

# MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS'İN LABORATUVAR TANISI

Mehmet Sait TEKEREKOĞLU\*  
Rıza DURMAZ\*  
İ. Halil ÖZEROL\*

\* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı, MALATYA

## Yazışma adresi:

Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU  
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı, MALATYA

*Tüberküloz basilinin kısa sürede tanımlanması, ilaç direncinin saptanması ve infeksiyon kaynağının belirlenmesi etkin bir tedavi için çok önemlidir. Bu nedenle klasik laboratuvar tanı metodları yanında hızlı sonuç veren, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, kolay uygulanabilir yeni kültür yöntemleri ve moleküler biyoloji teknikleri geliştirilmiştir.*

**Anahtar kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis, laboratuvar tanısı*

## **The laboratory diagnosis of mycobacterium tuberculosis**

*Rapid laboratory detection of the tuberculosis bacilli, determination of its drug resistance and detection of the source of infection are very important for successful treatment. Therefore rapid, highly specific and sensitive, easily applicable novel culture methods and molecular diagnostic techniques have been developed in the recent years.*

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis, Laboratory diagnosis.*

Tarihin en eski hastalıklarından birisi olan tüberküloz bir enfeksiyon hastalığı yanında ayrıca sosyal bir hastalık olup; günümüzde tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen önemini korumaya devam etmektedir. 1980'li yıllardan sonra ortaya çıkan "Human Immunodeficiency Virus" (HIV) infeksiyonu ile birlikte tekrar gündeme gelmiştir. Bugün sadece az gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkeler değil, gelişmiş ülkelerin de en büyük sorunlarından birisini oluşturan tüberküloz, bütün dünyada yaygın olarak görülmekte ve önemini korumaktadır.<sup>1-3</sup> Yurdumuzda da tüberkülozlu hasta sayısı son yıllarda artmaya devam etmektedir.<sup>4</sup>

Klasik olarak tüberküloz tanısı; klinik belirtiler, radyolojik görünüm, tüberkülin deri testi, klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda tüberküloz basilinin görülmesi ve besiyerinde üretilmesiyle mümkün olmaktadır. Klasik tanı yöntemlerinden mikroskopinin duyarlılığının düşük olması, kültürün ise uzun zaman alması, araştırmacıları bu hastalığın erken tanısında kullanılabilecek yeni yöntemleri denemeye yöneltmiştir.<sup>5,8</sup>

Günümüzde tüberküloz tanısında kısa sürede sonuç alınmasına olanak sağlayan moleküler biyoloji teknikleri kullanılmaya başlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyon yöntemi (PZR) bu amaçla kullanılan metodların başında gelmektedir.<sup>1,9,10</sup> Ancak yaygın olarak denenmesine karşın PZR yönteminde arzulanan özgüllük ve duyarlılık henüz elde edilememiştir.<sup>10,11</sup>

## **MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS'İN GENEL ÖZELLİKLERİ**

0.2-0.5 µm eninde ve 1-4 µm boyunda olan Mycobacterium tuberculosis, tek tek küçük zincirler halinde bulunabildiği gibi küçük demetler halinde de bulunabilen hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüz basillerdir. Besiyerlerindeki kültürlerinden yapılan preparatlarda ise çoğu kez büyük kümeler oluştururlar.

Tüberküloz basilleri Gram boyası ile güç boyanırlar. Mikobakterilerin boyanmasında en çok kullanılan yöntem Ehrlich Ziehl-Neelsen

dir. Ayrıca Auramin ve Kinyoun boyama yöntemleri de kullanılmaktadır<sup>12</sup>.

Katı besiyerinde kuru, pürüklü, siğil görünümünde kirli beyaz, deve tüyü renginde, hafif sarımtırak, 1-2 mm çapında koloniler oluşturur. Sıvı besiyerinde granüler şekilde, yüzeye yakın üreme gösterir. Mycobacterium tuberculosisin ikiye bölünme süresi ortalama 15-20 saat arasında değişmektedir. Bunun nedeni DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzim defektine bağlı olduğu düşünülmektedir<sup>1</sup>. İkiye bölünme süresinin uzun olması nedeniyle koloni oluşturma süreleri 10-14 günü bulurken, bu süre iki aya kadar uzayabilmektedir.<sup>1-3</sup>

### LABORATUVAR TANISI

Yurdumuz için de çok önemli bir sağlık sorunu olan tüberkülozun tanısı ile ilgili problemler, bugün hala klinik örneklerin alınması ve laboratuvara ulaştırılması aşamasında, hazırlamada, kültür tekniklerinde ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testlerinde karşılaşılan problemler olmak üzere incelemek mümkündür:

**İdrar:** Erken saatlerde, en az 40 ml, ilk akım idrarı alınması ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırılması gerekir. Diğer zamanlarda alınan idrar örnekleri dilüe olacağından uygun değildir. Birbirini takibeden üç günde, üç ayrı idrar örneğinin incelenmesi mikobakteri izolasyonu şansını artırır.

**Balgam:** Sabah erken saatlerde, hastanın ağız temizliği yapıldıktan sonra ve yataktan kalkmadan önce, 50 ml'lik plastik kullanılıp atılabilen disposable santrifüj tüplerinin 1/5'ini geçmeyecek şekilde balgam örneği almak gereklidir.

Balgam kültürünü birbirini izleyen üç günde, üç kez tekrar etmek izolasyon şansını artırır. Ancak kliniği ısrarla tüberkülozu düşündüren hastalarda üç örneğin negatif çıkması durumunda beş veya altı örneğin incelenmesi önerilmektedir.

**Açlık mide suyu (AMS):** Hasta birşey yemeden ve yataktan kalkmadan, mümkünse bir gece hastanede yatırıldıktan sonra, sabah erken saatlerde AMS alınması gerekir.

Mikobakteriler mide suyunda canlılıklarını çok çabuk kaybettiğinden, klinik örneğin % 40'lık anhidroz disodyum fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ile nötralize edildikten sonra (her 35-50 ml örnek için 1.5 ml tampon sıvısı) mümkün olan en kısa sürede laboratuvara ulaştırılması ve laboratuvarında bekletilmeden işlenmesi gerekmektedir.

**Steril vücut sıvıları:** Plevra, perikard, beyin-omurilik sıvısı (BOS), sinoviyal ve asit sıvıları, kan, kemik iliği ve irin gibi örnekler aspirasyon teknikleri veya cerrahi yöntemler kullanılarak aseptik koşullarda alınmalıdır. Mümkün olduğu kadar çok miktarda (10-15 ml) steril kaplara veya enjektöre toplanmalı ve kanlı örnekler antikoagülan olarak, sodyum polyanetol sülfonat (SPS) eklenmelidir. BOS gibi numuneler az sayıda mikobakteri içereceğinden, inceleme için en az iki ml örnek gerekir.<sup>14</sup>

Tüberküloz hastalarının erken tanı ve tedavisi, tüberkülozdan toplumun korunmasında en önemli yoldur. Bu nedenle tüberküloz enfeksiyonuna yakalandığı düşünülen hastaların teşhislerini kanıtlayacak, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin rutin kullanıma girmesi oldukça önemlidir.

### I. MİKROSKOPİK İNCELEME

Tüberküloz basiline en hızlı ve en ekonomik tanı yöntemidir. Alınan materyalden doğrudan veya homojenizasyon işleminden sonra hazırlanan preparat, Ziehl-Neelsen gibi boyama tekniği ile boyanarak incelenir. Fazla duyarlı olmamasına rağmen çabuk sonuç alınması nedeniyle laboratuvarlarda sıklıkla uygulanmakta olup; tanı değeri oldukça yüksektir<sup>13,15</sup>. Pratikte fazla kullanılmamakla birlikte, floresan boyalarla boyanarak, UV mikroskopunda veya özel diyafram takılarak normal ışık mikroskopunda preparatlar incelenebilmektedir.<sup>16</sup> Mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için örneğin mililitresinde en az 10.000 kadar bakteri bulunması gerekmektedir<sup>17</sup>.

## II. KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

Altın standart olarak önemini halen koruyan kültürün duyarlılığı direkt mikroskopik incelemeye göre daha fazladır. Çoğunlukla Lewenstein-Jensen ve Middlebrook besiyerleri kullanılmaktadır. Hızlı sonuç veren bazı sistemlere karşın geç sonuç vermesine rağmen kültür, bakterilerin canlılığını doğrudan göstermesi, ayrıca çoğaltılan süşun daha sonraki inceleme ve araştırmalar için muhafaza edilebilmesini sağlaması açısından çok önemlidir. Tüberküloz tanısında mutlaka kültür yapılarak bakteri üretilmeye çalışılmalıdır. Kültür negatif denilebilmesi için en az 6 hafta beklenmesi gereklidir. Son yıllarda hızlı sonuç veren kültür sistemleri geliştirilmiştir.

**Radyometrik yöntem (Bactec):** Kültür şişeleri içerisinde karbon kaynağı olarak <sup>14</sup>C içeren palmitik asit bulunur. Mikobakteriler üreme esnasında palmitik asiti kullanarak radyoaktif CO<sub>2</sub> oluştururlar. Üretilen radyoaktif gazın miktarı ölçülerek bakteri üremesi daha kısa sürede belirlenmektedir. Bu yöntemle klinik örneklerde M. tuberculosis'in gösterilmesi ortalama bir haftadır. Pahalı olması ve radyoaktif madde gerektirmesi dezavantajdır. Avantajı hızlı, kolay üretme ve tiplendirme sağlamasıdır. Bu yöntemle kısa sürede antibakteriyel duyarlılık incelemesi de yapılabilmektedir.<sup>15</sup>

**Floresan yöntemi:** Mikobakteri üremesi, ortamdaki oksijenin kullanılmasına bağlı olarak floresans veren bir madde içeren tüpte (Mycobacteria growth indicator tube, MGIT) kültür yapılarak gösterilir. MGIT'te dipteki silikona gömülü floresan bir madde bulunur. Besiyerinde oksijen bulunması floresansı engeller. Ancak bakteri üremeye başladığında oksijen tüketimine bağlı olarak floresans ortaya çıkar. Üremeye bağlı floresans 365 nm dalga boyunda ultraviyole ışığı (Wood lambası) ile görülür. Bu sistemde üreme on günde saptanabilmektedir. Bu yöntemle antitüberküloz ilaçlara duyarlılık da hızlı olarak belirlenebilmektedir.<sup>17</sup>

### Haberci mikobakteriyofaj:

Mikobakteriyofaj, mikobakterileri infekte edebilen ve bakteri içerisinde kolayca tesbit edilebilen bir ürün oluşturan virüstür. Lusiferaz enzim geninin bu fajlara klonlanması ile

haberci fajlar elde edilmiştir. Lusiferaz enzimi, ATP varlığında lusiferinin oksitlenmesini katalize eder ve bu sırada ışık oluşmasına yol açar. Klinik örneklerde haberci mikobakteriyofaj ile infekte edilen basiller lusiferin eklendiğinde ışık oluşturarak karanlık alanda kolayca görünürler. Klinik örnekte 500-5000 basil olması tanı için yeterli olmaktadır. Bu yöntem dört saat gibi kısa bir sürede tamamlanabildiğinden mikobakterilerde ilaç direncinin çabuk belirlenmesinde oldukça önemli olmaktadır.<sup>15,17</sup>

## III. SEROLOJİK YÖNTEMLER

Serolojik yöntemlerin özgüllükleri oldukça düşüktür. Ortamda bulunan M. tuberculosis dışı mikobakterilerin antijenleri ile çapraz tepkimeye yol açmaktadırlar. Bu nedenle sadece M. tuberculosis'te bulunan antijenler saflaştırılmış ve özgül monoklonal antikorlar elde edilmiştir. Teknolojik gelişmeler sonucunda, serolojik yöntemler tüberküloz tanısında yeniden önem kazanmaya başlamıştır. En sık kullanılan yöntem ELISA'dır. Antijenler birçok epitop taşıdıkları için çapraz tepkimelere neden olabilmekte ve özgüllüğü azaltmaktadır. Bu olumsuzlukları ortadan kaldıracı amacıyla katı fazda antikor rekabet testi (solid-phase antibody competition test, SACT) isimli bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde plastik bir yüzey tüm mikobakteri antijenleri ile kaplanıp, üzerine konan serumun, daha sonra eklenecek bir epitopa özgül monoklonal antikorun bağlanmasını ne ölçüde engellediği araştırılır. Sadece bir epitopa karşı yanıt arandığından özgüllük artmaktadır.

Serolojik testlerin duyarlılıkları % 60 ile % 80 arasında değişmektedir. Özgüllüğü ise tek özgül epitopa antikor cevabı arandığında % 100'e varmaktadır. Tüberkülozda serolojik tanıda genellikle olumlu sonuçlar, hastalığın ilerlemiş devrelerinde elde edilmektedir. Bu nedenle serolojik yöntemler tanıya ek bir katkı sağlamamaktadır.<sup>15,17</sup>

## IV. HÜCRELERDEN SALINAN ÇEŞİTLİ ENZİMLERİN BELİRLENMESİ

Adenozin deaminaz (ADA): Adenozin deaminaz pürin metabolizmasında görevi olan bir

enzimdir ve makrofaj, monosit ve özellikle de T-lenfosit gibi birçok hücrenin olgunlaşmasında önemli rol oynar. Plevra, periton, perikart ve beyin-omurilik sıvılarında tüberküloz bulunduğu ADA düzeyinin yükseldiği belirlenmiştir. Bu yükseklik malign tümörlerin varlığında da görülmekle birlikte tüberkülozda yükseklik oldukça belirgindir.<sup>15</sup>

**Lizozim:** Aktive olmuş makrofaj, monosit ve granülositlerden salgılanan ve bakteri duvarındaki peptidoglikanı parçalayan lizozimin de tüberküloz plörezi olgularında plevral sıvıda belirgin şekilde arttığı ve bunun tanıda çok yararlı olabileceği gösterilmiştir.<sup>17</sup>

## V. MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLER

**a) Nükleik asit hibridizasyon yöntemleri:** Basilin kromozomal DNA veya ribozomal RNA'larının, bunlara özgül olarak bağlanabilen DNA veya RNA probları ile, tür düzeyinde saptanması mümkün olabilmektedir. Bu yöntemlerin özgüllüklerinin çok yüksek olmasına karşın duyarlılıkları düşüktür. Prob olarak kullanılan moleküllerin örneğe yeterince bağlanabilmesi için örnekte yeterli miktarda nükleik asit bulunması gerekmektedir. Bu nedenle proplar genellikle sadece kültürde üremekte olan mikobakterilerin erken saptanması ve tiplendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır.<sup>17,18</sup>

### b) Nükleik asit çoğaltma yöntemleri:

**A) Hedef amplifikasyon metotları:** Bu yöntemler hedef molekülleri enzimatik olarak replike ederek kolayca tespit edilebilir seviyelere getirirler. İnfeksiyon etkenleri, klasik yöntemlerle saptanamayacak kadar az olduğu zaman, bunların gösterilmesinde en etkili yollardan biri de sadece hedef organizmada bulunan bir nükleik asit dizisini, saptanması mümkün bir düzeye ulaşıncaya dek çoğaltmaktır.

**I. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):** PZR DNA polimeraz enzimi kullanılarak özgül nükleik asit segmentinin in vitro koşullarda arka arkaya defalarca sentez edilmesidir. Mikroskop ve kültür yöntemleri ile saptanması zor veya olanaksız olan bir çok infeksiyon etkeninin saptanmasında kullanıldığı gibi

tüberküloz tanısında da en fazla umut veren yöntemler arasına girmiştir.

DNA kopyalarının oluşturulmasında küçük bir çift DNA primeri ve DNA polimeraz enzimi kullanılır<sup>19,20</sup>.

Örneğin ısıtılması ile çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA haline getirilmesi (denatürasyon), primerlerin tek zincirli hedef DNA'ya bağlanması (annealing), primerlerin bağlanma olduğu tek zincirli DNA'nın komplementerinin sentezlenmesi başka bir ifadeyle primerlerin uzaması (ekstansiyon) şeklinde gerçekleşmektedir.<sup>9,10,15</sup>

Bu uzama işleminden sonra, orijinal DNA segmenti ve yeni oluşan komplementer DNA zinciri yeni kalıplar olarak kullanılırlar. Bu şekilde, her PZR siklusu mevcut DNA miktarını iki katına çıkarır. Amplifiye olan ürünlerin hızlı tespit edilebilmesi nedeniyle PZR tanısız amaçla daha sık kullanılmaya başlanmıştır. PZR çok hızlı bir metoddur. PZR'ın yanlış negatif ve hatalı pozitif sonuçlar verebilmesi dezavantajlarıdır. Yanlış negatiflikler çoğunlukla ortamda bulunabilen inhibitörlere veya yetersiz sayıda primer ve enzim kullanılmasına bağlıdır. Sakınılması gereken en önemli sorun yanlış pozitifliklerdir. Bunlar özellikle bir önceki deney sırasında amplifiye edilen ve ortamda kalan DNA kalıntılarının (amplikon) veya direkt bakteriyel DNA'nın (kontaminasyon) amplifikasyon tüpüne karışması ile meydana gelir. Laboratuvar prosedürlerinin titizlikle uygulanması ve yeni geliştirilen çeşitli tekniklerin uygulamaya girmesi sonucunda amplikonlar ve yabancı DNA ile kontaminasyon riski önemli ölçüde azalmaktadır.<sup>19</sup>

**2. Transkripsiyona dayalı amplifikasyon yöntemleri (TAS/3SR):** Birinci aşamada, "reverse transcriptase" (RT) enzimiyle örnekte bulunan her bir tek zincir RNA'nın komplementeri olan DNA sentezlenmektedir. İkinci aşamada ise, ısı ile denatürasyonu takiben tek zincir haline getirilen cDNA'nın T7 RNA polimeraz enzimi ile in vitro transkripsiyonu sağlanmaktadır. Herbir cDNA'nın transkripsiyonu ile yaklaşık 40 kadar RNA oluşmakta ve bunlar bir sonraki siklusta yeni cDNA'ların oluşumu için kullanılmaktadır.<sup>19</sup>

**3. "Strand displacement amplification" (SDA):** Çift sarmal DNA'nın denatürasyonundan sonra üç deoksinükleozid trifosfat ve deoksiadenozin 5-(alfa-thio)-trifosfat ile uygun primerler kullanılarak üzerinde "restriction endonuclease site-specific nick" bölgeleri bulunan DNA'lar oluşturulmakta, sonra restriksiyon enzimi ile DNA üzerinde kopmalar meydana getirilmektedir. Daha sonra DNA polimeraz enzimi, kırılan zincirin kısa parçasının 3' ucundan başlayarak DNA sentezini yaparken, kopan DNA'ya ait uzun parçaların yer değiştirmesini sağlamaktadır, Yer değiştiren bu parçalar yeni reaksiyonların başlangıcında hedef DNA görevini üstlenmektedir. Kırılma, polimerizasyon, yer değiştirme işlemlerinden oluşan siklusun tekrarlanması ile amplifikasyon gerçekteşmektedir.<sup>19</sup>

**B) Prob çoğaltma yöntemleri:** Bu yöntemlerde, hedef nükleik asit dizileri yerine bu dizileri saptamak için kullanılan oligonükleotid proplar çoğaltılmaktadır.

**1. Ligaz zincir reaksiyonu (LZR):** Ligaz ısıya dayanıklı termostabil bir enzim olup; hedefe bağlanan probları birbirine bağlar. Denatürasyon, anelling ve birleşme (ligasyon) sikluslarından sonra DNA kopyası oluşur. LZR avantajları, yüksek derecede spesifik olması ve diğer amplifikasyon teknikleri ile birlikte kullanılabilmesidir. Her aşamada enzim eklenmesi, nonspesifik ürünlerin oluşması ve kontaminasyon kontrol sistemlerinin olmaması dezavantajlarındandır.<sup>20</sup>

**2. Q beta replikaz amplifikasyon yöntemi:** Q $\beta$  replikaz, Q $\beta$  bakteriyofajının replikasyonunda görev alan bir RNA bağımlı RNA polimeraz enzimidir. Bu enzim kullanılarak RNA proplarının kısa süre içinde amplifikasyonu sağlanmaktadır. Çok hızlı olması, büyük miktarda ürün oluşması, deneyin 2-3 saat içinde tamamlanması, izotermal şartlarda gerçekteşmesi, spesifik laboratuvar donanımına gerek duyulmaması avantajıdır. En önemli dezavantajı yanlış pozitifliklere neden olmasıdır.<sup>21</sup>

**C) "Restriction Fragment Length Polymorphisms" (RFLP):** Restriksiyon endonükleaz adlı enzimler çift sarmallı DNA'yı

daha küçük parçalara ayırırlar. Herhangi bir restriksiyon enzimi tarafından tanınan DNA dizisine restriksiyon bölgesi denir. Bu bölgeler DNA üzerinde rastgele yerlerde bulunurlar. Bu enzimler DNA'yı değişik büyüklükte parçalara böler. Nükleotid dizileri ve tanıma bölgelerinin uzunluğu açısından birbirinden farklı yüzlerce enzim vardır. Bu metodun uygulanması ortamda çok sayıda DNA bulunmasını gerektirdiğinden, sekonder kültür kullanılmasına ihtiyaç vardır. Zaman açısından bu bir dezavantajdır. Ancak tüberküloz suşlarının genotiplendirilmesine olanak sağladığı için epidemiyolojik çalışmalarda büyük önemi vardır.<sup>22,23</sup>

**D) Baz dizi analizi:** Çoğunlukla antitüberküloz ilaçlara direncin saptanmasında kullanılmaktadır. Baz dizisi tayin edilecek DNA'nın tek zincirinin komplementeri sentezlenerek kalıp DNA'nın baz dizisi tesbit edilmektedir. Tek zincirli DNA hedef olarak kullanılmaktadır.<sup>24,25</sup>

**E) Diğer moleküler yöntemler:** Yukardaki yöntemlere ilaveten "insertion sequece" (IS) primer setlerinin kullanıldığı yöntemler, rastgele seçilmiş bir primer kullanılarak yapılan "arbitrary" PZR ve çift primer setinin kullanıldığı "nested" PZR yöntemleri de tüberkülozda çeşitli amaçlarla kullanılabilir. Ayrıca KatG geni ve rpoB genine yönelik primerler kullanılarak izoniazid ve rifampisine dirençli suşlar tesbit edilebilmektedir.<sup>26-30</sup>

Sonuç olarak; giderek artan oranda önemini korumaya devam eden tüberkülozun tanı ve tedavisinde başarı sağlamak için; klasik tanı metodlarına ilaveten ilerleyen teknolojinin gereği olarak hızlı, duyarlılığı ve özgülüğu yüksek, pahalı olmayan, kolay uygulanabilir tanı metodların en kısa sürede girmesi gerekmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. 9. Baskı. İzmir: Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, 1996: 330-8.
2. Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu. Topçu AW, Doğanay M. (eds). İnfeksiyon Hastalıkları. Bursa: Nobel Tıp Kitabevi, 1996: 396-428.
3. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. Jawetz Melnick and Adelberg's. Medical Microbiology 20<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall International Inc. USA, 1995: 263-72.

4. Kılıçturgay K. Klinik Mikrobiyoloji. Bursa,Güneş & Nobel Tıp Kitabevleri,1994: 65-75.
5. An Q, Buxton D, Hendricks A, Robinson L, Shah J, Lu L, Vera-Garcia M, King W, Olive DM. Comprasion of amplified QB replicase and PCR assay for detection of Mycobacterium tuberculosis, J Clin Microbiol 1995; 33: 860-7.
6. Cho N, Van Der Vliet GME, Park S, Baik SH, Kim SK, Chong Y, Kolk AHJ, Klatser PR, Kim JD. Colorimetric microwell plate hybridization assay for detection of amplified Mycobacterium tuberculosis DNA from sputum samples. J Clin Microbiol 1995; 33: 752-4.
7. Yvette SM, Irene NR, Ann R. Cord formation in BACTEC medium is a reliable, Rapid Method for presumptive identification of Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol 1998; 33: 2769-71.
8. Lovannisci DM, Winn-Deen ES. Ligation amplification and fluorecence detection of M. tuberculosis DNA. Mol Cell Probes. 1993; 31: 729-31.
9. Yajko DM, Wagner C, Tvere VJ , Kocagöz T, Hadley WK, Chambers HF. Quantitative culture of Mycobacterium tuberculosis from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the amplicor PCR assay. J Clin Microbiol 1995; 33:1944-7.
10. Durmaz R, Durmaz B, Günal S. Polymerase Chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens. Turk J Med Sci 1997; 27: 291-5.
11. Noordhoek GT, Kolk AHJ, BJune G, Catty D, Dale JW, Fine PEM, Godfrey- Fausset P, Cho SN, Shinnick T, Svenson SB, Wilson S, Van Embden JDA. Sensitivity and specificity of the PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis: a blind comprasion study among seven laboratories. J Clin Microbiol 1994; 32: 277-84.
12. Özerol İH. İnfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan DNA problemleri ve nükleik asit çoğaltma (amplifikasyon) yöntemleri. Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi. 1997; 4(3) : 329-44.
13. Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, Singh SP, Murphy MJ, Desmond E, Sierra MF, Schollnik GK. Exogenous reinfection with multidrug-resistant M.tuberculosis in patients with advanced HIV infection N Engl J Med 1993; 328: 1137-44.
14. Uzun M. Tüberkülozun laboratuvar tanısında karşılaşılan problemler. Tümbay E. (ed). 1. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu. Bursa, 1996: 23-7.
15. Elmer W, Koneman Stephen D, Allen William M, Janda Paul C, Schreckenberger Washington C, Winn Jr. Diagnostic Microbiology. Fifth Edition. Philadelphia 1997: 893-952.
16. Gedikoğlu S. Mycobacterium tuberculosis'in hücre yapısı. Tümbay E. (ed) 1. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu. Bursa, 1996: 13-8.
17. Kocagöz T. Yeni laboratuvar yöntemleri ile tüberküloz tanısı. Tümbay E. (ed). 1. Ulusal mikobakteri simpozyumu. Bursa, 1996: 29-33.
18. Torrea G, Offredo C, Simonet M, Gicquel B, Berche P, Pierre AC. Evaluation of tuberculosis transmisson in a community by 1 year of systemic typing of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. J Clin Microbiol 1996; 34 : 1043-9.
19. Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojisi ve Mikrobiyolojide kullanımı. Mikrobiol. Bül. 1995; 29: 304-11.
20. Enrico T, Federica L and M.Tullia S. Early detection of Mycobacterium tuberculosis in BACTEC cultures by Ligase Chain Reaction. J Clin Microbiol 1998; 36: 2791-2.
21. Prichard CG, Stefano JE. Amplified detection of viral nucleic acid at subattomole levels using Q beta replicase. Ann Biol Chem (Paris) 1990; 48: 492-7.
22. Frothingham R. Differentiation of strains in Mycobacterium tuberculosis complex by DNA sequence polymorphisms, including rapid identification of M. bovis BCG. J Clin Microbiol 1995; 33: 840-4.
23. Palittapongarnpim P, Chomyc S, Fanning A and Kunimoto D. DNA fragment length polymorphism analysis of Mycobacterium tuberculosis isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. J Infect Dis 1993; 8 : 167-75.
24. Gözükkara ME. Biyokimya. Ankara: Ofset Reformat ltd. 1990: 341-4.
25. Olivier B, Martin V, Denise L et. al. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis using sequence capture polymerase chain reaction. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155: 1478-81.
26. Amalio T, Paul I, Francine M. et. al. Detection of rifampicin-resistance mutations in mycobacterium tuberculosis. Lancet 1993; 341: 647-50.
27. Irving N, Cynthia K, Melvin P.W. Detection of resistance to izoniazid, rifampin and streptomycin in clinical isolates of mycobacterium tuberculosis by molecular methods. Clin Inf Dis 1997; 24: 894-900.
28. Paolo S, Sergio B, Anna Maria B, Margherita D, Paolo C, Andrea G, Adriano L. Detection of rifampin resistance by single-strand conformation polymorphism analysis of cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of the central nervous system. J Clin Microbiol 1997; 35: 2802-6.
29. Peggy MB, Georgia V, Evangelos M. Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates from Greece. J Clin Microbiol 1998; 36: 20-3.
30. Mark Y. Stoeckle, Lei G, Nitai R, Irene W, Barry K, John K, Fabienne L, Lee W. Riley. Catalase-Peroxidase gene sequences in izoniazid-sensitive and-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis from New York City. J Inf Dis 1993; 168: 1063-5.