

# *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile genotiplendirilmesi

Genotyping mycobacterium tuberculosis strains with polymerase chain reaction (PCR)

Zeynep Ceren Karahan<sup>1\*</sup>, Alper Tekeli<sup>2</sup>, Figen Atalay<sup>3\*</sup>, Nejat Akar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>3</sup>Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Bölümü, Ankara

\*Dr. Z. Ceren Karahan şu anda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında, \*Dr. Figen Atalay Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalında görev yapmaktadır.

**Amaç:** Tüberküloz, günümüzde giderek artan bir toplum sağlığı sorunu haline gelmiştir. Enfeksiyon dinamiklerini incelemek ve uygun tedavi ve enfeksiyon kontrol stratejileri belirleyebilmek için etkenin moleküler tiplendirilmesi önemlidir. *Mycobacterium tuberculosis* genotiplenmesinde altın standart IS6110 RFLP analizi olmakla birlikte, yöntemle ilgili zorluklar nedeniyle son yıllarda Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PZR) dayalı yöntemler de kullanılmaktadır. Bu çalışmada, akciğer tüberkülozlu 39 farklı hastadan izole edilen *M. tuberculosis* izolatının, PZR yöntemi ile genotiplendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilen suşların hücre duvarları cam boncuklarla parçalanarak DNA elde edilmiştir. PZR ile genotiplendirme için, IS6110 inseriyon dizisinin iki ucuna yönelik hazırlanan IS-1 (5'CAA GAA CCT TTC CTA CCC CA 3') ve IS-2 (5'GGC TGA GGT CTC AGA TCA G 3') primerleri kullanılmıştır. Elde edilen bant paternleri bilgisayar ortamına aktarılarak, suşlar arası genetik yakınlık, Syngene Gene Directory 1.02.0 (Syngene, Cambridge, İngiltere) programında UPGMA metodu ile Dice katsayısı kullanılarak belirlenmiştir.

**Bulgular ve Sonuç:** Çalışma sonucunda izolatların hepsinin genotipik olarak birbirinden farklı olduğu tespit edilmiş, yöntem kolay uygulanabilir, hızlı, ucuz ve tekrarlanabilir bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), genotiplendirme

**Aim:** Tuberculosis is an increasing public health problem world wide. In order to evaluate the infection dynamics and to develop appropriate therapeutic and infection control strategies, molecular typing of the infectious agent is important. The gold standard of genotyping *Mycobacterium tuberculosis* isolates is IS6110 RFLP analyses. As this method is technically hard to perform, methods relying on Polymerase Chain Reaction (PCR) typing have been increasingly used. In this study we aimed to genotype 39 *M. tuberculosis* isolates obtained from different pulmonary tuberculosis patients by PCR.

**Materials and Methods:** The cell walls of the isolates grown on Löwenstein-Jensen medium were destructed by glass-beads in order to obtain genomic DNA. PCR genotyping was performed by using the primers IS-1 (5'CAA GAA CCT TTC CTA CCC CA 3') and IS-2 (5'GGC TGA GGT CTC AGA TCA G 3'), designed to cover the two sides of IS6110 insertion sequence. The band patterns were transferred to computer and genetic relatedness of the strains were analyzed by using the Syngene Gene Directory 1.02.0 (Syngene, Cambridge, England) program with UPGMA method by using the Dice coefficient.

**Results and Conclusion:** All the isolates were found to be genetically unrelated, and the method easy to perform, rapid, cheap and reproducible.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, polymerase chain reaction (PCR), genotyping

Geliş tarihi: 31.08.2006 • Kabul tarihi: 19.10.2006

Yazışma adresi

Dr. Z. Ceren Karahan  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Binası 3. kat, 06100-Sıhhiye, Ankara  
Tel. : (312) 310 30 10 /264  
Faks : (312) 310 63 70  
E-posta adresi : ckarahan@medicine.ankara.edu.tr

**M**ycobacterium tuberculosis kromozomal DNA'sının analizi, hızlı tanı koymaya yönelik moleküler testlerinin geliştirilmesini sağlamış ve moleküler genotiplendirme analizlerini kullanıma sokmuştur. Tüberküloz sürveyansının en önemli unsuru epidemiyolojik çalışmalardır. Moleküler tiplendirme yöntemlerinin kullanılması ile çok değerli epidemiyolojik bilgiler edinilebilir: Kültür sonuçlarının, gerçek etyolojik ajana mı yoksa laboratuvarında bir kontaminasyona mı bağlı olduğunu belirlemede, yeni bulaşı reaktivasyondan ve ekzojen bir enfeksiyonu alevlenmeden ayırmada ve tedavi esnasında direnç gelişimini izlemede

genotipleme yöntemlerine başvurulur (1-3). Epidemiyolojik veriler bir tüberküloz salgınına işaret ettiğinde, genotipleme yöntemleri, gerçek bir salgın mı olduğunu yoksa rastlantısal olarak çok sayıda vakanın mı bir araya geldiğini ortaya koyar. Bu sonuçlara göre toplum sağlığı parametreleri değerlendirilerek infeksiyonun yayılması engellenebilir. Hastalık kaynağının ve bulaş zamanının belirlenmesinde de genotipleme yöntemleri kullanılmaktadır (1).

Tüberküloz kontrol programlarında, tüberküloz bulaşının dinamiklerini incelemek için genotipleme yöntemleri kullanılmaktadır. Özellikle, tüberküloz açısından yüksek riskli grupların belirlenmesi, temas vakalarının araştırılması ve etkili tüberküloz kontrol programlarının geliştirilmesinde genotipleme yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Geleneksel görüş, mikobakterilerin eşit virülansa sahip olduğu şeklinde olsa da, topluma dayalı yapılan genotipleme çalışmaları, az sayıdaki suşun toplumdaki vakaların çoğundan sorumlu olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalar, farklı *M. tuberculosis* suşlarının konak ile değişik ilişkiler kurduğunu ve bulaş potansiyellerinin birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir (1,4).

*M. tuberculosis* genotiplendirmesinde kullanılan standart metod, farklı suşların kromozomlarında 1-25 kopya olarak bulunan ve başka mikroorganizmalarda bulunmayan, *IS6110* insersiyon dizilerinin dağılımının, "kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi" (restriction fragment length polymorphism [RFLP]) yöntemi ile ortaya konmasıdır (5, 6). Bu amaçla, kromozomal DNA *PvuII* enzimi ile kesilir, kesilen parçalar agaroz jel elektroforezi ile ayrılır, daha sonra işaretlenmiş *IS6110* fragmanı ile Southern blot (SB) yöntemi kullanılarak hibridize edilir (1, 7). Bugün için bu yöntem *M. tuberculosis* tiplendirmesinde altın standart olarak kabul edilmekteyse de, SB analizi ile ilgili uygulama zorlukları, bu yöntemin referans laboratuvarlarında bile yaygın olarak kullanılmasına engel olmuştur (1, 4). Buna karşılık, polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) dayalı tiplendirme yöntemleri, ucuz, kolay ve hızlıdır. Yapılan çalışmalar, PZR'ye dayalı tiplendirme yöntemlerinin duyarlılığının SB yöntemi ile benzer olduğunu göstermektedir (4, 7).

Bu çalışmada, Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Hastanesi'nde akciğer tüberkülozu tanısı ile izlenen 39 hastanın balgamından izole edilen *M. tuberculosis* suşlarının PZR ile genotiplendirmesi ve yöntemin uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

**Hastalar ve *M. tuberculosis* suşları:** Çalışmaya, Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Hastanesinde Mayıs 2003-Eylül 2003 tarihleri arasında akciğer tüberkülozu tanısı ile yatırılarak takip edilen 39 hastanın balgam kültüründen izole edilen 39 *M. tuberculosis* suşu

dahil edilmiştir. Hastaların yaş ortalaması 39.6 olup, yedisi kadın, 42'si erkektir (K/E= 0,16). Hastaların hiçbirinin birbiri ile akrabalığı olmadığı gibi, aynı çevrede de yaşamamaktadır. Hastalardan elde edilen izolatların hepsi en az bir anti-tüberküloz ajana karşı dirençli bulunmuştur. Direnç tayini, 20-40 mg/L Rifampin, 0,2-1 mg/L İzonyazid, 2-4 mg/L Ethambutol ve 4-8 mg/L Streptomisin kritik konsantrasyonlarını içeren Löwenstein-Jensen vasatlarında indirekt proporsiyon metodu ile yapılmıştır. Antimikrobiyal içeren besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı, antimikrobiyal içermeyen besiyerinde üreyenlerin sayısının %1'inden azsa ilaca duyarlı, aksi halde dirençli olarak kabul edilmiştir. Çalışmaya alınan hastalar ve hastalardan izole edilen suşlarla ilgili genel bilgi Tablo 1'de görülmektedir.

**DNA Eldesi:** Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilen *M. tuberculosis* izolatlarından kromozomal DNA eldesi, cam boncuklarla hücre duvarlarının parçalanması ile literatürde belirtilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (8,9). Kısaca, besi yeri üzerinde üreyen koloniler steril öze ile alınarak, 500 µl steril distile su içerisinde süspanse edilmiştir. 80 C°de 10 dakika tutularak inaktive edildikten sonra 15000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmişlerdir. Elde edilen çökelti, 100 µl TE tamponu (1 M Tris HCl, 0,5 M EDTA, pH= 8.0) içerisinde yeniden süspanse edildikten sonra üzerine yaklaşık 33 µl 425-600µm boyunda yıkanmış cam boncuk (Sigma, Almanya) eklenmiş ve maksimum hızda 10 dakika vortekslenerek hücre çeperleri parçalanmıştır. 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne alınarak, PZR işlemine kadar -20 C°de saklanmıştır.

**PZR:** PZR reaksiyonu, *IS6110* insersiyon dizisinin iki ucuna yönelik hazırlanan IS-1 (5'CAA GAA CCT TTC CTA CCC CA3') ve IS-2 (5'GGC TGA GGT CTC AGA TCA G3') primerleri kullanılarak literatürde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (7). PZR karışımı, 20 µl toplam hacim içerisinde 1 U Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Lituanya), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP (Fermentas, Lituanya), her bir primerden 1 µM ve 3 µl DNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. PZR şartları; 95 C°de 3 dakika ilk denatürasyon, 35 siklus 95 C°de 1 dakika, 55 C°de 1 dakika ve 72 C°de 1 dakika ve son olarak, 72 C°de 5 dakikalık son uzama olacak şekilde uygulanmıştır. Elde edilen PZR ürünleri %10'luk poliakrilamid jele yüklenerek 150V'da 6 saat yürütülmüş ve gümüş boyama yöntemi ile bantlar görünür hale getirilmiştir.

**Analiz:** Elde edilen bant patern fotoğrafları bilgisayar ortamına aktarılmış ve suşlar arası genetik yakınlık, Syngene Gene Directory 1.02.0 (Syngene, Cambridge, İngiltere) programında UPGMA metodu ile Dice katsayısı kullanılarak belirlenmiştir.

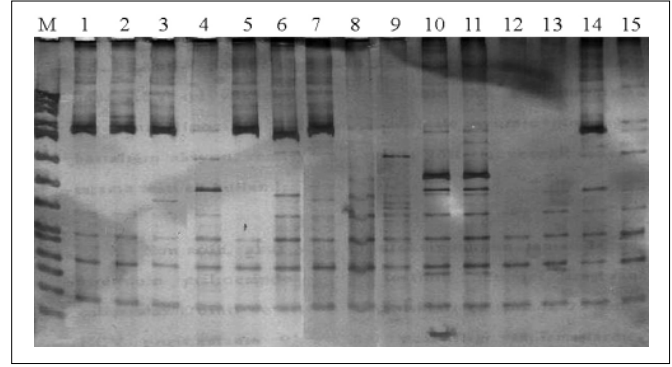
**Tablo 1.** Çalışmaya dahil edilen hastalar ve bu hastalardan izole edilen suşların direnç durumu

No	Yaş	Cins	Memleket	Direnç
1	35	E	Erzurum	R
2	41	E	Kastamonu	R
3	37	E	Urfa	RIE
4	25	E	Bingöl	RISE
5	40	E	Trabzon	RIS
6	38	K	Muş	RIS
7	34	E	Adana	R
8	45	E	Bursa	RI
9	41	E	Urfa	RIS
10	23	E	Adana	RS
11	21	E	Tokat	RI
12	19	K	Gaziantep	RIS
13	52	E	Çankırı	RI
14	73	K	Siirt	RIS
15	39	E	Mersin	RIS
16	70	K	Bartın	R
17	56	E	Konya	RISE
18	37	E	Gaziantep	RIE
19	40	E	Urfa	RISE
20	48	E	Kars	RISE
21	37	E	Gaziantep	R
22	23	E	Adana	RIS
23	26	K	Samsun	RIS
24	26	E	İstanbul	RIS
25	48	E	Antalya	R
26	60	E	İstanbul	R
27	24	E	Bursa	RIS
28	44	E	Çorum	RISE
29	28	E	Antalya	RIS
30	43	E	Adana	R
31	43	E	Ordu	RISE
32	40	E	Mardin	RI
33	50	E	Ankara	RI
34	40	E	Diyarbakır	RIE
35	37	K	Konya	RIS
36	40	E	Ordu	R
37	24	E	Ordu	R
38	50	E	Konya	RIS
39	50	K	Malatya	RISE

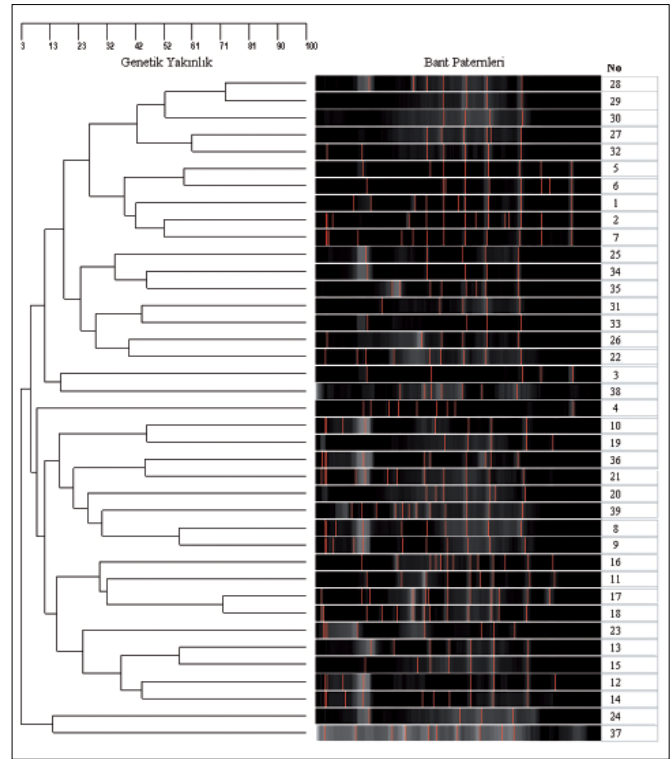
R: Rifampin, I: İzoniyazid, E: Ethambutol, S: Streptomisin

## Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 39 hastanın hiçbirinin birbiri ile ilişkisi olmadığı öğrenilmiştir. Hastalardan izole edilen *M. tuberculosis* suşlarının PZR ile genotiplendirmesi sonucunda, sayıları 4-13 arasında değişen, koyu boyanan bant gözlenmiştir. Elde edilen bantlar kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Şekil 1). Deneyin tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla her bir örnek iki kere çalışılmış ve her seferinde aynı bant paternleri elde edilmiştir.



**Şekil 1.** Elde edilen bant paternlerini gösteren jel görüntüsü. M ile belirtilen 1. sırada moleküler büyüklük belirteci ( $\phi$ x 174 DNA Hinfl kesim), 1-15. sıralarda hasta izolatlarına ait bant patern örnekleri görülmektedir.

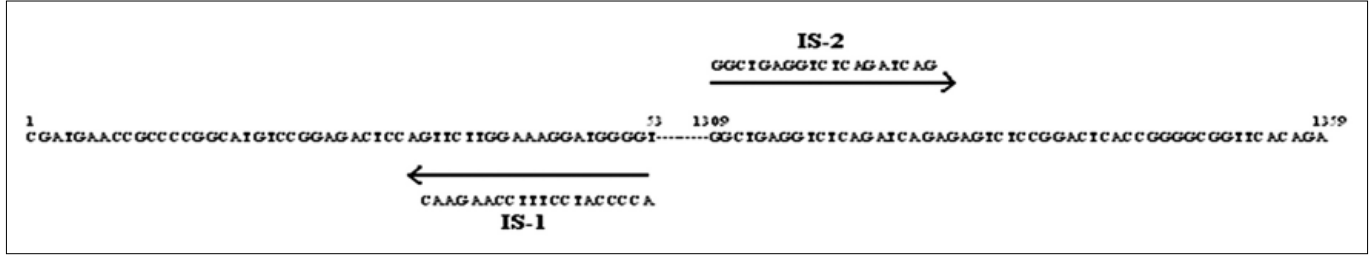


**Şekil 2.** Elde edilen bantların bilgisayar ortamında değerlendirilmesi sonucu elde edilen dendrogram görüntüsü. Sağ tarafta karşılık gelen bant görüntüleri ve hasta numaraları görülmektedir.

Bilgisayar programında değerlendirmede sadece koyu boyanan bantlar dikkate alınmıştır. Bantların değerlendirilmesi sonucunda, dendrogramda da görüldüğü üzere bütün suşların genetik olarak birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Suşlar arası genetik yakınlık %3 ile %71 arasında değişmektedir.

## Tartışma

*M. tuberculosis* kompleks (MTK) bakterileri içerisinde genetik homojenitenin yüksek olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar, IS elemanla-



Şekil 3. IS-1 ve IS-2 primerlerinin 1359bc'lik IS6110 dizisi üzerindeki görünümü. Oklar, dizi üzerinde primerlerin oturma yönünü göstermektedir.

rı ve kısa tekrarlayan DNA dizileri gibi MTB genomunda tekrarlayan DNA elemanlarının dağılımındaki farklılıklara bağlı polimorfizmlerin, suşların ayırımında kullanılabilirliğini ortaya koymuştur (2,10). *M. tuberculosis* kompleks içerisindeki DNA polimorfizmlerini tanımlamada kesilmiş fragmanların uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP), DNA hibridizasyonu, spoligotipleme, rasgele tekrarların sayı değişkenliği (variable number of tandem repeat, VNTR) tiplendirmesi, Mikobakteriyel dağıntık tekrarlayan birim (Mycobacterial interspersed repetitive units, MIRU) tiplendirmesi ve PZR gibi birçok farklı yöntem ve bu yöntemlerin kombinasyonları kullanılmaktadır. Bütün bu yöntemlerin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (1,4,11,12).

MTK suşlarında, genotiplemede kullanılacak dört adet IS tanımlanmıştır: IS6110, IS1081, IS1547 ve IS-benzeri eleman. Bunlar içerisinde; tüm suşlarda bulunması, mobilitesinin ve kopya sayısının fazla olması nedeniyle en sık kullanılanı IS6110 olmuştur. Diğerlerinin kopya sayısı daha az olup, ayırım güçleri de IS6110 ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür (11). IS6110 tiplendirmesi ile 0–25 arasında bant tespit edilmektedir. Elde edilen sonuçlar ileri derecede ayırıcı ve tekrarlanabilir olup, yöntem birbirleri ile yakın ilişkili ve ilişkisiz suşları birbirinden ayırabilme gücüne sahiptir (2). Yıllardır kullanılması nedeniyle bu yönteme dayalı veri bankaları oluşmuş durumdadır. Bugün için IS6110 RFLP tiplendirmesi altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, bugüne kadar çok az sayıda referans laboratuvarında, hatta az sayıda tüberküloz kontrol programında bu yöntem kullanılabilmiştir (1). Bunun en önemli nedeni, yönteminin karmaşıklığı, sonuçların alınması için uzun zaman geçmesinin gerekmesi ve maliyet yükseklidir. Ayrıca yöntem, bol miktarda canlı bakteri varlığına ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle, yeterli miktarda bakteri üretebilmek için değerlendirmeye kadar geçen süre uzamaktadır. Özellikle kopya sayısı 5'den az olan örneklerde güvenilir sonuç alınabilmesi için, ek bir yöntemin devreye sokulması gerekmektedir. Çok sayıda bantın değerlendirildiği durumlarda laboratuvarlar arası değerlendirmelerde farklılıklar olabilmektedir (2,10,12).

Alternatif olarak kullanılabilen PZR'ye dayalı yöntemler, daha az sayıda bakteri ile uygulanabilir, ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği de en az IS6110 RFLP tiplendirmesi kadar iyidir. Nispeten daha kolay ve ucuzdur. PZR'ye dayalı yöntemler içerisinde, ayırım güçlerinin nispeten daha yüksek olması nedeniyle en sık kullanılan yöntemler, spoligotipleme, VNTR tiplemesi ve MIRU tiplemesidir (2).

Çalışmamızda kullanılan PZR yöntemi, *M. tuberculosis* genomunda dağıntık halde bulunan IS6110 kopyaları arasında kalan bölgeleri çoğaltarak suşlar arasındaki farklılıkları ortaya koymaktadır. Kullanılan primerler, 3' uçları IS6110 elemanının dışına taşacak şekilde elemanın iki ucuna yönelik olarak geliştirilmiştir (Şekil 3).

Yöntem, katı veya sıvı besiyerinde üreyen bakterilerden direkt olarak DNA eldesini takiben, az miktarda DNA ile uygulanabilmekte, değerlendirilmesi kolay ve nispeten ucuz olup, hızlı sonuç vermektedir. Elde edilen sonuçların Southern blot hibridizasyon ile benzer duyarlılıkta olduğu belirtilmektedir (7). Yöntem, bizim çalışmamızda da literatürde belirtildiği şekilde tekrarlanabilir ve güvenilir bulunmuştur. Yöntemin en önemli dezavantajı, silik boyanan bantlar nedeniyle çok sayıda izolatuvar değerlendirilmesinde problem oluşması ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğinin düşük oluşudur (7,10). Bizim çalışmamızda da silik boyanan bantlar, özellikle bilgisayar ortamına aktarmada problem oluşturmuştur. Bant koyuluğunun değerlendirilmesi subjektif olduğundan, hangi bantların değerlendirmeye alınacağını belirlemek, özellikle silik boyanan bant sayısı fazla olan örneklerde sorun yaratmaktadır. Farklı bantların dahil edilmesinin sonuçları da etkileyebileceği dikkate alındığında, yöntemin farklı izolatlarda aynı şartlar altında değerlendirilmesinin uygun olacağı kanısındayız. Uygun programların yüklü olduğu bilgisayar veya görüntüleme ortamlarında bant yoğunluklarına göre seçim yapmak daha güvenilir sonuçlar alınmasına olanak verecektir. Bunun mümkün olmadığı hallerde ise, çalışma sonuçlarının aynı kişi tarafından değerlendirilmesi hata payını azaltabilir.

Türkiye'de *M. tuberculosis* izolatlarının genotiplemesine yönelik ilk çalışmayı, Durmaz ve ark. (13) yapmışlardır. Araştırmacılar, 320 hastadan izole edilen *M. tuberculosis* suşlarını standart IS6110 ve pTBN12 genotipleme yöntemleri ile

değerlendirmişler ve Türkiye’de birçok tüberküloz suşunun yaygın olarak bulunduğunu tespit etmişlerdir. 320 hastadan 155 farklı IS paterni, pTBN12 ile kombine edildiğinde ise, 317 izolatta 216 farklı patern tespit etmişlerdir. Bunların farklı coğrafik bölgelerde yaygın olarak bulunduğunu, kümelenen hastaların da çoğunun birbirleriyle ilişkisi olduğunu belirlemişlerdir (13). Bizim çalışmamızda ne izolatların antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları ile genotipleri arasında bir ilişki saptanmış, ne de hastaların yaşadıkları bölgelere göre bir kümelenme tespit edilmiştir. Çalışmamızda değerlendirilen suşlar arasında yakın ilişkili izolatların oluşturduğu kümelerin bulunmaması, bu hastaların ortak bir kaynaktan köken alan yeni bulaş sonucu ortaya çıkan vakalar olmadığını; aksine, daha önce geçirilmiş enfeksiyonun reaktivasyonu sonucu olduğunu düşündürmektedir.

Tüberkülozun etkin kontrolünün sağlanması için bulaş kaynaklarının ve yüksek riskli grupların ve risk faktörlerinin belirlenmesi önemlidir. Özellikle ülkemizde, tüberküloz insidansının yüksekliği nedeniyle etkin infeksi-

yon kontrol önlemlerinin geliştirilmesi şarttır. Enfeksiyon dinamiklerinin araştırılması ve etkin tüberküloz kontrol programlarının geliştirilmesinde genotipleme sonuçları önemlidir. Ancak, genotipleme yöntemlerinin kullanımının yaygınlaşabilmesi için, nispeten kolay, hızlı sonuç veren ve ucuz genotipleme yöntemlerinin kullanıma sokulması gerekmektedir. Kullandığımız PZR ile genotipleme yöntemi ile ülkemizde daha önce yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. PZR ile *M. tuberculosis* izolatlarının genotiplendirilmesi, kolay uygulanabilir, hızlı ve ucuz olması nedeniyle, özellikle sadece PZR olanakları bulunan merkezlerde güvenle uygulanabilir ve elde edilen bant paternleri kolaylıkla değerlendirilebilir. Yöntem, IS6110 tiplemesi kadar yüksek ayırım gücü ve duyarlılığa sahip olmasa da özellikle kısa sürede sonuç alınması nedeniyle, ilk değerlendirmede, hasta dinamiklerini incelemede ve uygun tedavi ve korunma stratejileri geliştirmede PZR ile genotipleme yönteminin uygulanabileceğini düşünmekteyiz.

#### Kaynaklar

1. Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. N Engl J Med 2003;349:1149-1156.
2. Nguyen LH, Gilbert GL, Marks GB. Molecular epidemiology of tuberculosis and recent developments in understanding the epidemiology of tuberculosis. Respirology 2004;9:313-319.
3. Seidler A, Nienhaus A, Diel R. The transmission of tuberculosis in the light of new molecular biological approaches. Occup Environ Med 2004;61:96-102.
4. Narayanan S. Molecular epidemiology of tuberculosis. Indian J Med Res 2004;120:233-247.
5. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD et al. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids Res 1990;18:188.
6. Van Soolingen D, Herman PW, de Haas PEW, Soll DR, van Embden JDA. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1991;29:2578-2586.
7. Ross BC, Dwyer B. Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993;31:329-334.
8. Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. J Clin Microbiol 1990;28:1913-1917.
9. Karahan ZC, Atalay F, Uzun M et al. Sequence analysis of *rpoB* mutations in Rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Turkey. Microb Drug Res 2004;10:325-330.
10. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol 1999;37:2607-2618.
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;35:907-914.
12. van Belkum A. High-throughput epidemiological typing in clinical microbiology. Clin Microbiol Infect 2003;9: 86-100.
13. Durmaz R, Gunal S, Yang Z et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Turkey. Clin Microbiol Infect 2003;9:873-877.