

KLİNİK ÖRNEKLERDEN KÜLTÜR İLE SAPTANAN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEKS KÖKENLERİNİN OTOMATİZE PCR YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

AUTOMATIZED PCR EVALUATION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX ISOLATES RECOVERED FROM CLINICAL SPECIMENS WITH CULTURE

Ayşen BAYRAM

Canan ÇELİKSÖZ

Tekin KARSLIĞİL

İclal BALCI

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep

Anahtar Sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, kültür, Cobas Amplicor MTB, PCR

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, culture, Cobas Amplicor MTB, PCR

Geliş: 04 Mart 2005

Kabul: 27 Haziran 2005

ÖZET

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerinden kültür yöntemleri ile tanınan *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökenlerinin, otomatize bir polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır. Laboratuvara tüberküloz öntanısi ile gönderilen örneklerinin standart NaOH-NALC yöntemiyle dekontaminasyon ve homojenizasyonları yapıldıktan sonra, gliserinli Löwenstein-Jensen besiyerine ve Middlebrook 7H12 sıvı besiyeri içeren BACTEC B12 şişelerine ekimleri yapılmıştır. Löwenstein-Jensen besiyerinde tipik kolonilerin ürediği gözlenen 41 örnek ile radyometrik BACTEC sisteminde (Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems, Cockeysville, MD, ABD) *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlanan 127 örnek çalışma grubunu oluşturmuştur. Aynı süreçte gelen ve kültürde üreme saptanmayan 46 örnek ise kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. COBAS AMPLICOR MTB PCR (Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ, ABD) yöntemiyle, Löwenstein-Jensen besiyerinde üreme saptanan örneklerin 32'sinde (%78.1), BACTEC sisteminde üreme sergileyen örneklerin ise 86'sında (%67.8) pozitiflik saptanmıştır. Kültürde üreme saptanmayan 46 örneğin tümünde (%100) moleküler yöntemle sonuçlar negatif olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, klinik örneklerden *M. tuberculosis* kompleks kökenlerinin saptanmasında kısa sürede tanıya gidilebilmesine rağmen, COBAS AMPLICOR MTB PCR yönteminin kültür yöntemlerine oranla daha az duyarlı olduğu, bu nedenle klinik tanıda sonuçların kültür yöntemleriyle birlikte değerlendirilmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates recovered from clinical specimens with culture methods with an automatized polymerase chain reaction (PCR) method. Specimens sent to the mycobacteriology laboratory were decontaminated and concentrated with the standard NaOH-NALC method and then cultured on Löwenstein-Jensen solid medium and BACTEC B12 vials containing Middlebrook 7H12 broth. Forty-one specimens with typical colonies on Löwenstein-Jensen medium and 127 specimens identified as *M. tuberculosis* complex in radiometric BACTEC system (Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems, Cockeysville, MD, USA) were marked as the study group. As control group 46 specimens without growth on either culture media were selected. The results of 32 (78.1%) specimens grown on Löwenstein-Jensen media were positive with COBAS AMPLICOR MTB PCR (Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) method whereas 86 (67.8%) of specimens identified in BACTEC system were positive with COBAS AMPLICOR MTB PCR method. All (100%) culture negative specimens within the control group were also negative with COBAS AMPLICOR MTB PCR method. It is concluded that although it is a rapid method in the identification of *M. tuberculosis* complex isolates from clinical specimens, COBAS AMPLICOR MTB PCR method is less sensitive than culture and that it can only be used together with the culture technique.

GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis kompleks adı verilen bir grup mikobakteri (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M.*

africanum, *M. microti*) tarafından oluşturulan tüberküloz, gelişmekte olan ülkelerin yanı sıra, son yıllarda giderek artış gösteren çoklu ilaç dirençli olgular nedeniyle geliş-

miş ülkelerin de önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır (1). Dünya çapında epidemik olan bu hastalığın geleneksel tanısı etkenin asidorezistan boyama (ARB) ya da florokrom boyama yöntemleriyle boyanarak mikroskopik olarak incelenmesi ve kültürüne dayanmaktadır (2). Tüberkülozun tanısında ARB ile kolay ve hızlı sonuç alınmasına rağmen duyarlılığı ve özgüllüğü düşük bir tekniktir (3). Tanıda altın standart olarak kabul edilmesine rağmen klasik kültür yöntemlerinin sonuçlanması altı haftaya kadar uzamaktadır. Klasik kültür yönteminin teknolojik olarak geliştirilmesi ile rutin kullanıma giren ve radyometrik olarak ölçüm yapan BACTEC sistemi ile identifikasyon süresi iki haftaya kadar düşmüştür.

Mikobakterilerin geleneksel yöntemlerle tanısı zaman alıcı ve yorucu ve tecrübe gerektiren işlemlere dayanmaktadır. Bu nedenle mikobakteri infeksiyonlarında hızlı, duyarlı ve özgül testlere gerek duyulmaktadır. Son yıllarda birçok infeksiyon etkeninin tanısında olduğu gibi, *M. tuberculosis*'in tanısında da moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. Günümüzde, klinik örneklerde *M. tuberculosis* tanısında standardize edilmiş ve Amerika Birleşik Devletleri'nde Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından onaylanmış iki moleküler test bulunmaktadır. Bu çalışmada kullanılan COBAS AMPLICOR MTB PCR testi bu iki testten birisi olup, *M. tuberculosis*'in tanısında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile nükleik asit çoğaltma yöntemini temel olarak almaktadır. Bu yöntem klinik örnekte *M. tuberculosis*'e özgül nükleik asit dizisinin saptanabilecek düzeye gelinceye kadar çoğaltılması esasına dayanmaktadır (4).

Bu çalışmada, klasik kültür yöntemlerinden Löwenstein-Jensen besiyerinde ve BACTEC sisteminde *M. tuberculosis* kompleks üremesi saptanan örneklerden otomatize bir moleküler tanı yöntemi olan COBAS AMPLICOR MTB testi ile aynı etkenin identifikasyonu ve sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin toplanması: Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda 2002–2003 yıllarında klasik ve radyometrik kültürlerde *M. tuberculosis* kompleks üremesi saptanan örneklerle yapıldı. Hastanenin çeşitli kliniklerinden tüberküloz öntanısı ile 2002 yılında 1419 tane, 2003 yılında 1501 tane olmak üzere toplam 2920 solunum yolu ve solunum yolu dışı örnek laboratuara gönderildi. Balgam, mide aspirasyon sıvısı, bronko-alveolar lavaj, idrar, yara, biopsi ve irin ör-

nekleri eritme ve dekontaminasyondan sonra, beyin-omurilik sıvısı, plöra sıvısı ve perikart sıvısı örnekleri doğrudan tüberküloz besiyerlerine ekildi.

Mikobakteriyolojik yöntem: Eritme ve dekontaminasyon amacıyla örnekler %4'lük NaOH ve N-asetil-L-sistein ile muamele edildi. Örnekler yoğunlaştırma amacıyla pH 6.8'lik fosfat tamponu ilave edilerek 3000xg'de 20 dakika 4° C'de santrifüjlendi. Bu işlem sonunda elde edilen çöktelden tüberküloz besiyerlerine ekim yapıldı (5). Çökeltilerin bir kısmı kapaklı tüplere konarak COBAS AMPLICOR MTB yöntemiyle incelemek üzere -80° C'deki derin dondurucuya kaldırıldı.

Örneklerden 900'ünün gliserinli Löwenstein-Jensen katı besiyerine, 2020'sinin polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin (PANTA) ilave edilmiş BACTEC B12 (Middlebrook 7H12) sıvı besiyerine ekimleri yapıldı. Kültürler %5-10 CO₂'li ortamda 37° C'de inkübasyona bırakıldı. Löwenstein-Jensen besiyerleri altı hafta boyunca haftada bir kez üreme kontrolü yönünden incelendi. Besiyerinde üreyen koloniler Ehrlich-Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyandı. Boyama sonucuna göre *M. tuberculosis* olduğu düşünülen kültürler üreme pozitif olarak kabul edildi. Altı hafta sonunda üreme gözlenmeyen kültürler negatif olarak rapor edildi (5).

BACTEC B12 şişeleri ilk üç hafta haftada üç kez, sonraki üç hafta haftada bir kez olmak üzere altı hafta süreyle radyometrik BACTEC 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems, Cockeysville, MD, ABD) aygıtında okutularak üreme indekslerine (GI) bakıldı. Üreme indeksi ≥ 10 olan örnekler tanıyı doğrulamak amacıyla ARB boyama, *M. tuberculosis* komplekse ait bir suş olup olmadığını araştırmak amacıyla P-nitro-alfa-asetil-amino-beta-hidroksipropionat (NAP) testi yapıldı. Ehrlich-Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyama sonucunda tipik ARB görünümünde ve NAP testi olumlu örnekler üreme pozitif olarak değerlendirildi. Üreme indeksi altı hafta boyunca < 10 olarak kalan örnekler ise negatif olarak değerlendirildi (6).

COBAS AMPLICOR MTB PCR yöntemi: Löwenstein-Jensen besiyerinde ve BACTEC sisteminde *M. tuberculosis* kompleks ürediği saptanan örneklerden daha önce elde edilen ve -80° C'de saklanan çökteller COBAS AMPLICOR MTB PCR testi ile incelendi. Test örneklerin hazırlanması, amplifikasyon ve saptama olmak üzere üç aşamadan oluşmaktaydı. İlk aşamada eritilmiş ve dekontamine edilmiş örneklerden 100 µl alınarak 500 µl yıkama solüsyonu ile 10 dakika 12.500 x g'de santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı alındıktan sonra, çökteli-

ye 100 µl lizis ayırıcı eklendi ve 45 dakika 60° C'de inkübe edildi. Daha sonra 100 µl nötralizasyon sıvısı eklenerek birinci aşama tamamlandı (7).

İkinci aşamada hazırlanan örneklerden, pozitif ve negatif kontrollerden 50 µl alındı ve aynı miktardaki amplifikasyon karışımına eklendi. Amplifikasyon karışımı primerler, nükleotitler, DNA polimeraz enzimi ve internal kontrol içeriyordu. Bu aşamada tüm mikobakterilerde ortak olarak bulunan 16S rRNA gen bölgesinde 584 bp büyüklüğündeki bir bölge amplifiye edildi. Hedef DNA biyotinle işaretli primerler kullanılarak çoğaltıldı ve oluşan biyotinle işaretli ampikonlar *M. tuberculosis*'e özgü oligonükleotitlerle hibridize edilerek saptandı. Her reaksiyonda hedef DNA ile birlikte *M. tuberculosis*'in hedef DNA bölgesindeki nükleotit dizisine özdeş internal kontrol de amplifiye edilerek örnekte bulunabilecek inhibitörler arandı. Böylece inhibitörlerin yol açacağı yanlış-negatif sonuçlar önlemlendi. Hazırlanan örnekler ve kontroller COBAS AMPLICOR Analyzer (Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ, ABD) aygıtına yerleştirildi. Amplifikasyon ve saptama aşamaları aygıt tarafından otomatik olarak yapıldı. Sonuçlar 450 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü ve absorbans değeri ≥ 0.350 optik dansite (OD) olan örnekler pozitif olarak kabul edildi. Internal kontrole ait absorbans değeri eşik değerinin altında olan örnekler 1:10 oranında sulandırıldıktan sonra tekrar incelendi (8). Kültürlerinde üreme saptanmayan 46 örnek ise kontrol grubu olarak çalışmaya alındı.

İstatistiksel analiz: Çalışmada *M. tuberculosis* kompleksinin identifikasyonunda kültür ve PCR yöntemleri kullanılarak elde edilen sonuçlar, McNemar testi ile $\alpha=0.1$ düzeyinde değerlendirilerek istatistiksel analizi yapıldı. PCR yönteminin kültür yöntemlerine göre olan duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri formülüne göre hesaplandı (9).

BULGULAR

Gliserinli Löwenstein-Jensen besiyerine ekimleri yapılan 900 örneğin 41'inde (%4.55), BACTEC B12 şişelerine ekilen 2020 örneğin 127'sinde (%6.28) *M. tuberculosis* komplekse ait suşlar üredi. *Mycobacterium tuberculosis* üreyen 168 klinik örneğin 114'ü (%67.9) balgam, 29'u (%17.3) bronkoalveolar lavaj, 11'i (%6.5) biopsi örneği, yedisi (%4.2) mide aspirasyon sıvısı, beşi (%2.9) plöra/perikardiyal sıvısı, ikisi (%1.2) ise idrar idi.

Löwenstein-Jensen besiyerinde üreme gösteren 41 klinik örnekten 32'si (%78.1) COBAS AMPLICOR MTB PCR yöntemiyle pozitif, dokuzu (%21.9) negatif olarak sap-

landı. Radyometrik BACTEC sisteminde üreme saptanmayan 127 örneğin 86'sı (%67.8) COBAS AMPLICOR MTB PCR ile pozitif, 41'i (%32.2) negatif bulundu. Her iki kültür yönteminde de üreme saptanmayan 46 kontrol örneğinin tümü (%100) PCR testi ile negatif olarak bulundu. COBAS AMPLICOR aygıtında incelenen (168 tane kültür pozitif ve 46 tane kültür negatif) 214 örneğin üçünde (%1.4) inhibisyon olduğu görüldü. İnhibisyon gözlenen örneklerin üçü de balgam örneği idi. PCR sonuçları negatif olan bu üç örneğin 1:10 oranında sulandırılarak tekrar incelenmesi ile internal kontrol absorbans değerleri eşik değerinin üzerine çıktı ve bu örnekler çalışmaya alındı.

Bu sonuçlara göre, *M. tuberculosis* komplekse ait mikobakterilerin identifikasyonunda COBAS AMPLICOR MTB PCR testi Löwenstein-Jensen kültür yöntemiyle karşılaştırıldığında; duyarlılığı %78, seçiciliği %100, pozitif testin prediktif değeri %100, negatif testin prediktif değeri %83.6 ve iki testin uyumu %89.6 olarak bulundu (Tablo 1). *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin identifikasyonunda COBAS AMPLICOR MTB PCR testi BACTEC kültür sistemi ile karşılaştırıldığında; duyarlılığı %67.7, özgüllüğü %100, pozitif testin prediktif değeri %100, negatif testin prediktif değeri %52.8 ve iki testin uyumu %76.3 olarak saptandı (Tablo 2).

Mycobacterium tuberculosis komplekse ait mikobakterilerin identifikasyonunda COBAS AMPLICOR MTB PCR testi ile Löwenstein-Jensen ve BACTEC kültür yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p \geq 0.1$).

Tablo 1. Löwenstein-Jensen katı besiyerinde *M. tuberculosis* kompleks üreyen örneklerin COBAS AMPLICOR MTB PCR test sonuçları

COBAS AMPLICOR	Löwenstein-Jensen besiyeri		Toplam
	Kültür pozitif	Kültür negatif	
PCR pozitif	32	-	32
PCR negatif	9	46	55
Toplam	41	46	87

Tablo 2. BACTEC B12 sıvı besiyerinde *M. tuberculosis* kompleks üreyen örneklerin COBAS AMPLICOR MTB PCR test sonuçları

COBAS AMPLICOR	BACTEC B12 besiyeri		Toplam
	Kültür pozitif	Kültür negatif	
PCR pozitif	86	-	86
PCR negatif	41	46	87
Toplam	127	46	173

TARTIŞMA

Mycobacterium tuberculosis'in tanısında geleneksel yayma ve kültür yöntemlerinin yanı sıra gen amplifikasyon tekniğinin kullanıma girmesi, mikrobiyologlar arasında büyük ilgiyle karşılanmış, bu tekniğin mikobakterilerin tanısında duyarlılık ve özgüllüğü artıracağı düşünülmüştü. Bu amaçla rutin kullanıma sürülen ilk iki test Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test (MTB; Roche Diagnostic Systems, Rotkreuz, İsviçre) ve *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (MTDT; Gen-Probe, Inc., San Diego, California, ABD) olmuştur. Yapılan çeşitli çalışmalar bu testlerin benzer sonuçlar verdiğini ve duyarlılıklarının %70-95 arasında değiştiğini göstermiştir (10-12). Noordhoek ve ark. (13) ise çeşitli moleküler teknikleri karşılaştırarak yürüttükleri uluslararası çok merkezli bir çalışmada, bu iki yöntemde elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olmadığını, mikobakterilerin moleküler yöntemlerle tanısında standardize edilmiş, güvenilir ve otomatize sistemlere ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada kullanılan COBAS AMPLICOR MTB PCR testi, Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Testi'nin Roche firması tarafından geliştirilmiş yeni sürümüdür. Bu test polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile nükleik asit amplifikasyonu ve nükleik asit hibridizasyonu ile *M. tuberculosis*'in balgam, bronko-alveolar lavaj gibi solunum yolu örneklerinde saptanması amacıyla üretilmiştir. Örneklerin hazırlanmasından sonraki amplifikasyon, hibridizasyon ve saptama aşamalarını otomatik olarak gerçekleştirmektedir.

COBAS AMPLICOR MTB PCR testinin kültür pozitif 229 solunum örneğe uygulandığı bir çalışmada; yöntemin duyarlılığı %91.3, özgüllüğü ise %99.6 olarak belirtilmiş, örnekteki basil sayısının az olduğu durumlarda testin yalancı-negatif sonuç verdiği, bu nedenle de duyarlılığının floresan mikroskopisinden düşük olduğu vurgulanmıştır (14). Yuen ve ark. (15) COBAS AMPLICOR MTB testi ile diğer moleküler testleri karşılaştırdıkları çalışmada; yöntemin duyarlılığını %84 olarak bulmuşlar, bu oranın yayma negatif örneklerde %58 olduğunu rapor etmişlerdir. BACTEC kültür yöntemi ile COBAS AMPLICOR testinin 66 tane kültür pozitif örnekte karşılaştırıldığı bir çalışmada; testin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %66.7, %99.6, %91.7, %97.7 olarak belirtilmiştir (3). Rajalahti ve ark. (16)'nın, 76 tüberküloz pozitif balgam örneği ile yapmış olduğu çalışmada; COBAS AMPLICOR MTB testinin klasik kültür yöntemine göre duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %83, %99, %97, %95 olarak

ve aynı hastadan üç balgam örneği alınmasının testin duyarlılığını %91'e çıkardığı bildirilmiştir. Eing ve ark. (17) altın standart olarak kabul ettikleri kültür yöntemi ile tanımlanan 101 örneği COBAS AMPLICOR MTB testi ile incelemişler; duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %66.3, %99.7, %94.3 ve %97.6 olarak bulmuşlar, testin duyarlılığının artması için aynı hastadan en az iki örnek alınması gerektiğini vurgulamışlardır. Aynı çalışmada COBAS AMPLICOR MTB testinin solunum yolu dışı örneklerdeki duyarlılığı da araştırılmış ve mide aspiratlarında testin duyarlılığının balgam örneklerine göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (17).

Bu çalışmada kültür pozitif 114 balgam örneğinin 89'u (%78.1) PCR yöntemiyle pozitif saptanırken, yedi tane kültür pozitif mide aspirasyon örneğinin altısı (%85.7) PCR yöntemiyle pozitif bulundu. Bu durum, mide aspiratının balgama göre daha düşük viskoziteye sahip olması nedeniyle bakterilerin santrifüj sonrası elde edilmelerinin daha kolay olması ve bir mide aspiratında balgamdan daha fazla miktarda (ort. 20 ml) hasta örneği bulunması ile açıklanmaktadır (17).

Shah ve ark.(18) solunum yolu örneklerinin dışında, çeşitli vücut sıvıları ve biyopsi örneklerinden *M. tuberculosis*'in izole edilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada; AMPLICOR MTB PCR testinin kültür yöntemine göre duyarlılığını, seçiciliğini, pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla %76.4, %99.8, %92.8, %99.2 olarak vermişler ve solunum yolu dışındaki örneklerde adı geçen yöntemin kültür sonuçlarıyla desteklenerek kullanılabileceği belirtilmiştir.

Türkiye'de 2004 yılında yapılmış olan bir çalışmada (19), *M. tuberculosis*'in tanısında mikroskopik inceleme ve BACTEC kültür sistemi COBAS AMPLICOR MTB PCR testi ile karşılaştırılmış; testin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %67.3, %99.3, %83.5, %98.4 olarak verilmiştir.

Bu çalışmada COBAS AMPLICOR MTB PCR testi Löwenstein-Jensen ve BACTEC kültür yöntemleriyle karşılaştırıldığında; duyarlılığı, sırasıyla, %78 ve %67.7; özgüllüğü her iki yöntem için de %100, pozitif testin prediktif değeri her iki yöntem için de %100, negatif testin prediktif değeri ise sırasıyla %83.6 ve %52.8 olarak bulunmuştur. Kullanılan otomatize PCR yönteminde saptanan duyarlılık oranları literatürdeki sonuçlar ile uyumlu bulunmuş olsa da, moleküler yöntemlerden beklenen duyarlılık oranından düşüktür. Bu oranın, diğer çalışmalarda belirtildiği gibi, her hastadan birden fazla örnek

alınması ile artacağı bilinmekle birlikte, girişimsel teknikler ile alınan örneklerin (bronko-alveolar lavaj, mide aspirasyonu sıvısı, beyin-omurilik sıvısı, biyopsi örnekleri) tekrarlanması hasta uyumu, testin sonuçlanma süresinin uzaması ve testin maliyetinin artması yönünde olumsuz bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda COBAS AMPLICOR MTB testinde %1-19 arasında değişen oranlarda inhibisyon olduğu ve bunun yalancı-negatif sonuçlara neden olduğu bildirilmiştir (2, 7, 14, 15, 17). Bu çalışmada üç (%1.4) örnekte inhibisyon görülmüş olup, üretici firmanın önerisi doğrultusunda örneklerin 1:10 oranında sulandırılması ile bu durum ortadan kalkmıştır. COBAS AMPLICOR MTB testinde sisteme eklenmiş olan internal kontrol yöntemin güvenilirliğini artıran ve *M. tuberculosis*'in tanısında kullanılan diğer ticari testlerde bulunmayan bir özelliktir. Yalancı-negatif sonuçlara katkısı olduğu düşünülen bir başka faktör ise, bu yöntemde incelenen örnek miktarının düşük olmasıdır (100 µl). Bu sorunun giderilebilmesi için testin daha yüksek miktarda örnek incelemek üzere yeniden yapılandırılması önerilmektedir (14).

Tüberküloz basillinin kesin tanı amacıyla kültürde üretilmesi yapılan çeşitli çalışmalarda ortalama 11-21 günlük bir süre gerektirmektedir (20). COBAS AMPLICOR MTB testi örneklerin hazırlanmasından itibaren yaklaşık 3.5

saat içinde sonuç vermektedir. Testin standardize edilmiş olması, tüm reaktiflerinin kullanıma hazır sunulması, uygulamasının kolay olması ve tekrarlanabilirliği yöntemin diğer avantajlarıdır.

Çeşitli çalışmalarda belirtildiği gibi (14, 15, 17, 21-25), COBAS AMPLICOR MTB testinin yayma negatif örneklerde tatmin edici sonuçlar vermemesi, bu hastalardan alınan üç ayrı örneğin incelenmesi sonucunda bile duyarlılığın %75'in altında kalması, yöntemin rutin klinik uygulamada tek başına kullanılmasına olanak tanımamaktadır.

Sonuç olarak, solunum yolu örneklerinden *M. tuberculosis* kompleks kökenlerinin saptanmasında kısa sürede tanıya gidilebilmesine rağmen, COBAS AMPLICOR MTB PCR testinin klasik Löwenstein-Jensen ve radyometrik BACTEC kültür yöntemlerine göre daha az duyarlı olduğu kanısına varılmıştır. Bu testin yayma negatif örneklerde kültür yöntemleriyle birlikte kullanılması gerektiği düşünülmektedir. Yayma pozitif örneklerde ise, yüksek özgüllüğü nedeniyle tanıyı doğrulamak, atipik mikobakterileri elimine etmek ve primer tüberküloz olgularında tedaviye erken başlamak amacıyla COBAS AMPLICOR MTB testinin güvenle kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Comstock GW. Epidemiology of tuberculosis. In: Reichman LB, Hershfield ES, eds. *Tuberculosis, A Comprehensive International Approach*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2000: 129-56.
2. Ninet B, Rohner P, Metral C, Auckenthaler R. Assessment of use of the COBAS AMPLICOR system with BACTEC 12B cultures for rapid detection of frequently identified mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 782-84.
3. D'amato RF, Wallman AA, Hochstein LH, et al. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1832-4.
4. Esen N. Mikobakterilerin tanısında, tanımlanmasında ve ilaç direncinin belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *İnfek Derg* 2003; 17: 507-11.
5. Nolte FS, Metchock B. *Mycobacterium*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995: 400-37.
6. Siddiqi SH. Procedure for primary isolation of mycobacteria from clinical specimens. In: *BACTEC TB System Product and Procedure Manual*. Maryland: Becton Dickinson, 1989: II.1-II.13.
7. Anonymous. *COBAS AMPLICOR for MTB. Method Manual*. Branchburg, NJ: Roche Diagnostic Systems, 1995.
8. Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Scagnelli M, Piersimoni C. Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test with COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1559-62.
9. Özdamar K. *Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi*. 4. baskı. Eskişehir: Kaan Kitabevi, 2002: 510.
10. Dalovisio JR, Montenegro-James S, 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 Infect Dis* 1996; 23: 1099-106.
11. Ichiyama S, Iinuma Y, Tawada Y, et al. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and Roche PCR-microwell plate hybridization method (AMPLICOR MYCOBACTERIUM) for direct detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 130-3.
12. Vuorinen P, Miettinen A, Vuento R, Hällström O. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1856-9.
13. Noordhoek GT, van Embden J, 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: 2522-5.
14. Bodmer T, Gurtner A, Scholkman M, Matter L. Evaluation of the COBAS AMPLICOR MTB system. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1604-5.

15. Yuen KY, Yam WG, Wong LP, Seto WH. Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube nested PCR assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 1385-9.
16. Rajalahti I, Vuorinen P, Nieminen MM, Miettinen A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in sputum specimens by the automated Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test. *J Clin Microbiol* **1998**; 36: 975-8.
17. Eing BR, Becker A, Sohns A, Ringelmann R. Comparison of Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay with in-house PCR and culture for detection of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **1998**; 36: 2023-9.
18. Shah S, Miller A, Mastellone A, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis in various biopsy and body fluid specimens by the AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* polymerase chain reaction test. *Chest* **1998**; 113: 1190-4.
19. Alp A, Pinar A, Hascelik G. Comparison of Cobas Amplicor system and microscopic examination with Bactec radiometric method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Mikrobiyol Bult* **2004**; 38: 193-201.
20. Doern GV. Diagnostic mycobacteriology: where are we today? *J Clin Microbiol* **1996**; 34: 1873-6.
21. Wobeser WL, Kraiden M, Conly J, et al. Evaluation of Roche PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **1996**; 34: 134-39.
22. Lim TK, Gough A, Chin NK, Kumarasinghe G. Relationship between estimated pretest probability and accuracy of automated *Mycobacterium tuberculosis* assay in smear-negative pulmonary tuberculosis. *Chest* **2000**; 118: 641-7.
23. Kim SY, Park YJ, Kang SJ, Kim BK, Kang CS. Comparison of the BDProbeTec ET system with the Roche COBAS AMPLICOR System for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in the respiratory and pleural fluid specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2004**; 49: 13-8.
24. Jonsson B, Ridell M. The Cobas Amplicor MTB test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory and non-respiratory clinical specimens. *Scand J Infect Dis* **2003**; 35: 372-7.
25. Levidiotou S, Vrioni G, Galanakis E, Gesouli E, Pappa C, Stefanou D. Four-year experience of use of the Cobas Amplicor system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and nonrespiratory specimens in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2003**; 22: 349-56.

İLETİŞİM

Yrd. Doç. Dr. Ayşen BAYRAM
Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
27310 GAZİANTEP
e-posta: aysenbayram@hotmail.com