

Balgam örneklerinden *Mycobacterium tuberculosis* kompleks türlerinin nested PCR metodu ile direkt belirlenmesi

Ahmet Ağaayak (*), Yasemin Bulut (*), Adnan Seyrek (*), Ayten Gündüz (*), Aziz Ramazan Dilek (*)

Özet

Bu çalışmanın amacı, balgam örneklerinde *Mycobacterium tuberculosis* kompleks türlerinin IS6110 kökenli "nested polymerase chain reaction" (PCR) ile direkt olarak belirlenmesidir. Bu amaçla, çalışmada, akciğer tüberkülozu tanısı konmuş 120 hastadan alınan balgam örnekleri kullanıldı. Dekontaminasyon işlemi takiben, balgam örneklerinin bir kısmı Löwenstein-Jensen besiyerine ekildi ve örnekler 35-37 °C'de 4-8 hafta inkübe edildi. Kültür sonucunda, 105 örnekte tüberküloz basilinin ürediği belirlendi. Bu nedenle, nested PCR metodunda 105 hastaya ait kültür ve direkt balgam örneklerinden elde edilen DNA'lar kullanıldı. Nested PCR sonucunda, toplam 105 direkt balgam örneğinin 78'inde (%74.29), kültür örneklerinin ise 84'ünde (%80) *M. tuberculosis* kompleks türleri belirlendi. Kültürde gerçekleştirilen nested PCR ile kıyaslandığında direkt balgamda gerçekleştirilen nested PCR'in duyarlılığı %92.8 (78/84), özgüllüğü ise %100 (21/21) olarak tespit edildi. Çalışmanın sonuçlarına göre, nested PCR metodunun direkt balgam örnek-

lerinden *M. tuberculosis* kompleks türlerinin belirlenmesinde pratik, özgül ve duyarlı bir metod olduğu kaydedilmiştir.

Anahtar kelimeler: Balgam, IS6110 gen bölgesi, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi, nested PCR

Summary

Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from sputum samples by nested PCR method

The purpose of this study was to detect the presence of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in sputum samples by IS6110-based nested polymerase chain reaction (PCR). The sputum samples of 120 patients with pulmonary tuberculosis were collected. After decontamination procedure, a portion of the sputum samples was inoculated on Löwenstein-Jensen medium and then the samples were incubated at 35-37 °C, for 4-8 weeks. Tuberculosis bacilles were identified in 105 out of 120 sputum cultures collected from the patients with tuberculosis. Therefore, the direct sputum samples and the DNAs extracted from the culture of those 105 patients were used for amplification of IS6110 gene region by nested PCR. In the result of the nested PCR method, 78 (74.29%) of the direct sputum samples were found to be positive for *M. tuberculosis* complex, while 84 (80%) of the culture samples were positive. When the results of the direct sputum samples were compared to the culture sam-

ples, the sensitivity and specificity of nested PCR from direct sputum samples were 92.8% (78/84), and 100% (21/21), respectively. This study has shown that nested PCR method is a practical, sensitive and specific method for the detection of *M. tuberculosis* complex strains from sputum samples.

Key words: Sputum, IS6110 gene region, *Mycobacterium tuberculosis* complex, nested PCR

Giriş

Tüberküloz, halk sağlığını tehdit eden önemli bir enfeksiyondur. Dünya Sağlık Örgütü; dünyanın üçte birinin tüberküloz basili ile enfekte olduğunu bildirmiştir (1). Bugün tüberküloz enfeksiyonlarının %95'i gelişmekte olan ülkelerde ortaya çıkmakta ve tüberkülozdan ölümlerin %99'u bu ülkelerde görülmektedir (2).

Bu mikroorganizmanın kültür ortamında çok yavaş üremesi, tanısı bakımından oldukça önemli bir dezavantajdır. Bu yüzden; tüberkülozun etkili şekilde kontrolü için kültüre alternatif olabilecek, hızlı, özgül ve duyarlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi çalışmaları sıklıkla yapılmaktadır. Bu amaçla son yıllarda başta moleküler yöntemlerle tanı yöntemleri olmak üzere, birçok çalışma rapor edilmiştir (3-5). Bu moleküler tanı yöntemleri yalnızca tüberküloz basil-

*Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Elazığ

Ayrı basım isteği: Dr. Yasemin Bulut, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Elazığ
E-mail: ybulut@firat.edu.tr

Makalenin geliş tarihi: 25.10.2005
Kabul edilme tarihi: 10.04.2006

lerinin belirlenmesinde değil, aynı zamanda bu basillerin tiplendirilmesinde oldukça sık kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla kullanılan moleküler yöntemler, çoğunlukla genom üzerindeki tekrarlanan elementleri hedef almaktadır. Bunların başlıcaları; insersiyon sekansları IS6110 ve IS1081, büyük polimorfik tekrar elementleri, GC zengin polimorfik dizilimler, değişken sayıda tandem tekrarlar, direkt tekrar lokusu, kesici oligonükleotitler, "mycobacterial interspersed repetitive" elementlerdir. *M.tuberculosis* kompleks genom üzerinde farklı kopya sayılarında bulunan ve lokalizasyon bakımından da türler arasında değişim gösteren bir transpozon olan IS6110, moleküler çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir "marker"dir (3-5).

Bu çalışmada, akciğer tüberkülozu tanısı konmuş hastaların balgam örneklerinde *M. tuberculosis* kompleks varlığının, IS6110 insersiyon gen bölgesi hedef alınarak, nested PCR'la belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Balgam örneklerinin dekontaminasyonu ve Ehrlich-Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyaması: Bu çalışmada kullanılan balgam örnekleri, 2002-2004 tarihleri arasında, Elazığ Verem Savaş Derneği'nde daha önce yapılan klinik ve laboratuvar tetkiklerinde akciğer tüberkülozu tanısı konmuş olan 120 hastadan alındı. Örnekler, öncelikle, organik kalıntıları sindirmek ve kontaminasyona sebep olan bakteri ve mantarları elimine etmek amacıyla dekontaminasyon işlemi uygulandı. Bu işlem için N-asetil-L-sistein (NALC-Mukolitik) ve sodyum hidroksid (NaOH) yöntemi tercih edildi (6). Lam üzerine örneklerden yayma yapılarak, örnekler Ehrlich-Ziehl-Neelsen karbolfüksin yöntemi ile boyandı. Lam oda ısısında bekletilerek hava etkisiyle kurutuldu. Boyanmış yayma preparat, ışık mikroskopunda incelenerek aside-alkole dirençli basiller gözlemlendi (7).

Mikobakterilerin kültürü: De-konta-

minasyonu yapılmış olan balgam örneklerinin bir kısmından Löwenstein-Jensen besiyerine ekim yapılarak 35-37 °C'de 4-8 hafta inkübe edildi. Balgam örneklerinin diğer kısmı ise PCR'da kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Kültüre ekilen örnekler, her hafta, hem makroskopik hem de mikroskopik olarak incelendi ve üremeleri kontrol edildi (6).

DNA İzolasyonu ve Nested PCR: Hem kültür hem de dekontamine balgam örneklerinin DNA ekstraksiyonu, ticari bir kit ile (Wizard Genomic DNA Purification kiti, Promega) gerçekleştirildi. Kısaca, santrifüj sonrası pelletlere 10 mg/ml'lik lizozim enzimi ve 50 mM'lık EDTA ilave edilerek, örnekler 37 °C'de 2 saat karıştırıcı inkübe edildi. Karışıma ticari kit içinde olan nükleik lizis solüsyonu eklenerek, karışım 80 °C'de 10 dk bekletildi. Karışıma, yine kit içinde bulunan RNA'ase enzimi katılarak, karışım 37 °C'de 30 dk bırakıldı. Sonra, karışıma protein çöktürme solüsyonu bırakılarak, karışım 10 dk buzlu suda bekletildi. Santrifüj sonrası üst sıvı, yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine eşit volümde izopropranolol eklendi. Tüpler çöktürme işlemi için 1 gece oda ısısında bekletildi. Daha sonra %70'lik etil alkol ile yıkamaları yapılarak DNA pelletleri kurutuldu. Pellet DNA'lar 40 l steril distile su ile sulandırıldı. Bu örnekler, PCR'da kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı (8,9).

Nested PCR'ın, gerek duyarlılık gerekse özgüllük bakımından normal PCR'a üstünlükleri bulunmaktadır. Nested PCR'ın pek çok farklı klinik örnekte *M.tuberculosis* kompleks türlerinin belirlenmesinde etkin olduğu gösterilmiştir (8). Bu nedenle nested PCR, elde edilen DNA ile IS6110 gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirildi (8). Mevcut çalışmada, nested PCR'ın birinci aşamasında her örnek için; 10X PCR buffer, 25mM MgCl₂, her biri 100 mM olan dNTP, 20 pmol/μl primer 1 (TJ5; 5'- CCG CAA AGT GTG GCT AAC - 3'), 20 pmol/μl primer 2

(TJ3; 5'- ATC CCC TAT CCG TAT GGT G - 3'), 23.5 μl dH₂O ve 0.5 μl 1Ü Taq DNA polimeraz (Promega/ABD) enzimi içeren karışım hazırlandı. Mikrosantrifüj tüplerine 40 μl PCR karışımı ve 10 μl örnek DNA'sı bırakıldı. Daha sonra örnekler, 1 döngü 94 °C'de 2 dk ön ısıtmayı takiben, 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 56 °C'de 1 dk birleşme ile 72 °C'de 2 dk uzamadan oluşan toplam 36 döngü ve 1 döngü de son uzatma 72 °C'de 10 dk olacak şekilde PCR cihazında çoğaltıldı. İkinci aşama PCR'da ise; 20 pmol/μl primer 3 (OLİ5; 5'- AAC GGC TGA TGA CCA AAC - 3') ve 20 pmol/μl primer 4 (STAN3; 5'- GTC GAG TAC GCC TTC TTG TT - 3') primerlerini içeren karışım hazırlanarak üzerine 2 μl birinci aşama PCR ürünlerinden katıldı. Örnekler birinci aşama PCR döngüsü uygulanarak nested PCR gerçekleştirildi (8).

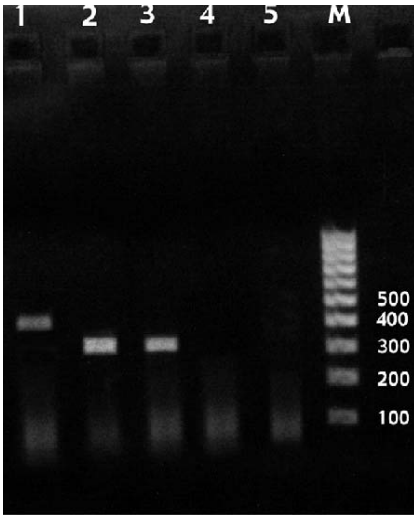
Elde edilen PCR ürünleri 0.5 g/ml etidyum bromid içeren %2'lik agaroz jelde elektroforez edildi. Elektroforez sonrası, jeller görüntüleme sisteminde ultraviyole ışınları ile incelendi.

Bu çalışmada pozitif kontrol olarak standart *M. tuberculosis* kompleks ATCC suşu (ATTC-35810) ve negatif kontrol olarak ise steril dH₂O kullanıldı.

Kültürde ve direkt balgamda gerçekleştirilen nested PCR deneylerinin sonuçları arasındaki istatistiksel ilişki, ki-kare (χ^2) testi kullanılarak belirlendi (10).

Bulgular

Kültürde, tüberküloz teşhisi almış olan 120 hastadan 105'inin balgamlarında tüberküloz basillerinin ürediği belirlendi. Bu 105 hastanın kültür ve direkt balgam örneklerinden DNA izolasyonunu takiben, IS6110 gen bölgesine özgü primerlerle nested PCR işlemi gerçekleştirildi. Pozitiflik, birinci aşama PCR sonucunda 409 baz çifti (bç), ikinci aşama PCR sonucunda ise 316 bç büyüklüğündeki DNA bantlarına göre değerlendirildi (Şekil 1). Toplam 105



Şekil 1. Elde edilen PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Hat 1; Klinik örnekte I. aşama PCR sonucu belirlenen bant (409 bç.'lik), hat 2; Klinik örnekte II. aşama PCR sonucu belirlenen bant (316 bç.'lik), hat 3; pozitif kontrolde II. aşama PCR sonucu belirlenen bant (316 bç.'lik), hat 4; negatif klinik örnek, hat 5; negatif kontrol, M; 100 bç.'lik DNA ladder marker

balgam örneklerinde yapılan nested PCR sonucunda 78'inde (%74.28), kültür örneklerine yapılan nested PCR sonucunda ise 84'ünde (%80) IS6110 gen bölgesinin 316 bç.'lik kısmı gözlemlendi. Balgam örneklerinden *M.tuberculosis* kompleks pozitif olarak belirlenen örneklerin tamamı kültür örneklerinde de pozitif olarak belirlendi. Kültürde gerçekleştirilen nested PCR ile kıyaslandığında direkt balgamda gerçekleştirilen nested PCR'in duyarlılığı %92.8 (78/84), özgüllüğü ise %100 (21/21) olarak tespit edildi. Aynı çalışmada, direkt balgamda gerçekleştirilen nested PCR'in pozitif prediktif değeri %100 (78/78) ve negatif prediktif değeri %77.7 (21/27) olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, direkt balgamda gerçekleştirilen nested PCR'in sonuçları ile kültür örneklerinde gerçekleştirilen nested PCR sonuçları arasında önemli fark tespit edilmemiştir ($\chi^2=0.972$; $p=0.324$).

Tartışma

Tüberküloz basillerinin tiplendirilmesi; hastaların epidemiyolojik olarak birbirleriyle ilişkilerinin belirlenmesi, reaktivasyonun bulaşmadan ayırt edilmesi, hastane ve toplumsal

kaynaklı enfeksiyonların belirlenmesi ve laboratuvar kontaminasyonlarının saptanması bakımından önemlidir (5).

İnsanlarda görülen tüberküloz olgularında *M.tuberculosis* kompleks türleri, kompleks dışı mikobakteri türlerine kıyasla, daha sık belirlenmektedir. Bu türlerin ayırımında biyokimyasal testler ve faj tiplendirme gibi konvansiyonel yöntemler uzun süre kullanılmış olmakla beraber, bu yöntemlerin önemli eksiklikleri bulunmaktadır. Bunlar kültüre dayalı yöntemler olduklarından, uzun bir sürede sonuç verebilmektedir. Bu sebeple direkt klinik örneklerden çalışılabilecek, doğru ve hızlı tiplendirme metoduna gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla son yıllarda, çeşitli DNA temelli teknikler uygulanmakta ve mikobakteri hedef genleri incelenerek türlere özgü gen bölgeleleri seçilmektedir (5,11).

Tüberküloz basillerinin tiplendirilmesi amacıyla sıklıkla kullanılan bölgeler, genom üzerinde tekrar elementlerdir. Bu amaçla kullanılan IS6110 insersiyon gen elementi, *M.tuberculosis* kompleks genomu üzerinde farklı kopya (1-20) sayılarında bulunan, lokalizasyon bakımından da türler arasında değişim gösteren bir transpozondur (5). Kivi ve ark., IS6110 gen bölgesini hedef alan çalışmada örneklerinin %64'ünde *M.tuberculosis* kompleks türlerini belirlemişlerdir (12). Warren ve ark., IS-3' probunu ve DNA parmak izi yöntemini kullanarak %99.7 oranında *M.tuberculosis* izolatları tanımlamışlardır (13). Montenegro ve ark. pulmoner tüberkülozlu 222 çocuk hastada 322 klinik örneğe (mide açlık sıvısı, nazofaringeal sıvı, balgam ve diğerleri) Pt8/Pt9 ve TB290/Pt9 primerleriyle yapmış oldukları seminested PCR sonucunda %67 oranında IS6110 gen bölgesini tespit etmişlerdir (14). Durmaz ve ark. IS6110 ve DNA parmak izi metoduyla yapmış oldukları çalışmada ise, 88 *M.tuberculosis* izolatının 58'ini (%65.90) tiplendirmişlerdir (15). Toraman ve ark. 77 beyin omurilik sıvısı, 13 mide açlık sıvısı, 10

balgam, 6 plevral mayi ve 5 torasentez mayi olmak üzere toplam 121 örnekte TJ3/TJ5 ve OLİ5/STAN3 primerlerini kullanarak yapmış oldukları nested PCR yöntemiyle 42 (%34.70) örnekte IS6110 gen bölgesini belirleyerek *M.tuberculosis* kompleks türleri ile diğer mikobakterileri birbirinden ayırt etmişlerdir (16). Atabey ve ark. çeşitli örneklerde (BOS, periton sıvısı, plevra sıvısı, doku biyopsileri, balgam) IS6110 gen bölgesini belirleyerek 150 hasta örneğinin 69'unda *M.tuberculosis* kompleks türlerini tespit etmişlerdir (17).

TJ3/TJ5 ve OLİ5/STAN3 primerleri kullanılarak yaptığımız bu çalışma sonucunda ise; 105 hastanın 78'inin (%74.29) direkt balgam örneklerinde, 84'ünün (%80) kültür örneklerinde IS6110 gen bölgesi elde edilerek, hem direkt balgam hem de kültür örneklerinden *M.tuberculosis* kompleks türleri tespit edilmiştir. Bu örneklerin tamamı akciğer tüberkülozu tanısı konmuş hastalardan alınmış ve tüm örneklerde Ziehl-Neelsen karbol-füksin yöntemi ile boyamada aside-alkole dirençli basiller gözlenmiş olmasına rağmen, balgam örneklerinin 27'si (%25.71), kültür örneklerinin ise 21'i (%20) nested PCR negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu negatifliğin sebebi, alınan örnekten nested PCR'in deteksiyon limitinin altında bakteri bulunmasından kaynaklanabileceği gibi, bu örneklerdeki etkenlerin *M.tuberculosis* kompleks dışı mikobakteriler olması da muhtemeldi. Ancak, bu çalışmada negatif örneklerde *M.tuberculosis* kompleks dışı mikobakteriler için bir tiplendirmeye gidilmemiştir. *M.tuberculosis* kompleks dışı mikobakteriler için bir tiplendirmeye gidilmemiş olunmasına rağmen, yalnızca mevcut pozitiflikler dikkate alındığında, bölgemizde tüberküloz olgularında *M.tuberculosis* kompleks türlerinin yüksek oranda bulunduğunu ifade edebiliriz.

Bu çalışmanın verilerine göre, pozitif prediktif değer yüksek çıkmıştır. Çalışmada örneklerin tamamının klinik tüberküloz hastalarından seçilmiş olması pozitif prediktif değer

yüksek çıkmasının sebebi olarak görülebilir. Ancak, çalışmanın sonuçları balgam örneklerinde nested PCR'in duyarlı ve özgül olduğunu, ayrıca etkenin kültür veya direkt balgamda belirlenmesi noktasında istatistiksel olarak da anlamlı bir farkın olmadığını göstermektedir. Balgam örneklerinden etkenin doğrudan nested PCR ile belirlenmesinde yüksek özgüllük ve duyarlılık nedeniyle, benzer yaklaşımın klinik olarak doğrulanamayan vakalarda *M.tuberculosis* kompleks türlerinin kısa sürede ve güvenli bir şekilde belirlenmesinde de kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, bu çalışmanın verileri *M.tuberculosis* kompleks türlerinin nested PCR ile direkt balgam örneklerinden belirlenmesinin pratik, duyarlı ve özgül bir yaklaşım olduğu kanaatini desteklemektedir.

Teşekkür

Akciğer tüberküloz olduğu tespit edilmiş hastalara ulaşılmasında ve bu hastaların balgam örneklerinin temin edilmesinde bizlerden yardımlarını esirgemeyen Elazığ Verem Savaş Dispanseri sorumlu tabibi Dr. Hayri Kırış ve kurum çalışanlarına teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Savic B, Sjöbring U, Alugupalli S, Larsson L, Miörner H. Evaluation of polymerase chain reaction, tuberculostearic acid analysis and direct microscopy for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in spu-

- tum. *J Infect Dis* 1992; 166: 1177-1180.
2. Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları*. 1nci baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 1996: 396-442.
3. Wilson SM, Goss S, Drobniewski F. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a *Mycobacterium* reference unit. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3385-3388.
4. van der Zanden AGM, Kremer K, Schouls LM, et al. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4628-4639.
5. Durmaz R. Türkiye'de tüberküloz basillerinin moleküler epidemiyolojisi. XXIX. Türk Mikrobiyolojisi Kongresi, 2000, 119-121.
6. Uzun M. Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003, 285-290.
7. Sarıgüzel N. Direkt mikroskopi teknikleri ve değerlendirilmesi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003, 291-299.
8. Tzoanopoulos D, Stakos D, Hatseras D. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in pericardial fluid, bone marrow and peripheral blood in a patient with pericardial tuberculosis: a case report. *Net J Med* 2001; 59: 177-180.
9. Niemann S, Harmsen D, Rüşch-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by gyrB DNA

- sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3231-3234.
10. SPSS for Windows, Release 9,0; 2000; Standart version 11.5.
11. Berktaş M. Tüberkülozda tanı. 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi-KLİMİK '99, 1999, 122-124.
12. Kivi M, Liu X, Raychaudhuri S, Altman RB, Small PM. Determining the genomic locations of repetitive DNA sequences with a whole-genome microarray: IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Mic* 2002; 40: 2192-2198.
13. Warren RM, van der Spuy GD, Richardson M, et al. Evolution of the IS6110-based restriction fragment length polymorphism pattern during the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Mic* 2002; 40: 1277-1282.
14. Montenegro SH, Gilman RH, Patricia S, et al. Improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Peruvian children by use of a heminested polymerase chain reaction assay. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 16-23.
15. Durmaz R, Özerol İH, Durmaz B, Gürel S, Şenoğlu A, Evliyaoğlu E. Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 361-366.
16. Toraman ZA, Bulut Y, Özdarendeli A. Çeşitli klinik örneklerden *Mycobacterium tuberculosis* complex'in polimeraz zincir reaksiyonuyla belirlenmesi. *Fırat Tıp Dergisi* 2002; 7: 860-864.
17. Atabey N, İzci Ö, Erkızan V, Sakızlı M. Tüberkülozun hızlı tanısında PCR yönteminin kullanılması. 5. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 1998, İzmir.