

## MİKOBAKTERİYEL DNA İZOLASYONUNDA ÜÇ FARKLI YÖNTEMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI\*

### COMPARISON OF THREE DIFFERENT MYCOBACTERIAL DNA ISOLATION METHODS

**Alpaslan ALP<sup>1</sup>, Şehnaz ALP<sup>1</sup>, Zeynep SARIBAŞ<sup>1</sup>, Gülşen HASÇELİK<sup>1</sup>**

**ÖZET:** Mikobakteri enfeksiyonlarında tanının kısa bir sürede konabilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle moleküler yöntemler günümüzde değerli tanı araçları haline gelmişlerdir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) öncesinde uygulanan DNA izolasyon aşaması, kullanılan testin duyarlılığını etkileyen en önemli basamaklardan biridir. Bu çalışmada, mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında kullanılan PCR yöntemlerinin verimliliğini etkileyebilecek üç DNA izolasyon yöntemi karşılaştırılmıştır. Bu amaçla kaynatma yöntemi, "MagNA Pure LC" (Roche Applied Science, Germany) otomatize izolasyon sistemi ve "Magtration 12GC" (Precision System Science, Germany) otomatize izolasyon sisteminin duyarlılıkları, dört farklı mikobakteri suşu (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra standart suşu, *M.tuberculosis* klinik izolatu, *M.phlei* ve *M.smegmatis*) kullanılarak test edilmiştir. Bu suşların seri dilüsyonları hazırlanarak her üç yöntemle de DNA izolasyonu uygulanmış, daha sonra PCR ile tüm mikobakterilerde bulunan *hsp65* genine özgül primerler kullanılarak 441 baz çiftlik bölge çoğaltılmıştır. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırıldığında, bant gözlenebilen en düşük dilüsyon oranı, 10<sup>-5</sup> ile "MagNA Pure" ve "Magtration" sistemleriyle izolasyon yapılan H37Ra suşunda saptanmıştır. H37Ra DNA'sının kaynatma yöntemi ile izolasyonunda ise ancak 10<sup>-2</sup> dilüsyonda bant gözlenebilmiştir. *M.tuberculosis* izolatında "MagNA Pure" sistemi, "Magtration" sistemi ve kaynatma yöntemiyle sırasıyla 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> ve 10<sup>-1</sup> dilüsyonlarda bant gözlenmiştir. *M.smegmatis* ve *M.phlei* suşlarında ise amplifikasyon sırasıyla 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-2</sup> ve 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> ve 10<sup>-2</sup> dilüsyonlarında gözlenmiştir. Çalışma sonucunda, "MagNA Pure" sistemi ile daha düşük miktarlardaki DNA'nın saptanabildiği, buna karşın kaynatma yöntemiyle ancak yüksek miktarlardaki DNA'nın saptanabildiği görülmüştür. Bu nedenle, rutin PCR uygulamalarında hem daha duyarlı olmalarından dolayı hem de standardizasyon sağlanabilmesi için, otomatize izolasyon sistemlerinin kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

*Anahtar sözcükler: Mikobakteri, DNA izolasyon yöntemleri, MagNA Pure LC, Magtration 12GC.*

**ABSTRACT:** Rapid diagnosis of mycobacterial infections is of crucial importance. For this reason molecular methods have become valuable diagnostic tools. DNA isolation step prior to polymerase chain reaction (PCR) is one of the most important steps that affect the sensitivity of the diagnostic tests. In this study, three isolation

\*Bu çalışma, 4. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (25-28 Nisan 2006, Ankara)'nde poster olarak sunulmuştur.

<sup>1</sup> Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

methods which could affect the sensitivity of the PCR methods used for the diagnosis of mycobacterial infections were compared. For this reason the sensitivities of boiling method, MagNA Pure LC automated isolation system (Roche Applied Science, Germany) and Magtration 12GC (Precision System Science, Germany) automated isolation system were compared by using four different mycobacterial strains (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra standard strain, *M.tuberculosis* clinical isolate, *M.phlei* and *M.smegmatis*). DNAs were isolated from serial dilutions of these mycobacterial strains by using three isolation methods, and 441 base pair region of *hsp65* gene was amplified by PCR. After the obtained products were run on agarose gel, it was observed that the lowest dilution rates at which bands could be seen were  $10^{-5}$  dilutions of H37Ra DNA isolated by MagNA Pure and Magtration systems. Isolation of H37Ra DNA by boiling method yielded a band in  $10^{-2}$  dilution sample. Isolation of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate by MagNA Pure system, Magtration system and boiling method provided amplification in  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-1}$  dilution samples, respectively. The lowest dilution samples which yielded visible bands on agarose gel were  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  and  $10^{-2}$  dilution samples for *M.smegmatis* strain and  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-2}$  dilution samples for *M.phlei* strain. The results of this study revealed that MagNA Pure system could detect smaller amounts of DNA in the sample while boiling method was not a reliable method to detect small amounts of DNA in clinical samples. Therefore it was concluded that the use of automated isolation systems could be a reliable alternative for routine PCR applications by providing both high sensitivity and standardization.

*Key words: Mycobacteria, DNA isolation methods, MagNA Pure LC, Magtration 12GC.*

## GİRİŞ

Mikobakteriyel enfeksiyonların tanısı uzun zaman aldığından, günümüzde hızlı ve güvenilir testlere ihtiyaç duyulmaktadır<sup>1-4</sup>. Tanıdaki bu zaman sorununu ortadan kaldıran en önemli gelişme, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin kullanıma girmesidir<sup>5-9</sup>. Günümüzde özellikle klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis*'in saptanmasında rutin olarak kullanılan çeşitli ticari sistemler mevcuttur<sup>10-14</sup>. Moleküler yöntemler rutin tanının yanı sıra, klinik örneklerde saptanan mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması amacıyla da kullanılmaktadırlar. PCR-restriksiyon enzim analizi (PCR-REA) yöntemi, mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan pratik ve ucuz bir yöntemdir<sup>15</sup>. Molekül ağırlığı 65 kDa olan "heat shock protein" genini (*hsp65*) hedef alarak yapılan PCR-REA çalışmalarında, iki özgül primer kullanılarak çoğaltılan 441 baz çifti (bç) uzunluğundaki ürünler, *BstEII* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleri ile kesilmekte, böylece elde edilen restriksiyon parçaları poliakrilamid jelde yürütülerek ayrıştırılmaktadır.

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanan her türlü PCR işlemi öncesinde, nükleik asit izolasyonunun verimli bir şekilde gerçekleştirilebilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında kullanılan PCR yöntemlerinin duyarlılığını etkileyebilecek ilk basamak olan DNA izolasyonu aşamasında kullanılacak üç yöntemin verimliliklerinin karşılaştırılması planlanmıştır. Bu amaçla kaynatma yöntemi, "MagNA Pure LC" otomatize izolasyon sistemi (Roche Applied Science, Germany) ve "Magtration 12GC" (Precision System Science, Germany) otomatize izolasyon sisteminin duyarlılıkları, dört farklı mikobakteri türünün seri dilüsyonları hazırlanarak test edilmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, üç farklı mikobakteriyel DNA izolasyon yönteminin duyarlılığı, *hsp65* geninin 441 bp'lik bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR yöntemi ile araştırıldı.

**Mikobakteri Suşları:** Çalışmada kullanılmak üzere 4 mikobakteri suşu seçildi. Seçilen *M.tuberculosis* H37Ra standart suşu, *M.tuberculosis* hasta izolatu, *M.phlei* ve *M.smegmatis*'in Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilmiş kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında mikobakteri süspansiyonları hazırlandı. Hedeflenen 0.5 McFarland bulanıklığına ulaşabilmek için, cam boncuk içeren tüplere 450'şer µl Tris-EDTA (TE) tamponu (10mM Tris, 1mM EDTA; pH: 8) eklendi ve 8 adet 10<sup>-1</sup> seri dilüsyon tüpü hazırlandı. Her mikobakteri suşu için üç set dilüsyon yapıldı ve bu setlerin her birisine üç farklı yöntemle DNA izolasyonu uygulandı.

### *Mikobakteriyel DNA İzolasyon Yöntemleri:*

Kaynatma yöntemi için örnekler üç kez TE tamponu ile yıkanıp, 20 dakika süreyle kaynatıldı. Kaynatma sonrasında tüpler 5.000x rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek hücre artıkları çöktürüldü ve süpernatant kısım alınarak DNA ekstresi elde edildi<sup>7</sup>.

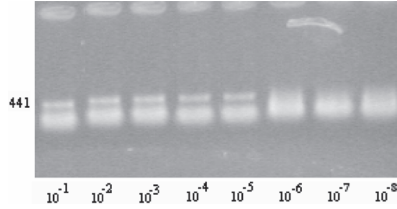
"MagNA Pure LC" otomatize izolasyon sisteminde (MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Roche Diagnostics, Germany), kit içinde bulunan ve sistemin gereksinimlerini içeren reaktifler ilgili pozisyonlara yerleştirildi. Daha sonra içinde önceden hazırlanmış lizis tamponu ve kantitasyon standardı içeren (300 µl) özel kartuşlar üzerine mikobakteri süspansiyonlarından 100'er µl eklendi ve otomatik işlem başlatıldı. "MagNA Pure LC" cihazı içerisinde öncelikle, lizis tamponu içinde bulunan proteinaz K'nın etkisiyle nükleik asitler açığa çıkarıldı; sonrasında, yine lizis tamponu içinde bulunan yüksek tuz konsantrasyonunun etkisiyle nükleik asitlerin, karışıma eklenen manyetik boncuklara bağlanması sağlandı. Birkaç yıkama işlemiyle, manyetik boncuklara bağlanmamış olan maddeler ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra yüksek ısı etkisi ve tuz konsantrasyonunun düşürülmesiyle birlikte nükleik asitler manyetik boncuklardan ayrılarak saf olarak elde edildi. Tüm bu işlemler cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi. Cihazın içerisinde, örneklerden otomatik olarak nükleik asit izolasyonu yapan bir kısım ile işlemler sonunda örneklerin bekletildiği bir soğutma bloğu mevcuttu. İzolasyon işlemi sona erdiğinde (yaklaşık 2-2.5 saat) bu kısımda bekletilen kartuşlar alındı ve elde edilmiş olan DNA'lar PCR için kullanıldı.

"Magtration 12GC" otomatize izolasyon sisteminde de, manyetik boncuklara nükleik asitlerin bağlanması stratejisinden yararlanıldı. Bunun için ilk aşamada lizis tamponu içinde bulunan proteinaz K'nın etkisiyle mikobakteriler parçalanarak nükleik asitleri açığa çıkarıldı. Nükleik asitler, lizis tamponu içinde bulunan yüksek tuz konsantrasyonunun etkisiyle, karışıma eklenen manyetik boncuklara bağlandı ve birkaç yıkama işlemiyle, manyetik boncuklara bağlanmamış olan maddeler ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra yüksek ısı etkisi ve tuz konsantrasyonunun düşürülmesiyle nükleik asitler manyetik boncuklardan ayrıldı ve saf olarak elde edildi.

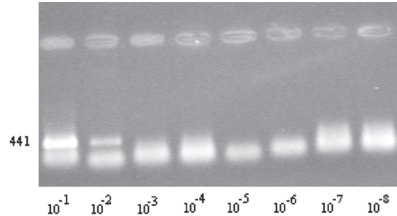
*Mikobakteriyel DNA'nın PCR ile çoğaltılması ve sonuçların değerlendirilmesi:* İzolasyon yöntemleriyle elde edilen mikobakteri DNA'ları, tüm mikobakterilerde bulunan *hsp65* geninin 441 bp'lik bölgesinin PCR ile çoğaltılmasında kullanıldı. Bunun için TB11 [5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT] ve TB12 [5'CTTGTCGAACCGCATACCCT] primerleri kullanıldı. Kalıp DNA'nın amplifikasyonu için 50 µl'lik karışımlar hazırlandı. Bu karışım kalıp DNA ile birlikte özgül primer çiftinden 100'er pM, 1.25U Taq polimeraz, 50mM KCl, 10mM Tris pH: 8.3, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'den oluşturuldu. Tüplere termal döngü cihazında 94°C'de 3 dakikalık denatürasyon sonrasında, 94°C'de 3 dakika denatürasyon, 58°C'de 45 saniye bağlanma ve 72°C'de 1 dakika polimerizasyon işlemleri 45 döngü tamamlanacak şekilde uygulandı. En son aşamada 72°C'de 3 dakikalık ek bir polimerizasyon basamağı eklenerek PCR işlemi tamamlandı. Elde edilen ürünler %1.5 agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırıldı ve etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışığı varlığında incelendi. Bu incelemede her dilüsyon örneği için, agaroz jelde 441 bp'lik bant olup olmadığına dikkat edildi.

## BULGULAR

Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırıldığında, bant gözlenebilen en düşük dilüsyon oranı, 10<sup>-5</sup> ile "MagNA Pure" ve "Magtration" sistemleriyle izolasyon yapılan H37Ra suşunda saptanmıştır (Şekil 1). Bu nedenle klinik örneklerden PCR yöntemiyle *M.tuberculosis* saptanması amacıyla bu iki otomatize nükleik asit izolasyon sisteminin güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. H37Ra suşunun kaynatma yöntemi ile izolasyonunda ise ancak 10<sup>-2</sup> dilüsyonda bant gözlenebilmiştir (Şekil 2). Dört mikobakteri türünde, üç izolasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar Tablo 1'de görülmektedir.



**Şekil 1.** "MagNA Pure" cihazında *M.tuberculosis* H37Ra DNA'sının izolasyonu, PCR'da bant gözlenebilen en düşük dilüsyon oranı 10<sup>-5</sup> olarak saptanmıştır.



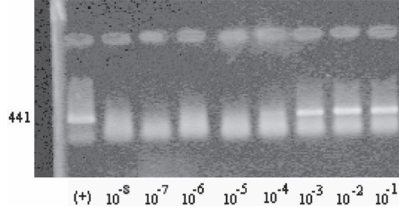
**Şekil 2.** Kaynatma yöntemiyle *M.tuberculosis* H37Ra DNA'sının izolasyonu, PCR'da bant gözlenebilen en düşük dilüsyon oranı 10<sup>-2</sup> olarak saptanmıştır.

**Tablo I.** Üç İzolasyon Yöntemiyle, PCR Sonrasında Bant Gözlenebilen En Düşük Dilüsyon Oranları

Mikrobiyoloji Suşu	İzolasyon Yöntemi		
	MagNA Pure LC	Magtration 12GC	Kaynatma
<i>M.tuberculosis</i> H37Ra	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-2</sup>
<i>M.tuberculosis</i> hasta izolatu	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>
<i>M.smegmatis</i>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>
<i>M.phlei</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>

*M.tuberculosis* hasta izolatında “MagNA Pure” sistemi, “Magtration” sistemi ve kaynatma yöntemiyle bant gözlenebilen en düşük dilüsyon oranları sırasıyla 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> ve 10<sup>-1</sup> olarak saptanmıştır. *M.tuberculosis* H37Ra suşunda olduğu gibi hasta izolatında da kaynatma yöntemiyle düşük miktarda DNA elde edildiği gözlenmiştir.

*M.smegmatis* suşunda “MagNA Pure” sistemi, “Magtration” sistemi ve kaynatma yöntemiyle bant gözlenebilen en düşük dilüsyon oranları sırasıyla 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup> ve 10<sup>-2</sup> olarak saptanmış, bu oranlar *M.phlei* suşu için sırasıyla 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> ve 10<sup>-2</sup> olarak belirlenmiştir (Şekil 3).



**Şekil 3.** *M.smegmatis* DNA'sının “Magtration 12GC” cihazında izolasyonu, PCR'da bant gözlenebilen en düşük dilüsyon oranı 10<sup>-4</sup> olarak saptanmıştır.

## TARTIŞMA

Günümüzde moleküler yöntemler, mikobakteri enfeksiyonları için büyük önem taşıyan hızlı ve güvenilir tanı araçları haline gelmişlerdir<sup>16,17</sup>. Bilindiği gibi rutin uygulama amacıyla seçilecek bir yöntemde aranılan en önemli özellik, testin özgüllük ve duyarlılığının yüksek olmasıdır. Klinik örnekte etken mikroorganizmaya ait DNA veya RNA'nın bol miktarda ve saf olarak elde edilmesi, PCR yöntemi öncesinde uygulanan nükleik asit izolasyon aşamasında gerçekleştirilir ve bu işlem, kullanılan testin duyarlılığını etkileyen en önemli basamaklardan biridir. Tüberküloz tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin özgüllükleri, yapılan birçok çalışmada yüksek bulunmuştur. Duyarlılık konusunda ise, uygulanan teste göre oldukça değişik sonuçlar elde edilebilmektedir<sup>9-11,14</sup>. Farklı duyarlılık sonuçları elde edilmesinde, kullanılan PCR yönteminin yanısıra, örnek türü ve örnek içindeki basil miktarı da önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle örnek içindeki basil miktarında kayba neden olmadan DNA izolasyonunun

sağlanması büyük önem taşımaktadır. Teorik açıdan bakıldığında, örnek içinde birkaç basilin bulunması durumunda bile PCR sonucunun pozitif bulunabileceği belirtilmektedir. Ancak pratik uygulamada, birçok çalışmada tüberküloz PCR duyarlılığının bu kadar yüksek olmadığı gösterilmiştir<sup>1,5,6,8,12,13,18</sup>. Bunun nedenleri arasında *M.tuberculosis* DNA'sının iyi bir şekilde açığa çıkarılmaması, örneğin işlenmesi sırasında basillerin kaybedilmesi veya örnek içinde inhibitor maddeler bulunması gösterilmektedir.

Bu çalışmada PCR yöntemi öncesindeki en önemli basamak olan DNA izolasyonu aşamasında kullanılacak üç izolasyon yönteminin verimlilikleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Bu amaçla kaynatma yöntemi, "MagNA Pure LC" otomatize izolasyon sistemi ve "Magtration 12GC" otomatize izolasyon sisteminin duyarlılıkları, dört farklı mikobakteri türünün seri dilüsyonları hazırlanarak test edilmiştir. Elde edilen DNA'ların çoğaltılması amacıyla, mikobakteri tanımlamasında kullanılan PCR-restriksiyon enzim analizi yönteminin ilk aşamasında kullanılan PCR protokolü seçilmiş ve *hsp65* geninin 441 baz çift uzunluğundaki hedef bölgesi çoğaltılmıştır. Bu protokolün seçilmesiyle, üç farklı nükleik asit izolasyon yönteminin farklı mikobakteri türlerindeki verimliliğinin anlaşılması hedeflenmiştir.

Çalışma sonucunda en iyi mikobakteriyel DNA izolasyon sonuçlarının otomatize "MagNA Pure" sistemi ile elde edildiği gözlenmiştir (Tablo I). Bu izolasyon yöntemiyle dört farklı mikobakteri suşunda da, diğer yöntemlerden daha fazla miktarda DNA elde edilmiş ve bu sistemin rutin uygulamada kullanılabilirliği güvenilir, hızlı ve pratik bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. "Magtration 12GC" sisteminde ise, *M.tuberculosis* H37Ra izolasyonunda "MagNA Pure" sistemi ile aynı sonuç elde edilirken, diğer üç mikobakteri suşunda "MagNA Pure" sisteminden bir log daha az DNA elde edilmiştir. Çalışma kolaylığı ve kısa sürede izolasyon sağlayabilmesi nedeniyle bu sistemin de rutin uygulamada kullanılabilirliği pratik bir nükleik asit izolasyon yöntemi olduğu düşünülmüştür.

Mikobakteriyel DNA izolasyonunda kullanılan yöntemler ile ilgili bir literatür taraması yapıldığında, gerek "MagNA Pure" sistemiyle, gerekse "Magtration 12GC" sistemiyle bu konuda yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak her iki yöntemle de farklı mikroorganizmalarla yapılmış çalışmalar mevcuttur. Örneğin ürogenital örneklerde *Chlamydia trachomatis* ve *Neisseria gonorrhoeae* saptanmasında PCR yönteminin kullanıldığı bir çalışmada, nükleik asit izolasyonu hem standart manuel izolasyon yöntemi ile hem de otomatize "MagNA Pure LC" sistemi ile gerçekleştirilmiş ve "MagNA Pure LC" sistemi ile elde edilen DNA miktarının daha fazla olduğu bildirilmiştir<sup>19</sup>. Klinik örneklerden kantitatif PCR ile HIV-1 RNA'sının saptanmasında "MagNA Pure LC" nükleik asit izolasyon sisteminin duyarlılığının araştırıldığı bir diğer çalışmada da, bu yöntemin analitik duyarlılığı %95, özgüllüğü ise %100 olarak saptanmış ve HIV'in moleküler tanısında "MagNA Pure LC" nükleik asit izolasyon sisteminin güvenle kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır<sup>20</sup>. PCR yöntemi ile klinik örneklerden insan papillomavirus (HPV) saptanmasına yönelik bir başka çalışmada ise, "MagNA



Pure LC” nükleik asit izolasyon sistemi ile elde edilen sonuçların manuel yöntemle elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu, çalışma kolaylığı ve düşük kontaminasyon riski açısından “MagNA Pure LC” sisteminin HPV moleküler tanısında tercih edilebilecek bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır<sup>21</sup>.

Daha önce farklı mikroorganizmalarla gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda da vurgulandığı gibi, moleküler yöntemlerin ilk aşaması olan nükleik asit izolasyonu, rutin PCR uygulamalarında büyük önem taşımaktadır. Genellikle manuel olarak yapılan bu işlem, uzun zaman alan, fazla işgücü gerektiren ve dikkatle uygulanması gereken bir aşamadır<sup>18</sup>. Klinik örnekten nükleik asit izolasyonu sırasında oluşabilecek kontaminasyon ya da işlemin uygulanması sırasında yapılan teknik hatalar, sonucu doğrudan etkilemektedir. Son yıllarda teknolojiye paralel olarak geliştirilen otomatize nükleik asit izolasyon sistemleri, bu sorunları ortadan kaldırabilecek gibi görünmektedir. Böylece rutin laboratuvar hizmetlerinde, işgücü ve zaman tasarrufunun yanısıra, kontaminasyon ve teknik hataların önlenmesi de mümkün olabilecektir. Otomatize nükleik asit izolasyon sistemlerinin, hem daha duyarlı ve hızlı olmaları nedeniyle, hem de standardizasyonun sağlanabilmesi açısından, rutin PCR uygulanan laboratuvarlarda kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak bu sistemlerin ekonomik maliyetlerinin daha yüksek olduğu da unutulmamalıdır.

Bu çalışma sonucunda, “MagNA Pure” sistemi ile daha düşük miktarlardaki mikobakteriyel DNA’nın saptanabildiği, kaynatma yöntemiyle ise ancak yüksek miktarlardaki mikobakteriyel DNA’nın saptanabildiği görülmüş, bu nedenle rutin PCR uygulamalarında nükleik asit izolasyonu için kaynatma yöntemi yerine mali olanaklar elverdiğince otomatize sistemlerin kullanılmasının, bu mümkün değilse diğer manuel izolasyon protokollerinin uygulanmasının yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Abe C, Hirano K, Wada M, et al. Detection of *M.tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe amplified *M.tuberculosis* direct test. J Clin Microbiol 1993; 31: 3270-4.
2. Siddiqi SH: Procedure for primary isolation of mycobacteria from clinical specimens, pp: II.1-II.13. In: BACTEC TB System Product and Procedure Manual. 1989, Becton Dickinson, Maryland.
3. Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al. Comparison of MB-Check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol 1992; 30: 878-81.
4. Bergmann JS, Woods GL. Enhanced amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in positive BACTEC 12B broth cultures of respiratory specimens. J Clin Microbiol 1999; 37: 2099-101.
5. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clin Chemistry 2001; 47: 809-14.
6. Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet 1989; ii: 1069-71.
7. Kocagöz T, Yılmaz E, Özkara S, 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. Cheng VCC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24: 711-20.

9. Afghani B, Lieberman JM, Duke MB, Stutman HR. Comparison of quantitative polymerase chain reaction, acid-fast bacilli smear and culture results in patients receiving therapy for pulmonary tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 29: 73-9.
10. Alp A, Pınar A, Haşçelik G. Klinik örneklerden *Mycobacterium tuberculosis* saptanmasında Cobas Amplicor sistemi ve mikroskopik inceleme yöntemlerinin Bactec radyometrik yöntemi ile karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bült* 2004; 38: 193-201.
11. Fegou E, Jelastopulu E, Sevdali M, et al: Sensitivity of the Cobas Amplicor system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and extrapulmonary specimens. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 593-6.
12. Kaul KL. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*: Impact on patient care. *Clin Chemistry* 2001; 47: 1553-8.
13. Woods GL. Molecular methods in the detection and identification of mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1002-6.
14. Smith MB, Bergmann JS, Onoroto M, et al. Evaluation of the enhanced amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1101-3.
15. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, et al. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2799-806.
16. Huggett JF, McHugh TD, Zumla A. Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. *Int J Biochem Cell Biology* 2003; 35: 1407-12.
17. Lim TK, Mukhopadhyay A, Gough A, et al. Role of clinical judgment in the application of a nucleic acid amplification test for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 2003; 124: 902-8.
18. Aldous WK, Pounder JI, Cloud JL, Woods GL. Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2471-3.
19. Geertsen R, Friedrich P, Dobec M, Emler S. Evaluation of an automated extraction method for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by Cobas Amplicor PCR from different sample materials. *Scand J Infect Dis* 2007; 39: 405-8.
20. Germer JJ, Gerads TM, Mandrekar JN, et al. Detection of HIV-1 proviral DNA with the Amplicor HIV-1 DNA Test, version 1.5, following sample processing by the MagNA Pure LC instrument. *J Clin Virol* 2006; 37: 195-8.
21. Stevens MP, Rudland E, Garland SM, Tabrizi SN. Assessment of MagNA pure LC extraction system for detection of human papillomavirus (HPV) DNA in PreservCyt samples by the Roche Amplicor and Linear Array HPV tests. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2428-33.