

AKCİĞER TÜBERKÜLOZU VE AKCİĞER DIŞI TÜBERKÜLOZ TANISINDA IN-HOUSE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİNİN KÜLTÜRLE KARŞILAŞTIRILMASI

THE COMPARISON OF THE IN-HOUSE POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD AND CULTURE IN THE DIAGNOSIS OF PULMONARY AND EXTRAPULMONARY TUBERCULOSIS

Bekir KOCAZEYBEK

İstanbul Üniversitesi CerrahpaŐa Tıp Fakóltesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Anahtar Sözcükler: Tüberküloz, akciğer tüberkülozu, akciğer dışı tüberküloz, tanı, polimeraz zincir reaksiyonu, kültür

Key Words: Tuberculosis, pulmonary tuberculosis, extra-pulmonary tuberculosis, diagnosis, polymerase chain reaction, culture

ÖZET

*Bu çalışmanın amacı, tüberküloz tanısında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile Löwenstein-Jensen besiyerinde kültür yöntemini karşılaŐtırmaktır. Çalışmaya Florence Nightingale Hastaneler Grubu'ndan 200 (% 66.6)'ü akciğer tüberkülozu (AT), 100 (% 33.3)'ü akciğerdıŐı tüberküloz (ADT) kuşkulu, toplam 300 hastadan 333 klinik örnek alınmıştır. Örnekler direkt mikroskopik inceleme için Ziehl-Neelsen (ZN) boyası ile boyanmıŐ ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde kültürü için NALC+% 4 NaOH ile dekontamine edilmiştir. Ayrıca her örnekten in-house polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction=PCR) alıŐması yapılmıştır. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK)'e spesifik IS 6110 bölgelerinden primer çiftler kullanılmıştır. Başvuruda AT kuşkulu 200 olgudan 22 (% 11) olguda ZN, 51 (% 25.5) olguda kültür pozitif, 55 (% 27) olguda PCR pozitif saptanmıştır. Bu olguların 53 (% 26.5)'ü diğer ilaç alımı ve tedaviye yanıt gibi parametrelerle son tanıda kesin tüberküloz (Tbc) olarak değerlendirilmiştir. Yine başvuruda ADT kuşkulu 100 olgudan ikisinde (%2) ZN, 23 (%23)'ünde LJ, 26 (%26)'sında PCR pozitif olmasına karşılık; 38 (%38) olgu kültür ve PCR dıŐındaki diğer parametrelerle (klinik, radyolojik, histopatolojik bulgular ve anti-tüberküloz tedaviye yanıt) son tanıda kesin Tbc olarak değerlendirilmiştir. Akciğer tüberkülozunda PCR ve LJ uyumu, istatistiksel olarak yüksek oranda bulunmuştur (Kappa % 94> % 65). Buna karşılık, ADT'de uyum oranı kabul edilebilir uyum oranının az altında bulunmuştur (Kappa % 59< % 65). Sonuç olarak, AT tanısında PCR sonuçlarıyla kültür pozitifliği büyük uyum gösterirken, ADT tanısında PCR sonuçları ile kültür pozitifliğinin uyumu kabul edilebilir oranın az altında olduğu görölmüŐtür.*

SUMMARY

*The aim of this study was to compare the in-house polymerase chain reaction (PCR) with Löwenstein-Jensen (LJ) culture method in the diagnosis of tuberculosis. In the Group of Florence Nightingale Hospitals totally 333 clinica specimens [200 (66.66%) from pulmonary tuberculosis (PT) and 100 (33.33%) from extrapulmonary tuberculosis (EPT) (totally 300 cases)] were included in the study. The specimens were stained with Ziehl-Neelsen (ZN) stain for direct microscopic examination and decontaminated with NALC + 4% NaOH for LJ culture. Additionally, the in-house PCR was performed for each sample. The primary pairs specific to the IS 6110 region of *Mycobacterium tuberculosis* complex were used. In 200 cases diagnosed as PT clinically, 22 (11%) were ZN positive, 51 (25.50%), were culture positive and 55 (27.50%) were PCR positive; 53 (26.5%) of these cases were finally diagnosed as*

tuberculosis with the help of parameters like response to therapy. In 100 cases diagnosed as EPT clinically at the time of admission, two (2%) were positive in ZN, 23 (23%) in LJ, 26 (26%) in PCR; however, 38 (38%) cases were finally diagnosed as tuberculosis with the help of culture and parameters except PCR (clinical, radiological, histopathological findings and response to antituberculosis therapy). The concordance of PCR with LJ in PT was found statistically at high ratios (Kappa 94% > 65%). However, in EPT the concordance ratio was found just below the statistically acceptable concordance ratios (Kappa 59% < 65%). As a result, the study showed that in PT cases the in-house PCR results and culture positiveness had a great concordance whereas in EPT the concordance of the PCR results and culture positiveness was found just below the accepted ratios.

GİRİŞ

Amerika Birleşik Devletleri'nde Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) çoğul dirençli salgınlarla birlikte, Tüberküloz (Tbc) insidansını düşürmede, toplumu korumada en etkili yollardan birinin erken tanı ve etkili tedavi olduğunu bildirmekte, duyarlılığı ve özgülüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay, pahalı olmayan tanı yöntemlerinin günlük kullanıma girmesinin gerekliliğini ileri sürmektedir (1). Yıllardır Ziehl-Neelsen (ZN) gibi aside dirençli boyama teknikleri ile basilin mikroskopik olarak görülmesi ve bakterinin besiyerinde üretilmesi temeline dayanan yöntemler en fazla kullanılan yöntemler olup basilin varlığını kısa sürede saptamaya yönelik, duyarlılığı ve özgülüğü yüksek son yıllarda geliştirilen radyometrik, floresans gibi hızlı kültür sistemleri ile tanıyı daha erken koyma amaçlı olarak kullanılan nükleik asitlerin hibridizasyonu ve amplifikasyonuna dayanan yöntemlere karşın kesin tanıda referans yöntem olarak geçerliliğini halen devam ettirmektedir (2, 3). Tüm bu yeni yöntemler içinde, son yıllarda klinik örneklerden direkt olarak hızlı sonuç vermesi ve duyarlılığından dolayı tanı amaçlı yaygın olarak kullanılmaya başlanan polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction=PCR)'dur (4, 5).

Bu çalışmada, akciğer tüberkülozu (AT) ve akciğer dışı tüberküloz (ADT) kuşkulu olgularda referans yöntem olarak kabul edilen kültürle, tüberkülozun hızlı ve kesin tanısına yönelik olarak kullanılan PCR yönteminin karşılaştırması yapılarak her iki yöntemin sonuçlarının irdelenmesine amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ağustos 1998 ile Mart 2000 arasında Florence Nightingale Grubuna bağlı iki özel, Metropolitan ve Avrupa Florence Nightingale Hastanelerinin Göğüs Hastalıkları, Dahiliye, Üroloji vb. polikliniklerine başvuran, kuşkulu AT ve ADT tanısı konulan, rutin bakteriyolojik tanı amacıyla mikrobiyoloji laboratuvarına değişik klinik örnekler gönderilen 300 olgu PCR araştırması için prospektif olarak çalışmaya alınmıştır. Olgular; 7-59 yaş arası, 211 (% 70.3)'i erkek, 89 (% 29.7)'u kadın olup tümünün anti-HIV 1/2 testleri negatif idi; bir olguda ise immünsupresyon vardı.

Çalışmaya klinik (ateş, öksürük, kilo kaybı, iştahsızlık, hemoptezi vb.), radyolojik (göğüs radyografisinde genellikle apikal bölgede nonhomojen ve kaviter lezyonlar veya diğer bölgelerde gözlenen infiltratif ve kaviter lezyonlar), histopatolojik (alınmışsa biyopsi örneğinde epiteloid histiyositli granülatöz doku ile birlikte kazeifikasyon) ve immünolojik (Montoux yöntemiyle tüberküloz deri testinde ≥ 10 mm indürasyon) bulgulardan en az birine veya daha fazla bulguya sahip AT veya ADT kuşkulu olgular alınmıştır. Akciğer tüberkülozu kuşkulu 200 olgudan 170'inde tek örnek, 30'unda çift örnek; ADT kuşkulu 100 olgudan 97'sinde tek örnek, üçünde çift örnek olmak üzere toplam 333 klinik örnek alındı. Her bir örnekten mikrobiyoloji laboratuvarında bilinen standardize genel prosedürlerle rutin amaçlı olarak mikroskopi (ZN), kültür (LJ), çalışması ve araştırma amaçlı olarak da in-house PCR çalışması prospektif olarak yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu, kültür ve mikroskopik incelemelerde çift alınan örneklerden birinde pozitif sonuç alındığında, o örnek Tbc olarak değerlendirilmiş, tek alınan örneklerde saptanan pozitif durumunda da benzer değerlendirme yapılmıştır. Örneklerden önce ZN ile direkt mikroskopi yapılmış, daha sonra N-asetil-L-sistein (NALC) + % 4 NAOH ile dekontaminasyon yapılarak tekrar ZN ile incelenmiş ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerine kültür yapılmıştır.

In-house PCR çalışması

Örnekler

Balgam ve bronşiyal sekresyon gibi solunum örnekleri ile idrar, beyin-omurilik sıvısı, açlık mide suyu, seröz zarlara ait sıvılar, lenf düğümü ve diğer organ biyopsileri ile histopatolojik bulguları tüberkülozu düşündüren parafin blok gibi solunum-dışı örnekler incelenmiştir.

İşlem

Örnekler çalışma gününe kadar 2-8°C'de saklanmıştır. Gastrik aspiratlar hızla trisodyum-fosfat tamponu ile (pH:12) nötralize edilmişlerdir. Doku örnekleri işleme girmeden önce steril koşullarda küçük parçalara bölünerek homojenize edilmişlerdir. Parafine gömülü olan doku bloklarından ise 5-7 μ m kesit alınmıştır. Her blokdan alınan 3 farklı kesit 1.5 ml'lik Eppendorf'lara konulmuş ve

oktan ile deparafinize edildikten sonra alkol ile iki kez yıkanmıştır. Kontaminasyona engel olmak amacıyla, her bloktan önce mikrotom bıçağı ksilen ile temizlenmiştir (6).

Dekontaminasyon işleminden sonra, sedimentler eşit hacimde Tris-EDTA tamponu ile (10 mM Tris-HCL, 0.5 mM EDTA) yıkanmış ve ultramikrosantrifüj aletinde 16000 g x 5 dakika santrifüj edilmiştir. Balgam, bronşiyal sekresyon, idrar, BOS ve diğer sıvılar 20 dakika kaynatılmışlardır (7). Doku örnekleri ve parafin bloklara ise Proteinaz K ile sindirme yöntemi uygulanmıştır (6).

Bu çalışmada negatif kontrollerle birlikte hem internal hem de eksternal pozitif kontroller kullanılmıştır. Eksternal pozitif kontrol olarak, aktif tüberküloz tanısı almış hastalardan alınan örnekler ile (reaktif kontrol), pozitif kültür örnekleri (non-reaktif) kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonunun internal kontrolü için, normal dokularda her zaman bulunan beta-globin genine ait primerler kullanılmıştır. Böylece, PCR inhibitörlerine bağlı olarak görülebilen yalancı negatif sonuçlar da kontrol edilmiştir.

Amplifikasyon işlemi

Amplifikasyon işlemi, daha önceki araştırmacıların protokollerinden küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (7). Tüm reaksiyonlarda, 25mM Tris-HCL (pH:8), 50 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂, herbir primerden 20 pmol (8), herbir dNTP'den 0.2 mM, 1.25 U Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas) ve 3 µl DNA kullanılmış ve toplam hacim 50 µl olmuştur. MJ Research thermocycler'a yerleştirilen örneklerle uygulanan amplifikasyon koşulları olarak, 94°C bir dakika, 64°C bir dakika, 72°C bir dakika

toplam 40 siklus ve final ekstensiyonu olarak da 72°C dört dakika uygulanmıştır. Tüm PCR reaksiyonları, negatif ve pozitif kontrollerle birlikte iki kez tekrarlanmıştır.

DNA'nın gösterilmesi

Her bir PCR ürününden 15 ml alınarak etidyum bromit ile boyandıktan sonra, %2'lik agaroz gel elektroforezinde yürütülmüş ve 123 bp'lik PCR ürünü ultraviyole altında bakılarak değerlendirilmiştir (9).

Son tanıda yukarıda belirtilen dört kriterle (klinik, radyolojik, histopatolojik ve immünolojik) uyumlu ZN, kültür sonuçlarının yanında anti-tüberküloz ilaç verilerek, yanıt alınmayı içine alan "Royal Dutch Organization Against Tuberculosis" (RDOAT) (10) kriterleri temel alınmıştır. Dört kriter ile birlikte ilaç alımı ve anti-tüberküloz tedaviye yanıtı ilişkin bilgileri, araştırmacı (BK) hastaların doktorlarıyla birebir görüşerek, başvuru ve takip dosyalarından almıştır. Çalışma sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde Kappa Testi (≥ % 65: uyumlu) kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan AT kuşkulu 200 olgudan klinik, radyolojik, histopatolojik, immünolojik bulgularından biri veya daha fazla bulgularla, beraber ZN, PCR, LJ sonuçları ve anti-tüberküloz ilaç verilmesi ve ilaca yanıt parametreleriyle 53 (% 26.5) olguya kesin AT son tanısı konulmuştur. Bakteriyojik tanı; 40 olguda balgamdan, 12'si BAL'dan, biri gastrik lavajdan olmuştur. Akciğer tüberkülozu olgularında PCR'nun kültüre göre duyarlılığı % 100,

Tablo 1. Kesin tanısı tüberküloz olan olgularda klinik örneklerle göre ARB, PCR ve kültür sonuçları ile PCR ve mikroskopinin kültürle karşılaştırılması

	n	ARB		PCR		LJ		Kültür		Du %	Öz %	PPD %	NPD %	K	
		n	%	n	%	n	%	Pozitif	Negatif						
Akciğer Tbc	53														
Balgam	40	32	80	40	100	38	95	Pozitif	51	4d	100	97.3	92.7	100.0	0.94
BAL	12	11		12		12		Negatif	-	145					
Gastrik lavaj	1	1		1		1		Mikroskobi							
Toplam	53	44	83.02	53	100	51	96.2	Pozitif	44	0	86.3	100	100	95.5	0.9
								Negatif	7	149					
Akciğer dışı Tbc	38							PCR							
Plöra sıvısı b	15	1		14		12		Pozitif	17	9e	73.9	88.3	65.4	91.9	0.59
Parafin blok a	6	0		4		4		Negatif	6	68					
İdrar	4	0		3		3		Mikroskobi							
Assit sıvısı	4	0		3		3		Pozitif	1	1f	4.3	98.7	50	77.6	0.1
Perikart sıvısı	2	0		1		1		Negatif	22	76					
Tanı testleri (-)	7g	0		0											
Toplam	38	1	2.6	25	65.8	23	60.5								

ARB: Aside rezistan bakteri, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, LJ: Löwenstein-Jensen besiyeri, BAL: Bronko-alveolar lavaj, D: Duyarlılık, Ö: Özgüllük, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer K: Kappa. a) Boyun bölgesinden alınan ve histopatolojisi tüberküloz lenfadenit olan parafin bloklar. b) Örnek sayısı 30'un altında olanlarda % verilmedi. c) K 0.65 Uyumlu, d) Dört olgunun ikisi Tbc, ikisi non-Tbc (biri akciğer kanseri, diğeri *in vitro* yalancı pozitif) olarak değerlendirildi. e) Dokuz olgunun sekizi Tbc, biri akciğer kanseri idi. f) RDOAT kriterleri ve PCR'in desteklemediği Non-Tbc bir olgu, g) ZN, kültür, PCR negatif, ancak RDOAT'ın diğer kriterleriyle Tbc olarak değerlendirilen olgular

özgüllüğü % 97.3, pozitif prediktif değeri (PPD) % 92.7, negatif prediktif değeri (NPD) % 100 iken, uyumluluk katsayısı $0.9 > 0.65$ olarak saptanmıştır. Mikroskopinin kültüre göre duyarlılığı % 86.3, özgüllüğü % 100, PPD % 100, NPD % 98.5 olarak bulunmuştur. "Royal Dutch Organization Against Tuberculosis" kriterlerinden bakteriyolojik tanı yöntemleri hariç diğer kriterlerle PCR pozitif, kültür negatif iki olguya kesin Tbc, yine PCR pozitif ancak kültür negatif iki olguya kesin non-Tbc son tanısı konulmuştur. Bu olguların ikisi de *in vitro* yalancı pozitif olarak değerlendirilmiştir. Akciğer dışı tüberküloz kuşkulu 100 olgudan 31 olguya RDOAT kriterleri ve PCR sonuçlarıyla, yedi olguya ise ZN, kültür, PCR negatif olmasına karşın, RDOAT'ın diğer kriterleriyle toplam 38 (%38) olguya kesin akciğer dışı tüberküloz son tanısı konulmuştur. Bu olguların bakteriyolojik tanısı en fazla plöra sıvısından olmuştur. Akciğer dışı tüberküloz olgularında PCR'in kültüre duyarlılığı % 73.9, özgüllüğü % 88.3, PPD % 65.4, NPD % 91.9, Kappa değeri $0.59 < 0.65$ iken, mikroskopinin kültüre göre duyarlılığı % 4, özgüllüğü % 98, PPD % 50, NPD ise % 77 Kappa değeri $0.1 < 0.65$ olarak bulunmuştur. Bu olgulardan PCR pozitif ancak kültür negatif bir olgu akciğer kanserli idi (Tablo 1).

TARTIŞMA

Gerek AT, gerekse ADT'un yüksek duyarlılık ve özgüllükte diğer konvensiyonel yöntemlere göre tanısını hızlandıran, bakterinin amplifiye edilen spesifik bölgelerine ait DNA partikülleridir (11). Genellikle *M. tuberculosis* kompleksin özgül IS 6110, hsp 65 veya 16 s rRNA geni bölgelerinden primer kullanılmakta (12), bazı çalışmalarda MTP 40, MTP 64 gen bölgelerinin kullanıldığı görülmektedir (13, 14). Bu bölgelerin çoğaltılmasıyla kültürde 4-8 hafta arasında beklenerek konulan tanının süresi saatlere inmiş, ancak burada yöntemin güvenilirliğini olumsuz etkileyen kontaminasyon, inhibisyon ve duyarlılığı etkileyen faktörler gibi etkenler PCR'nun rutin kullanımda olup olmaması ile ilgili tartışmaları başlatmıştır (15, 16). Her ne olursa olsun ZN'nin duyarlılığının düşük olması ve haftalarca kültür sonucunu beklemenin karşısında, pozitif ve negatif kontrollü, örneklerin çift çalışılması, hastanın klinik, radyolojik ve histopatolojik bulgularının desteklediği klinik tablolarda PCR'nun sonucuna güvenilebileceği ve tedavinin de başlanması gerektiği belirtilmektedir (4, 5, 17).

Klinik, laboratuvar ve anti-tüberküloz ilaçlara verdikleri yanıtlarla AT olan 53 olgunun hepsinde (% 100) PCR pozitif saptanmış, iki olguda yalancı pozitiflik bulunmuştur. Gerçek AT'lu olguların % 96.2'sinde kültür pozitif saptanmış, % 83.01'inde ise ZN pozitif saptanmıştır. Gerçek AT saptanmasında PCR'nun kültürle uyumlu sonuç vermesi çok yüksek oranda saptanırken (K: 0.94

> 0.7), aynı şekilde ZN'nin kültürle uyumu ise yüksek ($0.9 > 0.7$) bulunmuştur. Guinness ve ark. (18) 378 AT kuşkulu örnek ve IS 6110'ya spesifik primerle yaptıkları araştırmada, bu çalışmaya benzer gerçek AT'lu hastaların % 96.6'sında PCR pozitifliği, % 93.3'ünde kültür pozitifliği, % 73'ünde ZN pozitifliği bulmuşlar; yine başka bir çalışmada Tan ve ark. (5) BAL örnekleriyle yaptıkları araştırmada; PCR'nun kültürle uyum katsayısının 0.78 olduğu, gerçek AT'ların saptanmasında PCR'nun kültürle birlikte çok iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Gerçek AT saptanmasında PCR'nun kültürle yüksek oranda bir uyum sağlayarak sonuç verdiği, ancak klinik, radyolojik ve histopatolojik bulguların desteklemediği PCR pozitifliklerin kontaminasyona bağlı olabileceği ve bunların göz önüne alınmaması gerektiği bildirilmiştir (21,22,23). Gerçek Tbc olmayan PCR yalancı pozitif iki olgunun biri akciğer kanserli idi, diğerinin ise DNA'nın ekstraksiyonu ya da amplifikasyonundaki bir kontaminasyona bağlı *in vitro* yalancı pozitiflik vermiş (her bir çalışmada kullanılan iki negatif kontrolden biri bu olguda pozitif sonuç vermiştir) olduğu düşünülmüştür. Literatürler (21-24) ZN negatif olgularda, klinik ve diğer bulguların desteklediği ancak kültür sonucunun beklenemediği AT olgularını konfirme etmek için duyarlılığı arttıracak ve minimum çapraz-kontaminasyon riski ile spesifikliğini kaybettirmeyecek infeksiyon bölgesinden özgül örnek alınması (balgam yerine BAL, granülamatoz dokularda parafin blok hazırlama şeklinde) farklı hedef gen bölgesine spesifik değişik sayıda primer kullanılması (IS 6110 ile birlikte hsp 65 kd veya MTB 40 veya MTB 64 vb) ve PCR'u farklı tekniklerle yapmak (standart heminested yerine single-tube balanced heminested) gibi çabaların arttırıldığını bildirmektedir.

Akciğer tüberkülozu olgularında kültüre göre PCR'nun duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 97.3, pozitif prediktif değeri (PPD) % 92.7 ve negatif prediktif değeri (NPD) % 100 saptanmıştır. Toplam 833 olgu ve in-house yöntemi ile yapılan bir çalışmada (25); PCR'nun kültüre göre duyarlılığı, özgüllüğü, PPD, NPD sırayla %91.08, %99.85, %97.87, %99.37 olarak bulunmuş ve ZN negatif PCR pozitif, diğer bulgularla gerçek Tbc olarak değerlendirilerek tedavi edilen ve tedaviye yanıt alınan dokuz olgunun yedisinde kültür pozitif saptanırken ikisinde üreme görülmemiştir. Bir başka çalışmada (19); PCR'nun duyarlılığı %91.4, özgüllüğü %96.1; yine 293 olgu ile yapılan bir çalışmada (5), balgam örneklerinden PCR'in %100 duyarlı, %95 özgül olduğu bildirilmiştir. Bu araştırma, literatürlerle paralel olarak AT kuşkulu olgularda klinik, radyoloji ve histopatolojik bulguların desteklemesi halinde ZN negatif olsa bile PCR pozitifliğine göre anti-tüberküloz tedavinin kültür sonucu beklenmeden başlanması gerekliliğini ortaya koymuştur.

HIV enfeksiyonuyla birlikte insidansında artma gözlenen ADT enfeksiyonlarının özellikle klinik olarak sessiz seyretmesi, standart bir tarama testinin olmaması ve ZN'nin sıklıkla negatif saptanması gibi nedenlerle kültürü bekleme ya da ayırıcı tanıda pozitif prediktif değeri (PPD) düşük bazı klinik, biyokimyasal, hematolojik vb. yöntemlerle anti-tüberküloz tedavisi başlama yolu seçilmekte, sonuçta klinisyen hangi tercihi yaparsa yapsın hasta ciddi problemlerle karşı karşıya kalmaktadır (26, 27). Bu araştırmada gerçek EPT olan 38 olgunun % 2.6' sında ZN, % 65.8'inde PCR, % 60.5'inde kültür pozitifliği saptanmış, %63'ünde ise ZN negatif olmasına karşılık kültür sonucunu beklemeden PCR pozitifliğinin klinikle korelasyonundan dolayı anti-tüberküloz tedavi başlanıp sonuç alınmıştır.

Sarkoidoz ve crohn hastalığı gibi granülamatoz hastalıklar, plöra efüzyonu ve özellikle çocuklar arasında nörosekal ve mortalite ile seyreden meninjit gibi hastalıklarda etyolojik etken olarak ADT'un tanısında zamanın önemi belirtilmekte, ZN ve kültürde patojenin saptanamamasıyla özellikle akciğer dışı bölgesel Tbc enfeksiyonları ile ilgili PCR çalışmaları son yıllarda artmıştır (4, 7, 28-30). Inoue ve ark. (31) orta kulak tüberkülozunda ZN negatif olmasına karşın PCR pozitif olduğu için hastanın tedaviye alındığını ve sonuçta hastanın işitme kaybının dışında diğer semptomların düzeltildiğini bildirmişlerdir. Bu araştırmada, PCR pozitif kültürü negatif dokuz olgu, PCR'ü negatif, kültürü pozitif altı olgu ile , PCR ve kültürü negatif kliniği, radyolojisi ve histopatolojisi desteklediği için yedi olgu, toplam 22 olgunun 21'inde klinik ve diğer bulgularla gerçek Tbc saptanmış, bir olgu klinik desteklemediği için ADT olarak değerlendirilmeye alınmamış ve 21 olguya anti-tüberküloz tedavisi verilmiş ve yanıt alınmıştır. Buradaki sonuçlar, klinikle laboratuvar, kültürle-PCR arasında uyumsuzluk olduğunu göstermektedir (K: 0.59 < 0.7). Bu uyumsuzluğun, çalışma yöntemi olan in-house PCR'da farklı hedef bölgelere spesifik primer çiftlerinin kullanılmaması ve her bir hasta için birden fazla sayıda örnek çalışmaması veya alınan örneklerin kalitesiyle ilgili olabileceği düşünülmüştür.

Kolk ve ark. (17) 156 hastadan alınan 226 ADT kuşku örneklerinde hedef bölge olarak IS 6110 kullanarak yaptıkları araştırmada 52 olguda gerçek ADT bulduklarını, bunların 19'unda, bu çalışmanın sonuca benzer, uyumsuzluk olduğu, ancak ADT'un tanısında ve tedaviye başlanmasında PCR'nun, kültür ve ZN'ye göre daha önemli bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Biri Türkiye'den (32), diğeri İtalya'dan (33) bildirilen iki çalışmada, granülamatoz dokulardan alınan biyopsi örneklerinde parafin-blokta üç farklı primer çiftiyle bakılmışlar ve bu örneklerde PCR'nun yüksek bir duyarlılığa sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmada da diğer örneklerle göre parafin blokta yüksek PCR pozitifliği saptanmıştır, buna karşılık, tüm

BOS örnekleri PCR, kültür ve ZN negatif olarak bulunmuştur. Türkiye'de Akhan ve ark. (34) 24 tüberküloz meninjit olgusu ile yaptıkları araştırmada; hedef olarak MTB 40 geninin 393 bp'lik bölgesini kullanmışlar, örneklerin %91.6 'sını PCR ile pozitif bulmuşlar; Shankar ve ark. (13) ile Kaneko ve ark. (14) MTB 64 proteinini kullanmışlar, PCR pozitifliğini sırayla %75 ve %83 olarak saptamışlardır. Başka bir araştırmada (35) ise; 6 Kd'lık hedef geni kullanılmış, % 81 PCR pozitifliği saptanmıştır. Tüm bu araştırmalarda seçilen hedef bölgelerin farklılığına göre pozitiflik oranının değişkenlik gösterebileceği bildirilmekte, ADT tanısında PCR'nun daha güvenilir duruma gelmesi için en az iki farklı hedef bölgenin primer çiftlerinin kullanılmasının yararlı olacağı belirtilmekte, özellikle tüberküloz meninjitinin tanısında BOS'un miktarı ve kalitesinin önemli olduğu, en az dört kez lomber ponksiyon (LP) yapılması gerektiği, bunun yapılmasıyla tanı için güç bir yöntem olan kültür pozitifliğinin bile oran olarak %37'den %87'ye çıktığı belirtilmiştir (36) .

Literatürler (37, 38), ayrıca ADT tanısında PCR'nun klinikle uyumsuzluğunda, PCR'nun inhibisyonun ya da PCR'nun duyarlılığını etkileyen deney sürecindeki bazı nedenlerin örneğin TAg-polimeraz inhibitörlerinin purifikasyon sırasında DNA'nın kaybolmasının veya IS 6110 kopya sayısının 10-16 arasında olmasıyla ilişkili olabileceğini bildirmektedir. Akciğer dışı Tbc tanısının konulmasında, kültüre göre PCR'nun duyarlılığı % 73.9 iken, ZN'nin duyarlılığı % 4 gibi oldukça düşük bir oranda bulunmuştur. IS 6110'un kullanıldığı başka iki çalışmada (17, 30); ADT tanısının konulmasında PCR'nun kültüre göre duyarlılığının % 86.3, özgüllüğünün ise % 92 olduğu, buna karşılık, ZN'nin duyarlılığının ise % 31 olduğu bildirilmiş, diğerinde duyarlılığın % 94, özgüllüğün % 100 olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada (39) ise; 28 plerözili hastada, tanı konulmasında PCR'nun kültüre göre duyarlılığının % 89, özgüllüğünün % 100 olduğu bildirilmiştir. Türkiye'de meninjitli hastalarla yapılan bir çalışmada (34); PCR'nun duyarlılığının % 83.3, özgüllüğünün ise % 97 olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, bu araştırmada; tüm tüberküloz olgularının tanısında PCR'nun kültür pozitifliği ile büyük oranda uyum gösterdiği, gerçek AT tanısı konulmasında duyarlılığının ve özgüllüğünün çok yüksek olduğu, buna karşılık, ADT tanısı konulmasında PCR'nun kültürle uyumunun düşük olduğu, ayrıca duyarlılığın ve PPD'in literatürlere göre düşük oranda olduğu belirlenmiştir. Bunun özellikle akciğer dışı örneklerin anatomik yapısına spesifik olarak alınan miktarları, kalitesi veya çalışma prosedürüne uygun alınıp alınmadığıyla ya da, daha önemlisi hedef gen bölgesine spesifik değişik sayıda primer çiftleri kullanılmamasıyla ilgili olabilir.

TEŞEKKÜR

Dr. Vedat KÖKSAL ve Burç Moleküler Tanı Laboratuvarı'na yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Ellner JJ, Hinman AR, Dooley SW, et al. Tuberculosis symposium: Emerging problems and promise. *JID* **1993**; 168: 537-51.
2. Kocagöz T. Yeni laboratuvar yöntemleri ile tüberküloz tanısı. *İnfek Derg* **1997**; 11 (Suppl 1): 29-33.
3. Strong BE, Kubica GP. *Isolation and Identification of Mycobacterium tuberculosis*. HHS Publication No. 81-8390. Atlanta, Georgia: CDC, **1979**:35.
4. Suffys P, Palomino JC, Cardoso Leao S, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *In J Tuberc Lung Dis* **2000**; 4: 179-83.
5. Tan YK, Lee AS, Khoo KL, Ong SY, Wong SY, Ong YY. Rapid mycobacterial tuberculosis detection in bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction in patients with upper lobe infiltrates and bronchiectasis. *Ann Acad Med Singapore* **1999**; 28: 205-8.
6. Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. *In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PZR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. California: Academic Press, **1990**: 153-8.
7. 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: 1435-8.
8. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nyugen S, Guesdon J-L, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS 6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* **1990**; 28: 2668-73.
9. Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor, **1989**.
10. Tuberculosebestrijding. Leidraad voor de werkwijze, Koninklijke Nederlandse Centrale Vereniging tot bestrijding der Tuberculose (KNCV), The Hague, **1990**. (Tuberculosis control. Working guidelines. KNCV, The Hague, 1990).
11. Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frebault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* **1989**; 2: 1069-71.
12. Akın M, Halilçolar H, Güçlü SZ, Tuksavul F. Akciğer tüberkülozlu hastalarda izoniyazid ve rifampisin direncinin araştırılması. *İzmir GHH Dergis* **1990**; 4: 3-6.
13. Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, Prasad K, Schrinivas MB, Ahuja GK. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet* **1991**; 337: 5-7.
14. Kaneko K, Onodera O, Miyatake T, Tsuji S. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction (PCR). *Neurology* **1990**; 40: 1617-21.
15. Burdash NM, Manos JP, Ross D, Bannister ER. Evaluation of the acid-fast smear. *J Clin Microbiol* **1976**; 4: 190-1.
16. Noordhoek GT, Kolk AHJ, Bjune G, et al. Sensitivity and specificity of PZR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* **1994**; 32: 2049-56.
17. Kolk AHJ, Kox LFF, van Leeuwen J, Kuijper S, Jansen HM. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Eur Respir J* **1998**; 11: 1222-6.
18. Ginesu F, Pirina P, Sechi LA, et al. Microbiological diagnosis of tuberculosis: A comparison of old and new methods. *J Chemother* **1998**; 10: 295-300.
19. Bennedsen J, Thomsen VO, Pfyffer GE, et al. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* **1996**; 34: 1407-11.
20. Wolska-Goszka L, Nowak A, Galinski J, Slominski JM. Use of polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from patients. *Pneumonol Alergol Pol* **1998**; 66: 31-7.
21. Garcia QA, Garcia L, Tudo G, Navarro M, Gonza J, de Anta MT. Single-tube balanced heminested PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in smear-negative samples. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 1166-9.
22. Wei CY, Lee CN, Chu CH, Hwang JJ, Lee CP. Determination of the sensitivity and specificity of PCR assays using different target DNAs for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih* **1999**; 15: 396-405.
23. Liam CK, Chen YC, Yap SF, Srivinas P, Poi PJ. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in bronchoalveolar lavage from smear-negative pulmonary tuberculosis using a polymerase chain reaction assay. *Respirology* **1998**; 3: 125-9.
24. Wong CF, Yew WW, Chan CY, et al. Rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis via fiberoptic bronchoscopy: utility of polymerase chain reaction in bronchial aspirates as an adjunct to transbronchial biopsies. *Respir Med* **1998**; 92: 815-9.
25. Eing BR, Becker A, Sohns A, Ringelmann R. Comparison of Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Assay with In-House PCR and culture for detection of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **1998**; 36:7-29.
26. Grieco MH, Chemel H. Acute disseminated tuberculosis as a diagnostic problem. A clinical study based on twenty-eight cases. *Am Rev Respir Dis* **1974**; 109: 554-60.
27. Wolinsky E. Conventional diagnostic methods for tuberculosis. *Clin Infect Dis* **1994**; 19: 396-401.
28. Gomez-Pastrana D, Torronteras R, Caro P, et al. Diagnosis of tuberculosis in children using a polymerase chain reaction. *Pediatr Pulmonol* **1999**; 28: 344-51.
29. Bemer MP, Germaud P, Drugeon HB. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by a commercial polymerase chain reaction kit. *Pathol Bio (Paris)* **1998**; 46: 597-603.

30. **Portillo-Gomez L, Morris SL, Panduro A.** Rapid and efficient detection of extra-pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* **2000**; 4: 361-70.
31. **Inoue T, Ikeda N, Kurasawa T, et al.** A case of middle ear tuberculosis; PCR of the otorrhea was useful for the diagnosis. *Kekkaku* **1999**; 74: 453-6
32. **Özkara HA, Kocagöz T, Özçelik U, Akçören Z, Göçmen A.** Comparison of three different primer pairs for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction in paraffin-embedded tissues. *Int J Tuberc Lung Dis* **1998**; 2: 451-5.
33. **Vago L, Barberis M, Gori A, et al.** Nested polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 sequence on formalin-fixed-paraffin-embedded tissues with granulomatous diseases for rapid diagnosis of tuberculosis. *Microbiol Infect Dis* **1998**; 109:411-5.
34. **Akhan-Aşcıoğlu S, Hayran M.** Tüberküloz. *İnfek Bül* **1996**; 1: 5-8.
35. **Brisson-noel A, Aznar C, Chureau C, et al.** Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* **1991**; 338 364-6.
36. **Kent SJ, Crowe SM, Yung A, et al.** Tuberculosis meningitis: A 30 year review. *Clin Infect Dis* **1993**; 17: 978-94.
37. **Clarridge JE, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaytis BB.** Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* **1993**; 31: 2049-56.
38. **Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT.** Polymerase chain reaction amplification of a repetitive sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **1990**; 161: 977-81.
39. **Takagi N, Hasegawa Y, Ichiyama S, Shibagaki T, Shimokata K.** Polymerase chain reaction of pleural biopsy specimens for rapid diagnosis of tuberculous pleuritis (Short Communication). *Int J Tuberc Lung Dis* **1998**; 2: 338-41.