

**T. C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**TÜBERKÜLOZUN TANISINDA POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYON YÖNTEMİNİN DEĞERİ VE
N-ACETYL-L-CYSTEIN'NİN BU YÖNTEMİN DUYARLILIĞI
ÜZERİNE ETKİSİ**

141560

147560

**DR. MEHMET SAİT TEKEREKOĞLU
UZMANLIK TEZİ**

Tez Yöneticisi

**TEZ YÖNETİCİSİ
PROF. DR. RIZA DURMAZ**

**MALATYA
1999**

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İş bu çalışma , jürimiz tarafından Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

Onay:

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

TEŐEKKÜR

Bu çalıőmanın gerçekleőmesinde yardımlarını esirgemeyen, tüm konularda hoőgörü ve içtenlikle desteklerini sürdüren, engin tecrübeleriyle çalıőmalarıma ışık tutan danıőmanım Prof. Dr. Rıza DURMAZ'a ve hocalarım Prof. Dr. Bengül DURMAZ, Prof. Dr. Nilgün DALDAL ve Doç. Dr. İ. Halil ÖZEROL'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Deneylerimizde yardımlarını esirgemeyen, bu tezin hazırlanması sırasında emeği geçen bölümdeki bütün arkadaşlarıma teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
<i>M. tuberculosis</i> 'in genel özellikleri.....	7
<i>M. tuberculosis</i> 'in antijenik yapısı.....	9
<i>M. tuberculosis</i> 'in üreme özellikleri.....	12
Tüberkülozda immünopatogenez.....	13
Labaratuvar tanısı.....	16
Mikroskopi.....	18
Kültür.....	18
Serolojik yöntemler.....	20
Çeşitli hücrelerden salınan enzimlerin belirlenmesi.....	21
Moleküler biyolojik yöntemler.....	22
MATERYAL VE METOD.....	29
Örnekler.....	29
Kullanılan tompon ve çözeltiler.....	30
Örneklerin işlenmesi.....	32
İstatistiksel değerlendirme.....	35
BULGULAR.....	36
TARTIŞMA.....	43
SONUÇLAR.....	51
ÖZET.....	52
SUMMARY.....	54
KAYNAKLAR.....	55

GİRİŞ VE AMAÇ

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. Yıllarca yapılan mücadeleler sonucunda hastalık bir dereceye kadar kontrol edilebilir hale gelmiş, ancak 1980'li yıllardan sonra ortaya çıkan Human Immunodeficiency Virus (HIV) enfeksiyonu ile birlikte tekrar gündeme gelmiştir. Bugün sadece az gelişmiş yada gelişmekte olan ülkeler değil; gelişmiş ülkelerin de en büyük problemlerinden birisi durumuna gelmiş olan tüberküloz; bütün dünyada yaygın olarak görülmekte ve önemini korumaktadır (1-3).

Gelişmiş ülkelerde özellikle HIV ile infekte hastaların çoğul ilaca dirençli suşlarla infekte olmaları konuya ayrı bir boyut kazandırmış ve hastalığın tedavisinde zorluklar ortaya çıkmıştır (4). Yurdumuzda da tüberkülozlu hasta sayısı son yıllarda artmaya devam etmektedir (5).

Klasik olarak tüberküloz tanısı; klinik belirtiler, radyolojik görünüm, tüberkülin deri testi sonucunun değerlendirilmesi; klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda mikobakteri görülmesi ve besiyerinde üretilmesiyle mümkün olmaktadır.

Dünya Sağlık Teşkilatı'nın kararına göre bir hastaya kesin tüberküloz tanısı konabilmesi için uygun şekilde alınan klinik örneğin laboratuvara gönderilmesi, hazırlanan preparatlarda mikobakterilerin görülmesi ve ekim yapılan besiyerlerinde üretilmesi ile mümkün olur (6).

Tüberküloz basiline kısa sürede tanımlanması, ilaç direncinin saptanması ve infeksiyon kaynağının belirlenmesi etkin bir tedavi için büyük önem taşımaktadır (7-10).

Klasik tanı yöntemlerinden mikroskopinin duyarlılığının düşük olması, kültürün ise uzun zaman alması, araştırmacıları bu hastalığın erken tanısında kullanılabilecek yeni yöntemleri denemeye yöneltmiştir (11-14).

Son on yıl içinde yapılan genetik çalışmalar ve immünolojik alanlardaki ilerlemeler tüberküloz açısından da yeni teknolojik araştırmaların ortaya çıkmasına yardımcı olmuştur. 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 (1,15-18). Ancak yaygın olarak denenmesine karşın PZR yönteminde arzulanan özgüllük ve duyarlılık henüz elde edilememiştir (18,19). Bunda örnekte bulunabilecek inhibitörler başta olmak üzere homojenizasyon, DNA izolasyonu, amplifikasyon ve sonuçların gözlenmesinde uygulanan koşulların önemli etkisi vardır.

Bu çalışmada; tüberkülozun erken tanısında PZR yönteminin değerini ortaya koymak ve klinik örneklerin homojenizasyonu ve dekontaminasyonunda kullanılan N-acetyl-L-cystein-NaOH (NALC-NaOH) aşamasının, PZR'nun duyarlılığı üzerine olumsuz etkisinin olup olmadığını belirlemek amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Tarihin en eski hastalıklarından birisi olarak kabul edilen Tüberkülozun yaklaşık 10.000 yıldan beri varlığını sürdürdüğü sanılmaktadır. Nedeni bilinmeyen bir halk sağlığı sorunu olarak yıllarca önemini korumuş ve özellikle sanayileşme ve şehirleşmenin başladığı dönemlerde yaygınlığı artmıştır. Hipokrat devri, tüberküloz hakkındaki gerçek bilgilerin başlangıcı olarak kabul edilmektedir.

Tüberküloz tarihinin dönüm noktası olan 24 Mart 1882' de Alman mikrobiyolog R.Koch, tüberküloza neden olan bakterinin izolasyonunu tanımlamış ve bu tarihlerde tüberküloz, Avrupa'da her yedi ölümden birinin sebebi olarak bildirilmiştir. Robert Koch demiştir ki : Bir hastalığın öneminin ölçüsü eğer kurbanların sayısı ise, özellikle veba ve kolera gibi en çok korku saçan infeksiyon hastalıkları tüberkülozun çok gerisinde kalır. Bu büyük gelişmeyi, 1921' de BCG'nin bulunuşu ve 1944'te ilk tüberküloz ilacı olan streptomisin keşfi izlemiştir (20).

Bin dokuz yüz seksen dört yılına kadar tüberkülozun ortadan kaldırıldığına inanılıyordu. Ancak 1985 yılından itibaren tüberkülozun halk sağlığını önemli derecede tehdit eder duruma geldiği ortaya çıkmıştır (2-4). Son yıllarda özellikle moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği yöntemleri ile hastalığın immünopatogenezi aydınlatılmış, yeni tanı yöntemleri ve etkili ilaçların gelişimi konusunda önemli ve ümit verici gelişmeler sağlanmıştır. Tüm bu gelişmelere yani 100 yılı aşkın bir süredir etkenin bilinmesine, 70 yılı aşkın bir süredir aşının bulunmasına ve 50 yıla yakın bir süredir %100 tedavi edilebilir bir hastalık olmasına karşın, günümüzde tüberküloz sorununa henüz çözüm bulunamamıştır (20).

Gelişmekte olan ülkelerde önemi hiç azalmayan tüberküloz AIDS gibi nedenlerle, gelişmiş olan ülkeler içinde çok önemli bir sorun haline gelmiştir (21). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ile Tüberküloz ve Akciğer Hastalıkları Uluslararası Federasyonu (IUATLD) 'nın saptamalarına göre, dünyada yaklaşık bir milyar 700 milyon kişi **Mycobacterium tuberculosis** ile infektidir.

- * Basili taşıyanların 20 milyonu aktif tüberkülozlidir.
- * Bunların yılda üç milyondan fazlası ölmektedir.
- * Her yıl sekiz milyon yeni tüberküloz vakası ortaya çıkmaktadır.
- * Coğrafi dağılım düzensizdir.
- * En yüksek hasta sayısı Asya'da bulunmaktadır.

Erişkinler arasında tüberküloz, tüm dünyada tek bir enfeksiyon etkeninin yol açtığı en sık ölüm nedenidir. Eğer dünyadaki tüberküloz insidansı aynı düzeyde devam ederse 2000 yılında 30 milyon insanın hastalıktan ölmesi beklenmektedir (21). Dünya sağlık örgütünün (WHO) raporuna göre, çoğul ilaç direnci gösteren tüberküloz vakalarında da artış olduğu gösterilmektedir.

Yurdumuzda Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığının verilerine göre enfekte olgu sayısı 1993 yılı itibarıyla 12 milyon kişi olarak belirlenmiştir. Bu kişiler ülkemiz için büyük bir enfeksiyon havuzu oluşturmaktadır. Bu rakamın her yıl % 1-3'nün hasta olacağı göz önünde bulundurulursa tehlikenin boyutları ortaya çıkmaktadır (2).

Tablo 1. Türkiye'de yıllara göre tüberküloz insidansı (20).

Yıllar	Yıl ortası nüfus	Bulunan yeni tb sayısı	tb insidansı (yüzbinde)
1980	44438000	23210	52.2
1981	45540000	25232	55.4
1982	46688000	26457	56.7
1983	47864000	28634	59.8
1984	49070000	27530	56.1
1985	50306000	30960	61.5
1986	51546000	31030	60.2
1987	52845000	30779	58.2
1988	54176000	27884	51.4
1989	55541000	26669	48.0
1990	56000000	2494	44.0
1991	58000000	25166	43.9
1992	60000000	25455	42.9

Tablo 2. Türkiye’de bölgelere göre tüberküloz prevalansı (20).

Bölgeler	Kayıtsız hasta oranı %	Dispanser kayıtları	Prevelans (1000’de)
Ege	25	1.40	1.86
Akdeniz	32	1.58	2.32
İç Anadolu	58	1.03	2.48
Marmara	44	2.04	3.66
Doğu Anadolu	23	2.86	3.73
Trakya	63	1.48	3.97
Karadeniz	67	1.57	4.80
Güneydoğu Anadolu	67	2.42	7.44
Türkiye Geneli	51	1.76	3.58

Yurdumuzda prevalans ve insidans çalışmaları yeterli ve güvenilir değildir. Çünkü bunlar olgu bulma ve düzenli kayıt sistemine bağlıdır. Daha anlamlı yaklaşım, yıllık infeksiyon riskinin (YİR) tesbiti ile yapılabilir. YİR, bir yıl içinde toplumda tüberküloz ile infekte olacakların tüberkülozlu hastaya oranını yansıtır. YİR, gelişmekte olan ülkelerde, gelişmiş ülkelere 5-250 defa fazladır. WHO gelişmekte olan ülkelere tüberkülozlu hastaların % 50’sinden azının tesbit edilebildiğini ve bunların da % 50’sinden azının tedavi olabildiğini bildirmektedir (22).

Tüberküloz ırk, yaş ve gelir seviyesine bakılmaksızın her kesimden insanı etkileyebilmektedir. Ancak HLA BW15 geni taşıyan zenciler ile HLA DR2 geni taşıyan kıızılderililer tüberküloz hastalığına yatkın kişilerdir. Ayrıca bazı gruplarda risk daha da

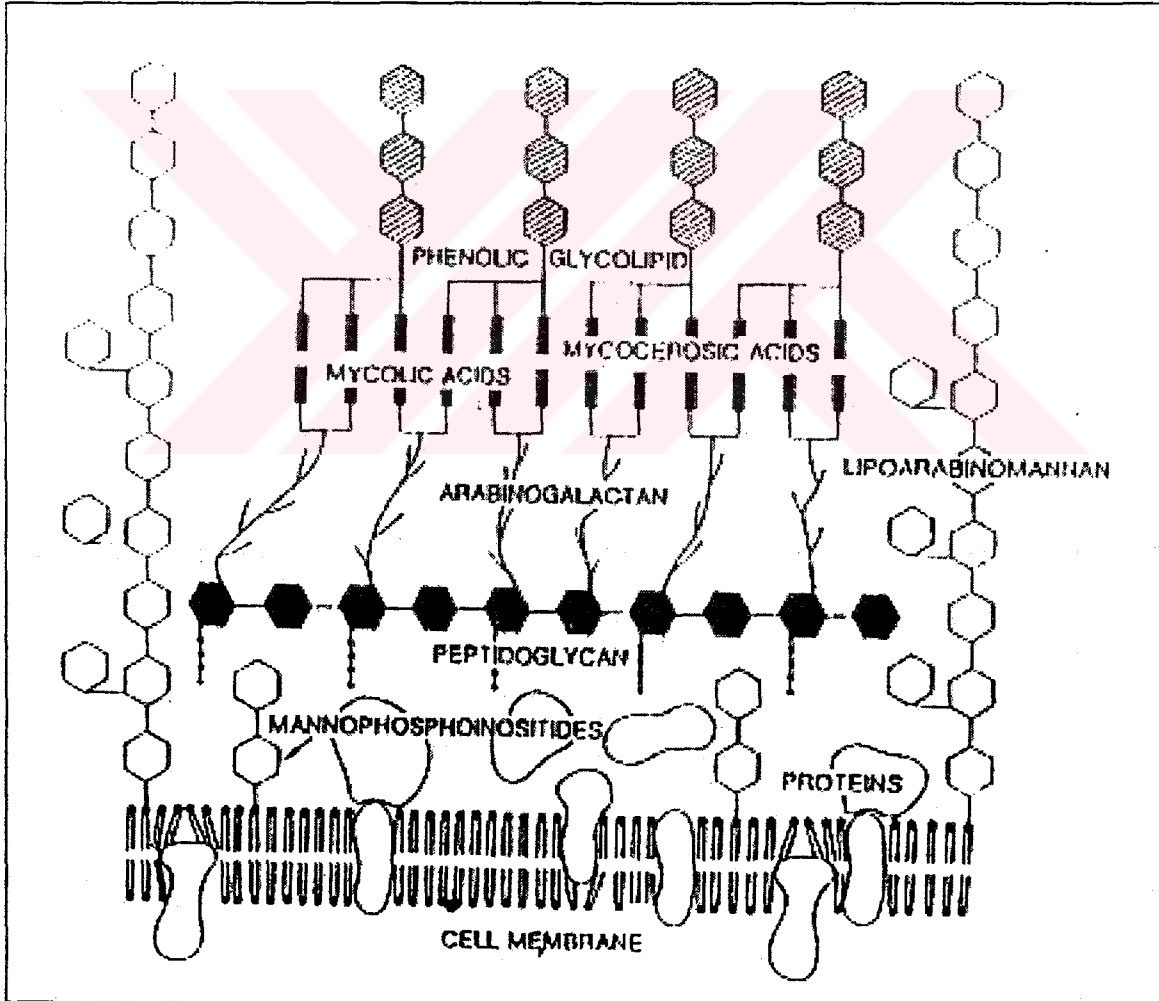
yüksek olarak saptanmaktadır. Bu gruplar içinde HIV ile enfekte kişiler, tüberkülozlu hastalarla ilişkide olanlar, tıbbi bakımı kötü ya da ihmal edilen kişiler, yoksullar, yüksek tüberküloz insidansı olan ülkelerden gelenler, mahkumlar, alkolikler, intravenöz ilaç kullananlar, kreşteki çocuklar, yaşlılar ve tüberkülozlu hastalarla teması olan hastabakıcıları sayılabilir (4). Tüberküloz enfeksiyonu sağlık personeli arasında genelde sessiz seyreder. Aktif enfeksiyon riski % 10 dur. Diğer gruplarda bu risk daha da yükselmektedir.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSISİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Tüberküloz etkeni bakteri 1882 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmış ve funguslar gibi yavaş üremeleri nedeniyle *Mycobacterium tuberculosis* olarak isimlendirilmiştir. Basiller 0.2 - 0.5 μm eninde, 1-4 μm boyundadır. Tek tek küçük zincirler halinde bulunabildiği gibi küçük demetler halinde de bulunabilirler. Hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüz basillerdir. Yaşlı kültürlerde ve uygunsuz koşullarda üreyen bakterilerin daha uzun, ipliksi ya da daha kısa hatta koklara benzer değişik şekilleri ortaya çıkabilmektedir. Balgam ve diğer hastalık maddelerinden yapılan preparatlarda tek ya da ikili üçlü gruplar halinde ve birbirine paralel ya da uçlarından birbirlerine yaklaşarak açılı X, V, L, harfleri oluşturacak biçimde bir arada bulunabilirler. Besiyerlerindeki kültürlerinden yapılan preparatlarda ise çoğu kez büyük kümeler oluştururlar. Mikobakterilerin hücre duvar yapısı diğer bakterilerden farklıdır. Duvarın ana iskeleti peptidoglikan ve arabinogalakton moleküllerinin fosfodiester bağları ile bağlanmasıyla meydana gelir. Ayrıca lipoarabinomannan ve fenolik glikolipidler duvar

yapısının önemli bir bölümünü oluşturur. Arabinogalakton ve glikolipid molekülleri arasında mikolik asitler yer alır. Mikolik asitler uzun zincirli satüre yağ asitleridir ve duvar yapısının önemli bir bölümünü oluşturur. Mikolik asitler zincir uzunluğuna göre keto, metoksi ve siklopropan gruplarına dahildir. Bakterinin toplam lipid miktarı hücre duvarı kuru ağırlığının % 60 kadardır. Hücre duvarında bulunan bu yüksek lipid miktarı bakterinin dış etkilere karşı direncinde, virulansında ve boyanma özelliğinde rol almaktadır (4,23,24).

Şekil 1. *Mycobacterium tuberculosis*' in hücre duvar yapısı.



Tüberküloz basilleri bakteriyolojik boyalarla kolay boyanmazlar. Gram boyası ile güç boyanırlar. Bu nedenle gram özelliklerinden söz edilmez. Bakterilerin bu özellikleri hücre çeperlerinin yapısındanadır. Hidrofobik karakter gösteren hücre çeperi, boyaların sudaki eriyikleri ile çok az reaksiyona girer. Bu nedenle mikobakteriumların boyanması için boyaların suda erir bir organik madde içerisinde eritilmesi ve ısıtılarak uygulanması gerekir. Fenol bu maddelerden birisidir. Fenol içerisinde eritilmiş bazik fuksinin koyu eriyiklerinin ısıtılarak (kaynatmaksızın) uygulanması ile boyanan mikobakteriumlar, mineral asitlerin etkisi ile boyalarını bırakmazlar.

Mikobakterilerin boyanmasında en çok kullanılan yöntem Ziehl-Neelson dir. Bu yöntemde kullanılan boya karbol fuksindir. Fuksin hücre duvarında bulunan mikolik asitle ısı yardımıyla birleşerek mikolat-fuksin kompleksini oluşturur. Bakteri alkol ve asit alkol ile yapılan dekolarizasyona rağmen boyayı vermez. Bu özellikleri nedeniyle aside rezistan basil (ARB) veya asit alkole rezistan (AARB) gibi isimler alır. Ziehl-Nelson yöntemiyle parlak kırmızı renkte boyanırlar (23).

A).Mycobacterium tuberculosisin antijenik yapısı

Mikobakterilerin fiziksel, kimyasal ve fonksiyonel özelliklerine göre farklılıklar gösteren çok sayıda antijenik yapısı mevcuttur. Bunlar ısı şoku proteinleri, lipoproteinler, salgısal proteinler ve enzimler olarak özetlenebilir.

1). Trehalozlar

Kort faktörü: Trehaloz-6-6'-dimikolat yapısındadır. Middlebrook 1947 yılında virulan tüberküloz basillerinin kort oluşturduğunu gözlemiş, bu yapının virulans ve hücre duvar yapısı ile ilgili olduğunu düşünmüştür. Kort faktörün nonvirulan suşlar ve mikolik asit içeren başka bakteri suşlarında da yer aldığı gösterilmiştir. Kort faktörü ile ilgili bir çok

çeşitli biyolojik aktiviteler tanımlanmıştır. Çoğu stokin salınımına bağlı olaylardır. Başlıcaları; sistemik toksisite, antitümör aktivite, granüloma oluşumu, makrofaj kemotaktik faktörlerin salınımı, lökosit migrasyon inhibisyonu olarak özetlenebilir.

Sülfolipidler: Kromotografik olarak beş komponenti olduğu saptanmıştır (SL-I, SL-I', SL-II, SL-II', SL-III). Yapılan çalışmalarda virulans derecesi ve sulfolipid arasındaki ilişki; fagozom aktivasyonunu inhibe ederek, bakterinin intrasellüler yaşamını sürdürmesine katkı olarak açıklanmaktadır.

Mikolipenik asit: Trehaloz esterlerdendir. Sadece virulan suşlar tarafından oluşturulur. Lökosit migrasyonunu önemli oranda azaltır. Çok dallı yapısı nedeniyle esterlerin hidrolizi güçtür, dolayısıyla bakteriyi konağın katabolizmasından korunur.

Lipoglikanlar: Etilglikopolisakkarit, etilmannopolisakkarit yapısındadır. Helikal yapıdadırlar. İç kısımlarında yağ asitleri yer alır. Lipid taşıyıcısı olarak işlev görek uzun zincirli yağ asitlerinin sentezine olanak sağlarlar.

2). Glikolipidler :

Lipooligosakkaritler: Yüzey glikolipidlerine glikozit bağları ile bağlanan açıl trehaloz molekülleridir. Serovarların dominant epitoplarını oluşturur ve önemli yüzey antijenleridir.

Fenolikglikolipidler (PGL) : Fenol fitioserol dimikokerosat glikozidleridir. Glikozil ürünleri tür ve antijenik özelliğini verir.

Polar glikopeptidolipidler : Mikosit C yapısındadır. Kısa bir oligosakkarit molekülü haptetik özelliğini sağlar.

3). Protein ve Antijenleri :

Bakterinin izole edildikten dokuz yıl sonra Koch (1891) en meşhur antijeni olan tüberkülini tanımlamıştır. Sadece tanı amacıyla kullanılabilir. Doğal olarak, hücre duvarında proteinlerde yer almaktadır ve önemli işlevleri vardır. Başlıcaları; hücre bölünmesinde rol alan enzimler ve duvar polimerlerinin sentezinde yer almak, atıkların hücre duvarından geçişinde rol oynamak, porinleri oluşturmak ve antijenik özellik sağlamak olarak özetlenebilir.

Mycobacterium'ların proteinleri fiziksel, kimyasal özellikleri, fonksiyon ve lokalizasyonlarına göre gruplandırılabilir. Isı şoku proteinleri, lipoproteinler, sitoplazmik membrana bağlı veya salgılanan proteinler başlıcalarıdır.

Isı şoku proteinleri: Hücrede ani ısı yükselmesi sonucu oluştuğu gösterilmiştir. Daha sonraları her tür hücrede olumsuz koşullarda oluştuğu ve hücrenin yaşamını sürdürmesine yardımcı olduğu anlaşılmıştır. *M. tuberculosis*'in en önemli ısı şoku proteinleri 65 kDa ve 12 kDa proteinlerdir.

Lipoproteinler : *M. tuberculosis*'in solubl ekstraktlarının önemli miktarda protein içerdiği saptanmış ve 38, 27, 26, 19 kDa lipoproteinlerinin varlığı gösterilmiştir. 38 kDa en yoğun çalışılan lipoproteindir. *M. tuberculosis* için oldukça spesifik bir antijen olarak kabul edilmektedir.

Salgısal Proteinler : Grubun ana elemanı antijen 85 kompleksidir. CIE (counter immunoelectrophoresis) ile 85A, 85B, 85C gibi 3 ayrı komponentten oluştuğu gösterilmiştir. Bunlar ayrı genler tarafından kodlanan ancak çapraz reaksiyon veren parçalardır. Koruyucu immünite gelişmesinde ve komplikasyonlarda rolü olduğu düşünülmektedir.

Enzimler : Çok sayıdaki enzimden iki tanesi klonlanmıştır. 40 kDa protein bakterinin erken kültürlerinde minimal bakteri lizisi ile açığa çıkar. Hücre zarından transport ile ilgilidir (25).

B). Üreme özellikleri

Tüberküloz basilleri zorunlu aerob bakterilerdir. Ortamda CO₂ artması üremeyi hızlandırmaktadır. En iyi 35-37°C de ürerler. *Mycobacterium tuberculosis* dışında bazı cinsler 24°C - 42°C arasında üreyebilmektedir. Organizmanın ilk izolasyonunun güç olmasına rağmen pasajlar sırasında daha kolay üreyebildiği görülmüştür (1,4). Asıl karbon kaynağı gliserol, nitrojen kaynağı asparajin ve amonyum tuzlarıdır, ayrıca aminoasit karışımlarıda yararlı olmaktadır. Lipid ihtiyacı konsantrasyonu iyi ayarlanmış yumurta sarısından sağlanmaktadır. Aksi taktirde inhibitör etki gösterir. Üremeyi hızlandırmak için potasyum, demir , magnezyum tuzları sülfat ve fosfatlar gereklidir. Diğer bakterilerin üremesini engellemek için inhibitör etkisinden dolayı malaşit yeşili kullanılır.

Tablo 3. *Mycobacteriumlar* için selektif besiyerleri

Besiyeri	İnhibitör
Sellektif Löwenstein- Jensen	Malaşit yeşili, penicilin, Nalidixic acide
Sellektif L.J.	Malaşit yeşili, Cycloheximite, Lincomycin, Nalidixic aside
Sellektif Middlebrook 7 H 10	Malaşit yeşili, Cycloheximide, Lincomycine, Nalidixic acide.
Sellektif Middlebrook 7 H 10	Carbenicillin, Amphothericin B, Trimethoprime lactate

Katı besiyerinde kuru, pürüklü, sigil görünümünde kirli beyaz renkte, deve tüyü renginde, hafif sarımtırak, 1-2 mm çapında koloniler oluşturur. Sıvı besiyerinde, hücre duvarının hidrofobik özelliğinden dolayı granüler şekilde, yüzeye yakın üreme gösterir.

Mikobakterilerin en önemli özelliklerinden birisi de bölünme zamanlarıdır. *Mycobacterium tuberculosisin* ikiye bölünme süresi ortalama 15-20 saat arasında değişmektedir. Bunun nedeni DNA dependent RNA polimeraz enzim defektine bağlı olduğu düşünülmektedir (1). İkiye bölünme süresinin uzun olması nedeniyle koloni oluşturma süreleri 10-14 günü bulurken, bu süre 2 aya kadar uzayabilmektedir (1-4).

TÜBERKÜLOZDA İMMUNUPATOGENEZ VE PATOLOJİ

Tüberküloz morbitide ve mortalitesi yüksek olan bir hastalıktır. Enfeksiyonun yaygınlığı, tüberküloz basilinin makrofajlara girip hücre içinde yaşama yeteneğine bağlıdır. Mikobakteriler makrofajlarda yıllarca canlı kaldıktan sonra reaktivasyona ve klinik hastalığın oluşmasına neden olabilmektedir.

Tüberküloz basili solunum yolundan akciğerlere aerosol partiküllerle ulaşırlar. Bir partikül içerisinde 1-3 basil bulunabilir (1,2,4). On kadar partikül enfeksiyonu başlatmaya yeterlidir. Basiller akciğerde özellikle PO₂ 140mmHg olduğu apikal bölgeye yerleşir. Burada granülomatöz bir odak oluşturur. Bu odak kendini drene eden lenf düğümleri ile primer kompleks oluşturur. Bu odak kolayca iyileşebilir. Ancak basilleri içerisinde muhafaza ederek konağın savunmasından koruyabilir (1,4,26). Primer enfeksiyon % 90-95'i 1-10 hafta sürede immün sistem tarafından sınırlandırılarak geç tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu ile kontrol edilen bir hücresel immünite geliştirir. Diğer % 5-10 ise primer enfeksiyonu izleyerek çoğunlukla immün yetersizlikler nedeniyle ya primer progressif hastalık gelişir; ya da latent dönemden sonra reaktivasyon tüberkülozu gelişebilir.

M. tuberculosis makrofajlara 1 ve 3 reseptörleri, vitronektin, fibronektin reseptörleri ve başka yüzey moleküllerine bağlanarak fagozom içine girer. Basil antimikrobik oksidatif yolu tetikleyen Fc reseptörlerine bağlanmaz. Basil taşıyan fagozom genelde lizozom ile birleşmez ve fagozomun pH'sı proton-ATPaz veziküllerinin dışlanması nedeni ile daha fazla asidifiye olmadan 6.5 dolayında kalır. Bu da mikobakterinin yaşamını idame ettirebilmesi için en uygun pH' dır.

Mikobakterinin makrofaj aracılığı ile öldürülmesini önleyen başlıca mekanizmalar (26).

*Lizozom füzyonunun inhibisyonu

*Makrofaj aktivasyonunun inhibisyonu (Protein kinaz C'nin inhibe edilmesi ve INF-gama etkisinin bloke edilmesi)

*Hücre içi sindirilmeye direnme (O_2 Toplayıcı, LAM ve fenolik glikolipid 1. aracılığı ile).

*Enzim indüksiyonu (Katalaz ve süperoksit dismutaz ile)

*Stres yanıtı (Hsp 65 ve Hsp 70 indüksiyonu ile)

Lipoarabinomannan (LAM) mikobakteriye erken yanıtta önemlidir. İmmun modülatör etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. *M.tuberculosis*'in PPD, monosit aktive edici faktör, fosfolipidler gibi duvar komponentlerinin birbirini modüle edebilen birçok sitokin ve diğer mediyatörün, T lenfositleri, monosit ve makrofajlardan sentezlenip salınmasını tetiklediği söylenebilir.

İnfeksiyon sırasında, antikorların oluşması, geç aşırı duyarlılık, makrofaj aktivasyonu ve granülomatöz inflamasyon gibi immün reaksiyonlar gelişir. Humoral immün yanıtın tüberküloza karşı savunmada önemli bir yeri yoktur (26). Granülomatöz

reaksiyon mikroorganizmanın yayılımını sınırlayan bir koruyucu immün yanıttır ve yanıt TNF-alfa'nın etkisi altında gelişir.

Tüberküloz lokal bir hastalıktır. Akciğerin bir yerinde lezyon gelişme gösterir ve kalsifiye olurken aynı akciğerin diğer alanlarında lezyonlarda stabilizasyon gelişir. Sonuç olarak tüberküloz eksaserebasyon ve remisyonlar göstererek ilerler. Vücutta akciğerlerin apikal bölgeleri, kemiklerin uç kısımları ve böbrekler PO₂'nin yüksek olduğu yerlere yerleşirken; PO₂'nin düşük olduğu karaciğer ve dalak gibi organlara yerleşmeleri, dissemine infeksiyonlar dışında pek mümkün değildir.

Solunum yolu ile bulaşmanın yanında, genitoüriner sistem, deri ve gastrointestinal yollardan da bulaşabilir. Basilin virulansına ve makrofajların öldürme kapasitelerine bağlı olarak hastalık oluşumu gerçekleşir ya da gerçekleşmez. Genelde bir çoğu iyileşir, ancak reaktivasyon meydana gelirse miliyer tüberküloz ortaya çıkar. Enfeksiyondan 2-8 hafta sonra hücrel immünite ve hipersensitivite gelişir, tüberkülin testi pozitifleşir (4).

Primer enfeksiyonun iyileşmesinden sonra immün süpresyon sonucu 3 yıl içinde reaktivasyon gelişebilir. Tekrarlayan hastalıklar (Diabetes mellitus gibi), primer immün yetmezliğe neden olan malign hastalıklar, toksik kemoterapi, steroid tedavisi gerektiren hastalıklar, astım, kollojen doku hastalıkları, kötü beslenme, alkol ve ilaç bağımlılığı, ileri yaş, sigara içme ve HIV enfeksiyonları hastalığın ilerlemesini sağlarlar.

Tüberküloz tutulma yerine göre belirtiler verir. Akciğerde enfeksiyon oluşursa, ateş, halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı, gece terlemeleri, öksürük başlıca semptomlar olurken; balgam çıkarma, göğüs ağrısı ve hemoptizi de olabilir.

HIV epidemisinden önce tesbit edilen tüberküloz olgularının %85'inde pulmoner tutulum, %15'inde ise ekstra tutulum veya her iki yerde de görülürken; HIV ile enfekte kişilerde yapılan çalışmalarda pulmoner tutulum %38, ekstra tutulum %30 ve her iki bölgedeki tutulum %32 oranında bulunmuştur.

LABORATUVAR TANISI

Yurdumuz içinde çok önemli bir sağlık sorunu olan tüberkülozun tanısı ile ilgili problemler, bugün hala klinik örneklerin alınması ve laboratuvara ulaştırılması aşamasında başlamaktadır. Kısaca özetleyecek olursak;

- *Klinik örneklerin alınması ve laboratuvara ulaştırılması,
- *Preparasyonda problemler,
- *Kültürde problemler,
- *Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'nda 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. Kontaminasyon ihtimali nedeniyle 24 saatlik idrar örneği mikobakteriyolojik inceleme için kabul edilmemelidir. Birbirini takibeden üç günde, üç ayrı idrar örneğinin incelenmesi mikobakteri izolasyon şansını artırır.

Balgam: Sabah erken saatlerde, ağız temizliği yapıldıktan sonra ve yataktan kaldırılmadan önce, 50 ml'lik plastik disposable santrifüj tüplerinin 1/5'ini geçmeyecek şekilde balgam örneği almak gereklidir. Hasta balgam çıkaramıyorsa , aynı kabın içerisine birkaç kez öksürtülmesi uygun olur. 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.

Hasta balgam çıkaramıyorsa;

*Ilık hipertonic tuzlu su ile indüklenmiş balgam örneği alınması,

*Balgam çıkartmakta güçlük çeken veya balgamını yutan küçük çocuklardan açlık mide suyu alınması,

*Bronkoalveoler lavaj sıvısı veya bronş yıkama suyu alınması uygundur.

Açlık mide suyu: 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_2HPO_4) 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, perikart, 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 örneklere antikoagülan olarak, sodyum polyenetol sülfonat (SPS) eklenmelidir. BOS gibi numuneler az sayıda mikobakteri içereceğinden, inceleme için en az iki ml örnek gerekir (27).

Tüberküloz hastalarının erken tanı ve tedavisi, tüberkülozdan toplumun korunmasında en önemli yoldur. Bu nedenle tüberküloz infeksiyonuna yakalandığı

düşünülen hastaların teşhislerini kanıtlayacak, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin rutin kullanıma girmesi oldukça önemlidir.

1.Mikroskopik inceleme

Tüberküloz basilinin en hızlı ve en ekonomik tanı yöntemidir. Alınan materyalden doğrudan veya homojenizasyon işleminden sonra hazırlanan preparat, Ziehl-Neelson gibi boyama tekniği ile boyanarak incelenir. Fazla duyarlı olmamasına rağmen çabuk sonuç alınması nedeniyle laboratuvarlarda sıklıkla uygulanmakta olup; tanı değeri oldukça yüksektir (4,24,25,27). Pratikte fazla kullanılmamakla birlikte, floresan boyalarla boyanarak , UV mikroskobunda veya özel diyafram takılarak normal ışık mikroskobunda preparatlar incelenebilmektedir (25). Mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için örneğin mililitresinde en az 10.000 kadar bakteri bulunması gerekmektedir (28).

2.Kültür

Altın standart olarak önemini halen koruyan kültürün duyarlılığı direkt mikroskopik incelemeye göre daha fazladır. Çoğunlukla Lowenstein-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. Koloni oluşumu 3-4 hafta gibi uzun bir süre almaktadır. 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 ^{14}C içeren palmitik asit bulunur. Mikobakteriler üreme esnasında palmitik asiti kullanarak radyoaktif CO_2 oluştururlar. Üretilen radyoaktif gazın miktarı ölçülerek bakteri üremesi daha kısa sürede belirlenmektedir. Yaklaşık yirmi yıldır kullanılmakta olan bu yöntemle klinik örneklerde *M. tuberculosis*'in gösterilmesi ortalama bir haftaya kadar indirilmiştir. Ancak pahalı olması ve radyoaktif madde gerektirmesi dezavantajdır. Olumlu yanı, hızlı, kolay üretme ve tiplendirme sağlamasıdır. Tiyofen-2-karboksilat hidrazit (TCH) *M. bovis*'in üremesini engeller ve bunun *M. tuberculosis*'den ayırımında kullanılır. Bu yöntemle kısa sürede antibakteriyel duyarlılık incelemesi de yapılabilmektedir (24,28).

Floresan yöntem: 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. Besiyerindeki oksijen floresansı engeller. Ancak bakteri üremeye başladığında oksijen tüketimine bağlı olarak floresans ortaya çıkar. Üremeye bağlı floresans 365 nm dalga boyunda ultraviyole ışığı ile görülür. Wood lambası bu amaçla kullanılmaktadır. Bu sistemde üreme on günde saptanabilmektedir. Bir önceki radyometrik sistemden daha ucuz olması, radyoaktif madde gerektirmemesi avantaj olup aynı yöntemle antitüberküloz ilaçlara duyarlılık da hızlı olarak belirlenebilmektedir (24 , 28).

Haberci mikobakteriyofaj: Mikobakteriyofaj, mikobakterileri infekte edebilen ve bakteri içerisinde kolayca tesbit edilebilen bir ürün oluşturan virüstür. Ateş böceğinin

ışık üretmesinden sorumlu lusiferaz enzim geninin bu fajlara klonlanması ile haberci fajlar elde edilmiştir. Lusiferaz enzimi ATP varlığında lusiferini oksitler 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 4 saat gibi kısa bir sürede tamamlanabildiğinden mikobakterilerde ilaç direncinin çabuk belirlenmesinde en çok ümit veren yöntemler arasında sayılmaktadır (24,28).

3. Serolojik Yöntemler

Serolojik yöntemler tüberküloz tanısındaki en eski yöntemlerdendir. Özgüllükleri oldukça düşüktür. Çevrede yaygın olarak bulunan *M. tuberculosis* dışındaki mikobakterilerin antijenleri ile çapraz tepkimeye yol açmaktadırlar. Bu konudaki ilerlemelerle, sadece *M. tuberculosis*'te bulunan antijenler saflaştırmış ve özgül monoklonal antikorlar elde edilmiştir. Teknolojik gelişmeler sonucunda, serolojik yöntemler tüberküloz tanısında yeniden önem kazanmaya başlamıştır. En sık kullanılan yöntem ELISA'dır. Antijen ile kaplı plastik yüzey üzerine serum konup, bağlanan antikorların varlığı enzimle işaretli anti-insan immünglobülinleri ile araştırılmaktadır. Antijenler ne derece saflaştırılmış olursa olsun, birçok epitop taşıdıkları için çapraz tepkimelere neden olabilmekte ve özgüllüğü düşürmektedir. Bu olumsuzlukları ortadan kaldırmak 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. İncelenen serumun sadece 1/5 oranında dilüe edilmesi gerektiğinden

duyarlılığı daha fazladır. Sadece bir epitopa karşı yanıt arandığından özgüllük artmaktadır. Saflaştırılmış antijen gerektirmemesi başka bir avantajdır. Ayrıca dot-immunoassay yönteminde antijen emdirilmiş kağıt, serum örneği ile karşılaştırılmakta, sonra antikorların varlığı, enzimle işaretli anti-insan immünglobülini ile araştırılmaktadır. Renk değişikliği bir standartla karşılaştırılarak gözle veya optik bir okuyucu yardımıyla okunduğu bu yöntemin uygulaması daha kolay olmasına rağmen, sonuçlar ELISA ile mukayese edildiğinde başarısız bulunmuştur.

Serolojik testlerin duyarlılıkları % 60 ile % 80 arasında değişmektedir. Özgüllüğü ise tek özgül epitopa antikor cevabı arandığında % 100'e varmaktadır. Tüberkülozda serolojik tanı teknik açıdan mümkün olmakla birlikte genellikle olumlu sonuçlar, hastalığın ilerlemiş devrelerinde elde edilmektedir. Bu tür vakalarda mikroskopi ve kültür yöntemleri çoğunlukla pozitif sonuç verdiği için, serolojik yöntemlerin tanıya ek bir katkısı olmayacaktır (24,28).

4. Çeşitli hücrelerden salınan enzimlerin belirlenmesi

Adenozin deaminaz (ADA): Adenozin deaminaz pürin metabolizmasında görevi olan bir enzimdir ve makrofaj, monosit, 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 (24, 28).

Lizozim: Aktive olmuş makrofaj, monosit ve granülositlerden salgılanan ve bakterilerin duvarındaki peptidoglikanı parçalayan lizozimin de tüberküloz plörezi olgularında

plevral sıvıda belirgin şekilde arttığı ve bunun tanıda çok yararlı olabileceği gösterilmiştir (28).

5. Moleküler Biyolojik 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 o denli değildir. 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 (28-29). Hibridizasyon in situ, katı faz ve sıvı faz hibridizasyon teknikleri şeklinde uygulanmaktadır.

b). Nükleik asit çoğaltma yöntemleri

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 ulaşana dek çoğaltmaktır.

Tablo 4. İn vitro NAÇ yöntemleri (14,18,30-32).

Metod	Kullanılan enzimler
Hedef Çoğaltma	
PCR	Termostabil DNA polimeraz
TAS	Revers Transkriptaz, RNA polimeraz
3SR	Revers Transkriptaz, RNase H, RNA polimeraz
SDA	DNA pol, rest. endonükleaz
Prob çoğaltma	
LCR	Termostabil DNA ligaz
Qbeta replikaz	Qbeta replikaz

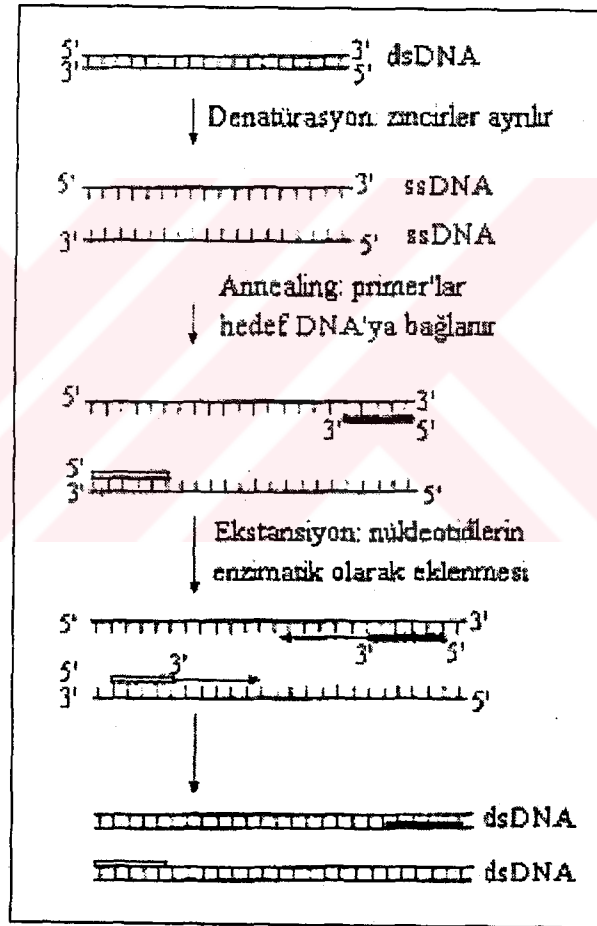
I. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyon)

Polimeraz zincir reaksiyonu DNA polimeraz enzimi kullanılarak özgül nükleik asit segmentinin in vitro koşullarda arka arkaya defalarca sentez edilmesidir. Mullis ve arkadaşları tarafından 1985 yılında geliştirilen PZR yöntemi 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 arsına girmiştir. DNA kopyalarının oluşturulmasında küçük bir çift DNA primer'i ve DNA polimeraz enzimi kullanılır. RNA dizileri, bir transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA'ya çevrilmeleri halinde dolaylı olarak amplifiye edilebilir (24, 30-31).

Üç basamaklı bir işlemin tekrarlanması esasına dayanır: Bir tüp içerisine hedef DNA, primerler, ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz, dNTP'lar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Mg^{++} iyonları, tampon ve su konduktan sonra sıra ile bu üç aşama ard arda tekrarlanarak hedef DNA'nın amplifikasyonu gerçekleşir.

- 1) Örneğin ısıtılması ile çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA haline getirilmesi (denatürasyon),
- 2) Primerlerin tek zincirli hedef DNA'ya bağlanması (annealing)
- 3) Primer'lerin bağlanma olduğu tek zincirli DNA'nın komplementerinin sentezlenmesi başka bir ifadeyle primerlerin uzaması (ekstansiyon) şeklinde gerçekleşmektedir (15,16,18,24).

Şekil 2. PZR yönteminin tematisasyonu.



Bu uzama işleminden sonra, orjinal 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 tanısal amaçla daha sık kullanılmaya başlanmıştır. PZR'ın avantajı, tüm genom yerine sadece primer'e spesifik hedef baz çiftlerini kullanarak spesifik DNA baz çiftlerinin çoğaltılmasıdır. Ayrıca PZR çok hızlı bir metod olup; bir DNA parçası, 3 saat içinde 1 milyon kez kopyalanabilir. 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 (30).

2. Transkripsiyona dayalı amplifikasyon yöntemleri (TAS/3SR)

TAS yönteminin esası; in vitro transkripsiyonla amplifikasyon sağlamaktır. Bu sistemde her siklus iki aşamadan oluşmaktadır. 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. TAS'ın bir modifikasyonu olan Self-sustained sequence replication system (3SR) yönteminde bütün işlemler izotermal koşullarda gerçekleşmektedir. TAS'da uygulanan ısı ile

denatürasyon işlemi yoktur. RN'az enzimi kullanılarak cDNA sentezi esnasında bir yandan da RNA'nın yıkımı gerçekleştirilmektedir. Böylece DNA-RNA hibridizasyonu engellenerek tek iplikli DNA oluşumu sağlanmakta ve cDNA'nın transkripsiyonu oluşmaktadır (30).

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 restriction 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 gerçekleşmektedir (30).

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

1. Ligaz zincir reaksiyonu (LZR) : Ligaz veya DNA ligaz ısıya dayanıklı termostabil bir enzim olup; hedefe bağlanan probları birbirine bağlar. Denatürasyon, annealing ve birleşme (ligasyon) sikluslarından sonra DNA kopyası oluşur. Isı ile denatürasyonla yeni sentezlenen DNA parçası kalıp olarak kullanılır. Bu yöntemde kullanılan ilk primerler daha sonraki primerler için kalıp olarak kullanıldığından, ikinci primerler birinci primerlere tamamen komplementerdir. İlk primerler herhangi bir nedenle hedef moleküle bağlanamazsa primer amplifikasyonu gerçekleşemez. LCR' ın

en önemli avantajları, yüksek derecede spesifik olması ve diğer amplifikasyon teknikleri ile birlikte kullanılabilmesidir. Her aşamada enzim eklenmesi, nonspesifik ürünlerin oluşması ve kontaminasyon kontrol sistemlerinin olmaması dezavantajlarından (31).

2.QBeta replikaz amplifikasyon yöntemi: İlk kez 1988 yılında Prickard ve arkadaşları tarafından tanımlanan bir prob amplifikasyon yöntemidir. Q β replikaz, Q β bakteriyofajının replikasyonunda görev alan bir RNA bağımlı RNA polimeraz enzimidir. Bu enzim kullanılarak RNA problemlerinin kısa süre içinde amplifikasyonu sağlanmaktadır. Çok hızlı olması, büyük miktarda ürün oluşması, deneyin 2-3 saat içinde tamamlanması, izotermal şartlarda gerçekleşmesi, spesifik laboratuvar donanımına gerek duyulmaması avantajıdır. En önemli dezavantajı yanlış pozitifliklere neden olmasıdır (32).

c) Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)

Genomik DNA'nın çok büyük bir molekül olması halinde moleküler düzeyde incelenmesi zorlaşmaktadır. Bu '*restriksiyon endonükleaz*' ları adı verilen bir grup özel bakteriyel enzimin keşfinden sonra kısmen çözülmüştür. Bu 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 (33-34).

d). Baz dizi analizi

Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. 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. İnvitro ortamda dNTP ve ddNTP varlığında DNA polimeraz enzimi ile DNA zincirinin sentezlenmesinin devamı veya sonlanması esasına dayanır. Sentez bir uçtan başlar, dNTP'nin DNA yapısına katılması zincirin uzamasını sağlar. Buna karşın ddNTP'nin DNA yapısına katılması durumunda zincir uzaması durur. Dört ayrı tüpün herbirinde farklı bir ddNTP ve diğer üç dNTPs'ler bulunmaktadır. Her bir tüp içindeki ddNTP'ler radyoaktif bir madde ile işaretlenmiştir. Oluşan farklı uzunluklardaki DNA zincirlerinin okunması otoradyografik olarak yapılmaktadır (35,36).

e). Diğer moleküler yöntemler

Yukardaki yöntemlere ilaveten insertion sequece (IS) primer setlerinin kullanıldığı yöntemler, rastgele seçilmiş bir primer kullanılarak yapılan arbitrarier PZR ve çift primer setinin kullanıldığı nested PZR yöntemleri de çeşitli amaçlarla kullanılabilir. Ayrıca KatG geni ve rpoB genine yönelik primerler kullanılarak izoniazid ve rifampisine dirençli suşlar tesbit edilebilmektedir (37-41).

MATERYAL VE METOD

A). ÖRNEKLER

I. Rutin tanı amacıyla incelenen klinik örnekler : Son dört yıl içinde PZR laboratuvarında çalışılan 1282 balgam, 550 idrar ve 380 steril vücut sıvısı (plevral mayii, torasentez mayii, peritoneal sıvı, parasentez mayi ve beyin omurilik sıvısı) olmak üzere toplam 2212 örneğe ait mikroskopi, kültür ve PZR sonuçları retrospektif olarak değerlendirmeye alındı.

II. NALC-NaOH uygulanmasının PZR'nun duyarlılığına etkisini araştırmada kullanılan örnekler.

a) Klinik örnekler : Çalışmamızda İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut ÖZAL Tıp Merkezinde tüberküloz ön tanısı almış hastalardan alınan ve Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen 147 balgam, 72 idrar ve 52 steril vücut sıvısı (plevral mayii, torasentez mayii, peritoneal sıvı, parasentez mayi ve beyin omurilik sıvısı) olmak üzere toplam 271 örnek incelenmiştir.

. Standart bakteri yoğunlukları : *M. tuberculosis* H₃₇ Rv standart suşundan hazırlanan 10^6 , 10^4 , 10^2 , 10^1 yoğunluktaki bakteri süspansiyonları denendi. Belirtilen bakteri yoğunlukları sağlıklı Tıp Fakültesi öğrencilerinden alınan balgam ve idrar örnekleri içerisinde hazırlandı.

B. KULLANILAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER

a). **TE tamponu:** 10 mM Tris-HCL içinde 1mM EDTA hazırlanır. Bunun için 315.12 mg Tris-HCL 200 ml distile suda iyice çözüldükten sonra çözeltiliye 74.45 mg EDTA eklenir. Maddeler iyice çözüldükten sonra pH 8.0' a ayarlanıp steril edilerek kullanılır.

b). **Tris-base çözeltisi :** 100 mM lük Tris-base çözeltisi için 1210 mg Tris base 100 ml distile suda çözünür. pH 8.0'a ayarlanır ve steril edilerek kullanılır.

c). **Proteinaz K çözeltisi:** Triptirachium Album'den hazırlanan proteinaz K' nın 4 mg'ı (Sigma H 6829) 10 ml Tris-base içinde çözülerek hazırlandı.

d). N-acetyl-L- cystein - Sodyum Hydroxide (NALC-NaOH)

1. 1N NaOH: 40 gr NaOH 1000 ml distile suda çözünerek hazırlandı.

2. Trisodyum sitrat stok solüsyonu : Trisodyum sitrat (5.5 H₂O)'ın 17.6 gm'ı 500 ml distile suda çözülerek hazırlanır. 1 N NaOH ile eşit oranda karıştırılarak steril edilir ve buzdolabında saklanır.

3. NALC-NaOH çözeltisi : Yukardaki karışımın 100 ml'sine içinde 250 mg N-acetyl-L-cystein eklenerek hazırlanır. Günlük olarak tüketilir.

e). 0.067 M Fosfat Tamponu (pH: 6.8)

1. Stok alkali tampon

Na₂HPO₄ (12 H₂O).....11.931 gm

Distile su500 ml

2. Stok asit tamponu

KH₂PO₄ (susuz)4.535 gm

Distile su500 ml

Bir ve iki ayrı ayrı iyice çözüldükten sonra eşit hacimde birbirine karıştırılır. Otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edilir. Kullanıncaya kadar buzdolabında saklanır. Kullanırken pH'nın 6.8 olması önemlidir.

f). TBE Buffer (Tris-Borik asit- EDTA): Stok solüsyon (5x, pH 8.0)

54 gm Tris base

27.5 Borik asit

20 ml 0.5 M EDTA

Tris base ve borik asit belirtilen miktarlarda tartılarak 980 ml distile suda çözülür. Sonra 0.5 M EDTA (pH 8.0)' dan 20 ml eklenir. İyice karıştırılır Oda ısısında saklanır. Presipitat oluşmuş ise kullanılmaz.

0.5 M EDTA'nın hazırlanışı ise 37.22 gm EDTA 2H₂O 160 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözünmesi sağlanır. pH'nın 8.0 olması için NaOH peleti ilave edilir. Otoklavda steril edilerek kullanılır.

g). Etidyum bromür

Etidyum bromür'ün 100 mg'ının 100 ml distile suda, manyetik karıştırıcı üzerinde bir kaç saat karıştırılarak, çözünmesi ile hazırlanır. Renkli şişeye konur ve şişenin etrafı aliminyum foil ile kapatılır. Hazırlanan bu çözeltiden her 100 ml agarozu 50 mikrolitre konulur.

h). Gel loading dye : Kırk miligram bromphenol, 5 ml gliserol, 1.5 ml 0.5 M EDTA ve 4.5 ml distile su olmak üzere total volüm 10 ml hazırlandıktan sonra 500 mikrolitrelik hacimlere bölünerek buzdolabında saklanır.

i). Agarozu jel hazırlanışı: (%1.5'lik): Üç gram agaroz, 200 ml 1x TBE tamponu ile çözülür ve içerisine 100 mikrolitre etidyum bromür ilave edilir.

i). Doymuş Fenol: (Sigma P4557)

j).Kloroform: (Merk C 2431)

k).Absolü alkol: Tekel

l).De iyonize distile su: (Sigma W- 4502. DNAaz RNAaz free)

C- ÖRNEKLERİN İŞLENMESİ

I- Rutin PZR uygulamasında kullanılan örneklerin işlenmesi :

Balgam örneklerine direkt olarak, idrar örneklerine ise santrifüj edildikten sonra dipte kalan çökeltinin üzerine hacminin iki katı kadar NALC-NaOH eklenerek homojenizasyon ve dekontaminasyon yapıldı. Örnekler yirmi dakika oda ısısında bekletildikten sonra üzerine 0.067 M pH'sı 6.8 olan fosfat tamponundan vida kapaklı tüpün alabileceği kadar ilave edildi. Soğutmalı santrifüjde +4°'de 3000 devirde 20 dakika santrifüj edildi. Üst kısım dipte 1.5 ml örnek kalacak şekilde döküldü. Tüp vortekslenerek homojenizasyon sağlandı. Buradan 1 ml ependorf tüpe alınarak DNA izolasyonunda kullanıldı (42). Geri kalan kısım Löwenstein -Jensen kültür ortamına ekim ve boyamada kullanıldı.

II. NALC-NaOH ile homojenizasyonun PZR duyarlılığına etkisini belirlemek amacıyla yapılan işlemler:

1. Örneklerin ekstraksiyon aşamasına getirilmesi:

a). NALC-NaOH uygulanmadan homojenizasyon : Balgam örnekleri vida kapaklı tüplere konulduktan sonra üzerine 1ml steril distile su eklenerek 10 saniye vorteksle homojenize edildi. Homojen hale gelen örneğin 1 ml'si ependorf tüpe alınarak DNA izolasyonunda kullanıldı.

b). NALC-NaOH uygulanması : 1 a' da bahsedildiği gibi homojenize edilen örneğin kalan kısmına miktarı kadar NALC-NaOH çözeltisi ilave edilerek I. aşamada bahsedildiği gibi işlendi.

İdrar ve steril vücut sıvıları ise vida kapaklı tüplerde santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı. Dipte kalan örnekten 1 ml ependorf tüpüne alınarak DNA izolasyonu yapıldı. Örneğin kalan kısmı NALC-NaOH ile işlendikten sonra DNA izolasyonu, kültür ve mikroskopi'de kullanıldı. (Steril vücut sıvıları bu araştırmaya özgü olarak incelenen klinik örnek sayısını artırmak amacıyla idrar gibi işlenmiştir).

Standart bakteri süspansiyonları sağlıklı tıp fakültesi öğrencilerinden alınan balgam ve idrar örneklerine ilave edildi ve belirli yoğunlukta iki seri halinde hazırlandı. Bir serisi NALC-NaOH ile işlendikten sonra, diğer seri ise direkt olarak DNA izolasyonunda kullanıldı.

2- DNA izolasyonu

a). Yukarda bahsedilen yöntemlerle homojenizasyon ve yoğunlaştırma işlemlerinden geçirilen örneklerin 1 ml'si ependorf tüpüne alınarak 13 000 xg 10 dakika santrifüj edildi.

b). Üst kısım dipte 100 µl kalacak şekilde içinde dezenfektan bulunan bir kaba döküldükten sonra, proteinaz K çözeltisinden (400µg/ml) 100 µl ilave edildi. Böylece örnekle beraber nihai konsantrasyon 200µgm/ml olmaktadır.

c). Bu karışım 5 saniye vortekslendikten sonra 56°C'lik su banyosunda bir gece bekletildi.

d). Bir saat - 30°C 'de bekletildikten sonra; 10 dakika kaynatıldı.

- e). Oda ısısına geldikten sonra, üzerine 450µl soğukta bekletilmiş satüre phenol ilave edildi vortekslendi ve 13 000 xg 'de 3 dakika santrifüj edildi.
- f). Süpernatant yeni bir tüpe alındıktan sonra yukardaki phenol aşaması tekrar edildi.
- g). Süpernatant yeni bir tüpe alındı. Üzerine soğukta beklemiş chloroform'dan 450µl eklendi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra 13 000 xg' de 3 dakika santrifüj edildi.
- h). Süpernatant yeni bir tüpe alındı; üzerine 500µl soğukta beklemiş %100'lük ethanol ilave edildi, vortekslendi, (5 dakika oda ısısında bekledikten sonra) 13 000 xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
- ı). Üst sıvı tamamen döküldü. Pellet üzerine %70'lik soğukta beklemiş ethanolden 500µl ilave edilerek karıştırılmadan 13 000 xg 'de 5 dakika santrifüj edildi.
- i). Üst kısım tamamen döküldükten sonra; tüp ters çevrilerek kuruması sağlandı.
- j). Kuruduktan sonra pellet üzerine DNaz ve RNaz içermeyen steril distile sudan 25 µl konuldu ve iyice karışması için pipetaj yapıldı. Amplifikasyona hazır aşamasına getirildi. Bu şekli ile -20°C de uzun süre saklanabilmektedir.

3- Amplifikasyon: *M.tuberculosis* kompleksi genomunda bulunan 1359 baz çifti uzunluğundaki IS6110 gen bölgesinin üzerindeki 123 baz çiftlik bölgeyi amplifiye eden T₄ (CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG) ve T₅ (CTC GTC CAG GGC CGC TTC GG) primerleri kullanılarak standar koşullarda amplifikasyon sağlandı (18).

2X PZR Tamponunun hazırlanışı:

1. 10X PZR buffer (Panotaq enzime özgü)200µl
2. 10X dNTP mix (2.5 mM herbir nükleotid).....200µl
3. 10X MgCl₂ (10 mM).....200 µl
4. 10X BSA (1mg/ml)200 µl
5. Distile su200 µl

Toplam 50 µl olan amplifikasyon tüpünün içeriği; 5 µl ekstraksiyon ürünü, 25 µl 2X PZR tamponu, 0.5 µl T₄ (20 pmol), 0.5 µl T₅ (20 pmol), 1.5 U (0.3µl) Taq DNA polymerase

(Panotaq USA) ve 18.7 µl distile sudan oluşmaktadır. Amplifikasyon otomatik thermal cyclers (PTC-200. Peltier Thermal) ile

1. 94 °C 4 dakika denaturation

2. 94° C 2 dakika denaturation

56° C 3 dakika annealing

72° C 2 dakika extension

İkinci aşama 35 kez tekrar edilir.

3. 4° C'de saklanır.

4 - Amplifikasyon sonucunun gözlenmesi: Amplifikasyon ürünü brom fenol mavisi içinde 3/4 oranında seğreltildi. Bu karışımın 6 µl'si, içinde etidyum bromür bulunan % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. UV ışık altında DNA size marker (QX 174 digested with Hae III) ve kontroller (pozitif ve negatif) yardımıyla oluşan bantların değerlendirilmesi yapılmıştır.

D- İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME : Bulguların değerlendirilmesinde Ki-Kare testi ve Fisher'in Kesin Ki- Kare test kullanılmıştır.

BULGULAR

I. Son dört yıl içinde rutin tanı amacıyla kullanılan PZR yöntemiyle incelenen 2212 örneğine ait bulgular : Toplam 1282 balgam örneğinin 191'inde (% 15) ARB, 153'ünde (% 12) kültür, 415'inde (%32) ise PZR pozitif bulundu (Tablo 5).

Tablo 5. Toplam 1282 balgam örneğine ait sonuçların dağılımı

		ARB		
		+	-	TOPLAM
KÜLTÜR	+	153	47	200
	-	38	1044	1082
TOPLAM		191	1091	1282
PZR	+	166	249	415
	-	25	842	867
TOPLAM		191	1091	1282

İdrar örneklerinin incelenmesinde ARB pozitifliği % 15, kültür pozitifliği % 10, PZR pozitifliği ise % 25 (Tablo 6).

Tablo 6. Toplam 540 idrar örneğine ait sonuçların dağılımı

		ARB		
		+	-	
KÜLTÜR	+	53	20	73
	-	28	439	467
TOPLAM		81	459	540
PZR	+	57	79	136
	-	24	380	404
TOPLAM		81	459	540

Steril vücut sıvısı olarak toplam 380 örnek incelenmiş; bunların 42'sinde (% 11) ARB, 44'ünde (% 12) kültür ve 88'inde (% 23) PZR pozitif bulunmuştur (Tablo 7).

Tablo 7. Toplam 380 steril vücut sıvısı sonuçlarının dağılımı

		ARB		
		+	-	TOPLAM
KÜLTÜR	+	26	18	44
	-	16	320	336
TOPLAM		42	338	380
PZR	+	34	54	88
	-	8	284	292
TOPLAM		42	338	380

Genel bir değerlendirme yapıldığında toplam 2212 klinik örneğin 314'ünde (% 14) ARB, 317'sinde (% 14) kültür ve 639'unda (% 29) PZR yöntemiyle pozitif sonuç

alınmıştır (Tablo 8). Örnek ayrımı yapılmaksızın toplam ARB pozitif olan 314 örneğin 257'sinde (% 83), kültüründe *M. tuberculosis* üretilen örneklerin ise % 100'ünde PZR pozitif bulunmuştur.

Tablo 8. Toplam 2212 örnekteki ARB, kültür ve PZR sonuçları

YÖNTEM	POZİTİF
	Sayı (%)
ARB	314 (% 14.2)
KÜLTÜR	317 (% 14.3)
PZR	639 (% 29)

II. NALC-NaOH uygulamasının PZR duyarlılığı üzerine etkisi ile ilgili denemelerden elde edilen bulgular:

Çalışmamızda Turgut ÖZAL Tıp Merkezinde tüberküloz ön tanısı almış hastalardan alınan 147 balgam, 72 idrar ve 52 steril vücut sıvısı ARB, kültür (Lowenstein jensen), NALC-NaOH uygulanmadan PZR ve NALC-NaOH uygulanması sonucu PZR yöntemleriyle *M. tuberculosis* yönünden incelendi.

Balgam örneklerinin 41'inde (% 28) ARB (+), kalan 106'sında (% 72) negatifti. Bu örneklerden NALC-NaOH ile muamele edilmeden önce ve sonra hazırlanan homojenatlardan elde edilen DNA ekstraksiyon ürünlerine uygulanan PZR yöntemiyle alınan sonuçlar Tablo 9'da görülmektedir.

Tablo 9. İncelemeye alınan balgam örneklerine ait mikroskopi ve PZR sonuçlarının dağılımı

		+	-	Toplam
*Mikroskopi (1)	+	39	5	44
NALC-NaOH uygulanmadan PZR (2)	-	2	101	103
Toplam		41	106	147
**Mikroskopi (1)	+	17	0	17
NALC-NaOH uygulandıktan sonra PZR (3)	-	24	106	130
Toplam		41	106	147
***NALC-NaOH uygulanmadan PZR (2)	+	20	2	22
NALC-NaOH uygulandıktan sonra PZR (3)	-	24	101	125
Toplam		44	103	147

*Sütundakiler 1'e , satırdakiler 2'ye aittir. **Sütundakiler 1'e, satırdakiler 3'e aittir. ***Sütundakiler 2'ye, satırdakiler 3'e aittir.

Lowenstein jensen kültür ortamında balgam örneklerinin 23'ünde mikobakteri üretildi. Kültürde üreyen mikobakteriler, *M. tuberculosis* kompleksine özgü primerlerle amplifikasyona alınarak tüberküloz basili olduklarına karar verildi. Bu örneklerin 12'sinde ARB ve PZR her iki yöntemle pozitif, 8'inde ARB ve NALC-NaOH uygulanmadan yapılan (homojenizasyon yöntemi) PZR pozitif , NALC-NaOH uygulandıktan sonra yapılan (teksif yöntemi) PZR negatif, 3 tanesinde ise ARB ve teksiften sonra yapılan PZR pozitif, NALC-NaOH uygulanmadan yapılan PZR negatifti.

İncelenen 72 idrar örneğinin 16'sinde (% 22) aside-alkole dirençli basil görüldü. Bu örneklerle yapılan PZR sonuçları Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. İncelemeye alınan idrar örneklerine ait mikroskopi ve PCR sonuçlarının dağılımı

		+	-	Toplam
*Mikroskopi (1)	+	15	8	23
NALC-NaOH uygulanmadan PZR (2)	-	1	48	49
Toplam		16	56	72
**Mikroskopi (1)	+	5	1	6
NALC-NaOH uygulandıktan sonra PZR (3)	-	11	56	66
Toplam		16	55	72
***NALC-NaOH uygulanmadan PZR (2)	+	11	1	12
NALC-NaOH uygulandıktan sonra PZR (3)	-	12	48	60
Toplam		23	49	72

*Sütundaki ler 1'e, satırdakiler 2'ye aittir. **Sütundakiler 1'e, satırdakiler 3'e aittir. ***Sütundakiler 2'ye, satırdakiler 3'e aittir.

Lowenstein jensen kültür ortamında idrar örneklerinin 6'sında (% 9) üreme olmuştur . Bu örneklerin tamamında ARB ve NALC-NaOH ile işlenmeden yapılan PZR pozitif, NALC-NaOH uygulandıktan sonra yapılan PZR negatif bulunmuştur.

Bu çalışmaya özgü olarak NALC-NaOH ile işlenmeden ve işlendikten sonra incelemeye alınan 52 steril vücut sıvısının 9'unda (%17) aside dirençli basil görülmüştür. Bu örneklere NALC-NaOH ile homojenizasyon uygulanması halinde PZR yöntemiyle alınan pozitiflik oranının anlamlı ölçüde azaldığı görülmüştür (Tablo 11).

Tablo 11. İncelemeye alınan steril vücut sıvılarına ait mikroskopi ve PZR sonuçlarının dağılımı

		+	-	Toplam
*Mikroskopi (1)	+	8	3	11
NALC-NaOH uygulanmadan PZR (2)	-	1	40	41
Toplam		9	43	52
**Mikroskopi (1)	+	1	0	1
NALC-NaOH uygulandıktan sonra PZR (3)	-	8	43	51
Toplam		9	43	52
***NALC-NaOH uygulanmadan PZR (2)	+	4	0	1
NALC-NaOH uygulandıktan sonra PZR (3)	-	7	41	48
Toplam		11	41	52

*Sütundakiler 1'e, satırdakiler 2'ye aittir. **Sütundakiler 1'e, satırdakiler 3'e aittir. *** Sütundakiler 2'ye, satırdakiler 3'e aittir.

Lowenstein jensen kültür ortamında pozitif sonuç alınan 2 (% 4) steril vücut sıvısında ARB ve NALC-NaOH uygulanmadan yapılan PZR pozitif iken, NALC-NaOH uygulamasından sonra yapılan PZR negatif bulunmuştur.

Bütün klinik örnekler birlikte değerlendirildiğinde toplam 66 örnekte ARB pozitif bulunmuştur. ARB saptanan bu örnekler göre PZR yönteminin duyarlılığı ve NALC-NaOH'ın buna etkisi Tablo 12'de görülmektedir.

Tablo 12. ARB (+) örneklerde NALC-NaOH aşamasının PZR yönteminin duyarlılığına etkisi.

Klinik Örnek	PZR yönteminin duyarlılığı (%)		
	NALC-NaOH ile işlenmemiş	NALC-NaOH ile işlenmiş	P
Balgam	39/41 (% 95)	17/41 (% 41)	<0.05
İdrar	15/16 (% 93)	5/16 (% 31)	<0.05
Steril vücut sıvısı	8/9 (% 89)	1/9 (% 11)	<0.05
Toplam	62/66 (% 94)	23/66 (% 35)	<0.05

Kültür sonucu pozitif çıkan toplam 31 klinik örneğin 28 (% 90)' inde NALC-NaOH ile işleme alınmadan yapılan DNA ekstraksiyonunu takiben pozitif sonuç alınırken ; NALC-NaOH ile işlendikten sonra yapılan DNA ekstraksiyonunu takiben alınan pozitiflik 15 (% 48)'e inmektedir. İki oran arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Standart bakteri yoğunlukları ile yapılan 14 denemeye ait bulgular tablo 12'de görülmektedir. NALC-NaOH uygulanmadan önce yapılan PZR yöntemi ile 10^6 bakteri varlığında % 100, 10^4 bakteri varlığında % 100, 10^2 bakteri varlığında % 71 ve 10^1 bakteri varlığında ise % 21 pozitiflik alınırken ; örneklerin NALC-NaOH ile işleme alınmasından sonra yapılan PZR yöntemi ile bu durum 10^6 bakteri için % 93, 10^4 bakteri için % 79, 10^2 bakteri için % 21, 10^1 bakteri için % 7 olarak bulunmuştur.

Tablo 12. Standart bakteri yoğunluklarına uygulanan NALC-NaOH aşamasının PZR duyarlılığına etkisi.

	10^6		10^4		10^2		10^1	
	+	-	+	-	+	-	+	-
A	14	0	14	0	10	4	3	11
B	13	1	11	3	3	11	1	13

A). NALC-NaOH uygulanmadan PZR B). NALC-NaOH uygulandıktan sonra PZR

TARTIŞMA

Tüberküloz hastalarının erken tanı ve tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Bu nedenle tüberküloza yakalandığı düşünülen hastaların tanılarını kanıtlayacak , duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren , uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir gereksinimdir.

Ziehl -Neelsen boyama tekniği ile basilin mikroskopta görülmesi ve besiyerinde üretilerek tanımlanması kullanılan en yaygın yöntemlerdir. Ancak her iki yöntemin de tanı açısından önemli eksiklikleri vardır. Mikroskopide pozitif sonuç alınabilmesi için örneğin mililitresinde $5 \times 10^3 - 10^4$ basil bulunması gereklidir. Kültür ile örnekteki birkaç canlı bakterinin (10-100 basil/ml) gösterilmesi mümkündür, ancak kolonilerin gözle görülebilmesi 1-2 ay gibi oldukça uzun zaman gerektirmektedir (24,28,43). Tüberküloz basilinin varlığını kısa sürede saptamaya yönelik , duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek çeşitli moleküler yöntemler denenmektedir (24,28). Bu yöntemlerden birisi de nükleik ait çoğaltma tekniklerinden olan polimeraz zincir reaksiyonudur.

Polimeraz zincir reaksiyonu, mikroskop ve kültür yöntemiyle saptanması zor ya da olanaksız olan herhangi bir nümunedeki tüberküloz basilinin tesbitinde en fazla umut veren yöntemlerin başında gelmektedir. Ancak yanlış negatiflik ve hatalı pozitiflikler yöntemin en önemli dezavantajlarıdır. Hatalı pozitiflikler bir önceki deney sırasında amplifiye edilen ve ortamda kalan ampikon veya başka bir örneğe ait mikobakteriyel DNA'nın amplifikasyon tüpüne karışmasıyla meydana gelmektedir (44,45).

Diğer taraftan klinik örnekler içerisinde bulunan oldukça farklı komponentler, enzimatik reaksiyonlarda inhibitör etki yaparak hatalı negatif sonuçların alınmasına

neden olabilmektedir. Eğer örnek içerisinde hedef molekül yeteri kadar fazla ise, örneğin dilüsyonu ile inhibitörlerin etkisi elimine edilebilir . Biyolojik sıvılarda $0.8\mu\text{M}$ hemoglobin ve onun metabolik ürünlerinin DNA polimeraz üzerine inhibitör etkisinin olduğu bilinmektedir. Deterjanlar birçok enzim için inhibitördür . BOS idrar ve balgam Taq DNA polimerazı inhibe edici maddeler bulundurabilmektedir. Balgamda bulunan glikoproteinlerin bir komponenti olan asidik polisakkaritler, DNA polimeraz inhibitörü olarak bilinmektedir. Ayrıca çok yaygın olarak ekstraksiyon aşamasında kullanılan EDTA, Sodium Dodesyl Sülfat (SDS) ve guanidyum HCl'ün amplifikasyon enzimleri üzerine inhibitör etkileri vardır. Böyle moleküller hücre membranını parçalamak veya nükleazları inaktive etmek amacıyla kullanıldıklarında, bunları uzaklaştırmak veya nötralize etmek için ilave işlemlere gereksinim vardır. Yine ekstraksiyon aşamasında kullanılan fenol ve kloroformun'da inhibitör etkisinin ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir (42,43,45).

DNA izolasyonunun yetersiz oluşu, inhibitörlerin uzaklaştırılmamış olması, hedef DNA'nın stabilitesinin korunamamış olması, amplifikasyon koşullarının yetersiz oluşu, eldivendeki pudranın amplifikasyon tüpüne karışması ve amplifikasyon sonucunu gözlemede duyarlılığı düşük yöntemlerin kullanılması da yanlış negatifliklere yol açabilmektedir. (42,43,46).

Polimeraz zincir reaksiyon yöntemi yaygın olarak denenmiş olmasına rağmen henüz özgüllük ve duyarlılığı arzulanan düzeye getirilememiştir. Bunun olabilmesi için amplifikasyon koşullarının standardizasyonu en önemli faktördür. Amplifikasyon tüpüne konulan hedef molekül istenilen nitelikte olsa bile, reaksiyon tüpündeki MgCl_2 , dNTP, primerler, tampon ve enzim miktarı gibi diğer komponentlerin konsantrasyonları da

oldukça önemlidir. Ayrıca amplifikasyonda uygulanan *denaturation*, *annealing* ve *extension* sıcaklık ve sürelerinin her laboratuvar koşulları ve çalışılacak mikroorganizmaya göre optimize edilmesi gerekmektedir. Bütün bu olaylar farklı araştırmacılar tarafından kullanılan PZR ile değişik sonuçların alınmasını açıklamaktadır.

Yaptığımız çalışmada ARB pozitif 314 örneğin % 83'ünde, kültürde *M. tuberculosis* üretilen örneklerin ise tamamında PZR pozitif bulunmuştur. Literatürde bu testin duyarlılığının % 67-100 arasında değiştiği bildirilmiştir (44,46-52). Yedi laboratuvar sonuçlarının değerlendirildiği bir çalışmada hatalı pozitifliğin % 3-20 arasında değiştiği ve hatta bir laboratuvarda bu değer % 77 gibi oldukça yüksek rakama ulaştığı not edilmiştir (46).

Eisenach ve ark. (53) balgam örnekleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada kültür pozitif 44 örneğin 43'ünde (% 98) PZR ile pozitif sonuç alırken; tüberküloz olmayan 26 örneğin tamamının PZR'nunu negatif bulmuşlardır.

Nolte ve ark. (49) balgam örnekleri ile yaptıkları araştırmada ARB pozitifliğinin derecesine göre PZR duyarlılığının % 67-99 arasında değiştiğini kaydetmişlerdir. Aynı araştırmacılar sonuç gözlemede agaroz jel elektroforezini kullandıklarında testin duyarlılığını % 85, hibridizasyon kullandıklarında ise % 91 olarak saptamışlardır.

Diğer bir çalışmada klinik olarak tüberküloz tanısı konulan balgam örneklerinde PZR'nun duyarlılığı ARB pozitif örnekler için % 100, ARB negatif örnekler için % 73 olarak belirlenmiştir (54). Bennedsen ve ark. (10) PZR yönteminin balgam örnekleri üzerindeki duyarlılığını % 82, özgüllüğünü % 96 olarak saptamışlardır. Kültür pozitif olup, ARB negatif olan örneklerde duyarlılık % 60.9, kültür ve ARB'si pozitif olanlarda

duyarlılık % 91 olarak belirlenmiştir. Choi ve ark. (55) PZR yöntemiyle yaptıkları çalışmada kültür pozitif örneklerin % 93'ünde pozitif sonuç almışlardır.

Beige ve ark. (8) yaptıkları çalışmada ARB pozitif örneklerin % 100'ünde, kültür pozitiflerin % 94'ünde , tüberküloz olmayanların ise % 17'sinde PZR ile pozitif sonuç almışlardır. PZR yöntemiyle balgam örnekleri üzerinde yapılan diğer bir çalışmada kültüründe *M. tuberculosis* üretilmiş olan 80 örneğin 67'sinde (% 84) pozitif sonuç alınmış. Aynı çalışmada ARB pozitifliğinin derecesi ile PZR'm duyarlılığı arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (56).

Amplicor PCR yönteminin kullanıldığı bir araştırmada kültür sonuçlarıyla kıyaslandığında testin duyarlılığı % 83, özgüllüğü ise % 97 olarak bulunmuştur (57). Aynı yöntemin kullanıldığı diğer bir çalışmada ARB pozitif örneklerin % 91.7'sinde, kültür pozitif örneklerin % 68'inde, ARB negatif örneklerin % 46.1'inde PZR pozitif sonuç vermiştir (9). AMPLICOR PCR sistemiyle pozitif olan 31 örneğin 20'sinde (% 65) kültür pozitif, negatif örneklerin ise tamamında kültür negatif olarak saptanmıştır (58).

PZR ve Gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test (MTD) yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir araştırmada, PZR yönteminin duyarlılığı %81, özgüllüğü % 94; MTD'nin ise sırasıyla % 90.6 ve % 95 olarak kaydedilmiştir. Bu çalışmada ARB ve kültür negatif olan 82 örneğin 5'inde (% 6), ARB ve kültür pozitif 22 örneğin 21'inde (% 95), ARB negatif kültür pozitif 5 örneğin 5'inde (%100) PZR ile pozitiflik gözlenmiştir (59). MTD'nin kullanıldığı diğer bir çalışmada toplam 119 balgam örneği incelenmiş; testin duyarlılığı % 82, özgüllüğü % 99 olarak bildirilmiştir.

Aynı çalışmada kültürün duyarlılığı % 88, özgüllüğü % 100, mikroskopinin ise duyarlılığı % 53 özgüllüğü % 99.8 olarak kaydedilmiştir (60).

Ichiyoma ve ark (61). Roche AMPLICOR MTB yöntemi ile ARB pozitif örneklerin % 94.7'sinde, klinik olarak tüberküloz olduğu halde ARB negatif örneklerin ise % 55'inde pozitiflik gözlemişlerdir .

Bu çalışmada incelenen toplam 2212 klinik örneğe ait mikroskopi, kültür ve PZR sonuçları birlikte değerlendirildiğinde mikroskopi ve kültür pozitifliğinin birbirine yakın olduğunu; buna karşın PZR pozitifliğinin bunlardan en az iki kat fazla olduğu görülmüştür. Bu beklenen bir bulgudur. Bilindiği gibi bu testlerde pozitif sonuç alınabilmesi için örneğin ml'sinde bulunması gereken basil sayısı PZR'dan kültür ve mikroskopiye doğru gidildikçe artmaktadır.

Çalışmamızda ARB pozitifliğine göre PZR duyarlılığı balgamda % 87, idrarda % 70 , steril vücut sıvılarında % 80 olarak saptanmıştır. Kültüründe *M. tuberculosis* üretilen örneklerin tamamında PZR ile pozitif sonuç alınmıştır. ARB ve kültür negatif örneklerin % 15'inde PZR sonucu pozitif bulunmuştur. ARB ve kültür negatif olduğu halde PZR'nu pozitif olan örneklerin alındığı hastalara ait klinik verilere ulaşamadığı için testin özgüllüğü hakkında kesin bir yorum yapılamamaktadır. Ancak PZR yönteminin örnekte bulunan mikroskop veya kültürün saptayamayacağı sayıdaki basilleri de amplifiye ederek pozitif sonuç vereceği göz önüne alındığında, bu sonuçların en azından bir kaçının tüberküloz hastasına ait olacağı düşünülebilir .

PZR yönteminin özellikle steril vücut sıvılarında (% 80) ve idrar örneklerinde (% 70) vermiş olduğu pozitif sonuçların tanısal değeri vardır. Bilindiği gibi bu örneklerde çoğu defa klinik olarak tüberküloz tanısı konulduğu halde hem mikroskopi hemde kültür

negatif olmakta veyahutta yalnızca mikroskopi pozitif çıkmaktadır. Klinik tanı yöntemlerinin duyarlılığının düşük olduğu bu tip örneklerde klinik verileri destekleyen PZR pozitifliğinin değeri tartışılmazdır.

Diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da PZR yönteminin duyarlılığı ARB ve kültür pozitifliği yanında, klinik örneklere göre de değişik oranlarda bulunmuştur. BOS örnekleri ile yapılan bir çalışmada MTD testi kullanılarak klinik ve kültür verilerine göre tüberküloz menenjit tanısı konulan 24 örneğin % 33'ünde pozitif sonuç alınırken; tüberküloz olmayan 60 BOS örneğinin tamamında negatif sonuç alınmıştır (62). Gen-probe amplified *M. tuberculosis* direct test ile yapılan bir çalışmada respiratuar örneklerin % 83-94.7'sinde , nonrespiratuar örneklerin ise % 83- 86.8'inde mikobakteri varlığı kanıtlanmıştır (63).

NALC-NaOH ile yaptığımız denemelerde; örneklerin bu madde ile işlenmesi halinde PZR yönteminin duyarlılığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmalar kaydedilmiştir. NALC-NaOH'ın bu etkinliği klinik örneklerde olduğu gibi standart bakteri süspansiyonları üzerinde yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir. Mililitresinde 10^2 basil bulunan örnekle yapılan 14 ayrı denemenin, 10'unda NALC-NaOH uygulamadan yapılan PZR ile pozitif (% 71.4) sonuç alınırken; bu madde uygulandıktan sonraki pozitiflik % 21.4'e düşmektedir.

Yapılan çalışmalarda balgam örneklerinin dekontaminasyonu, homojenizasyon ve konsantrasyonunda NALC-NaOH, NaOH, sodium lauryl sulfate-NaOH ve sputolysin-NaOH protokolleri uygulandığında, *M. tuberculosis*'e özgü PZR duyarlılığında % 3-52 oranında azalma kaydedilmiştir (49,64,65).

NALC-NaOH yalnızca PZR duyarlılığında değil, kültürde bakteri izolasyonunda da olumsuz etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada örneklerin NALC-NaOH, Tween 80 ve C₁₈ - Carboxyproplbetaine ile işlenmesinin kültür sonuçlarına etkisi araştırılmış ve farklı sonuçlar kaydedilmiştir (66,67,68). Thornton ve ark (67) en fazla inhibitör etkinin NALC-NaOH'e bağlı olarak geliştiğini ve bu madde ile işlenmiş örneklerin ancak % 20'sinde basil üretilirken; Tween 80'e dayalı homojenizasyon yöntemleri ile işlenen örneklerde % 58, C₁₈ -Carboxyproplbetaine ile işlenen örneklerde % 86 oranında kültür pozitifliği saptamışlardır.

Örnek işlemede kullanılan yöntem ve maddelerin inhibitör etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla birçok araştırma yapılmıştır. Wilson ve ark (69) örnek hazırlamada chatrope-silica metodunu kullandıklarında PZR yönteminin duyarlılığını % 75 , özgülüğünü % 100 olarak saptamışlardır. Aynı araştırmacılar kloroform metodunu kullandıkları zaman yöntemin duyarlılığını % 92, özgülüğünü ise % 99 olarak bulmuşlardır (69). Noordhoek ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada DNA izolasyonunda ve purifikasyonunda farklı yöntemlerin kullanıldığı yedi laboratuvarın sonuçlarını değerlendirmişler. Bakteriyel lizis ve DNA purifikasyonunda kullanılan yöntemlerin farklılığına göre testin duyarlılık ve özgülüğünün önemli ölçüde değiştiğini göstermişlerdir (46).

Bu çalışmamızda NALC-NaOH'ın PZR yönteminin üzerinde inhibitör etkisinden kaçınmak amacıyla; balgam örneklerinin homojenizasyonunda vorteks yöntemi kullanılmış ve sonuçta PZR'nun duyarlılığında anlamlı derecede artış gözlenmiştir. Buradan hareketle balgam gibi homojenizasyon gerektiren tüm klinik örneklerin dekontaminasyondan önce araştırmada kullandığımız, uygulaması kolay vorteks

yöntemiyle homojenize edildikten sonra DNA izolasyonuna geçilmesinin yararlı olacağı kanısındayız. Ayrıca idrar gibi homojenizasyona gerektirmeyen örneklerin çökeltilerine dekontaminasyon uygulanmadan DNA izolasyonuna geçilmesi PZR'nin duyarlılığını artıracaktır.



SONUÇLAR

1. Dört yıl süreyle incelenen 2212 klinik örneğin % 14.2'sinde mikroskopi, % 14.3'ünde kültür ve % 29'unda PZR pozitifliği vardır.
2. ARB pozitifliğine göre PZR yönteminin duyarlılığı balgam örnekleri için % 87, idrar için % 70 ve steril vücut sıvıları için % 80 olarak saptanmıştır.
3. Kültürde *M. tuberculosis* üretilen örneklerin tamamında PZR pozitif bulunmuştur.
4. Örneklerin homojenizasyon ve dekontaminasyonunda kullanılan NALC-NaOH PZR'nun duyarlılığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmaya neden olmuştur.
5. NALC-NaOH'ın bu etkisi hem klinik örneklerde hem de standart bakteri yoğunlukları üzerinde yapılan denemelerde gözlenmiştir. NALC-NaOH muamele edilmeden yapılan PZR denemesinde ARB pozitif örneklerin % 94'ünde pozitif sonuç alınırken; bu madde ile işlendikten sonra pozitiflik % 35'e inmiştir. Mililitresinde 10^2 bakteri bulunan örnekle yaptığımız 14 ayrı denemede NALC-NaOH 'ın deneye girmesi halinde pozitiflik oranı % 71'den % 21'e inmektedir.
6. Bütün bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde;
 - a). Polimeraz zincir reaksiyon yöntemi özellikle mikroskopisi ve kültürü negatif çıkan ve klinik olarak tüberküloz şüphesi veren hastaların tanısında yardımcı bir test olarak kullanılabilir.
 - b). Bu testin gerekliliği özellikle steril vücut sıvısı ve idrar gibi örneklerde daha da artmaktadır.
 - c). Ancak testin duyarlılığını artırmak için klinik örnekler NALC-NaOH ile işleme alınmadan önce DNA ekstraksiyonuna tabi tutulmalıdır.

ÖZET

Tüberkülozun erken tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) yönteminin değerini ortaya koymak ve klinik örneklerin homojenizasyonu ve dekontaminasyonunda kullanılan N-acetyl-L-cystein-NaOH (NALC-NaOH) aşamasının , PZR'nun duyarlılığı üzerine olumsuz etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

Son dört yıl içinde tüberküloz ön tanısı alan 1282 balgam, 550 idrar ve 380 steril vücut sıvısı olmak üzere toplam 2212 örneğe ait mikroskopi, kültür ve PZR sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca Turgut ÖZAL Tıp Merkezinde tüberküloz ön tanısı almış hastalardan alınan 147 balgam, 72 idrar ve 52 steril vücut sıvısı olarak üzere toplam 271 klinik örnek ve *M. tuberculosis* H₃₇Rv standart suşundan hazırlanan 10⁶ , 10⁴ , 10² , 10¹ yoğunluktaki bakteri süspansiyonlarında NALC-NaOH uygulanmasının PZR yönteminin duyarlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

İncelenen 1282 balgam örneğinin % 15'inde ARB, % 12'sinde kültür , % 32'sinde ise PZR pozitif bulunmuştur. İdrar örneklerinde bu oran sırasıyla % 15, %10 ve % 25 olarak tesbit edilmiştir. Steril vücut sıvılarının % 11'inde ARB , % 12'sinde kültür ve % 23'ünde PZR pozitif olarak saptanmıştır. Genel bir değerlendirme yapıldığında 2212 klinik örneğin % 14.1'inde ARB, % 14.3'ünde kültür ve % 29'unda PZR pozitif bulunmuştur. ARB pozitifliğine göre PZR'nun duyarlılığı balgam için % 87, idrar için % 70 ve steril vücut sıvıları için % 80 olarak saptanmıştır.

NALC-NaOH uygulamasının PZR duyarlılığına etkisi ile ilgili denemelerde NALC-NaOH ile işlenmemiş balgam örneklerinde PZR duyarlılığı % 95, NALC-NaOH ile işlenenlerde ise % 41 olarak bulunmuştur. İdrar örneklerinde bu oran sırasıyla % 93 ve % 31, steril vücut sıvılarında ise % 89 ve % 11 olarak belirlenmiştir. Standart

bakteri yoğunlukları ile yapılan denemelerde NALC-NaOH ile işleme almanın PZR duyarlılığını özellikle düşük bakteri yoğunluklarında önemli derecede azalttığı gözlenmiştir.



SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the value of PCR method in early diagnosis of tuberculosis and determine the effect of NALC-NaOH on PCR sensitivity.

During the last four years, a total of 2212 samples (1282 sputa, 550 urines and 380 sterile body fluids) were retrospectively evaluated with the results of direct acid fast stain (AFS), culture and PCR methods. Moreover 271 clinical specimens (147 sputa, 72 urines and 52 body fluids) from patient suspected with tuberculosis and bacterial suspension prepared from *M. tuberculosis* H37RV standard strain were analysed for the effect of NALC-NaOH on sensitivity of PCR.

Of 1282 sputa 15% were positive for AFB stain, 12% for culture and 32% for PCR. For urine samples, these values were 15%, 10% and 15% respectively. In regard to body fluids, the positivity rates were 11%, 12% and 23% in the sequence mentioned above. In generally AFB were seen in 14.1% they were isolated in 14.3% and PCR yielded positive results in 29% of clinical specimens.

The sensitivities of PCR according to the results of direct acid fast stain were 87% in sputa samples 70% in urine samples and 80% in body fluid samples. PCR sensitivities were decreased in clinical samples undergoing NALC-NaOH processing as compared to non-processed samples. The values were 93%, 41% for sputum samples, 93%, 31% for urines and 89%, 11% for body fluids in NALC-NaOH non processed and processed samples, respectively. The similar decline in PCR sensitivity was observed in suspensions of standard *M.tuberculosis* after treatment with NALC-NaOH.

KAYNAKLAR

1. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. 9. Baskı. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 1996, s.330-358.
2. Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu. Topçu AW, Doğanay M. (eds). İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevi, Bursa, 1996, s. 396-428.
3. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. Jawetz Melnick and Adelberg's. Medical Microbiology 20th. ed. Prentice-Hall International Inc. Printed in the United States of America. Mycobacteria, 1995, pp. 263-272.
4. 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: 1137-1144.
5. Kılıçturgay K. Klinik Mikrobiyoloji. Güneş & Nobel Tıp Kitabevleri , Bursa, 1994, s. 65-75.
6. Kasımoğlu Ö. Tüberküloz tanısında yeni gelişmeler. Anđ Ö, Uzun M. (eds). Tüberküloz Tanı, direnç tedavi. Türk Mikrobiyoloji cemiyeti, İstanbul, 1996, 20: 11-16.
7. Moore DF, Curry JJ. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplicor PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 2686-2691.
8. Beige J, Lokies J, Schaberg T, Finckh U, Fischer M, Mauch H, Lode H, Köhler B, Rolts A. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. J Clin Microbiol 1995; 33: 90-95.

9. Cartuyvels R, Ridder CD, Jonckheere S, Verbist L, Eldere JV. Prospective clinical evaluation of amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test as a screening method in a low-prevalence population. J Clin Microbiol 1996; 34: 2001-2003.
10. Bennedsen J, Thomsen VO, Pfyffer GE, Funke G, Feldman K, Beneke A, Jenkins PA, Hegginbothom M, Fahr A, Hengstler M, Cleator G, Klapper P, Wilkins GL. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 1996; 34: 1407-1411.
11. An Q, Buxton D, Hendricks A, Robinson L, Shah J, Lu L, Vera-Garcia M, King W, Olive DM. Comparison of amplified QB replicase and PCR assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis*, J Clin Microbiol 1995; 33: 860-867.
12. 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: 752-754.
13. 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: 2769-2771.
14. Lovannisci D M , Winn-Deen ES. Ligation amplification and fluorescence detection of *M. tuberculosis* DNA. Mol Cell Probes. 1993; 31: 729-731.
15. Yajko DM, Wagner C, Tvere VJ , Kocagöz T, Hadley W K, Chambers H F. Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the amplicor PCR assay. J Clin Microbiol 1995; 33:1944-1947.

16. Kox LFF, Rhienthong D, Miranda AM, Undamsantisuk N, Ellis K, Van Leeuwen J, Van Heusden S, Kuijper S, Kolk AHJ. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clin Microbiol 1994; 32: 672-678.
17. Kirchner P, Rosenau J, Springer B, Teschner K, Feldman K, Böttger EC. Diagnosis of Mycobacterial infections by nucleic acid amplification. 18-month prospective study. J Clin Microbiol 1996; 34:304-312.
18. Durmaz R, Durmaz B, Günal S. Polymerase Chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. Turk J Med Sci 1997; 27: 291-295.
19. 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 comparison study among seven laboratories. J Clin Microbiol 1994; 32:277-284.
20. Uzun M. Tüberküloz epidemiyolojisi. Anđ Ö, Uzun M (eds). Tüberküloz Tanı, direnç , tedavi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti . İstanbul, 1996; 26: 1-9.
21. Anđ Ö, Erturhan Z. Tüberkülozun dönüşü ve direnç sorunu. Anđ Ö, Uzun M. (eds). Tüberküloz tanı, direnç ve tedavi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti. İstanbul, 1996; 26: 17-25.
22. Koçyiğit E. Yurdumuzda erişkin tüberkülozu. Anđ Ö, Uzun M. (eds). Tüberküloz tanı, direnç ve tedavi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti. İstanbul. 1996; 26: 45-52.
23. Bilgehan H. Mycobacteriaceae, Klinik Mikrobiyoloji. 9. Basım. Barış yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir. 1995, s. 397-439.

24. Elmer W, Koneman Stephen D, Allen William M, Janda Paul C, Schreckenberger Washington C, Winn Jr. Diagnostic Microbiology. Fifth Edition. Philadelphia 1997; pp. 893-952.
25. Gedikođlu S. Mycobacterium tuberculosis'in hücre yapısı. Tümbay E. (ed) 1. Ulusal mikobakteri simpozyumu. Bursa, 1996; s. 13-18.
26. Kılıçturgay K. Tüberkülozda immunopatogenez. Tümbay E. (ed). İnfeksiyon dergisi. 1997; 4: 7-12.
27. Uzun M. Tüberkülozun laboratuvar tanısında karşılaşılan problemler. Tümbay E. (ed). 1. Ulusal mikobakteri simpozyumu. Bursa, 1996; 23-27.
28. Kocagöz T. Yeni laboratuvar yöntemleri ile tüberküloz tanısı. Tümbay E. (ed). 1. Ulusal mikobakteri simpozyumu. Bursa, 1996; 29-33.
29. Torrea G, Offredo C, Simonet M, Gicquel B, Berche P, Pierre AC. Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systemic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J Clin Microbiol 1996 ; 34 : 1043-1049.
30. Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojisi ve Mikrobiyolojide kullanımı. Mikrobiol. Bült. 1995; 29: 304-311.
31. 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: 2791-92.
32. 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.
- 33- 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: 840-844.

34. 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.
35. Gözükarar M E . *Biyokimya*. Ofset Repromat ltd. Ankara.1990, s. 341-344.
36. Olivier B, Martin V, Denise L, Gilles M, Amid A, Bernard M, Charles M, Jacques C and Allan J. Hance. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis using sequence capture polymerase chain reaction. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1478-1481.
37. Amalio T, Paul I, Francine M, Doulas L, Stewart C, M.Joseph C, Lukas M, Kurt S, Thomas B. Detection of rifampicin-resistance mutations in *mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993; 341: 647-50.
38. 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.
39. 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: 2802-2806.
40. Peggy MB, Georgia V, Evangelos M. Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 20-23.

41. Mark Y, Stoeckle, Lei G, Nitai R, Irene W, Barry K, John K, Fabienne L, Lee W, Riley. Catalase-Peroxidase gene sequences in isoniazid-sensitive and-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from New York City. J Inf Dis 1993; 168: 1063-1065.
42. Greenfield Z, White TJ. Sample preparation methods. In . Diagnostic molecular microbiology. Principles and Applications (Eds: Persing DM, Smith TF, Tenover TC, White TJ). ASM press Washington DC. p: 122-137. 1993.
43. Durmaz R, Durmaz B, Günel S. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in Clinical Specimens. T J Med Sci 1997; 27: 291-296.
44. Durmaz R. Moleküler yöntemlerin uygulanmasında karşılaşılan sorunlar. IV Ulusal viral hepatit simpozyumu. Ankara. p: 78-85. 1998.
45. Persing DH, Cimino GD. Amplification product inactivation method. Principles and Applications (Eds: Persing DM, Smith TF, Tenover TC, White TJ). ASM press Washington DC. p: 105-121.
46. Gerda TN, Arend HJK, Gunnar B, David C, Jeremy WD, Paul EMF, Peter GF, Sang-Nae C, Thomas S, Svensen SB, Stuart W, Jan DA. van Embden. Sensitivity and Specificity of PCR for Detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a Blind Comparison Study among Seven Laboratories. J Clin Microbiol 1994; 32: 277-284.
47. Abe C, Hirano K, Wada M, Kazumi Y, Takahashi M, Fukasawa Y, Yoshimura T, Miyagi C, Goto S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. J Clin Microbiol 1993; 31: 3270-3274.

48. Forbes BA, Hicks KES. Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31: 1688-1694.
49. Nolte FS, Methock B, Jr McGowan JE, Edwards A, Okwumabua O, Thurmond C, Mitchell PS, Plikaytis B, Shinnick T. Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. J Clin Microbiol 1993; 31: 1777-1782.
50. Kox LFF, Rhienthong D, Medo Miranda A, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, van Heusden S, Kuijper S, Kolk AHJ. A More Reliable PCR for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples. J Clin Microbiol 1994; 32: 672-678.
51. Cho SN, 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: 752-754.
52. D'Amanto RF, Wallman AA, Hochstein LS, Colaninno M, Kim K, Patel RC, Miller A. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. J Clin Microbiol 1995; 33: 1832-1834.
53. Eisenach DK, Sifford MD, Donald M, Joseph HB, Crawford JT. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Samples Using a Polymerase Chain Reaction. 1991; 1160-1163.
54. Tevere JV, Hewitt PL, Dare A, Hocknell P, Keen A, Spadaro JP, Young KKY. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR Amplification with Pan-

Mycobacterium Primers and Hybridization to an *M. tuberculosis*-Specific Probe. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 918-923.

55. Choi YJ, Hu Y, Mahmood A. Clinical Significance of a Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Clin Microbiol and Inf Dis* 1995; 28: 200-204.

56. Betty AF, Hicks KES. Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory Specimens in a Clinical Laboratory by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1688-1694.

57. Douglas FM, Janis IC. Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Directly from Sputum Sediments by Amplicor PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2686-2691.

58. Jungkind D, Drenzo S, Beavis KG, Silverman NS. Evaluation of Automated COBAS AMPLICOR PCR System for Detection of Several Infectious Agents and Its Impact on Laboratory Management. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2778-2783.

59. Abe C, Hirano K, Wada M, Kazumi Y, Takahashi M, Fukasawa Y, Yoshimura T, Miyagi C, Goto S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens by Polymerase Chain Reaction and Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3270-3274.

60. Jonas V, Alden MJ, Curry JI, Kamisango K, Knott CA, Lankford R, Wolfe JM, Moore DF. Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Directly from Sputum Sediments by Amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2410-2416.

61. Ichiyama S, Ito Y, Sugiura F, Inuma Y, Yamori S, Shimokata M, Hasegawa Y, Shimokata K, Nakashima N. diagnostic Value of the Strand Displacement Amplification

Method Compared to Those of Roche Amplicor PCR and Culture for Detecting Mycobacteria in Sputum Samples. J Clin Microbiol 1997; 35: 3082-3085.

62. Lang AM, Iglesias JF, Pena C, Sanchez JF, Stockman L, Rys P, Roberts GD, Henry NK, Persing DH, Cockerill III FR. Clinical Evaluation of the Gen-Probe Amplified Direct Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms in Cerebrospinal Fluid. J Clin Microbiol 1998; 36: 2191-2194.

63. Gamboa F, Fernandez G, Padilla E, Manterola JM, Lonca J, Cardona PJ, Matas L, Ausina V. Comparative Evaluation of Initial and New Versions of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis in Respiratory and Nonrespiratory Specimens. J Clin Microbiol 1998; 36: 684-689.

64. Leckie GW, Erickson DD; He Q, Facey IE, Lin BC, Cao J, Halaka FG. Method for Reduction of Inhibition in a *Mycobacterium tuberculosis*-Specific Ligase Chain Reaction DNA Amplification Assay. J Clin Microbiol 1998; 36: 764-767.

65. Amicosante M, Richeldi L, Trenti G, Paone G, Campa M, Bisetti A, Saltini C. Inactivation of polymerase inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* DNA amplification in sputum by using capture resin. J Clin Microbiol 1995; 33: 629-630.

66. Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL, Passen S. In Vitro Comparison of NALC-NaOH, Tween 80, and C₁₈-Carboxypropylbetaine for Processing of Specimens for Recovery of Mycobacteria. J Clin Microbiol 1998; 36: 3558-3566.

67. Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL, Denise EL, Romagnoli M, Turner J, Merz WG, Schwalbe RS, Moody M, Lue Y, Passen S. Novel Method for Processing

Respiratory Specimens for Detection of Mycobacteria by Using C₁₈-Carboxypropylbetaine: Blinded Study. J Clin Microbiol 1998; 36: 1996-2003.

68. Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL, Wolfe DM, Llorin OJ, Passen S. Processing Respiratory Specimens with C₁₈-Carboxypropylbetaine: Development of a sediment Resuspension Buffer That Contains Lytic Enzymes To Reduce the Contamination Rate and Lecithin To Alleviate Toxicity. J Clin Microbiol 1998; 36: 2004-2013.

69. Stuart MW, Ruth M, Pamela MN, Peter DGF, Neil GS, Alister V. Progress toward a Simplified Polymerase Chain Reaction and Its Application to Diagnosis of Tuberculosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 776-782.