

## Tüberküloz Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminin Konvansiyonel Yöntemlerle Karşılaştırılması\*

Araş.Gör. Sezgin GÜNEŞ, Dr. Hasan BAĞCI, Dr. Nurten KARA

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

- ✓ Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), kültüre göre daha kısa sürede cevap vermesi nedeniyle *Mycobacterium tuberculosis*'in tanısında kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler bu bakteriye özgül olan Insertion Sequence 6110 (IS6110)'a ait olup 123 baz çifti uzunluğunda bir bölgenin çoğaltılmasında kullanıldılar.

31 balgam, 20 idrar, 5 parasentez, 4 torasentez, 3 periton mayı ve 1 bronkiyal lavaj olmak üzere 64 örnek çalışıldı. Balgam örneklerinin dekontaminasyonu N-asetil-L-sistein-NaOH, diğer örneklerin dekontaminasyonu ise NaOH-Sodyum sitrat yöntemiyle yapıldı. Kaynatma yöntemiyle elde edilen DNA, polimeraz zincir reaksiyonunda kullanıldı. 33 örnek PCR pozitif, 31 örnek PCR negatif olarak bulundu. ARB (aside-alkole rezistan basil) pozitif örneklerin sayısı 30, ARB negatif örneklerin sayısı ise 30'du. Kültür sonuçlarına göre 17 örnek kültür pozitif, 31 örnek ise kültür negatifti. Polimeraz zincir reaksiyonunun duyarlılığı %94, özgüllüğü ise %79 olarak hesaplandı.

Standart suş *M. tuberculosis* H37Rq'dan elde edilen DNA ile yürütülen PCR'in *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* DNA'larının varlığında (1µg'dan az) bile normal olarak çalıştığı görüldüğü.

Standart suş DNA'sının farklı konsantrasyonlarının PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen sonuçlara göre içinde yaklaşık olarak 8 *M. tuberculosis* genomuna eşdeğer miktarlarda DNA bulunduran biyolojik materyallerde basilin varlığının gösterilmesinin mümkün olduğu bulundu.

Sonuç olarak, PCR'in tüberküloz tanısında kullanılabilecek hızlı, duyarlı ve özgül bir yöntem olduğu gösterildi.

**Anahtar kelimeler:** Tüberküloz, tanı, PCR

- ✓ **Comparison of The *Mycobacterium Tuberculosis* with The Conventional Methods**

Polymerase chain reaction (PCR), due to its faster response than culture was used for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. Amplification reactions were performed using primers that amplify a 123 bp fragment of Insertion Sequence 6110 (IS6110) specific to *M. tuberculosis*.

A total of 64 samples were tested by PCR. The type (number) of specimens tested as follows: sputum (31), urine (20), perisentez (5), torosentez (4), peritoneal fluid (3) and bronchial washing (1). Sputum samples were decontaminated by N-acetyl-L-cysteine-NaOH, other samples were decontaminated by NaOH-Na citrate method. The DNA used in PCR was obtained by boiling. 33 samples were found positive with PCR and 30 samples were negative with PCR. 30 samples were smear positive and 30 samples were smear negative. 17 samples were culture positive and 30 samples were culture negative. The sensitivity and specificity were 94% and 79%, respectively.

Polymerase chain reaction run with the DNA isolated from standart *M. tuberculosis* strain

\* Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Araştırma Fonu'na (T-148 no.lu proje) desteklenmiş olup, Araş. Gör. Sezgin GÜNEŞ'in Yüksek Lisans Tezi'nden hazırlanmıştır.

H37Rq was working normally in the presence of DNAs (less than 1 µg) of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

The detection limit for PCR was determined by making serial dilutions of DNA from the standart *M. tuberculosis* H37Rq strain. The detection limit of *M. tuberculosis* H37Rq strain was found to be as low as ~8 *M. tuberculosis* genome equivalents of DNA in biological samples.

**Key words:** Tuberculosis, diagnosis, PCR

## GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü istatistiklerine göre, 1999 yılında tüberküloz 9 milyon yeni hastaya ve 3 milyon hastanın da ölümüne neden olmuştur<sup>(3)</sup>. Gelişmekte olan ülkelerde, vertebral tüberkülozu hala başlıca morbidite, mortalite ve non-travmatik parapleji nedenlerinden biridir<sup>(1)</sup>. Gelişmiş ülkelerde de AIDS'in yaygın hale gelmesiyle tüberkülozlu hasta sayısı yeniden artmaya başlamıştır<sup>(2)</sup>. Tüberkülozun diğer infeksiyon hastalıklarından daha öldürücü olması ve HIV (Human Immunodeficiency Virus) infeksiyonunun epidemik hale gelmesi nedeniyle erken tanısı büyük önem taşımaktadır<sup>(4)</sup>. Tüberküloz tedavisinde gelişen ilaç direnci hastalığın kontrolünü zorlaştırmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Tüberküloza Karşı Birlik ve Akciğer Hastalıkları Global Projesi'nde (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Global Project) 1994-1997 yılları arasında 35 ülkede yapılan istatistiklere göre tüberküloz tedavisinde yaygın kullanılan ilk dört ilaca karşı direnç gelişmiştir ve hızlı kontrol önlemleri geliştirilmediği sürece bu ilaçlara karşı direnç oranları artacaktır<sup>(5)</sup>. Tüberkülozun gelişmekte ve gelişmiş ülkeleri ilgilendiren ve ilaçlara karşı direnç geliştiren bir hastalık olması nedeniyle erken tanısı büyük önem taşımaktadır.

Ön tanı, hasta hikayesi, klinik ve radyolojik bulguların ışığında konulabilirse de kesin tanı için histolojik ve bakteriyolojik analizler gerekmektedir<sup>(17)</sup>. *M. tuberculosis* tanısında kullanılan en hızlı yöntem boyanmış yayma preparatların mikroskopla ince-

lenmesiyle yapılan ARB (aside ve alkalene dirençli bakteri) araştırmasıdır. Bu yöntemin duyarlılığı oldukça düşüktür ve ancak 1 ml'de yaklaşık 10000 bakteri taşıyan örneklerde pozitif sonuç verir<sup>(9-11)</sup>. Kültür yöntemi ise ancak 1 ml'de yaklaşık 100 bakteriyi tanıyabilmekte ve bazen 10 haftada sonuçlanabilmektedir<sup>(12)</sup>. Bu testin duyarlılığı yalnızca %50 olarak tahmin edilmektedir<sup>(11)</sup>.

PCR, tipik ve atipik bakterileri ayırabilmektedir. Bu durum, *M. tuberculosis* ile aynı klinik tabloyu gösteren diğer mikobakterileri ayırmada önemlidir<sup>(13)</sup>.

Bu çalışmamızda tüberküloz tanısında kullanılan PCR testinin geliştirilmesi ile tanı testi olarak duyarlılık ve özgüllüğünü ölçmeyi amaçladık.

## MATERYAL VE METOD

Bu çalışma OMÜ Merkez Laboratuvarı Tüberküloz Ünitesine ve Samsun Göğüs Hastalıkları Hastanesi'nde tüberküloz tanısıyla yatmakta olan ve ilaç tedavisi gören 64 hasta ve 15 sağlıklı kişi üzerinde yapıldı. 64 hasta örneği 31 balgam, 20 idrar, 5 parasentez, 4 torasentez, 3 periton, ve 1 plevral mayiden oluşmaktadır. 15 kontrol örneği 10 balgam ve 5 idrardan oluşmaktadır. 13 örneğin kültüründe kontaminasyon olması, 1 örneğin kültür ve 4 örneğin ARB sonuçlarının bilinmemesi nedeniyle toplam 18 örnek değerlendirilmeye alınmadı.

### Örneklerin PCR'a Hazırlanması

Örneklerin laboratuvar ve çalışanların infeksiyonunu engellemesi amacıyla yapılan dekontaminasyon işlemi için Sechi<sup>(6)</sup>, bakteri

DNA'larını saflaştırmak için "Kaynatma" metodu kullanıldı<sup>(6)</sup>.

#### **DNA Amplifikasyonu**

Kullanılan primerler, *M. tuberculosis* kromozomunda ortalama 16 kez tekrarlanan IS6110 içinde 123 baz çiftlik bölgeyi tanımlamaktadır. Kullanılan primer çifti TUB-F:(5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3') ve TUB-R:(5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCCGG-3')<sup>(7)</sup> olup TÜBİTAK Gebze Araştırma Enstitüsü'nde sentezlenmiştir. PCR, 25 µl'lik reaksiyon hacminde, 1 x PCR tamponu (Promega, Extrapol, Fermentas Taq DNA polimeraz tamponlarından biri), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM deoksiribonükleosid trifosfatlar, her primerden 0.5 µM, %5 gliserol ve DMSO, 1.25 U Taq DNA polimeraz (Promega, Extrapol, Fermentas) ve 2 µl DNA kullanılarak yapıldı. Reaksiyon şartları, 96°C'de 7 dakika denatürasyon; 35 döngü: 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 68°C'de 1 dakika hibridizasyon ve 72°C'de 1 dakika sentez; 72°C'de 5 dakika son sentez şeklindeydi.

PCR ürünleri %2'lik agarozda 100 bp DNA Ladder'i (GIBCO BRL ve Promega) kullanılarak yürütüldü. Elektroforez sonrası etidiyum bromid ile boyanan DNA, UV transilluminatörde (Vilber Lourmat) incelendi ve fotoğralları çekildi. 123 bp'lik amplifikasyon ürünün gözlenmesi pozitif olarak değerlendirildi.

#### ***E. coli* ve *S. aureus* DNA'larının PCR'a etkisi**

*E. coli* ve *S. aureus* DNA'larını saflaştırmak için "Kaynatma" metodu<sup>(6)</sup> modifiye edilerek kullanıldı. *E. coli* ve *S. aureus* inokulumları 37°C'de bir gece büyütüldüler. Sonra 50ml'lik üç falkon tüpünden birincisine 5 ml *E. coli*, ikincisine 5 ml *S. aureus* kültürlerinden eklendi, üçüncüsüne de 5 ml *M. tuberculosis* standart suş H37Rq stoğundan bir "loop" dolusu bakteri konularak vorteksle karıştırıldı. Bundan sonra üç tüpe de aşağıdaki işlemler uygulandı<sup>(6)</sup>. Çökelti Eppendorf

tüplerine alınıp TE ile 400 µl'ye tamamlandı ve 30 dakika kaynatıldı. Soğuduktan sonra eşit hacimde kloroform:izoamil alkol (24:1) konuldu. Vortekslendi. 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Sıvı üst fazdan 200 µl alındıktan sonra üzerine %96'lık 400 µl soğuk absolü alkol konuldu. -18°C'de 30 dakika bekletildi. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. DNA peleti üzerine %70'lik 1 ml alkol konuldu ve pelet yıkandı. 13000 rpm'de 10 dakika çöktürüldü. Süpernatant atılıp tüpler 37°C'de 30 dakika kurutuldu. DNA'lara 25 µl TE eklenerek 4°C'de saklandı. OD 260'da DNA konsantrasyonları ölçüldü. *M. tuberculosis* H37Rq DNA konsantrasyonu 0.56 µg/µl, *E. coli*'nin 0.73 µg/µl, *S. aureus*'un 1.8 µg/µl olarak hesaplandı. PCR daha önce anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. PCR amplifikasyon ürünü %2'lik agaroz jel elektroforezi yapılarak analiz edildi.

#### **Kullandığımız Yöntemin Test Edilmesi**

Kullandığımız PCR yöntemiyle, PCR ürününü görebilmemiz için en az kaç tane *M. tuberculosis* genomunun bulunması gerektiğini test ettik. Bu test için *M. tuberculosis* H37Rq standart suş DNA'sı kullanıldı. H37Rq standart suş DNA'sından 2'şer µl kullanılarak PCR yapıldı. Bu stok DNA'nın konsantrasyonu 112 ng/2 µl idi. H37Rq stok DNA'sı 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> ve 10<sup>8</sup> kez seyreltildi. Dolayısıyla 25 µl reaksiyon karışımlarındaki DNA final konsantrasyonları yaklaşık olarak 11 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg ve 1 fg olacaktır. Amplifikasyon ürünleri etidiyum bromür eklenmiş olan %2'lik agaroz jeli üzerinde elektroforezle ayrıştırılarak incelendi.

#### **BULGULAR**

Bu çalışmada incelemeye alınan toplam 64 hastanın biyolojik örnekleriyle yürütülen PCR, ARB ve kültür testleri sonuçları tablo 1'de verilmektedir. 46 örnekle yürütülen PCR

sonuçları tablo II'de verilmektedir. PCR sonuçları kültür testi sonuçlarına göre değerlendirilmektedir.

Tablo I. PCR, ARB ve Kültür Testleri Sonuçları.

Test Türü	Kontaminasyon içeren örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı	Negatif örnek sayısı
PCR	-	33	31
Kültür	13	17	31
ARB	-	30	30

Çalışmamızda duyarlılık (PCR pozitif örnek sayısı/Tüberküloz pozitif örnek sayısı x 100) %94, özgüllük (PCR negatif örnek sayısı/Tüberküloz negatif örnek sayısı x 100) %79, pozitif öngörüm %73, negatif öngörüm %96 olarak hesaplandı.

15 kişilik kontrol grubundaki tüm PCR sonuçlarında amplifikasyon gözlenmedi.

#### **M. tuberculosis H37 Standart Suşu'nun E. coli ve S. aureus Varlığında Çoğaltılması**

Standart suş *M. tuberculosis* H37 Rq DNA'sı ile yürütülen PCR'in 25 µl'lik reaksiyon karışımı içerisinde 1 µg *E. coli* ve *S. aureus* DNA'larının varlığının inhibisyona neden olduğu görüldü.

#### **Kullandığımız PCR Yönteminin Test Edilmesi**

Standart H37 Rq suşu DNA'larının farklı konsantrasyonlarının PCR ile çoğaltılması sonucunda, DNA konsantrasyonunun azalmasıyla PCR sonunda gözlenen 123 baz çifti uzunluğundaki DNA bantının yoğunluğu azalmaktadır (Şekil).

#### **TARTIŞMA**

PCR *M. tuberculosis* tanısında kullanılan diğer laboratuvar yöntemlerine göre hızlı, duyarlı ve özgül bir yöntemdir<sup>(7,8,15)</sup>. PCR'in duyarlılık ve özgüllüğü değişik araştırma grupları tarafından değişik yüzdelerde bulundu: %81.3 ve %94.7<sup>(9)</sup>, %93 ve %75.5<sup>(14)</sup>, %92.2 ve %98.5<sup>(15)</sup>, %100 ve %62.6<sup>(16)</sup>, %87 ve %97<sup>(17)</sup>, %94.7 ve %83.3<sup>(18)</sup>. Bizim bulduğumuz duyarlılık ve özgüllük yüzdeleri ise sırasıyla 94.3 ve 79'dur (tablo II). Sonuçlarımız bu konudaki diğer çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. *M. tuberculosis*'in PCR ile yapılan tanısında pozitif ve negatif öngörüm değerleri ise sırasıyla %97 ve %84<sup>(17)</sup>, %94.7 ve %84<sup>(18)</sup> olarak bulundu. Bizim bulduğumuz pozitif ve negatif öngörüm değerleri ise %73 ve %96'dır (tablo II). PCR standart kabul edilerek kültür testiyle yapılan uyum

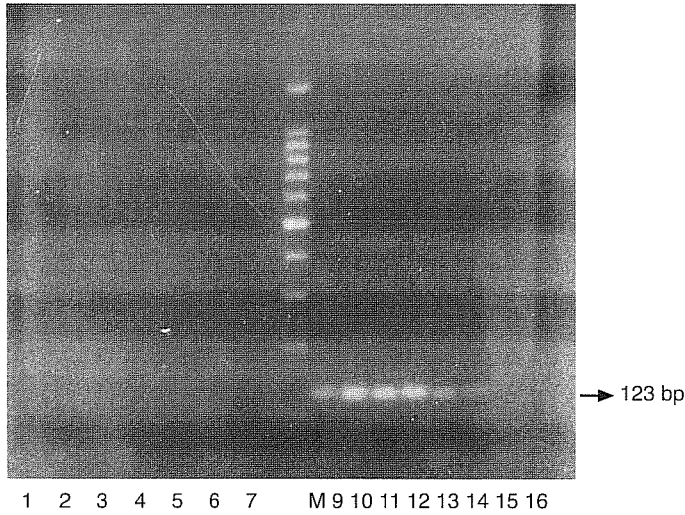
Tablo II. *M. Tuberculosis* Tanısında PCR Sonuçlarının Kültür ve ARB ve Test Sonuçlarıyla Karşılaştırılması.

Örnek sayısı	Örnek sayısı				Duyarlılık (sensitivity) (%)	Özgüllük (specificity) (%)	Öngörüm (predictivity)	
	Kültür pozitif <sup>a</sup>		Kültür negatif <sup>b</sup>				Pozitif	Negatif
	PCR+	PCR-	PCR+	PCR-				
Toplam (46)*	16	1	6	23	94	79	73	96
ARB pozitif ( 22)	14	1	3	4	93	57	82	80
ARB negatif (24)	2	0	3	19	100	86	40	100

<sup>a</sup>: *M. tuberculosis* için pozitif kültür sonuçları

<sup>b</sup>: *M. tuberculosis* negatif kültür sonuçları

\* 13 örneğin kültüründe kontaminasyon olması ve 5 örneğin kültür ya da ARB sonuçlarının bilinmemesi nedeniyle toplam 18 örnek değerlendirilmeye alınmadı.



Şekil. Optimize edilen PCR'ın duyarlılığının ölçülmesi.

Kuyu no. 1-8: Sağlıklı insanlardan alınan örneklerle yürütölen PCR;  
Kuyu no. 9: "Promega 100 baz çifti DNA Ladder size marker";  
Kuyu no. 10-15 standart suş M. tuberculosis H37 Rq DNA'ları: 10. kuyu ~11 ng, 11. kuyu ~1 ng, 12. kuyu ~100 pg, 13. kuyu ~10 pg, 14. kuyu ~1pg, 15. kuyu ~100 fg, 16 kuyu negatif kontrol. Negatif kontrol ile balgam ve idrar örneklerinde bant gözlenemezken, standart suş M. tuberculosis H37 Rq DNA'sının 10'ar kez seyreltilerek katılmasıyla yürütölen PCR tüplerinde beklendiği gibi 123 baz çiftlik DNA bantları gözlendi.

kontrol testinde Kappa değerı 0.692. PCR ve ARB uyumuna bakıldığında ise Kappa değerı 0.564 bulundu. Bu testler arasında da makul bir uyum görölmektedir.

46 örnekle yürütölen PCR sonuçlarına göre örneklerin 14 tanesi üç testte de pozitif sonuç verdi. Bir örnek de kültür pozitif olduğu halde PCR sonucu negatif bulunmuőtur. Bu durum, PCR'da inokölasyon hacmi çok küçük olduğu için (inokölasyon hacmi kültürde 0.5-1 ml, PCR'da ise 1-2 µl'dir), bakteri sayısının az olduğu durumlarda, örneğin işlendikten sonra inokölasyon için alınan kısmında mikobakteri DNA'sının bulunmamasından kaynaklanabilir. 6 örnek ise kültür sonuçlarına göre negatif, PCR sonuçlarına göre pozitif sonuç vermiőtir. Bu durum kültürde ve

linik olarak görölmeyen geçmiőteki bir pulmoner hastalıktan veya yalancı pozitif sonuçlardan kaynaklanabilir<sup>(19)</sup>.

Duyarlılık ve özgülölük sonuçları dekontaminasyon, DNA izolasyonu ve PCR ürünün görüntölenmesinde farklı yöntemlerin kullanımına bağlı olarak büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Duyarlılık ve özgülölüğün karşılaştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada yedi farklı laboratuvarından içinde hiç M. tuberculosis basili bulundurmayan veya bilinen sayıda basil bulunduran örneklere tanı koymaları istenmiőtir<sup>(20)</sup>. Her laboratuvarın IS6110 bölgesini çoğaltmaya yönelik kendi yöntemlerini kullandığı tanı çalışmaları sonuçlarına göre yanlış pozitif sonuçların %3-20 hatta laboratuvarından birinde %77 olduğu; duyarlılığın ise 10<sup>3</sup> bakterinin var olduğu örneklerde %2-90 arasında deđiőtiđi görölmüőtür<sup>(20)</sup>. Elde edilen sonuçların farklı olmasının nedeni olarak bu laboratuvarlarda balgam örneklerine uygulanan akıcı hale getirme (liquefaction) ve dekontaminasyon işlemlerinin farklı oluşu ve amplifikasyon işlemlerinde standardizasyonun bulunmayıőı gösterilmiőtir<sup>(21)</sup>.

M. tuberculosis'in PCR ile tanısında yanlış sonuçlara neden olan bazı sorunlar gözlenmektedir. Bu sorunlardan biri, özellikle M. tuberculosis tanısının rutin olarak yapıldığı laboratuvarlarda görölmektedir. Laboratuvar malzemelerinden, kullanılan pipetörlerden veya doğrudan havadan daha önce amplifiye edilmiő PCR ürünleri sonraki çalışmalarda kontaminasyona neden olmakta ve yalancı pozitif sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir. Bunu engellemek için PCR'ın ve dekontaminasyonun yapıldığı bölümler ayrı odalarda olmalıdır. Her PCR'da olası kontaminasyonu gözlemek amacıyla negatif kontrol kullanıldı. DNA izolasyonu için basit ve ucuz oluşu ne-

deniyle kaynatma yöntemini kullandık<sup>(8)</sup>. DNA konsantrasyonunun yüksek oluşu da PCR'ı inhibe etmekte veya zayıf bantların görülmesine neden olmaktadır<sup>(23)</sup>. Bu nedenle reaksiyona girecek DNA konsantrasyonu iyi ayarlanmalıdır.

PCR sonucunda amplifikasyon gözlenmeyen örneklerde, pipetajın DNA'nın olmadığı bölümden yapılmış olabileceği düşünülerek, aynı örnekten ikinci ve üçüncü kez PCR yapıldı. Bunların bir kısmının pozitif sonuç verdiği görüldü. Bu sonuç PCR'ın kesin negatif sonuç verdiğini söyleyebilmek için aynı örneğin birkaç kez çalışılması gerektiğini göstermektedir. Bu gözlemlerimiz, Afghani ve ark.'nın yaptıkları çalışma sonuçlarıyla da uyum içindedir<sup>(24)</sup>.

Mikobakterilerle ilgili bir diğer sorun da, hücre duvarlarının bir özelliğinden dolayı bu bakterilerin bir araya gelerek kümeleşmeleridir. Bu durum, mikobakterilerin klinik örneklerde eşit dağılımını engellemektedir<sup>(25)</sup>.

*E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin normal vücut florasında varlığı nedeniyle bu bakterilerin *M. tuberculosis* amplifikasyonunu inhibe edebileceği düşünüldü. Bunu test etmek amacıyla, PCR, *E. coli* ve *S. aureus* DNA'larının farklı konsantrasyonları varlığında yürütüldü. 25 µl'lik reaksiyon karışımı içerisinde, standart suş *M. tuberculosis* H37Rq'dan elde edilen DNA ile yürütülen PCR'da *E. coli* ve *S. aureus* DNA'larının 1 µg miktarlarının inhibisyona neden oldukları görüldü.

Reaksiyon karışımında denatürasyon sıcaklığını düşüren DMSO<sup>(26)</sup> ve gliserol<sup>(27)</sup> (her ikisi de %5 son konsantrasyonlarında) eklenerek PCR yürütüldü. Reaksiyon karışımında DMSO ve gliserol içermeyen PCR'larda negatif sonuç veren 15 örnekten 3'ü DMSO ve gliserol varlığında pozitif sonuç verdiler. Bu nedenle sonraki tüm PCR çalışmaları bu iki molekülü içerecek şekilde yürütüldü.

Kullandığımız yöntemin test edilmesine

yönelik yaptığımız PCR şartlarında örneklerde en az 8 *M. tuberculosis* basili bulunması durumunda PCR'la pozitif sonuç alınabilmektedir.

## SONUÇ

PCR, inhibisyon ve çapraz kontaminasyonun engellenmesi durumunda *M. tuberculosis* tanısında kullanılacak hızlı, duyarlı ve özgül bir yöntemdir.

**Teşekkür:** Örneklerin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Samsun Göğüs Hastalıkları Hastanesi Başhekimini Dr. Ata KARAYUNUS'a, Samsun Verem Savaş Dispanseri Hekimlerine ve Hastanemiz Merkez Laboratuvarı Tüberküloz Ünitesi'nden Biyolog Yasemin EKİNCİ'ye teşekkür ederiz.

Geliş tarihi : 20.07.2001

Yayına kabul tarihi : 19.11.2001

Yazışma adresi:

Araş. Gör. Sezgin GÜNEŞ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

55139 Kurupelit, SAMSUN

## KAYNAKLAR

1. Currier BL, Eismont FJ. Infectiones of the Spine. The spine. Third Ed., Philadelphia: WB Saunders Co, 1992; 1319-1380.
2. Narain JP, Raviglione MC, Kochi A. HIV-associated tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for prevention. Tubercle 1992; 73: 311-321.
3. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA 1995; 273: 220-226.
4. Tala E, Kochi A. Elimination of tuberculosis from Europe and the world. Eur Respir Journal 1991; 4: 1159-1160.
5. Mendez PA, Raviglione MC, Laszlo A. et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance 1994-1997. NEJM 1998; 338: 1641-1649.

6. Sechi L. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis from urine and other clinical samples from AIDS and non-HIV infected patients. *Molecular and Cellular Probes* 1997; 11: 281-285.
7. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infectious Diseases* 1990; 161: 977-981.
8. Afghani B, Stutman HR. Diagnosis of tuberculosis: Can the polymerase chain reaction replace acid-fast bacilli smear and culture? *J Inf Dis* 1995; 172: 903-904.
9. Abe C, Hirano K, Wada M. 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.
10. Bates JH. Diagnosis of tuberculosis. *Chest* 1979; 76: 757-763.
11. Daniel TM. The rapid diagnosis of tuberculosis: A selective review. *J Lab Clin Med* 1990; 116: 277-282.
12. Kim TC, Blackman RS, Heatwole KM. Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with tuberculosis. *Am Rev Res Dis* 1989; 129: 264-268.
13. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, et al. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 255-258.
14. Miller N, Dykey DD, Cleary TJ. Evaluation of gene-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 393-397.
15. Pao CC, Benedict YTS, You JB, Maa JS, et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1877-1880.
16. Kocagöz T, Yılmaz E, Özkara Ş, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1435-1438.
17. Berk RH, Yazıcı M, Atabey N, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formaldehyde solutions- fixed, paraffin embedded tissue by polymerase chain reaction. *Spine* 1996; 21: 1991-1995.
18. Bennedsen J, Thomsen VO, Plyffer GE, et al. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1994; 34: 1407-1411.
19. Noordhoek GT, Kolk AHJ, Bjune G, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 277-284.
20. Noordhoek GT, Embden JDA, Kolk AHJ. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2522-2525.
21. Mangiapan G, Vokurka M, Scholds L, et al. Sequence capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1209-1215.
22. Afghani B, Lieberman JM, Duke MB, et al. Comparison of quantitative polymerase chain reaction, acid-fast bacilli smear and culture results in patients receiving therapy for pulmonary tuberculosis. *Diag Microbiol Inf Dis* 1997; 29: 73-79.
23. Daloviso JR, James SM, Kemmerly SA, et al. Comparison of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) direct test, Amplicor MTB PCR, and IS6110-PCR for detection of MTB in respiratory specimens. *Clin Inf Dis* 1996; 23: 1099-1106.
24. Fu YH, Kuhl DPA, Pizzutti A, et al. Variation of the CGG repeat fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991; 67: 1047-1058.
25. Heitz D, Devys D, Imbert G, et al. Inheritance of the Fragile X syndrome: Size of the Fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. *J Med Genet* 1992; 29: 794-801.