

54832

OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANS ÜSTÜ ÖĞRETİM YÖNETMELİĞİ UYARINCA
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ GENETİK BİLİM DALI'NDA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

**DEĞİŞİK KLİNİK ÖRNEKLERDE TÜBERKÜLOZUN
PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)
İLE KESİN VE HIZLI TANISI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Derya ÜSTÜNER

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Muhsin ÖZDEMİR

1996

KABUL VE ONAY SAYFASI

Derya ÜSTÜNER'in YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırladığı "Değişik klinik örneklerde tüberkülozun PCR (Polymerase Chain Reaction) ile kesin ve hızlı tanısı" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

30.10.1996

DDH
Bşk. Üye: Prof. Dr. Yurdanur Akgün *Y. Akgün*
Tezdeki düzeltmeler yeterli değildir. Açıklama ek raporda sunulmuştur. Tez kabul edilemez niteliktedir.
Üye: Yrd. Doç. Dr. Muhsin ÖZDEMİR *M. Özdemir*
Üye: Yrd. Doç. Dr. Sevilhan ARTAN *S. Artan*

Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29.10.1996
gün ve 369/839 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Neş'e TUNCEL
Enstitü Müdürü V.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
ANAHTAR KELİMELEER.....	iii
RESİMLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
2.1.1. <i>M. tuberculosis</i> 'in Tarihçesi	2
2.1.2. <i>M. tuberculosis</i> Basilinin Özellikleri	2
2.1.3. <i>M. tuberculosis</i> 'in Görülme Sıklığı.....	3
2.1.4. <i>M. tuberculosis</i> 'in Tanı Yöntemleri	5
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	6
2.2.1. PCR'in Tanımı	6
2.2.2. PCR'daki Gerekli Elemanlar.....	6

2.2.3. PCR'in Üç Aşaması	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1. Gereç	11
3.1.1. Materyal.....	11
3.1.2. Kimyasal Maddeler	12
3.1.3. Solüsyonlar.....	13
3.1.3.1. DNA İzolasyon Tamponları.....	13
3.1.3.2. Jel Elektroforez Tamponları	15
3.1.3.3. DNA Amplifikasyon Tamponları	16
3.1.4. Aygıtlar ve Gereçler	17
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. DNA Eldesi	18
3.2.1.1. Balgamdan DNA Eldesi.....	18
3.2.1.2. Plevra Mayiinden DNA Eldesi	20
3.2.1.3. Kandan DNA Eldesi.....	21
3.2.2. PCR İle Amplifikasyon	23
3.2.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Değerlendirilmesi	24
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA.....	29
6. SONUÇ	32
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	33
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Tüberküloz hastalığının PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile kesin ve hızlı tanısını gerçekleştirmek üzere, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Kliniği, Eskişehir Verem Savaş Dispanseri, Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları Hastanesi ve Göğüs Cerrahi Merkezi'ndeki, toplam 25 tüberküloz hastasından alınan kan, plevra mayil ve balgam örnekleri ile bu çalışma gerçekleştirildi.

Araştırma beş aşamada yapıldı. İlk aşamada, örnekler dekontamine edildikten sonra *M. tuberculosis* basilinin DNA'sı elde edildi. İkinci aşamada elde edilen DNA'nın PCR ile çoğaltılması yani amplifikasyon basamağı gerçekleştirildi. Üçüncü aşamada, DNA'ların % 3 lik agarozda, 90 V - 60 A'e maruz bırakılarak yürütülmesi sağlandı. Dördüncü aşamada, UV altında sonuçlar, pozitif ve negatif kontrollerle, toplanan örnekler pozitif veya negatif olarak değerlendirildi. Sonuncu aşamada ise UV altında MP4 Polaroid kamera sistemi ile örneklerin fotoğrafları çekildi.

Değerlendirmeler sonucunda, PCR ile tüberküloz hastalığının kesin ve hızlı tanısının yapılabilirliği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), Balgam,
Mycobacterium tuberculosis

SUMMARY

In this study, a method based on PCR (Polymerase Chain Reaction) for the rapid and definitive detection of *M. tuberculosis* was used to 25 clinical specimens. Such as, sputum, peripheral blood, and pleural fluid. The specimens were obtained from Eskişehir Osmangazi University Medical Faculty Hospital, Eskişehir tuberculosis Union, and Ankara Atatürk Chest Disease Hospital.

The research was obtained from five stages. In the first stage, after specimens decontaminated, DNA of *M. tuberculosis* bacille was obtained. In the second stage, the extracted DNA was amplified by PCR. In the third stage, PCR-amplified DNA were electrophoretically analysed on 3% agarose gel. In the fourth stage, the positive and the negative results were compared with positive and negative controls under the UV. Finally, the photographs of all results were taken with MP4 Polaroid Camera.

After the results of the evaluations it has seen that all the rapid and definitive diagnosis of the tuberculosis can be put forward to by PCR.

Key Words: PCR (Polymerase Chain Reaction), Sputum,
Mycobacterium tuberculosis.

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Bir Grup Akciğer Tüberküloz Hastasının PCR ile Amplifiye Edilen Bakteri DNA'sının Agaroz Jelde, UV Altındaki Görüntüsü (Balgamdaki Basil DNA'sı)	26
4.2. Başka Bir Grup Akciğer Tüberküloz Hastasının PCR ile Amplifiye Edilen Bakteri DNA'sının Agaroz Jelde, UV Altındaki Görüntüsü (Plevra Mayiideki Basil DNA'sı)	27
4.3. Bir Grup Miliyer Tüberküloz Hastasının PCR ile Amplifiye Edilen Bakteri DNA'sının Agaroz Jelde, UV Altındaki Görüntüsü (Kandaki Basil DNA'sı)	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>M. tuberculosis</i> 'in Dünyada Görülme	
Sıklığı (1990 yılına göre)	3
2.2. Dünyadaki Ölümelerde Tüberküloz	
5. Sırada Yer Almaktadır	4
2.3. Türkiye'nin Değişik Coğrafik Bölgelerinde	
1981-1982 Araştırması Bulgularına ve Dispanser	
Kayıtlarına Göre Aktif Tüberküloz Prevelansı	
(S.B. Verem Savaş Daire Başkanlığı).....	4
2.4. Amplifikasyon İşleminde Yaklaşık 30 Döngü Sonucu Hedef DNA	
Çoğalma Sayısı.....	9
3.1. Çalışmaya Alınan 25 Tüberküloz Hastası	11
3.2. Balgamdan DNA Eldesinde Alınan Süpematant	
Miktarına Karşılık Eklenecek Isopropanol Alkol Miktarı	20
3.3. Kandan DNA Eldesinde Alınan Süpematant Miktarına Karşılık	
Eklenecek Salin Solüsyonu ve Absolü Ethanol Miktarı	22
3.4. <i>M. tuberculosis</i> 'i Belirleyen Primer Dizileri	23
3.5 PCR ile Amplifikasyonda Döngü Sayısı, Sıcaklık, Zaman	23

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Acıklama</u>
A =	Amper
cm =	Santimetre
M =	Molarite
m =	Molalite
mg =	Miligram
ml =	Mililitre
n =	Nano
nm =	Nanometre
µg =	Mikrogram
rpm =	Rotation per minute
pM =	Pikomol
T _m =	Melting Temperature
u =	Unit
UV =	Ultraviyole
V =	Volt

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Acıklama</u>
A	=Adenin
AFB	=Asit-Fast Bakteri
BCG	=Bacille Calmette Guarin
bç	=Baz çifti
C	=Sitozin
dATP	=2' deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	=2' deoxycytidine 5'-triphosphate
ddNTP	= Dideoxynucleoside triphosphate
dGTP	=2' deoxyguanine 5'-triphosphate
dH ₂ O	=Distile Su
DNA	=Deoksiribonükleik asit
dNTP	= Deoxynucleoside triphosphate
dTTP	=2' deoxythymidine 5'-triphosphate
EDTA	= Ethylenediamine tetraacetic acid
EZN	= Ehrlich-Ziehl-Neelsen
G	= Gravity
Hae	=Haemophilus aegypticus
kb	= Kilobase
<i>M. tuberculosis</i>	= <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PBS	= Phosphate Buffered Saline
PCR	= Polymerase Chain Reaction

SDS	=	Sodyum Dodesil Sülfat
T	=	Timin
TBC	=	Tüberküloz
Taq	=	Thermus Aquaticus
TAE	=	Tris-acetate-ethylene diaminetetra-acetic acid
TBE	=	Tris-borate-ethylene diaminetetraacetic acid
TE	=	Tris-ethylene diamine tetraacetic acid
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminoethane



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda başta enfeksiyon hastalıkları olmak üzere çeşitli tıp dallarında önemli ilerlemeler olmuştur. Moleküler genetik, mikobakteriyal hastalıkları çok çabuk belirleyebilmektedir. Genetik polimorfizm nedeni ile, Kafkasya'da yaşayanlar arasında tüberküloz hastalığının az görüldüğünü, buna karşılık Afrika yerlilerinde ve Kızılderililerde bu hastalığın daha fazla olduğunu ve ırklara göre hastalanma şansının değiştiği bilinmektedir (41).

Tüberküloz hastalığının tanısı, hastanın hikayesi, klinik ve radyolojik bulgular üzerinden yapılabilmekte ancak kesin bakteriyolojik tanı, balgam yaymasından asit-fast bakterilerin gösterilmesi ve kültürde etkenin üretilmesine dayanmaktadır. Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile asit-fast bakterinin (AFB) direkt mikroskopide gösterilmesi en hızlı ve basit yöntemlerden birisi olmakla beraber duyarlılığı ve özgüllüğü olmayan bir testtir (30). Ayrıca patojenik mikobakterilerin kültürde üremeleri 4 ile 8 hafta gibi uzun süre almaktadır. Son zamanlarda tüberküloz tanısında çabuk, duyarlı ve özgül testler geliştirilmiştir. Özgül nükleik asit dizgelerinin PCR ile amplifikasyonu (çoğaltılması) birçok enfeksiyon etkeninin saptanması için güçlü bir sistem oluşturmuştur (6,29,32,33,56). *M. tuberculosis'in* PCR tanısında en çok kullanılan primerlerden birisi "putative insertion dizgesi" olan IS6110'dir. *M. tuberculosis'in* ortaya çıkartılması için IS6110 dizgesindeki 123 bç'lik DNA amplifiye edilmektedir (7,54).

Hastadan alınan örneklerle çalışılan PCR sonuçları, bakteriyolojik ve klinik bulgular ile karşılaştırıldığında yöntemin oldukça duyarlı ve özgül olduğu ortaya çıkmaktadır (1, 5, 22, 25, 56).

Tüberküloz dünyadaki ölümlerde, beşinci sırayı almaktadır. Şimdiye kadar uygulanan mevcut tanı ve tedavi yöntemleri tüberküloz hastalığının önüne geçememiştir. Moleküler biyolojinin bu yeni yöntemi, tüberküloz hastalığına kesin ve hızlı tanı koyarak bu hastalıktan ölümleri azaltmayı planlamaktadır (22,30).

Gerçektende PCR, tüberkülozda tanı özgüllüğü ve duyarlılığı olan bir yöntemdir. Sadece *M. tuberculosis* için değil pek çok viral ve bakteriyel hastalıkların tanı ve teşhisinde de kullanılmaktadır.

Biz, bu çalışmada, PCR'a dayalı bir metod uygulayarak tüberkülozlu hastalara bir gün gibi kısa bir zamanda kesin ve hızlı sonuç verme olanağını sağlamaya çalıştık. Böylece hemen ilaç tedavisi de uygulanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

2.1.1. M. tuberculosis'in Tarihçesi

Tüberküloz, çok eski dönemlerin hastalıklarındandır. Tüberküloz tarihinin dönüm noktası 1882'dir. Berlin Fizyoloji Demeği'nin toplantısında R. Koch, tüberküloza neden olan basilin izolasyonunu tanımlamıştır. Bunu 1921'de tüberküloz aşısı olan BCG'nin Fransız araştırmacılar Calmette ve Guarin tarafından bulunuşu izler. 1944'de ise Waksman tarafından ilk tüberküloz ilacı olan Streptomisin bulunmuştur (30).

2.1.2. M. tuberculosis Basilinin Özellikleri

Bergey'in Manuel of Determinative Bacteriology'de tanımladığı gibi, 0.3-0.6 µ ve 1-4 µ boyutlarında olan basil, düz veya biraz eğri tek veya birkaç tanesi bir arada bulunur. Kuvvetli asit ve asit-alkole dayanıklı olduğu Ehrlich-Ziehl Neelsen (EZN) yöntemleri ile gösterilmiştir. Mikobakteriler Gram veya basit boya yöntemleri ile kolay boyanmazlar. Hücre duvarının yüksek lipid içeriği, boyanın penetrasyonuna dirençlidir. Normal koşullarda Gram boyasında mikobakteriler, çok az mavî boya alırken, alkol ve asetonla renk gidermeye de dirençli olduklarından G(+) olarak tarif edilmişlerdir. Hücre duvarı lipid içeriği ve antibiyotik direnci açısından G(-) bakterilere benzetenler vardır. Hatta bazıları da Gram nötr olarak bildirmişlerdir (17, 20, 49).

Mycobacterium tuberculosis teker teker, yahut ufak kümeler halinde duran uzun ya da kısa çomakçıklardır. Toparlık şekillerine de rastlanır. Tüberküloz mikrobunun sporu, kapsülü ve kirpikleri yoktur. Mikobakteriler aerop veya mikroaerofildir. %5-10 CO₂'li ortamda üremeleri hızlandırılabilir. Tipik suşların replikasyon zamanı 15-20 saattir. İnokülasyondan sonra koloniler Middlebrook-Cohn, 7H10 gibi besiyerlerinde en erken 2 haftada, Löwenstein-Jensen gibi yumurtalı besiyerlerinde ise en erken 3 haftada görülebilir. *M. tuberculosis'in* optimal üreme derecesi 37°C'dir (16, 30).

M. tuberculosis %99 niasin meydana getirir. Bu özellik kuvvetli nitrat redüksiyonu ile belirtilir. Yine *M. tuberculosis*, katalaz aktivitesini 68°C'de 20 dakikada kaybeder. Redüktaz aktivitesi, potassium telluritin siyah metalik tellurium redüksiyonu ile belirlenir. Mikobakteriler ısıya duyarlıdır. Pastörizasyonla 20 dakikada tahrip olurlar. Özellikle balgamın dekontaminasyonunda kullanılan, asit, alkali ve kimyasal dezenfektanlara dirençlidir. %5 fenol ile 24 saatte dezenfekte edilir. Kuruluğa, haftalar hatta aylarca dayanır. Kültür

besiyerlerinde 2-8 ay canlı kalabilirler. Basil içeren balgamın 20-30 saat güneş ışığına maruz kalması halinde basiller ölür. Mikobakteriler, direkt güneş ışığından korunduğu zaman, pütrifiye balgamda birkaç hafta, kuru balgamda 6-8 ay canlı kalabilir. Kuru balgam, toz partiküllerinde havada 8-10 gün bulaşıcı olabilir (17, 30, 49).

İnfeksiyon kaynakları ise, *M. tuberculosis*'in insan tipi için tüberkülozlu hastalardır. *M. bovis* için ise, infeksiyon kaynağı sütteür.

2.1.3. *M. tuberculosis* 'in Görülme Sıklığı

1990 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, Dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ünü oluşturan 1.7 milyar kişi tüberküloz basilli ile enfektedir ve bu sayıya her yıl 100-200 milyon kişi eklenmektedir. Yine Dünya'da 20 milyondan fazla tüberküloz hastası bulunmaktadır ve bunlara her yıl 8 milyon yeni hasta eklenmektedir. Her yıl 3 milyonu, bir diğer deyişle hergün 5500-8000'i veya her 11-16 saniyede biri ölmektedir. Bir tüberküloz hastasının ortalama 5-10 kişiyi enfekte ettiği tahmin edilmektedir (30).

Çizelge 2.1. *M. tuberculosis*'in Dünyada Görülme Sıklığı (1990 yılına göre).

Bölge	Enfekte Toplum (Milyon)	Ölümler
Afrika	171	660.000
Amerika	117	220.000
Doğu Akdeniz	52	160.000
Güney-Doğu Asya	426	940.000
Batı Pasifik	547	890.000
Avrupa ve Diğer Gelişmiş Ülkeler	382	40.000

Çizelge 2.2. Dünyadaki ölümlerde tüberküloz 5. sırada yer almaktadır.

Hastalık	Yıllık Ölüm
Kalp-damar hastalıkları	12 milyon
Diyare ile ilgili hastalıklar	5 milyon
Kanser	4.8 milyon
Pnömoni	4.8 milyon
Tüberküloz	3 milyon
Kronik obstrüktif Akciğer Hastalığı	2.7 milyon
Kızamık	1.5 milyon

Çizelge 2.3. Türkiye'nin değişik coğrafik bölgelerinde 1981-82 araştırması bulgularına ve dispanser kayıtlarına göre aktif tüberküloz prevalansı (S.B. Verem Savaş).

Bölgeler	Tüberküloz	Prevalansı
	1981-82 araştırması (binde)	Dispanser kayıtları (binde)
Ege	1.86	1.40
Akdeniz	2.32	1.58
Marmara	3.66	2.04
Doğu Anadolu	3.73	2.86
Trakya	3.97	1.48
Karadeniz	4.80	1.57
GüneyDoğu	7.44	2.42
Türkiye Geneli	3.58	1.76

2.1.4. *M. tuberculosis*'in Tanı Yöntemleri

Tüberküloz tanısında bugün kullanılan yöntemler (Tüberküloz basilinin yayma ve kültür metodları, tüberkülin testi ve akciğer grafisi) yaklaşık 100 yıl önce bulunmuş ve ne yazık ki son 50 yılda bu alanda ciddi bir ilerleme sağlanamamıştır. O zamandan beri tüberküloz bakteriyolojisinde, hızlı fakat pahalı bir yöntem olan radyometrik teknikler dışında çok az değişiklik olmuştur (30,56).

Tüberküloz basilinin kültürü ve daha sonra kültür ürününün tanımlanması tüberküloz teşhisinde geleneksel olarak başvurulan yöntemlerden biridir. Bununla birlikte tüberküloz basilinin çok yavaş olan büyüme hızı konvansiyonel yöntemlerle teşhisin süresinin 3-6 haftaya kadar uzamasına yol açmaktadır. Bu da tanı ve tedavinin gecikmesine neden olmaktadır. Kültürün, birçokları tarafından tüberküloz teşhisinde esas yöntem olarak kabul görmesine karşın, kültür öncesinde numuneyi diğer mikroorganizmalardan temizlemek için yapılan dekontaminasyon sırasındaki ufak bir dikkatsizlik bile yaymada görülmüş basilin ürememesine yol açabilmektedir.

Balgam mikroskopisi ile vaka bulma etkinliği konusunda da tartışmalar vardır. Balgamın direkt mikroskopik incelemesi kolay bir yöntem değildir. Mikroskobî uzmanlarınca değerlendirilen tek balgam yaymasında %33-40, tekrarlanan balgam yaymalarında ise %65-70'lik pozitiflik elde edilirken ortalama olarak en çok %30-50'sinin saptanabilmiş olması, bu yöntemin vaka bulma çalışmalarında yeterince yararlı olmadığını düşündürmektedir.

1977'deki Middlebrook ve arkadaşları tarafından, *M. tuberculosis*'in, C14 işaretli palmitik asit içeren 7H12 kültür ortamında üremesini özgül olarak saptayabilen otomatize radyometrik bir metod geliştirilmiştir. Bu yöntemde, mikobakteriyel üremeyi, bu üreme sonucu kültür ortamında oluşan serbest $^{14}\text{CO}_2$ ölçümü ile saptayabilen Bactec isimli bir alet kullanılmaktadır. Bu yöntemle *M. tuberculosis*'in ayırımı ve adlandırma süresi 2-3 haftaya indirilebilmiştir. Oldukça pahalı olan bu cihaz, gelişmiş ülkelerde ve yurdumuzda da yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (30).

PCR teknolojisinin tam otomasyona yönelik olarak tanımlandığı 1987 yılından bu yana PCR sadece genomik DNA'yı incelemekle kalmamış, aynı zamanda mikrobik enfeksiyonların tanısında da yeni ve geniş ufuklar açmıştır. Mikobakteri yönünden konu ele alındığında değişik mikobakteri suşlarının herbiri; ve tabii ki bu arada *M. tuberculosis* için mikroorganizma genomunun farklı bölgelerine spesifik PCR yöntemleri geliştirilmiştir (44,45,53,58). Klinik numunelerden tüberküloz tanısının PCR (Polymerase Chain Reaction) ile

konulması bir çalışma günü içinde gerçekleştirilebilmekte ve duyarlılığı %85, özgüllüğü %97 olmaktadır (18, 39, 42, 50).

2.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

2.2.1. PCR'in Tanımı

Polimeraz zincir reaksiyonu, (PCR) spesifik DNA veya RNA dizilerinin in vitro amplifikasyon tekniğidir. PCR tekniği Mullis ve arkadaşları (38) tarafından Cetus Anonim Şirketi'nde tasarlanmış ve isimlendirilmiş olup prensipleri Khorana ve arkadaşları tarafından 1985 yılında detaylı bir şekilde izah edilmiştir.

Moleküler biyolojinin en güçlü tekniklerinden olan PCR, avantajları nedeniyle çok kısa bir süre içerisinde geniş bir uygulama alanı bulmuştur. PCR, DNA ya da RNA'nın enzimatik olarak in vitro şartlarda milyonlarca defa çoğaltılmasına olanak sağlayan bir yöntemdir (10,18,21,23). Genetik hastalıkların moleküler düzeyde analiz ve tanısına yenilik getirmiştir. Bu yöntemde değişik dokulardan elde edilen 1-2 hücreden sonuç alma olanağı bulunmaktadır. Örneğin; ağız çalkalaması sonucu ortama düşen bukkal mukoza hücreleri, tek bir saç telli, bir spermium, bir lenfosit gibi tek hücreden fikse edilmiş patolojik örnekler, kurutulmuş kan damlaları gibi değişik kaynaklı pek çok materyal yeterli olabilmektedir (2, 3, 12, 19, 55).

PCR az miktardaki örnekten spesifik bir gen bölgesini çoğaltmak ve tanıya yönelik incelemeler için yeterli genetik materyal sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.

2.2.2. PCR'daki Gerekli Elemanlar

PCR uygulamasına geçilmeden önce kalıp DNA gerekmektedir. Komplementer zinciri sentezlemek için gerekli primerler, ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz, dNTP, Mg⁺⁺ iyonları, tampon ve bidistle su gereklidir. Primerler liyofilize veya solüsyon halinde bulunmaktadır. Taq polimeraz bulunmadan önce, enzim olarak Escherichia Coli DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır (43, 51). Fakat bu enzim yüksek ısıya dayanıksız olduğu için, her siklusta denaturasyon sonrası ortama yeniden konulmaktaydı. Daha sonra volkanik sularda bile yaşayabilen Thermus aquaticus bakterisinden elde edilen, yüksek ısılara dayanıklı Taq polimeraz bulunarak, enzimin her defasında yeniden eklenmesine ihtiyaç kalmamıştır (9,28, 38). Hedef DNA parçasının amplifikasyonu, thermocycle adı verilen, ısıyı süratle yükseltip, alçaltan otomatik aygıtlar ile sağlanır ve tek bir eppendorf tüpü içinde gerçekleştirilir (26).

2.2.3. PCR'in Üç Aşaması

Denatürasyon: DNA molekülünün her iki iplikçiği birbirlerine hidrojen bağları ile tutunmuşlardır. Isının 94°C'ye getirilmesi ile bu iki iplikçik birbirinden ayrılır.

Bağlanma(Annealing): Isının aniden düşürülmesi ile, ortama ilave edilmiş olan primerler birbirinden ayrılmış DNA iplikçiklerinin komplementerine bağlanırlar. Bu primerler 18-20 bazdan oluşan oligonükleotidler olup, seçimi bilgisayarlar tarafından yapılmaktadırlar. Etkene özgül olarak önceden sentezlenmişlerdir. Bağlanma ısı;

$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ formülü ile bulunur. T_m 50°C ile 65°C arasında değişmektedir.

Uzama(Extension): Isının 72°C'ye yükseltilmesi ile ortamdaki Taq polimeraz enzimi, uygun bölgelere bağlı primerlerden hareketle ve yine ortama ilave edilmiş dNTP kullanarak, yeni ve komplementer zincir sentezini gerçekleştirir. Bu sentez 5' uçdan 3' uca doğru ve kalıp görevi yapan ana zincirin her bir bazının karşısına komplementeri olan baz gelerek devam eder.

PCR ile DNA'nın çoğalması 2^n formülüne göre olur ve yaklaşık 1 saat süren 30-40 döngüden sonra elde edilen DNA yaklaşık 1073741824 katındadır. (n =Döngü sayısı)(2, 3,4, 12, 19, 55).

PCR ürünleri agaroz-jel elektroforezi ile molekül ağırlıklarına göre ayrılarak, DNA'nın varlığı gösterilebilir. Oluşan bantların özgüllüğü UV altında değerlendirilir. Bununla beraber PCR'in özgüllüğü ve duyarlılığını etkileyen faktörler bulunmaktadır. Bunlar kalıp DNA, primerlerin uzunluğu, kullanılan ısı ve reaktiflerin konsantrasyonu gibi parametrelerdir. Yine enzim ve primer konsantrasyonları da PCR'in başarıyla yapılmasını etkilemektedir. Çoğaltma işlemi de, her ne kadar siklus sayısı ile doğru orantılı ise de, bazı durumlarda siklus sayısını bir yerden sonra arttırmak, duyarlılığı aynı oranda arttırmamakta ve hatalı sonuçlar elde edilmektedir. Bu tip durumlarda nested PCR (n.PCR) şeklinde tanımlanan ve kısaca iki aşamalı PCR dediğimiz yöntem uygulanır. Bu yöntemde ilk olarak daha uzun olan outer primerler ile amplifikasyon yapılmaktadır (30 döngü). Daha sonra ise ilk amplifikasyon tüpünden alınan örnekteki DNA daha kısa olan inner primerler ile çoğaltılmaktadır (20 döngü). Nested PCR ile testin duyarlılığı artmaktadır (50).

Araştırmamızda, *M. tuberculosis*'in PCR ile tanısında en çok kullanılan primerlerden birisi olan putative insertion dizgesi diye anılan IS6110'u kullandık. IS6110 *M. tuberculosis* kompleksindeki suşlar için (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) özgüldür.

IS6110, *M. tuberculosis*'in birçok suşunda yüksek kopya sayısında (10-20 kopya) bulunur (54, 56).

M. tuberculosis, için özgüllüğü ve tekrarlayan kopyaların bulunması IS6110'u amplifikasyon için ideal bir hedef olarak ortaya çıkartmaktadır. *M. tuberculosis*'in ortaya çıkarılması için IS6110 dizgesindeki 123 baz çiftlik DNA amplifiye (çoğaltılmalı) edilmelidir (5, 24,31,56).

DNA amplifikasyonunda kullanılan PCR'in optimal hale getirilmesi *M. tuberculosis* basillinin analizi için çok önemlidir. Reaksiyon sonrası elde edilen istenmeyen amplifikasyonlar analizin yanlış değerlendirilmesine yol açabilir. Elde edilen sonucun değerlendirilmesi için mutlaka PCR içinde kullanılan maddelerin çok uygun konsantrasyonda ve döngülerin uygun sayıda olması gerekmektedir. Fazla miktarda hedef DNA konması istenmeyen amplifikasyona sebep olabilir. Kontaminasyonu engellemek için de kullanılan tüp yada pipet uçlarının tek kullanımlık olması öneriler arasındadır. Her türlü kontaminasyona karşı alınabilecek önlemlerden birisi çalışma alanlarının ve reaktiflerinin UV'lenmesidir (26, 36, 52).

PCR'in en büyük sorunu yalancı pozitifliktir. İşte çok az miktardaki DNA parçacığını milyonlarca kez çoğaltıyor olması bu yöntemi çok duyarlı yapmakla beraber yalancı pozitifliğe de neden olmaktadır. Kullanılan reaktiflerin kontaminasyonu veya örneklerin birbirini kontamine etmeleri yalancı pozitiflikle sonuçlanmaktadır. Bu yüzden PCR aşamalarının farklı mekanlarda gerçekleşmesi gerekmektedir. DNA eldesi, amplifikasyon, reaktiflerin hazırlanması ve PCR ile PCR sonrası farklı bölümlerde olmalıdır (11,27,35, 37).

Biyolojik yöntemle, kontaminasyonun önlenmesi ise UNG (Urasil N-Glycosylase) Sterilizasyonu ile gerçekleştirilir. UNG, DNA'daki deoksiurasilleri bularak onları molekülden uzaklaştıran bir enzimdir. Amplifikasyon tüpüne dTTP yerine dUTP konarak amplifikasyon gerçekleştirilmekte böylece sentezlenen DNA'nın yapısına deoksiurasiller girmektedir. Bu DNA'lar UNG ile muamele edildiğinde, enzim tarafından deoksiurasiller uzaklaştırılmaktadır. Deoksiurasilleri giderilen DNA molekülleri alkali ve ısının etkisiyle parçalanmakta ve sonuç olarak, amplifikasyon tüpüne karışmış olsalar bile amplifiye olamamaktadırlar (15, 16, 56).

PCR'in çeşitli mikroorganizmalar için hızla standardizasyonu gerekmektedir. Bu da tutarsızlıkları engellemek için tek tip ticari kitlelerin çıkıp, yaygınlaşması ile gerçekleşir (18, 47, 56).

Çizelge 2.4. Amplifikasyon işleminde yaklaşık 30 döngü sonucu hedef DNA çoğalma sayısı.

Döngü Sayısı	Hedef DNA'nın Sayısı	
n=1	2^1	2
n=2	2^2	4
n=3	2^3	8
n=4	2^4	16
n=5	2^5	32
n=6	2^6	64
n=7	2^7	128
n=8	2^8	256
n=9	2^9	512
n=10	2^{10}	1024
n=11	2^{11}	2048
n=12	2^{12}	4096
n=13	2^{13}	8192
n=14	2^{14}	16348
n=15	2^{15}	32768
n=16	2^{16}	65536
n=17	2^{17}	131072
n=18	2^{18}	262144
n=19	2^{19}	525288
n=20	2^{20}	1048576

n=21	2^{21}	2097152
n=22	2^{22}	4194304
n=23	2^{23}	8388608
n=24	2^{24}	16777216
n=25	2^{25}	33554432
n=26	2^{26}	67108864
n=27	2^{27}	134217728
n=28	2^{28}	268435456
n=29	2^{29}	536870912
n=30	2^{30}	1073741824

PCR teknolojisinin sağlık sektörüne sağladığı başlıca iki büyük imkan vardır. Bunlardan biri, doğum öncesi kalıtsal hastalıkların, diğeri de bulaşıcı hastalıklar olarak tanımladığımız viral ve bakteriyel hastalıkların tanı ve teşhisidir. Her ikisini de büyük bir hassasiyet ve çabuklukla yapması, kesin sonuca ulaşması, PCR'ın en gözde teknoloji olmasının nedenidir (1, 36).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Materyal

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Bölümü ve Eskişehir Verem Savaş Dispanseri, Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları Hastanesi ve Göğüs Cerrahisi Merkezi'nden, 25 tane tüberkülozlu hastadan kan, plevra mayii, balgam toplandı. Balgam örnekleri sabah erkenden steril disposable petri kaplarına alındı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Bakteriyojji laboratuvarında dekontaminasyon işlemi yapıldıktan sonra, balgam örnekleri buz torbaları ile -20 °C'lik ısıda köpüklerin içinde taşındı. Kan örneklerinin transportu ise EDTA'lı tüplerle yapıldı.

Çizelge 3.1. Çalışmaya alınan 25 Tüberküloz Hastası.

Tanıyı Koyan Birim	Tanı	Çalışılan Klinik Örnek	Çalışılan Klinik Örnek Sayısı	PCR Sonucu	PCR Sonucu
				+	-
Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları Hastanesi ve Göğüs Cerrahisi Merkezi	Akciğer Tüberkülozu	Balgam	12	12	—
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları	Akciğer Tüberkülozu	Balgam	4	4	—
Eskişehir Verem Savaş Dispanseri	Akciğer Tüberkülozu	Balgam	3	3	—
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları	Akciğer Tüberkülozu	Plevra Mayii	3	3	—
Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları Hastanesi ve Göğüs Cerrahisi Merkezi	Milliyer Tüberküloz	Kan	3	3	—

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Tris baz

EDTA

Etidyum bromid

Taq polimeraz

dNTP

Primer

Izoamil alkol

Izopropanol

TrisHCL

SDS

NaOH

Proteinaz K

Fenol

Kloroform

Alkol

PBS

EDTA'lı 20 ml'lik plastik tp

Parafilm

Eppendorf tp

NaCl

HCl

Polaroid Film

Süzgeç Kağıdı

Falkon tüpü

Potasyum fosfat

Sodyum fosfat

Sodyum Sitrat dihidrat

Na₂HPO₄ (Anhydr)

KH₂PO₄

N.A.L.C. (N-Acetyl-L-Cysteine)

Triton X-100

Na₂HPO₄·7H₂O

3.1.3. Solüsyonlar

3.1.3.1. DNA İzolasyon Tamponları

Liziz Tampon:	NH ₄ Cl	115 mM
	KHCO ₃	10 mM
	EDTA	0.1 mM
STE Tampon:	NaCl ₂	100 mM
	EDTA	1 mM
	TrisHCl	50 mM
Proteinaz K:	200 mg/ml	

% 20 (w/v)SDS: Sodyum dotesil sülfat 20 gram

Distile su 100 ml

Fenol Tampon: Doymuş Fenol (pH=7.4) 25 ml

(V/V) (25:24:1) Kloroform 24 ml

İzoamil alkol 1 ml

TE Tampon: TrisHCl (pH=7.4) 10 mM

EDTA (pH=8.0) 1 mM

Stok Proteinaz K : Proteinaz K 0.1 mg/ml

Triton X-100 % 0.5

TrisHCl (pH=8.3) 200 mM

Sol I : Sodyum Sitrat dihidrit 29 gram

Distile Su 1 lt

Sol II: 1 M NaOH 40 gram

Distile Su 1 lt

0.067 M'lık Fosfat Buffer (pH=6.8):

Sol A (Sodyum Fosfat) : Na₂HPO₄ (Anhydr) 9.47 gram

Distile Su 1 lt

Sol B (Potasyum Fosfat):	KH_2PO_4	9.07 gram
	Distile Su	1 lt

N-Acety-L-Cysteineli alkali eriyiği hazırlanışı :

Sodyum Sitrat dihidrat	1 hacim
1 M'lık NaOH	1 hacim

karıştırılır ve üzerlerine % 0.5 gram N.A.L.C. katılır. Bu karışım dekontaminasyon solüsyonudur. 24 saat içinde kullanılmalıdır. Çünkü N.A.L.C. bu süre içinde bozulmaktadır. +4 °C'de saklanır.

10 X Phosphate Buffered Saline (PBS) :

NaCl	80 gram
KCl	2 gram
KH_2PO_4	2 gram
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11.5 gram

1 lt distile suda çözündürülür.

3.1.3.2. Jel Elektroferez Tamponları

Tris Asetat Tampon:	Tris baz	2 M
(TAE 50X, pH=8.0)	EDTA	50 mM
	Asetik asit	57 ml

Tris Borat Tampon:	Tris baz	1.8 mM
(TBE 20X, pH=8.3)	Borik asit	1.8 mM
	EDTA	50 mM

Yükleme Tamponu:	NaOH	0.4 M
	EDTA	25 mM
	Bromfenol mavisi	% 0.6

Etidyum Bromür:	Distile Su	10 mg/ml
distile su ile çözündürülür.		

3.1.3.3. DNA Amplifikasyon Tamponları

Taq Polimeraz: (5U/ μ l) *Thermus aquaticus* bakterisinden saflaştırılmış DNA polimeraz (Boehringer Mannheim Company).

dNTP Karışımı:	d ATP	20 mM
(pH=7.4)	d CTP	20 mM
	d GTP	20 mM
	d TTP	20 mM

Amplifikasyon:

Her primer bir reaksiyon için 660 ng olacak şekilde distile su ile çözülür.

3.1.4. Aygıtlar ve Gereçler

Etüv

Lamin Air Flow

Santrifüj

Elektronik hassas terazi

Digital pH metre

10 ml'lik disposable tüpler

Mikro Santrifüj

Soğutmalı Santrifüj

Sıcak su banyoları

Mikropipet

Mikropipet ucu

Buz makinesi

Vortex

Hot plate+Vortex

Pastör pipeti (uzun ve kısa)

Polimer tüp

Mezür

Beher

Inkübator

Kuru hava sterilizatörü

Distile su cihazı

Buzdolabı

Deep-freeze

Cam yazar kalem

Shaker

Thermocycle

UV Transillüminatör

Elektroforez

MP4 Polaroid Kamera

UV Gözlüğü

Mikrodalga Fırın

3.2. YÖNTEM

3.2.1. DNA Eldesi

3.2.1.1. Balgamdan DNA Eldesi

Tüberküloz tanısı için balgam, bronkoalveolar lavaj örneği veya bronşiyal yıkama kullanılmaktadır. Balgam için sabah erken 5-10 cc arasındaki örnek steril disposable kaba alınır. Öncelikle dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemi yapılır (13, 14, 34, 45, 48):

1. 5 veya 10 cc balgam üzerine aynı miktarda N-acety-L-cysteineli alkali eriyiği eklendi.
2. Tüp sıkıca kapatıldı ve vortexde iyice karıştırıldı.

3. Tüp oda ısısında 20-25°C'de 15 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda tüpün dolmasına az kalana kadar 0,1 M'lık fosfat tampon eriyiği (pH=6.8) eklendi.
4. 3000 G'de yarım saat santrifüj edildi.
5. Tüpün ağızı %70'lik alkol ile ıslatılmış pamukla silindi.
6. Santrifüj sonunda tüpün üstünde kalan sıvı (süpernatant) atıldı.
7. Tüpün ağızı tekrar alkol ile silindi.
8. Tüpde kalan pelet üzerine 2 ml 0,1 M'lık fosfat tampon eriyiği (pH=6.8) eklendi.

Homojenizasyon ve dekontaminasyon işleminden sonra kalan peletten,

1. 1ml alındı ve 13000 rpm de mikrosantrifüjde 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
2. 283 µl dilution buffer eklendi. Daha sonra polimer tüpe aktarılıp üzerine 16µl deterjan solüsyonu, 1,5 µl'lik proteolitik enzim solüsyonu eklendi.
3. Karıştırıldı ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
4. 50µl salin solüsyonu eklendi ve karıştırıldı.
5. 40µl'lik presipitasyon solüsyonu eklendi, karıştırıldı ve 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.
6. 400µl'lik ekstraksiyon solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. 13000 rpm'de mikrosantrifüjde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç faz görüldü. En aşağıdaki organik fazdır ve proteinler burada toplandı. Orta fazda jel ve bazı proteinler vardır. En üstteki ise DNA'lı fazdır.
7. Yeni bir tüpe en üst faz alındı. Isopropanol alkol eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
Alınan DNA'lı faza göre isopropanol eklendi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Balgamdan DNA eldesinde alınan süpernatant miktarına karşılık eklenecek isopropanol alkol miktarı.

Alınan süpernatant (µl)	Eklenecek isopropanol alkol (µl)
400 µl	240 µl
350 µl	210 µl
300 µl	180 µl
250 µl	150 µl
200 µl	120 µl

8. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.
9. 1ml'lik %70'lik etil alkolle yıkandı.
10. Vakumla pelet kurutuldu, alkol uzaklaştırıldı.
11. Elde edilen DNA miktarına göre 60 ile 100µl arasında bidistile su eklendi. 37°C-50°C arasında 1 saat inkübe edildi.
12. Daha sonra PCR'ı yapılmak üzere +4°C'ye kaldırıldı (7,24,42,47).

3.2.1.2. Plevra Mayiinden DNA Eldesi

1. 600 µl plevra mayii, 200 µl TE buffer ile karıştırıldı.
2. Üzerine 100 µl stok proteinaz-K eklendi ve 60 °C'de 1 saat inkübe edildi.
3. Fenol-kloroform ekstraksiyonu yapıldı. Bunun için 950 µl fenol eklendi ve karıştırıldı.
4. 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi
5. Üstteki faz başka bir eppendorf tüpüne aktarılıp, üzerine eşit hacimde kloroform eklendi ve karıştırıldı.
6. 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi.

7. Üstteki faz yine başka bir eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 300 µl NaCl ve 600 µl absolu ethanol (-20 °C'den çıkmış) eklendi.
8. Absolü ethanol eklendikten sonra gece boyunca +4°C veya 1 saat -20 °C'de bekletildi.
9. 20 dakika 13000 devirde santrifüj edildi. Süpematant atıldı.
10. Pelet üzerine 1 ml % 70 etanol eklendi. 10 dakika 13000 devirde santrifüj edildi.
11. Süpematant dikkatli bir şekilde pelet korunarak atıldı.
12. Eppendorf kurutma kağıdına ters vurularak fazla sıvı döküldü. Pelet kurusun diye yarım saat ağzı açık 37°C'lik etüvde bekletildi.
13. En son olarak 100 µl TE buffer eklenerek, PCR'ı yapılmak üzere +4 °C'de saklandı (11, 13, 40).

3.2.1.3. Kandan DNA Eldesi

1. EDTA'lı 1 ml'lik kan, 1 dakika 11500 devirde santrifüj edildi.
2. Süpematant döküldü ve iki-üç kez 0.5 ml'lik PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkandı.
3. 1 dakika 11500 devirde santrifüj edildi ve süpematant atıldı.
4. Üzerine 180 µl'lik dilution buffer eklenip, karıştırıldı.
5. Karışım polimer tüpe aktarıldı.
6. 200 µl lizis buffer eklenip, tüp 2-3 kez ters-yüz edildi.
7. 20 µl proteolitik enzim eklendi ve yine tüp 2-3 kez ters-yüz edildi.
8. 65°C'de yaklaşık 2 saat inkübe edildi.
9. 400 µl ekstraksiyon solüsyonu eklendi ve vortex ile karıştırıldı.
10. 1 dakika 11500 devirde santrifüj edildi. Üç faz oluştu. En üstteki DNA'lı faz başka bir tüpe alındı.

11.En üstteki fazdan alınan miktar kadar salin solüsyonu ve absolü ethanol eklendi.

Yarım saat -20 °C'de bekletildi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Kandan DNA eldesinde alınan süpernatant miktarına karşılık eklenecek salin solüsyonu ve absolü ethanol miktar.

Alınan Süpernatant (μl)	Eklenecek Salin Solüsyonu (μl)	Eklenecek Absolü Ethanol (μl)
400	200	1000
300	150	900
200	100	600
100	50	300

12.11500 devirde +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi.

13.Süpernatant döküldü ve % 70'lik 1 ml ethanol eklendi. 10 dakika +4 °C'de 11500 devirde santrifüj edildi.

14.Peletin kuruması sağlandı.

15.200 μ l'lik dilution buffer ile karıştırıldı. 37 °C - 50 °C'de yaklaşık 1 saat bekletildi ve DNA'nın çözünmesi sağlandı.

16.Daha sonra PCR'ı yapılmak üzere +4 °C'ye kaldırıldı (15, 16).

3.2.2. PCR İle Amplifikasyon

1. Her bir örnek için 24.8 µl reaksiyon karışımı (dNTP, tampon, bidistile su, primerler) ve 0.2 µl'lik Taq polimeraz enzimi konularak 25 µl'lik tüpler hazırlandı.

Çizelge 3.4. *M. tuberculosis*'i belirleyen primer dizileri (Real Company).

Hedef	İsim	Nükleotid Sırası 5' den 3' ne
IS6110	T4	CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG
IS6110	T5	CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG

2. Yine pozitif ve negatif kontrollara 25 µl'lik reaksiyon karışımı ve Taq polimeraz enzimi konduktan sonra, negatif kontrol için 25 µl steril su, pozitif kontrol olarak *M. tuberculosis* basili taşıyan hastadan elde edilen DNA kondu.
3. Bizim topladığımız ve DNA'larını elde ettiğimiz, +4 °C'de bekleyen örneklerimizden de 25 µl alınarak, reaksiyon karışımı ve Taq polimeraz enzimi içeren 25 µl'nin üstüne eklendi.
4. Birkaç dakika santrifügasyon yapıldı.
5. Thermocycle'da zaman ve sıcaklık ayarlaması yapılarak tüpler yerleştirildi.
6. Yaklaşık 1 saat sonra amplifikasyon işlemi tamamlandı (52)

Çizelge 3.5. PCR ile amplifikasyonda döngü sayısı, sıcaklık ve zaman.

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
1	94 °C	2 dakika
35	94 °C	15 saniye
	68 °C	15 saniye
	72 °C	15 saniye
1	72 °C	6 dakika

3.2.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Değerlendirilmesi

3 gram agaroz, 100 ml'lik TBE tamponu içinde mikrodalga fırında % 30'luk defrostda 5 dakikada eritildi. Mikrodalga fırından çıktıktan sonra agarozu 5 µl Etidyum bromid eklenerek DNA'nın UV altında görülmesi sağlandı. Etidyum bromid, kanserojen bir madde olduğundan inhalasyonu önlemek için jele 65°C civarındayken eklendi. Elektroforez kasetinin kenarları bantlandı ve kuyucukları oluşturmak üzere tarak takıldıktan sonra agaroz döküldü. 15 dakika sonra katılaştıran jel elektroforez tankına kondu. Tarak ve bantlar çıkartıldı (56).

Parafilm üzerinde 2 µl bromfenol mavisini (elektroforez yükleme çözeltisi) ve 12 µl PCR ürünü mikropipet yardımı ile karıştırılarak örnekler ve pozitif, negatif kontroller, marker kuyucuklarına yüklendi (57).

Elektroforez tankı TBE tamponu ile dolduruldu. 90 Volt ve 60 Amper uygulanarak örneklerimiz 30-45 dakika arasında koşturuldu ve bantların ayrılması sağlandı (46).

PCR ürününün jeldeki boyutunu tesbit etmek için DNA boyut belirleyici olarak Marker HaeIII kullanıldı. En son olarak UV transilluminatör ile görülüp, MP4 Polaroid kamera sistemi ile resimlendirildi (14, 48).

4. BULGULAR

Kesin Tüberküloz tanısı konmuş hastalardan alınan kan, plevra mayii ve balgam örnekleriyle çalışıldı. Bu teknik ile bir gün gibi kısa sürede sonuç verileceği görüldü.

Çalışmamızdaki DNA amplifikasyonu için kullanılan primerler daha önce kullanılmış ve test edilmiş olduğundan, PCR reaksiyonunda, primerlerin kendi aralarında sarmallaşma durumu görülmemiştir.

Markerla karşılaştırılınca örneklerimizin 123 baz çifti ağırlığında bant verdiği görüldü. Bu da basilin varlığını gösteren bir sonuçtur.

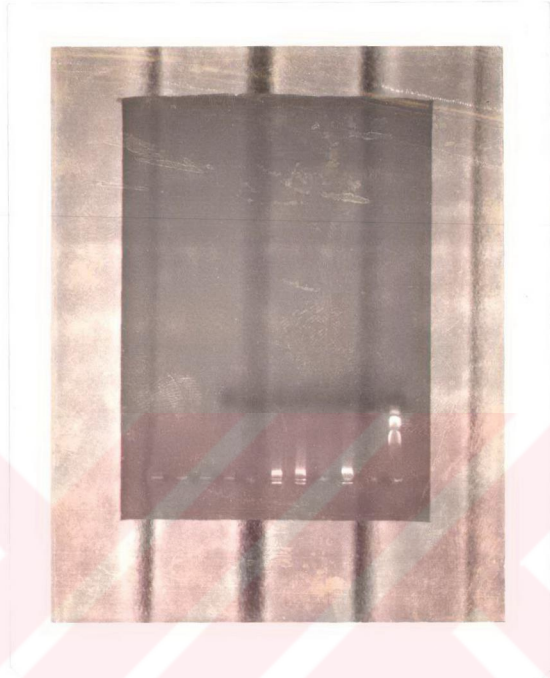
Bütün örneklerde basil DNA'sının 123 baz çifti ağırlığında olduğu görülmüştür. Bunlardan 19 balgam örneğinin 9'u , plevra mayii ve kan örneklerinin tamamı Resim 4.1,4.2 ve 4.3'de gösterilmiştir.

Resim 4.1, MP4 Polaroid kamera ile UV altında görüntülendi. Sağ baştaki birinci kuyuda PCR ürünün boyutunu karşılaştırabileceğimiz HaeIII markerı bulunmaktadır. Jelde görmeyi beklediğimiz 123 baz çiftlik bantları gördüğümüz halde iyi fotoğraflayamadığımız için 2. ve 3. kuyu haricindeki bantlar resimde net görünmüyor. Yine 5. kuyuda anormal amplifikasyona bağlı olarak jel boyunca sürüntü (smear) görülmüştür. En sondaki 10. kuyuda pozitif , 11. kuyuda negatif kontrolümüz bulunmaktadır.

Akciğer Tüberküloz tanısı konan hastaların balgam örneklerinden elde edilen DNA'lar amplifiye edilerek elektroforez sonrası 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. ve 9. kuyularda 123 baz çiftlik ağırlıktaki bantlar görülüp fotoğraflandırılmıştır.

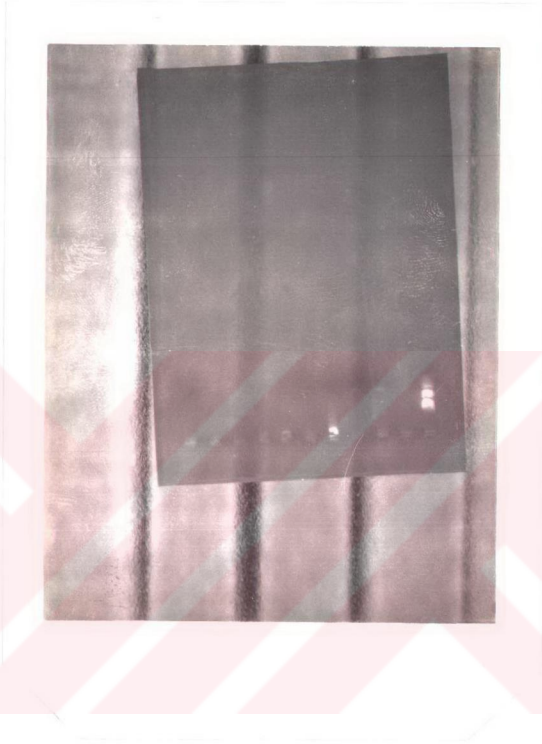
Resim 4.2'de ise Akciğer Tüberküloz tanısı konmuş hastalardan alınmış plevra mayii örneklerinden elde edilen amplifiye edilmiş basil DNA'ları fotoğraflanmaya çalışılmıştır. Pozitif ve negatif kontrollerimiz 2. ve 6. kuyudadır. 3., 4. ve 5. kuyularda ise amplifiye edilmiş DNA bantları bulunmaktadır. Diğer kuyulara herhangi bir örnek yüklenmemiştir.

Resim 4.3'de, Miliyer Tüberküloz tanısı konan hastalardan alınmış olan kan örnekleriyle çalışılmıştır. 3., 4. ve 5. kuyularda bantlar net olarak görülmektedir. 2. kuyuda pozitif kontrolümüz, 8. kuyuda negatif kontrolümüz bulunmaktadır. Pozitif kontrolün, markerın ve hastaların 123 baz çiftlik bant verdiği görülmüştür. Burada da diğer kuyulara herhangi bir örnek yüklenmemiştir.



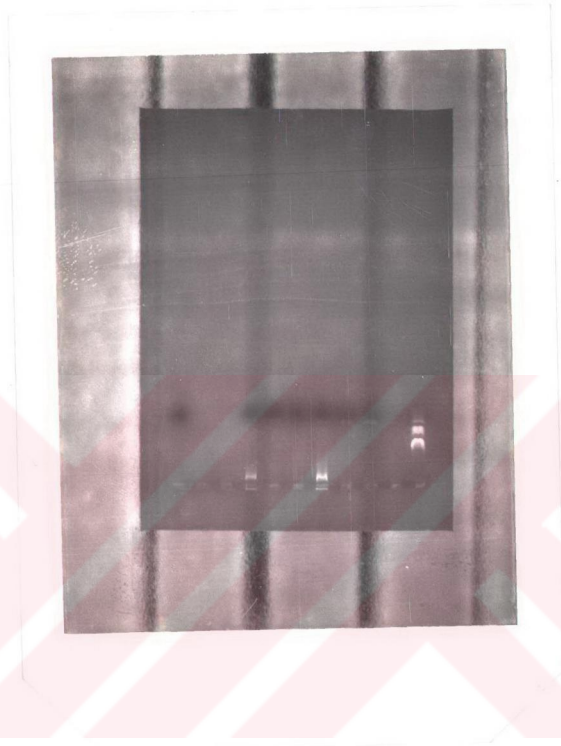
11. ← ————— 2. Marker
Kuyu Kuyu

Resim 4.1. Bir grup Akciğer Tüberküloz hastasının PCR ile amplifiye edilen bakteri DNA 'sının agaroz jelde, UV altındaki görüntüsü (Balgamdaki basil DNA'sı)



11. ←—————→ 2. Marker
Kuyu Kuyu

Resim 4.2. Başka bir grup Akciğer Tüberküloz hastasının PCR ile amplifiye edilen bakteri DNA'sının UV altındaki görünümü (Plevra mayiideki basil DNA'sı)



11. ← 2. Marker
Kuyu Kuyu

Resim 4.3. Bir grup Miliyer Tüberküloz hastasının PCR ile amplifiye edilen bakteri DNA'sının agaroz jelde, UV altındaki görüntüsü (Kandaki basil DNA'sı).

5. TARTIŞMA

Tüberküloz tanısının hızlı bir şekilde konulması, tedaviye hangi ilaç ile başlanacağına belirlenmesi açısından çok önemlidir. Hasta eğer tüberküloz ise tedaviye ne kadar çabuk başlanırsa o kadar hızlı sonuç alınır. PCR yöntemiyle, tüberküloz hastalığının hızlı ve kesin tanısı konulabilmektedir. Bu da PCR yönteminin yaygın olarak kullanımını sağlamıştır (10,21,23).

Bazı araştırmacılar genetik faktörlerin, hastalığın gelişmesinde rolü olduğunu özellikle Kafkasya'da yaşayanlar arasında tüberküloz hastalığının az görüldüğünü buna karşılık Afrika yerlilerinde ve Kızılderili'ler arasında hastalığın daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (41).

Ucuz ve sonuç alınan mikroskopik incelemede etkenin gösterilebilmesi için mililitrede en az 10 000 adet basil bulunması gerektiği gibi, gözlenen basil *Mycobacteriaceae* familyasına ait herhangi bir bakteri olabilir. Kültür yönteminde ise alınan örnekte birkaç bakteri dahi üretilebilirse de bu örnekte canlı basilin bulunması gerekir ve basilin üremesi için 4-8 haftaya ihtiyaç vardır. PCR'a dayandırılarak yaptığımız bu çalışmada araştırılacak örnekte; tek bir *M. tuberculosis* basilinin bulunması tanı için yeterlidir (17,22).

PCR reaksiyonu ile tüberküloz etkeninin bulunması diğer yöntemlere göre daha pahalı bir yöntemdir (31). Ancak yaşamsal önemi bulunan vakalarda, örneğin tüberküloz menenjitde etkenin gösterilmesi daha çabuk, daha hassas ve daha özgün olduğu için klasik bakteriyolojik yöntemler yerine tercih edilmektedir (22). Tüberküloz menenjit vakalarında hasta hemen tedavi edilmezse 3-4 hafta içinde ölür. Bu gibi acil tedavi gerektiren vakalarda uzun süreli kültür sonuçları sadece klinik tanıyı kesinleştirmesi açısından önemlidir. PCR ile ilk tanı evresinde, tanı basil DNA'sının amplifikasyonu ile gösterilip, tüberküloz tedavisine geçilir. Uzun süreli kültür sonucunda *M. tuberculosis* etkeni üretilip PCR bulguları teyid edilir (6,7,22,31,42).

Vakalarda klasik yöntemlerde gözlenen hatalı negatiflik ve hatalı pozitiflik oranları bu teknik ile en aza indirilmiştir (7,8,22). PCR reaksiyonunda kullanılan primerler sadece *M. tuberculosis* genine özgün olduğu için PCR tekniği ile, aside dirençli olarak boyanan mikroorganizmanın *M. tuberculosis* olup olmadığı da kesin olarak ayrılabilir (22,31,42).

Pao ve arkadaşlarının 1990'da yaptıkları çalışmada kültür yöntemiyle 38 balgam örneğine pozitif sonuç verirken, 198 balgam örneğine negatif sonuç vermiştir. Pozitif sonuç verilen 38 balgam örneğine PCR'da pozitif sonuç vermiştir. Oysa negatif sonuç verilen 198 balgam örneğinde, PCR sadece 137'sine negatif sonuç vermiştir. Yine aynı çalışmada örnek olarak balgam dışında plevra mayiide kullanılmıştır. Burada da yine kültürte 11 örneğe

pozitif sonuç verilirken PCR'da 11 örneğe pozitif sonuç vermiştir. Fakat kültür yöntemiyle 37 örneğe negatif sonuç verilirken, bu PCR ile 29 örnektir (42). Kültür yöntemine göre PCR'in daha duyarlı olduğu bu çalışmalarla da görülmektedir.

Claridge ve arkadaşlarının, 1993'de yaptıkları bir çalışmada da 121 balgam örneğine PCR pozitif sonuç verirken, 6 balgam örneğine PCR negatif sonuç vermiştir. Oysa kültür yöntemiyle 127 örneğe de pozitif sonuç verilmiştir. Aynı çalışmada kültür yöntemi ile 52 balgam örneğine negatif sonuç verilirken, PCR sadece bunlardan 19'una negatif sonuç vermiştir (11). Yine kültür yönteminde yalancı pozitiflik sayısının fazla olduğunu bu sonuçlar göstermektedir.

Frederick ve arkadaşlarının 1993'de yaptıkları çalışmada da sadece jel analizi ile PCR'da %85 duyarlılık ve %97 özgüllük saptamışlardır. Bu aşamadan sonra hibridizasyon yaptıkları zaman duyarlılık %91, özgüllükde ise %100'e ulaşmışlardır (40,53).

Biz çalışmamızda;

T4 5' CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG 3' ve

T5 5' CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG 3'

primerlerini kullandık. Amacımız *M. tuberculosis*'in ortaya çıkarılması için IS6110 dizisinde 123 baz çiftlik DNA'nın amplifiye edilmesi idi. Bu sonucu bütün kan, balgam ve plevra mayii örneklerinde aldık.

Bazen tekrar edilen PCR reaksiyonundan sonra görülmesi gereken ürünün görülmemesi, yalancı negatiflik olarak isimlendirilir. Yalancı negatifliğe neden olabilecek durumlar şunlar olabilir (39) :

- Kullanılan primerlerin hedef DNA ile her zaman homolog olmaması,
- Reaksiyonda PCR inhibitörleri bulunması,
- Yetersiz amplifikasyon,
- Başarısız ekstraksiyon.

Anne ve arkadaşlarının 1989'da yaptıkları çalışmada, farklı primerler kullanılarak farklı moleküler ağırlıktaki bantları elde etmişlerdir. Örneğin;

TB-1 5' GAGATCGAGCTGGAGGATCC 3' ve

TB-2 5' AGTGTCAGCCCAAAGGTGTT 3'

primerlerini kullanarak PCR ve elektroforez sonrası 383 baz çiftlik bantları görüp, *M. tuberculosis* tanısı koymuşlardır (39).

Wilson ve arkadaşlarının 1993'de yaptıkları başka bir çalışmada ise iki primer yerine dört primer kullanarak PCR ile testin duyarlılığını daha da artırmışlardır. (nested PCR)

T6294 5' GGACAACGCCGAATTGCGAAGGGC 3' ve

T6850 5' TAGGCGTCGGTGACAAAGGCCACG 3'

primerlerini kullanarak 580 baz çiftlik bantlar elde etmişlerdir. Daha sonra

T6505 5' ACGACCACATCAACC 3' ve

T6670 5' AGTTTGGTCATCAGCC 3'

primerlerini de kullanarak 181 baz çiftlik bantlar elde edilmiştir (50).

Bizim çalışmamız, Pao ve arkadaşlarının 1990'da yaptıkları çalışmaya ve Clarridge ve arkadaşlarının 1993'de yaptıkları çalışmaya uymaktadır. Biz de değişik klinik örneklerde T4 ve T5 primerlerini kullanarak IS6110 dizgesindeki 123 baz çiftlik DNA'yı amplifiye ederek *M.tuberculosis*'i gösterdik. Çünkü kullandığımız primerler aynı ve uyguladığımız yöntemler birbirine benzer idi.

Kocagöz ve arkadaşlarının 1993'de yaptıkları çalışmada, kültür ve PCR yöntemini karşılaştırmış, kültür yönteminde %76 hassaslık ve %100 özgüllük bulunurken, PCR yönteminde %87 hassaslık ve %96 özgüllük tespit edilmiştir. Bu sonuçta bize PCR'in ne kadar duyarlı olduğunu göstermektedir (31).

Üretilen mikobakterilerin tiplerinin belirlenmesinde veya klinik örneklerdeki *M. tuberculosis* tanısında PCR yöntemi çabuk, duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Devam eden çalışmalar sonucunda, bu testin rutin kullanımındaki yeri daha iyi tayin edilecektir (8,11, 35, 36).

6. SONUÇ

Amacımız tüberküloz hastalığı için kesin ve hızlı tanı sağlayabilmektir. Mevcut literatürdeki moleküler tanı yöntemleri kullanılarak bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

1. Bu çalışmada 25 tane tüberküloz hastası, negatif ve pozitif kontrolle birlikte çalışılmıştır. Literatürdeki bu tür çalışmalarla karşılaştırılmış ve T4 ve T5 primerlerini kullanarak IS6110 dizgesindeki 123 baz çiftlik DNA amplifiye edilmiştir.
2. Değişik klinik örneklerden DNA eldesi yapılarak, metodun optimizasyonu ve daha saf ve fazla miktarda DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA'lara PCR uygulanmıştır.
3. Değişik miktarlardaki enzim ve DNA'nın istenmeyen reaksiyonlara neden olduğu belirlenmiştir. Örneğin; aşırı amplifikasyon nedeni ile bazı kuyularda smear oluşmuştur.
4. PCR ile tüberküloz hastalığının kesin ve hızlı tanısının yapılabilirliği saptanmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. AKDAĞ, R., TAŞYARAN, M. A., CEVİZ, N., KIZILTUNÇ, A., BAKAR, N., TOMBUL, H. Z., MIRICI, A., CEVİZ, M., KARAKELOĞLU, C.: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction in various body fluids from children and adults, *The New Journal of Medicine*, 12,16-20, (1995).
2. ARDA, M.: *Biyoteknoloji*, Vol. 1,30-51, Kükem derneği bilimsel yayınları, Ankara, (1990).
3. AYDINLI, K.: Prenatal tanı ve tedavi, *Perspektif yayın ve reklam hizmetleri*,31-50, İstanbul, (1992).
4. BAŞARAN, N.: *Tıbbi Genetik*, Beşinci baskı, Bilim Teknik Yayınevi, İstanbul, (1994).
5. BEAVIS, K., DONALD, L., GİGER, O.: Evaluation of amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens, *J. of Clinical Microbiology*, 33, 2582-2586, (1995).
6. BÖDDINGHAUS, B., ROGALL, T., FLOHR, T., BLÖCKER, H. and BÖTTGER, E.C.: Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA, *J. Clin. Microbiology*, 28, 1751-1759, (1990).
7. BRISSON-NOEL, A., AZNAR C., CHUREAU, C., NGUYEN, S., PIERRE, C., BARTOLI, M., BONETE, R., PIALOUX, G., GICQUEL, B., GARRIGUE, G.: Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation, *Lancet*, 338, 364-366, (1991).
8. BRISSON-NOEL, A., GICQUEL, B., LECOSSIER, D., LEVY-FREBAULT, V., NASSIF, X and HANCE, A.J.: Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of Mycobacterial DNA in clinical samples, *Lancet*, ii,1069-1071, (1989).
9. BROWN, M-AD, INNIS, MA., GELFAND, DH., SNINSKY, SS.: *Sequencing with Taq DNA polymerase*, 189-196, Academic Press Inc, Sandiego, (1990).
10. CHIA C, P., T.S. BENEDICT, Y., JINN-BANG, Y., JUEHN-SHIN, M., ELLEN H, F., CHAU-HSIUNG, C.: Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J. of Clinical Microbiology*, 28, 1877-1880, (1990).

11. CLARRIDGE, J.E., SHAWOR, R.M., SHINNICK, T.M., PLIKAYTIS, B.: Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory, *J. of Clinical Microbiology*, 31, 2049-2056, (1993).
12. CONNOR, J.M. and FERGUSON-SMITH, M.A.: *Essential Medical Genetics*, (OSNEY, M., ed), Four Dragons Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1993).
13. DIEFFENBACH, C.W., DIEKSLER, G.S.: Setting up a PCR laboratory, *PCR Meth. Appl.* 3, 52-57, (1993).
14. DRAGON, E.: Handling reagents in the PCR laboratory, *PCR Meth. Appl.*, 3, 58-59, (1993).
15. EISENACH, K.D., CAVE, M.D. and CRAWFORD, J.T.: PCR detection of *M. tuberculosis* in Diagnostic Molecular Microbiology, American Society for Microbiology, Mayo Foundation, 191-196, (1993).
16. EISENACH, K.D., CAVE, M.D., BATES, J.H. and CRAWFORD, J.T.: PCR amplification of a repetitive DNA sequence specific for *M. tuberculosis*, *J. Infect. Dis.*, 161, 977-981, (1990).
17. ELLEN, J.B., LOCE, R. P., SYDNEY, M. F.: *Bailey&Scott's diagnostic microbiology*, Toronto, (1994).
18. FORBES, A. Betty., Hicks, Karen, E.S.: Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. *J. of Clinical Microbiology*, 31: 1688-1694, 1993.
19. FRIEDMAN, J.M., DILL, F.J., HAYDEN, M.R. and MCGILLIVRAY, B.C.: *Genetics*, (1992).
20. GRAFOS, A. S. P.: *A colour atlas of microbiology* R.J. Olds animal health officer (Bacterial Diseases), food&agriculture organisation of the United Nations, Spain, (1993).
21. GÜLBARAN, Z., HABİBOĞLU, E., EREN, M., BATTALOĞLU, E., ÇELİKOĞLU, F., ÇALIŞ, Ö., TELATAR, M., ÇELİKOĞLU, S., TOLUN, A.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by DNA analysis, *Doğa-Tr. J. of Medical Sciences*, 18, 187-192, (1993).
22. GÜRAN, Ş., YILMAZ, E., BAL, Ş.: Tüberküloz peritonit vakasının polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı, *Yeni Tıp Dergisi*, 13(1), 8-9, (1996).
23. GYLLENSTEN, UB. : Direct sequencing of in vitro amplified DNA, 45-60, Stockton Press, New York, (1989).

24. HERMANS, P.W.M., SCHUIJTEMA, A.R.J., VAN SOOLINGEN, D., VERSTYNNEN, C.P.H.J., BIK, E.M., THOLE, J.E.R., KILK, A.H.J., VAN EMBDEN, J.D.A.: Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction, J. Clin. Microbiol., 28, 1204-1213, (1990).
25. INNIS, MA., MYAMBO, KE., GELFAND, DH., BROW MAD.: DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction - amplified DNA, Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 9436-9440, (1988).
26. IVINSON, AJ. A TAYLOR, GR., McPHERSON, MJ., QUIRKE, P.: PCR : A practical approach, 15 - 27, Oxford University press, Oxford, (1993).
27. JINNO, Y., YOSHIURA, K., NIHKAWA, N.: Use of psoralen as extinguisher of contaminate DNA in PCR, Nucleic acid res., 18, 6739, (1990).
28. JIN-SUNG, L.: Alternative dideoxy sequencing of double - stranded DNA by cyclic reactions using Taq polymerase, DNA and Cell Biology, 10 (1), 67 - 73, (1991).
29. KAWASAKI, ES., WANG, AM.: Detection of germ expression, 89 - 97, Stockton Press, New York, (1989).
30. KOCABAŞ, A.: Tüberküloz kliniği ve kontrolü, Çukurova Üniversitesi Basımevi, Adana, (1991).
31. KOCAGÖZ, T., YILMAZ, E., ÖZKARA, Ş., KOCAGÖZ, S., HAYRAN, M., SACHEDEVA, M., CHAMBERS, F. H.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure, J. of Clinical Microbiology, 31, 1435-1438, (1993).
32. KIRSHNER, P. and BÖTTGER, E.C.: Microheterogeneity within rRNA of *Mycobacterium gordonae*, J. Clin. Microbiol., 30, 1049-1050, (1992).
33. KOLK., A.R.J., SCHUIJTEMA, S., KUJIPER, V., LEEWER, P.W.M., HERMANS, J.D.A., VAN, E.: Detection of *mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction & a non-radioactive detection system, J. of Clinical Microbiology, 30, 2567-2575, (1992).
34. KWOK, S., HIGUCHI, R.: Avoiding false positives with PCR, 339,237-238, (1989).
35. KITCHIN, P.A., BOOTMAN, J.S.: Quality control of the PCR, Rev. Med. Viol., 3, 107-114, (1993).

36. LYNCNH, J., BROWN, J.: The polymerase chain reaction, Current and future clinical applications, *J. Med. Genet*, 27, 2-9, (1990).
37. MANIATIS, T., FRITSCH, E. SAMBROOK, J.: Molecular cloning, A laboratory manual cold spring harbor laboratory, (1983).
38. MULLIS, K. and FALONA, F.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro, The polymerase chain reaction, *Methods in enzymology*, 155, 335, (1987).
39. NOEL, A.B., GICQUEL, B., LECOSSIER, D., FREBAULT, V.L., NASSIF, X., HANCE, A.J.: Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of *Mycobacterial* DNA in Clinical Samples, *The Lancet*, 4, 1069-1071, (1989).
40. NOLTE, S. F., METCHOCK, B., MCGOWAN, E.J., EDWARDS, A., OKWUMABUA, O., THURMOND, C., MITCHELL, P.S., PLIKAYTIS, B., SHINNICK, T.: Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction & DNA hybridization, *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1777-1782, (1993).
41. ÖZYARDIMCI, N.: Gögüs Hastalıkları, Bursa Verem Savaş Demeği Yayınları, Cilt:1, 1-44, Uludağ Üniversitesi Basımevi, (1985).
42. PAO, C.C., YEN, T.S.B., YOU, J.B., MAA, J.S., FISS, E. M., CHANG, C.H.: Detection and identification of *M. tuberculosis* by DNA amplification, *J. of Clinical Microbiology*, 28, 1877-1880, (1990).
43. ROCEHELLE, P.A., WEIGHTMAN, A.J. F.: D. Nase I Treatment of Taq DNA polymeras for complete PCR decontamination, *Biotechniques*, 13, 520, (1992).
44. ROGALL, T., FLOHR, T., BÖTTGER, E.C.: Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA, *J. of General Microbiology*, 136, 1915-1920, (1990).
45. SARDELLI, S., WILLIAMS, J.F.: PCR optimization reactions conditions and components, Perkin-Elmer Cetus, *Biotechnology catalog*, 54-55, (1991).
46. SEKIYA, T.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformational polymorphisms, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 2766 - 2770, (1989).
47. SHANKAR, P., MANJUNATH, N., LAKSHMI, R., ADITI, B., SETH, P.: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction, *Lancet*, 335, 423, (1990).

48. SIRKO, D.A., EHRLICH, GD.: Laboratory facilities, protocols, and operations, In: PCR based diagnostics in infectious disease, Blackwell Scientific Publications, Boston, 27, (1994).
49. STRATFORD, B.C.: An atlas of medical microbiology common human pathogens, Blackwell Scientific Publications, London, (1977).
50. STUART, M. W., RUTH, Mc N., NYE, P., GODFREY, P.D., NEIL, F., STOKER, N., VOLLER, A.: Progress toward a simplified polymerase chain reaction & its application to diagnosis of tuberculosis, J. of Clinical Microbiology, 31, 776-782, (1993).
51. TABOR, S., RICHARDSON, C.C.: Effect of manganese ions on the incorporation of dideoxynucleotides by bacteriophage T7 DNA polymerase and Escherichia Coli DNA polymerase I, Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 4076 - 4080, (1989).
52. TAYLOR, G.: Polymerase chain reaction, basic principles and automation, Oxford University press, Oxford, 1-15, (1993).
53. THEIN, S.L, WALLACE, RB.: The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders, A practical approach, IRL press, Virginia, 33 - 50, (1986).
54. THIERRY, D., CAVE, M.D., EISNACH, K., CRAWFORD, D., BATES, J.T., GIRQUEL, B., GUESTON, J.L.: IS6110, an IS-like element of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Nucleic Acids Res, 18, 188, (1990).
55. THOMPSON, M.W., Mc INNES, R.R. and WILLARD, H.F.: Genetics in Medicine, (WONSIEWICZ, M.J., ed) Fifth Edition, 97-114 W.B. Saunders Company, Philadelphia, (1991).
56. TÜRKOĞLU, S., BADUR, S.: Enfeksiyon Hastalıkları Tanısında PCR, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 43-47, İstanbul, 22, (1995).
57. VOGELSTEIN, B., GILLESPIE, D.: Preparative and analytical purification of DNA from agarose, Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 615 - 619, (1979).
58. ZWADYK, P., DOWN, J.A., MYERS, N. and DEY, M.S.: Rendeing of mycobacteria safe for molecular diagnostic studies and development of a lysis method for strand Displacement amplification and PCR, J. Clin. Microbiology, 32, 2140-2146, (1994).

ÖZGEÇMİŞ

T.C. vatandaşı olan Derya ÜSTÜNER 24.04.1967 yılında Ödemiş' de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Antalya'da tamamladı. 1985 senesinde Antalya Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl Orta Doğu Teknik Üniversitesi (O.D.T.Ü.) Gıda Mühendisliği Bölümü'nü kazandı. 1991 senesinde mezun oldu. Burdur Süt Endüstrisi Kurumu'nda (S.E.K.) çalıştı. 1993 yılında Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi kadrosuna atanarak Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na bağlı Tıbbi Genetik Bilim Dalı'nda görevlendirildi. Halen Tıbbi Genetik Bilim Dalı'nda görevini sürdürmektedir. Evlidir. 10 Temmuz 1996