

TANI ve İLAÇ DUYARLILIK TESTLERİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN DEĞERİ

Y. Doç. Dr. Nuran Esen

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

Tüberküloz insanlık tarihi kadar eskilere dayanan bir enfeksiyon hastalığı olmasına rağmen günümüzde hala önemini korumaktadır. Geleneksel yöntemler-le laboratuvar tanısı zaman alıcı ve zahmetli olan mikobakteriyel enfeksiyonların erken tanı ve tedavilerinde güvenilir sonuçlar veren hızlı testlere gereksinim duyulmaktadır. Son yıllarda kullanımı giderek artan moleküler yöntemler mikobakterilerin klinik örnekten tanısında, tür düzeyinde tanımlanmasında, ilaç direncinin belirlenmesinde ve epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır. Nükleik asit tabanlı yöntemlerin klinik tanıda kullanılabilmesi için standardize edilmeleri gerekmekte, bir kısmı ise yüksek maliyet ve/veya deneyimli personel gerektirmeleri nedeniyle kullanımları kısıtlanmaktadır.

1. Klinik Örnekten *Mycobacterium tuberculosis* Tanısı:

Nükleik asit tabanlı (NAT) testler, diğer enfeksiyon etkenlerinde olduğu gibi mikobakterilerde de özgül nükleik asit dizisinin, saptanabilecek düzeye gelinceye

kadar çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Geleneksel yöntemlere göre daha hızlı tanı konulmasını sağlamakla birlikte bu testlerin klinik örnekte tüberküloz varlığının saptanmasında altın standart olan direkt bakı ve kültür kombinasyonu ile birlikte uygulanması önerilmektedir. Bir çok laboratuvar da kullanılmakta olan in-house PCR yönteminin duyarlılık ve özgüllükleri, ekstraksiyon ve amplifiye ürün saptanmasında kullanılan farklı yöntemler nedeniyle değişmektedir. Noordhoek ve arkadaşları yedi laboratuvar da aynı örneklerden aynı primerler kullanılarak PCR yöntemiyle *M. tuberculosis*'in araştırıldığı kör çalışmada, duyarlılık ve özgüllüklerin %2-90, yalancı pozitifliklerin ise %3-77 oranında değiştiğini saptamışlardır. Bu nedenlerle klinik örnekte *M. tuberculosis* tanısının konulmasında standardize edilmiş testlere gereksinim artmış ve iki test Amerika Birleşik Devletlerinde, FDA (Gıda ve İlaç Yönetimi) tarafından onaylanmıştır. Bu testler son bir yıl içinde tedavi almayan, direkt bakısı pozitif olguların solunum yolu örneklerinde ve *M. tuberculosis* ayrımının yapılabildiği merkezlerde, kültür ile birlikte yapılması koşulu

ile FDA onayı almıştır. Bunlardan PCR tabanlı Amplicor (Roche) testinde internal kontrol bulunmakta, AmpErase (UNG) yalancı pozitifliği (10^3 amplikon/reaksiyon) engellemektedir. Amplikor testinde saptanabilecek minimal mikobakteri konsantrasyonunun belirlenebilmesi amacıyla Yajko ve arkadaşları klinik balgam örneklerinin seri dilüsyonlarını hazırlayarak kantitatif kültür yapmış ve bu dilüsyonlardan Amplicor testi çalışmışlardır. Amplikor testinin, dekontamine edilmiş 50µL balgam örneğinde 42 CFU (koloni oluşturan ünite) veya üzerinde *M. tuberculosis*'i saptayabildiğini belirlemişlerdir.

FDA onaylı diğer test ise izotermal bir amplifikasyon yöntemi olan MTD, (Mycobacterium tuberculosis direct test) (Gen-Probe) TMA (transcription mediated amplification- transkripsiyon aracılı çoğaltma) tabanlı bir testtir. Bu yöntemde çoğaltılan hedef nükleik asit ribozomal RNA (rRNA) olduğundan canlı *M. tuberculosis* basillerini saptamaktadır. Bu test, Amplicor'dan farklı olarak sadece direkt bakı pozitif örneklerde değil, negatif örneklerde de FDA onayı almıştır. Direkt bakıda ARB pozitifliği ile birlikte bu testlerin pozitif bulunması tüberküloz tanısını desteklerken, her iki test sonucunun negatif olması ise kültürde *M. tuberculosis* üreme olasılığından uzaklaşmaktadır. Direkt bakı ve moleküler yöntemlerin birbirlerini desteklemesi klinik tanıyı kolaylaştırırken, sonuçların farklı olması durumunda, klinik tabloya göre tanı konulmakta veya testin tekrarlanması gerekmektedir. MMWR'da, (Mortality and morbidity weekly report) 2000

yılında tüberkülozda nükleik asit amplifikasyon testlerinin kullanımıyla ilgili güncelleştirilen yazıda direkt bakıda ARB ve moleküler yöntemler için bir algoritma geliştirilmiştir.

- 1- Direkt bakıda ARB ve kültür için üç ayrı gün balgam örneği alınır.
- 2- A. Hastanın ilk örneğinde ARB ve NAT testleri pozitif ise hastanın tüberküloz olduğu düşünülerek başka örnekte NAT testi yapılmaz.
- 2- B. ARB pozitif, NAT negatif ise inhibitörlerin varlığının araştırılması için amplikor testi uygulanır.

a. İnhibitörler belirlenmezse, örnek sayısı üçü aşmayacak şekilde diğer örneklerde NAT test tekrarlanır. Tekrar ARB pozitif, NAT negatif bulunursa tüberküloz dışı mikobakteriler düşünülür.

b. İnhibitör belirlenirse bu örnekte NAT testlerin tanısal değeri yoktur. Örnek sayısı üçü aşmayacak şekilde diğer örneklerde NAT test çalışılır.

c. ARB negatif, MTD pozitif ise örnek sayısı üçü aşmayacak şekilde diğer örnekler MTD ile test edilir. Tekrarlar da pozitif ise hastada tüberküloz düşünülür

d. ARB ve MTD negatif ise bir örnek daha MTD ile test edilir. Eğer tüm örneklerde ARB ve MTD negatif bulunmuşsa enfeksiyonu olmadığı düşünülebilir fakat klinik değerlendirme çok önemlidir. NAT testlerin negatif olması aktif tüberküloz olasılığını ekarte ettirmez.

3. İlk NAT test ve tekrarları uyumsuz ise klinik olarak tanı önemlidir.

4. Son olarak hastanın tedaviye yanıtı ve

kültür sonuçları tüberküloz tanısının desteklenmesinde veya reddedilmesinde kullanılır.

Bu testlerin solunum yolu dışındaki örneklerde FDA onaylarının olmamasına ve standardize edilmemelerine rağmen çeşitli klinik örneklerle yapılmış olan araştırmalar bulunmaktadır. Her iki testin de solunum yolu dışındaki örneklerde performansları değişmekte, bazı çalışmalarda solunum yolu örneklerinde olduğu kadar yüksek, bazılarında ise düşük bulunmuştur. Gamboa ve arkadaşlarının çalışmasında, kan ve kemik iliği aspiratlarının, protein ve enzimleri denatüre eden ve örnekte bulunan pek çok inhibitör maddeyi elimine eden SDS-NaOH ile işlemlenmesinin optimal koşullarda *M. tuberculosis*'in sıvı ve katı besiyerlerinde üremesini engellemediği vurgulanmıştır. Lang ve arkadaşlarının MTD ile beyin omurilik sıvısında (BOS) *M. tuberculosis*'in araştırıldığı çalışmalarında, üretici firmanın önerilerinden farklı olarak örneklerin sodyum dodesil sülfat (SDS)-NaOH ile denatüre edilmesi, 10 kat fazla (50 µL yerine 500 µL) konulması ve cut-off değerinin 30.000 RLU'dan 11.000 RLU'ya indirilmesi ile duyarlılık %83, özgüllük %100, PPD %100, NPD %94 bulunmuştur. Baran ve arkadaşları benzer olarak Amplikor ile BOS'da *M. tuberculosis*'in araştırıldığı çalışmalarında örneğin 10 kat fazla (100 µL yerine 1000 µL) konulmasının duyarlılığı arttırdığını bildirmişlerdir.

FDA onayı olan bu testler dışında SDA (strand displacement amplification - zincir ayırma çoğaltması) (BDProbeTec) ve LCR (Ligase Chain Reaction - Ligaz zincir

reaksiyonu) (Abbott LCx *M.tuberculosis*) yöntemlerinin ticari formları bulunmaktadır. İzotermal olan SDA yönteminde, restriksiyon enzimi ile kesilen kalıp DNA, *Escherichia coli* DNA polimeraz I'in kesim noktasından başlayarak bir zinciri ayırıp diğeri üzerinde DNA sentezi yapabilme özelliğine dayanmaktadır. Amplikor ve TMA'dan farklı olarak bu testte hem IS6110, hem de 16SrRNA çoğaltıldığından *M.tuberculosis* kompleks varlığını ve bazı mikobakteri türlerini belirleyebilmektedir.

LCR ise enfeksiyon ajanının ortaya konmasında ısıya dayanıklı DNA ligazın kullanıldığı prob hibridizasyon bazlı nükleik asit çoğaltma yöntemidir.

2. Mikobakterilerin Tür Düzeyinde Tanımlanması

DNA Dizi Analizi, mutasyonların saptanmasında altın standart olmasına rağmen manuel uygulanmalarında teknik zorluklar bulunmaktadır. Otomatik DNA sekanslama ise pahalı ve yatırım gerektirmektedir. Amplifikasyon işleminden sonra PCR ürünlerinin saflaştırılması, florokrom işaretli didioksi sekanslama reaksiyonu, sekanslama ürünlerine elektroforez uygulanması ve analiz gibi basamakları gerektirir. Radyoaktif madde, kemilüminesans veya florometrik maddelerle işaretleme yapılmaktadır. DNA dizi analiziyle, mikobakterilerde tür tayini ve ilaç direncini belirleyen mutasyonlar gibi filogenetik bilgilere ulaşılabilmektedir. Oldukça hızlı ve kesin sonuçlar vermesine rağmen pahalı ve zahmetli bir yöntem olduğundan rutin olarak değil araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Tüm mikobakteri türlerinin sahip olduğu 65 kDa'luk

ısı şok proteinin (*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.

Mikobakterilerin kısa sürede tiplendirilmesi amacıyla geliştirilen PRA [PCR-REA (Restriksiyon enzim analizi)] yöntemi, *hsp65*'i kodlayan genin, restriksiyon enzimleriyle kesilmesi temeline dayanmaktadır. Elde edilen paternlerin tür saptama cetveline göre analiz edildiği bu yöntem hibridizasyon basamakları ve radyoaktivite içermemektedir.

Nükleik asit hibridizasyon yönteminde, hedef DNA dizisi komplementeri olan işaretli prob ile hibridlenmekte ve tanı konmaktadır. Özgüllükleri yüksek fakat duyarlılıkları düşük olan bu yöntemde 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. *M.tuberculosis* kompleksi, *M.avium* kompleksi, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M.kansasii* ve *M.gordoniae*'den oluşan sınırlı sayıda tür için mevcut olan DNA problemleri, klinik laboratuvarlarda sıklıkla izole edilen bu

türlerin tanımlanmasında biyokimyasal testlere gereksinimi ortadan kaldırmaktadır. Bu DNA problemlerinin en büyük dezavantajı; her seferinde sadece bir mikobakteri türünün test edilmesi nedeniyle maliyetinin artmasıdır. Son yıllarda ters hibridizasyon yöntemi olan LiPA (Line probe Assay) ile mikobakterilerin identifikasyonu yapılabilmektedir. PCR ile çoğaltıldıktan sonra hedef DNA dizisi komplementeri olan membran üzerinde yerleştirilmiş olan işaretli problemlerle hibridizasyona sokularak tek çalışma ile; *Mycobacterium* sp, *M. tuberculosis* kompleks, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordoniae*, *M. avium* kompleks, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* ve *M. chelonae - abscessus* kompleks olarak tanımlanabilmektedir.

3. Mikobakterilerde 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. Rifampisine dirençli mutasyonlar; genellikle, *rpoB*'nin 81 bazçiftlik gen bölgesinde nokta mutasyon delesyon ve insersiyonların olduğu gözlenmiş ve bu bölge RRDR (rifampin resistance determining region - rifampisin direncini belirleyen bölge) olarak adlandırılmıştır. Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilk basamak ilaçlardan olması,

moleküler yöntemlerle saptanabilirliği nedeniyle araştırmalar ve klinik kullanımda diğer antitüberküloz ilaçlardan çok rifampisin direncinin belirlenmesine çalışılmaktadır. Ayrıca rifampisine dirençli izolatların %90'dan fazlasında izoniazid direnci de birlikte bulunduğundan MDRTB (multi-drug resistant tuberculosis) için bir gösterge olduğu düşünülmektedir. Drobniowski ve arkadaşları ARB pozitif örneklerin referans merkeze gönderilerek moleküler yöntemlerle *M.tuberculosis* varlığının araştırılması ve ardından rifampisin direncinin belirlenmesinin hasta maliyetini düşürdüğünü, MDRTB tanısının erken dönemde konulmasının HIV pozitif olgularda bile yaşam süresini uzattığını bildirmişlerdir.

Direncin belirlenmesinde DNA dizi analizi, SSCP (single strand conformation polymorphism-tek zincir biçim çeşitliliği), heterodupleks analiz, ters hibridizasyon yöntemi (Inno-Lipa, Innogenetics), FRET (fluorescence resonance energy transfer - floresans rezonanslı enerji aktarımı) gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Kullanılmakta olan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

DNA dizi analizi ile ilaç direncine neden olan mutasyon, delesyon ve insersiyonların saptanması antimikobakteriyel ilaç duyarlılığında moleküler altın standart olarak kabul edilmektedir. Yüksek maliyet kullanımını kısıtlamaktadır.

SSCP yönteminde, PCR ile çoğaltılan ilaç direncinden sorumlu gen bölgesindeki çift zincirli DNA, ısı ile denatüre edildiğinde elde edilen tek zincirler içerdikleri nükleotid

dizisine göre kıvrılmalar nedeniyle özgül yapı oluşturur. Elektroforez sırasında zincirin özgül yapısı jel gözeneklerinden geçiş hızını etkilemesi nedeniyle, hastadan elde edilen izolatın ilaca duyarlı kontrol kökenden farklı sonuç vermesi o gende mutasyon olduğunu göstermektedir. Tek zincirli DNA'nın elektroforez jelinde görülebilmesi için genellikle radyoaktif bir madde ile işaretleme gereksinim, deneyim gerektirmesi ve uygulama zorlukları nedeniyle günlük kullanıma girememiştir.

Heterodupleks analizinde, ilaç direncine neden olan gen bölgesi, hem hastadan izole edilen basilden, hem de ilaca duyarlı olduğu bilinen bir kontrol suşundan PCR ile çoğaltıldıktan sonra bir tüpte karıştırılıp, önce 95°C'ye kadar ısıtılarak DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması, daha sonra oda sıcaklığına dek soğutularak zincirlerin yeniden eşleşerek birleşmesi sağlanır. Farklı bakteriden geldiği halde uygunluk gösteren tek zincirler de bir araya gelerek heterodupleksler oluşur. Eşleşme duyarlı bir suшта tam, dirençli suşlarda heterodupleksler arasında mutasyon noktasında birleşmenin olmaması nedeniyle çift sarmal yapı bozulur ve zincirdeki bükülmeler elektroforez sırasında molekülün mutasyon bulunmayan DNA'dan farklı hızda yürütmesine neden olur. Çift zincirlerin etidyum bromür ile boyanıp UV transluminatörde hemen gözlelenebilir olması rutinde kullanılmaya uygun olmasını sağlamıştır.

Ters Hibridizasyon Yönteminin rifampisin direncini saptamaya yönelik ticari formu bulunmaktadır. Nitrosellüloz membran üzerinde dirençten sorumlu gen bölgesine ait duyarlı ve mutant dizileri içeren probalar bulunmaktadır. PCR ile çoğaltıldıktan sonra

dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri bu problemler ile hibridizasyona sokulduğunda mutant dizilere bağlanırsa dirençli olarak yorumlanır.

FRET yönteminde, PCR sırasında çoğaltılmış DNA molekülüne bağlanan biri 3' diğeri 5' ucu floresans ile işaretli ve çok yakın yerleşimli iki DNA prob arasında enerji aktarımı ile başlangıçta en yüksek miktarda floresans izlenirken, tüplerin yavaş yavaş ısıtılması ile floresansın azaldığı erime noktaları saptanır. Probu bağlandığı bölgede mutasyon varlığı, gevşek bağlanmaya ve erime nokta ısısının düşmesine neden olmaktadır. Bu yöntem ilaç dirençlerini belirleyen mutasyonların belirlenmesinde, klinik örneklerdeki mikobakterilerin saptanmasında ve tür düzeyinde tanımlamalarda kullanılmaktadır.

4. Mikobakterilerde Epidemiyolojik Araştırmalar

Moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ile epidemiyolojik araştırmalar, özellikle salgınlarda kaynağın belirlenmesi, reenfeksiyon-reaktivasyon ayırımının yapılabilmesi, iatrojenik enfeksiyonların ve laboratuvar kontaminasyonlarının tanımlanması mümkün olabilmektedir. Önceleri IS6110 REA ve/veya PGRS (polimorfik GC rich sequence - polimorfik GC'den zengin bölge) yöntemleriyle yapılan araştırmalar, son yıllarda spoligotyping (spacer oligonucleotide typing) ve MIRU-VNTR (variable number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units - Mikobakterilerdeki tekrarlayan ünitelerin

değişken sayıda tekrarları) gibi yöntemlerin geliştirilmesi ile hız kazanmıştır.

Kromozomal DNA'nın IS6110 tekrar bölgelerinden restriksiyon enzimleriyle kesilerek oluşan değişik uzunluktaki parçaların agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra DNA bantlarının membrana aktarılarak hibridizasyon yapılması esasına dayanan IS6110 REA yöntemi ile *M.tuberculosis* kompleks izolatlarının kromozomlarında bulunan IS6110'un tekrarlanma özelliği, uluslararası standardize edilmiş DNA parmak izi protokolünün geliştirilmesini sağlayarak klinik izolatların genotiplerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılmakla beraber bu yöntemin ayırıcı gücü IS6110 kopya sayısının beşin üzerinde olduğu izolatlarda yüksek iken, beş ve altındaki *M.tuberculosis* kompleks izolatlarının tanımlanmasında yetersiz kalmakta bu nedenle epidemiyolojik çalışmalarda başka bir yöntemle birlikte çalışılmasını gerektirmektedir.

Üzerinde PGRS (polimorfik GC'den zengin bölge - polimorfik GC rich sequence) taşıyan rekombinant bir plazmit olan pTBN12, *E.coli* DH5α'dan izole edilip çeşitli enzimler ile kesildikten sonra saflaştırılıp prob olarak kullanılmaktadır. Bu prob her genom üzerinde yaklaşık 30 kez tekrarlayan PGRS ile hibridizasyona girmekte ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır.

PCR bazlı spoligotyping yönteminde direkt tekrarlayan kromozomal bölgelerin amplifikasyonu hedeflenmekte ve *M.tuberculosis* kompleks izolatlarının ayırımında kullanılmaktadır. PCR sonrası ortalama 36 baz çiftlik amplifiye ürünlerin 43

set oligonükleotit içeren membran ile hibridize edilmesi ile farklı epidemiyolojik kökenli izolatlarda bölgeler ve sayılarda değişiklik görülmektedir. Geleneksel yöntemlerle zor olan *M. tuberculosis*, *M. bovis* ayrımı spoligotyping ile yapılabilmektedir. Bu yöntem klinik örneklerden soyutlanan *M. tuberculosis* izolatlardan başka parafin bloklarda ve arkeolojik örneklerde de denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. En az 20 kez tekrar kullanılabilen membranlarda 43 örnek birlikte çalışlabilmektedir. Değerlendirilmesi ve uygulaması kolay nispeten ekonomik bir yöntemdir.

Son yıllarda geliştirilen PCR bazlı moleküler yöntemolan MIRU-VNTR'de 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. Hızlı sonuç vermesi, fazla miktarda DNA gerektirmemesi, canlı olmayan örneklerde uygulanabilmesi bu yöntemin avantajlarındandır. Bu yöntem, IS6110 REA'ndan daha hızlı olmasına rağmen uygulanması spoligotyping kadar basit değildir

IS6110 tekrarlarından bağımsız olan PGRS, spoligotyping ve MIRU-VNTR yöntemlerinin IS6110 tekrar sayısının beş ve altında olduğu izolatlarda ayırıcı gücü IS6110 REA'den yüksektir. MIRU-VNTR yönteminin uygulanmasıyla IS6110 kopya sayısının düşük olduğu *M. tuberculosis* kompleks izolatlarında olduğu gibi sayının yüksek olduğu izolatlarda da grup çeşitliliği artmaktadır. Yapılan çalışmalarda izolatlar arasındaki farklılığın belirlenmesinde tek yöntem kullanımı değil, yöntemlerin kombinasyonu önerilmektedir. Cowan ve arkadaşlarının çalışmasında tüm örnekler IS6110 REA, spoligotyping ve MIRU uygulanmış; tek başına IS6110 58, spoligotyping 59, MIRU ise 80 ayrı pattern gösterirken, üç yöntemin birlikte kullanılması ile bu değer 112'ye ulaşmıştır.

DNA Chip teknolojisi, DNA molekülündeki farklı nükleik asitlerin katı faz üzerinde belirli bir düzende yerleştirilmiş bulunan oligonükleotitlere bağlanması ile sinyal oluşumu esasına dayanmaktadır. Maliyeti düşük, kullanımı basit, değerlendirmesi kolay ve gelecek vadeden bu yöntem önceleri sadece gen ekspresyonu ve genomik içeriğin incelenmesinde kullanılırken, son yıllarda *M.tuberculosis*'de IS6110 kopya sayısının ve rifampisin direncinin belirlenmesinde de kullanılmaya başlanmıştır.

KAYNAKLAR:

1. 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.
2. Baran Jr J, Riederer KM, Khatib R. Limits of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in spiked cerebrospinal fluid using the polymerase chain reaction in tuberculosis meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **2000**;1:47-50.
3. Barlow RE, Gascoyne-Binzi DM, Gillespie SH. Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high-and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* **2001**;39(7):2453-7
4. 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.
5. Dale JW, Al-Ghusein H, Al-Hashmi S et al. Evolutionary relationship among strains of *Mycobacterium tuberculosis* with few copies of IS6110. *J Bacteriol*. **2003**;185: 2555-62.
6. Drobniewski FA, Watterson SA, Wilson SM, Harris GS. A clinical, microbiological and economic analysis of a national service for the rapid molecular diagnosis of tuberculosis and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol*. **2000**; 49: 271-8
7. Durmaz R: *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının genotiplendirilmesi: IS6110 ve pTBN12-fingerprinting, Durmaz R (ed): *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*; Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. **2001**:181-190.
8. 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.
9. Fluit C, Visser MR, Schmitz J, Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* **2001**;14:836-871.
10. Gamboa F, Manterola JM, Lonca J et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of RNA and DNA pretreated blood and bone marrow aspirates by a simple lysis method. *J Clin Microbiol* **1997**;35:2124-8.
11. 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.
12. 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.
13. Kocagöz T. *Mycobacterium tuberculosis* için uygulanan fenotipik ve genotipik direnç testleri. 4. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu Kitabı. **2002**;115-24.
14. Lang AM, Feris-Iglesias J, Pena C et al. Clinical evaluation of the Gen-Probe amplified direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* **2000**;36:2191-4.
15. 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**;21:794-802.
16. 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.
 17. Noordhoek GT, 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.
 18. Notice to readers: Update: Nucleic Acid Amplification Tests For Tuberculosis. MMWR Weekly. **2000**; 49:593-4
 19. 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.
 20. Ramaswamy S, Musser JM: Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update, Tuber Lung Dis **1998**;79:3-29.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Woods G. Molecular methods in the detection and identification of mycobacterial infections. Arch Pathol Lab Med **1999**;123:1002-1005.
 24. Yajko DM, Wagner C, Tevere VJ, Kocagoz T et al. Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the Amplicor PCR assay. J Clin Microbiol **1995**;33:1944.