

Akciğer ve Akciğer Dışı Tüberküloz Tanısında Moleküler Yöntemlerin Kullanımı

Use of Molecular Techniques in the Diagnosis of Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis

Mustafa ÖZYURT

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul.
Gulhane Military Academy of Medicine, Haydarpaşa Training Hospital, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 16.09.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 04.02.2012

ÖZET

Tüberküloz, hayatı tehdit eden bir enfeksiyon hastalığı olup, tüm dünyada önde gelen ölüm sebeplerinden biridir. Multisistemik bir hastalık olan tüberkülozda akciğer ve plevra tutulumu olguların çoğunda mevcuttur. Özellikle ilaca dirençli olguların tespitinde mevcut tanısall yöntemlerin istenilen duyarlılığı sağlayamaması, tüberkülozun küresel kontrolünü sınırlandırmıştır. Tanıda altın standart, kültür ve klinik tanı birlikteliğidir. Tanıya yönelik konvansiyonel yöntemlerin kolay uygulanabilir olmaması, 2-8 haftalık zamana ihtiyaç göstermesi ve tür düzeyinde tanılamada yetersiz kalması, rutin kullanımda sorunların çözümüne yönelik arayışları yeniden gündeme getirmiştir. "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" tarafından tanısall mikobakteriyolojide, *Mycobacterium tuberculosis*'in hızlı tanısı için standardize edilmiş, özgüllük ve duyarlılığı yüksek, güvenilir ve hızlı yöntemlerin kullanımı önerilmiştir. Özellikle, CDC kılavuzlarında yer alan tanısall stratejilerin uygulandığı ve Amerikan Toraks Cemiyetinin sınıf 2 ve 3 standartlarını yakalayan, yayma pozitif örnek sayısı ≥ 500 /yıl olan referans merkezlerinde veya sağlık kurumu laboratuvarlarında, nükleik asit amplifikasyon (NAA) esaslı testlerin, hızlı tanıyı desteklemek üzere kullanımı, mantıklı ve maliyet-etkin bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Küresel tüberküloz yönetim stratejilerinde bu testlerin kullanımına yönelik ayrıca maliyet-etkinlik analizlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan meta-analizlerin neredeyse tamamında ortaya çıkan veriler, laboratuvar koşullarında tasarlanan polimeraz zincir reaksiyonuna (in-house PCR) ait sonuçların özgüllük ve duyarlılıklarının çok değişkenlik gösterdiği ve ticari NAA testlerine ait sonuçlarla uyum sağlamadığı yönündedir. Bu meta-analizlere ait değerlendirmelerde, klinik olarak tüberkülozun her iki formunun laboratuvar tanısı için NAA testlerinin özgüllüklerinin genellikle tahmin edilenden çok daha yüksek, duyarlılıklarının ise özgüllüğün aksine çok daha düşük ve oldukça değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir. Sonuç olarak rutin uygulamada, şüpheli klinik örneklerden tüberkülozun hızlı tanısında tek başına NAA testlerine güvenilemeyeceği ve bu testlerin tarama amaçlı olarak kesinlikle kullanılmaması gerektiği, ancak konvansiyonel testlerle birlikte kliniği

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Mustafa Özyurt, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, Selimiye Mahallesi Tıbbiye Caddesi 34668 Üsküdar, İstanbul, Türkiye.
Tel (Phone): +90 216 542 2020, E-posta (E-mail): ozyurtm2002@yahoo.com

desteklemede oldukça değerli olabildiği düşünülmektedir. Bu derleme yazıda, akciğer ve akciğer dışı tüberküloz tanısında moleküler yöntemlerin değeriyle ilgili güncel bilgiler tartışılmaktadır.

Anahtar sözcükler: *Tüberküloz; tanı; moleküler yöntemler.*

ABSTRACT

Tuberculosis, is a life-threatening infectious disease and one of the leading causes of mortality worldwide. It is a multisystemic disease, and involvement of lungs and pleura is seen in majority of patients. The global control of tuberculosis is impeded by the relatively low sensitive conventional diagnostic assays, especially for drug resistant strains. The current gold standard for tuberculosis diagnosis is the combination of culture and clinical diagnosis. Since conventional diagnostic assays require long time, are labor intensive and insufficient for species-level identification, new solutions for problems in routine diagnostic applications for tuberculosis are required. Implementation of reliable, highly specific and sensitive assays which were standardized for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*, is recommended by Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Implementation of nucleic-acid amplification based tests (NATs) to support rapid diagnosis especially in reference laboratories or health-care clinical laboratories, which use the diagnostic algorithms denoted in CDC guidelines, meet American Thoracic Society class 2 and 3 standards and have smear positive sample counts ≥ 500 per year, is accepted as a logical and cost-effective approach. Analysis of cost-effectiveness for NATs are also required for global TB management plans. All current meta-analysis on NAT for tuberculosis indicate that in-house assays display considerable variations in sensitivity and specificity and exhibit discrepancies with commercial NATs. Evaluations also notified that the specificity for NAT is usually higher than expected in laboratory diagnosis of both forms of tuberculosis, whereas sensitivity is very low with considerable inter-assay variations. In conclusion, it is thought that current NATs are not reliable as single assays for rapid tuberculosis diagnosis for routine testing and should not be used in screening, but they are valuable methods in supporting conventional assays for clinical follow-up of patients. This review article discusses the diagnostic value of molecular methods in the evaluation of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in the light of the current literature.

Key words: *Tuberculosis; diagnosis; molecular methods.*

GİRİŞ

Tüberküloz, vücudun tüm doku ve organlarında görülebilmemesine karşın, olguların yaklaşık %80-85'inde akciğerleri tutmaktadır. Son 10 yılda tüberküloz prevalansındaki artışla birlikte akciğer dışı tüberkülozda da artış izlenmiş olmasına karşılık özellikle akciğer dışı tüberküloz tanısındaki güçlükler, akciğer tüberkülozu, tanısında karşılaşılanlardan çok daha fazladır ve multidisipliner bir yaklaşım gerektirir^{1,2}.

Günümüzde dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte olduğu bilinmektedir³. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2009 yılı verilerine göre dünyada 2007 yılında resmi olarak 13.7 milyon (206/100.000) aktif tüberkülozlu hasta bildirim yapılmış olup, bunların 9.27 milyonu (139/100.000) yeni tanı konmuş olgulardır. Enfeksiyon kaynaklı önlenebilir hastalıklardan biri olmasına rağmen, zamanında tanısı konulmayıp uygun tedavi almadıkları için 2007 yılında sadece tüberkülozdan yaşamını kaybeden hasta sayısının 1.76 milyon olduğu bildirilmiş, ayrıca yaklaşık 500.000 çok ilaca dirençli (ÇİD) tüberküloz olgusu bildirim yapılmıştır^{2,4}.

Tüberküloz olgularının çok büyük bir bölümünün geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde saptanmış olması dikkat çekicidir ve gerçek hasta sayıları ile tüberküloz insidansının bildirilenlerden çok daha yüksek olduğu endişesi her zaman söz konusudur⁵. Tüberkülozlu hastaların sağlık kurumuna geç başvurusu veya sağlık kurumuna başvurusu takiben uygun tedaviye geç başlanmasıyla ilişkili hasta ve doktor gecikmesi sonucu klinik ve laboratuvar tanısı konulmamış, doğrudan gözetim altında tedavi (DOTS) programına dahil edilmemiş her bir aktif akciğer tüberkülozlu olgunun yılda 10-15 kişiyi enfekte edebildiği düşünüldüğünde, bu tablonun kaygı verici boyutunu anlamak hiç de zor değildir. Yayma negatif hastaların orantısız sıklığından dolayı, halen insan immünyetmezlik virusu (HIV) ile ilişkili tüberkülozun tanısında gecikmeler yaşanmaktadır. Tanıdaki gecikmeler aktif olarak bulaşın devamına, sekonder ilaç direncine (yaygın ilaca dirençli tüberküloz dahil) ve mortalitede artışa yol açabilmektedir⁴. Bu tablo göz önüne alındığında tüberküloz, dünyada önemini her gün artırmakta olan ve halk sağlığını tehdit eden önemli tehlikelerden biri olma özelliğini günümüzde de devam ettirmektedir. Tüberküloz hastalarının erken tanı ve tedavisi, bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Bu nedenle, ulusal tüberküloz kontrol programları çerçevesinde tüberkülozun yayılımını önlemede ve kontrol altına alabilmede önemli bir role sahip olan mikobakteriyoloji laboratuvarlarının birincil amacı, insidansı düşürmek için akciğer tüberkülozlu olguların en kısa sürede tespiti, izolatların doğru tanımlanması, antitüberküloz duyarlılık testlerinin yapılmasıyla antitüberküloz tedavinin başarılı olup olmadığının takip edilmesidir⁶.

TÜBERKÜLOZUN TANISI ve MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Tüberkülozun erken tanısında hızlı testlerden biri olan aside dirençli bakteri (ARB) boyama yöntemlerinin duyarlılığı düşük olup, yeni tüberküloz olgularının sadece %44'ünde etkin olabilmektedir. Bu duyarlılık, çocuklarda %15-20 oranlarındadır². Akciğer ve akciğer dışı tüberkülozda ilk tanı, klinik verilerle yapılmış olsa bile, kesin tanı için etkenin konvansiyonel testlerden radyolojik ve histopatolojik incelemelerin dışında, direkt muayenede tespiti ve kültürde üretilerek laboratuvarında doğrulanması esastır. Bu nedenle tanıda altın standart, kültür ve klinik tanı birlikteliğidir. Moleküler yöntemlerin, tanısal mikobakteriyoloji içinde yer almasından önce tüberkülozun hızlı tanısı için tek yol, tercihan sabah balgamından hazırlanan Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yaymalarının direkt mikroskopi ile değerlendirilmesi olmuştur. Mikroskopik incelemede ARB'nin görülebilmesi için hasta örneğinde 5000-10.000/ml basil bulunması gerekmektedir^{3,7,8}. Yirmi dört saat içerisinde sonuç alınabilmesi ve ucuz bir test olmasına rağmen, kültürle doğrulanmış tüberküloz olgularına ait örneklerle uygulanan boyama tekniği, santrifüjasyon işleminin hızı, yayma preparatını değerlendiren kişinin tecrübesi ve çalışılan popülasyondaki tüberküloz prevalansına bağlı olarak değişen düşük duyarlılığı (%45-80), tüberküloz dışı mikobakterileri dışlayamaması ve düşük pozitif prediktif değere (%50-80) sahip olması gibi özellikleri, direkt muayenenin tanısal olarak tek başına yetersizliğinin göstergeleridir^{6,9}.

Antimikobakteriyel tedavi alan hastalara ait örneklerin çoğu yayma pozitif, kültür negatif görülmeyle birlikte, bu durum, laboratuvar hatası olarak kontamine su veya boya-

larla hazırlanan yaymalarda ve inkübasyon süresi kısaltılmış kültürlerle uzun süreli dekontaminasyon işlemine tutulmuş hasta örneklerinde gözlenebilir⁹. Direkt muayene ile *M.tuberculosis* ve tüberküloz dışı mikobakterilerin ayırımı yapılamadığından, kültür halen altın standarttır. Kültür, klinik örnekte ≥ 10 canlı tüberküloz basilinin bulunması halinde gösterilebilmesi mümkün, duyarlılığı %80-85, özgüllüğü yaklaşık %98 olan bir konvansiyonel yöntemdir. *M.tuberculosis*'in logaritmik üreme periyodu yaklaşık 18 saatte bir bölünerek gerçekleştiğinden, kültür ortamlarında etkenin tanımlanabilmesi için ortalama 2-8 haftaya gereksinim duyulur. Bu nedenle kültür, tüberküloz tanısında çok değerli bir test olmakla birlikte, tüberküloz kontrolü için yayma mikroskopisi kadar öneme sahip değildir; zira kültür olanağı her yerde yoktur ve sonuçların alınması için geçen süre, değişimi izlemek açısından çok uzundur^{3,7,9}.

Son yıllarda tüberküloz ilaçlarına dirençli tüberküloz basillerinin izolasyonlarındaki artış, tanıya yönelik konvansiyonel testlerin pratik olmamaları, sonuçlandırılmalarının uzun zaman gerektirmesi ve tür düzeyinde tiplendirmede yetersiz kalmaları, rutin kullanımda sorunların çözümüne yönelik arayışları yeniden gündeme getirmiştir. Bu amaçla "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)", 2010 yılına kadar tüberküloz olgularının %75'inin 48 saat içerisinde tanısına yönelik "halk sağlığı hedefleri"ne ulaşılabilmesi için, tanısal mikobakteriyolojide standart testlere ilaveten *M.tuberculosis*'in tanısı için mevcut en hızlı yöntemlerin kullanımını önermiştir⁷. Bu kapsamda, üzerinde yoğun araştırmaların sürmekte olduğu standardize edilmiş, özgüllük ve duyarlılığı yüksek, hızlı ve güvenilir tanı testlerinin rutin kullanımlarının önerilebilir hale getirilebilmesi için dünya genelinde izlenebilir gayretler söz konusudur. CDC'nin tüberküloz tanısına yönelik bu önerileri doğrultusunda, üreticiler tarafından özellikle son 20 yıl içinde doğrudan hasta örneklerinden ve/veya kültür ortamlarından tanıya yönelik hızlı sonuç verebilen ve kolay uygulanabilir özelliğe sahip birçok tanı sistemi ve test teknikleri geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Bunlar arasında ümit verici özellik arz edenler, moleküler genetik teknikler olmuştur^{6,7,10,11}. Teorik olarak hasta örneğinde birkaç basilin bulunması durumunda bile bunu saptayabilen nükleik asit amplifikasyon (NAA) esaslı moleküler tanı testleriyle yapılan ilk çalışmalar, çoğunlukla laboratuvar tanısına yönelik olmuş, mevcut klinik kuşkunun karar verme sürecine katkısı göz ardı edilmiştir. Ancak günümüzde klinik ve laboratuvar tanısını desteklemede halen bu yöntemlerin geliştirilmeye olan gereksiniminden dolayı, çalışma performanslarına yönelik araştırmalar aralıksız devam etmektedir^{3,6,8}.

NAA testleri içerisinde ilk geliştirilen yöntem, laboratuvar koşullarında tasarlanan polimeraz zincir reaksiyonudur (in-house PCR). Bu yöntem, üreticiler tarafından geliştirilen ticari NAA testlerinin dışında, halen pek çok kurumda özellikle akciğer ve daha az sıklıkla da akciğer dışı tüberkülozlu hastaların erken tanısını desteklemek veya araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Tüberküloz ve ÇİD tüberküloz hastalarının tespiti amacıyla bu testlerin kullanımı, kurumlarda NAA testlerine yönelik uygulama standartları ve altyapı eksiklikleri nedeniyle genellikle referans laboratuvarlarla sınırlanmıştır¹²⁻¹⁴. Özellikle hastalara ait yayma pozitif ve negatif solunum örneklerinden *M.tuberculosis*'in hızlı tanısı için "Food and Drug Administration (FDA)" onayı almış, bu testlerden, transkripsiyon esaslı amplifikasyon (TMA) yöntemiyle çalışan ve kemilüminesan tekniği ile saptama yapabilen

“Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTDT; Gen-Probe, San Diego, ABD)” ile sadece yayma pozitif solunum örnekleri için FDA onayı olan PCR esaslı, internal kontrol içeren ve kolorimetrik olarak saptama yapabilen “Roche Amplicor Mtb test (Roche Molecular Systems, Branchburg, ABD)” ile bunun otomatize versiyonu “Cobas Amplicor (Amplicor MTB; Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya)” uygulandıkları solunum örneklerinde mükemmel performans (duyarlılık > %95, özgüllük %100) sergiledikleri için birçok kurum bünyesinde konvansiyonel testlere ilaveten laboratuvar kullanımına girmiştir^{3,7,15}. Bunun yanı sıra FDA onayı olmamakla birlikte, solunum yolu örneklerinde olduğu kadar klinik şüpheli diğer örneklerden yapılan çalışmalarda da yüksek duyarlılık ve özgüllük sergileyebildiği için uluslararası kabul gören diğer kuruluşlardan onay almış (CE belgeli), izotermal dizi yer değiştirme amplifikasyonu (SDA) esaslı, internal kontrolü bulunan, amplifikasyon ürününü florimetrik olarak anlık tespit edebilen “BD ProbeTecTMET MTB Direct Detection Test (Becton Dickinson, Sparks, ABD)” yaygın olarak kullanılan diğer ticari moleküler tanı sistemidir¹⁵. Benzer amaçla kullanımı gittikçe yaygınlık kazanmaya başlayan NAA esasına dayalı diğer bir yöntem olan gerçek zamanlı PCR tekniğini kullanan ve internal kontrol içeren sistemlerde (LightCycler 2.0-Roche Applied Science, Almanya; iCycler IQ-BioRad Lab, ABD; ABI PRISM 7700-Applied Biosystem, ABD) amplifikasyon ürününün varlığı, sisteme uyumlu ticari kitler kullanılarak (Cobas TaqMan MTB, Iontek, Fluorion MTBC QLP 2.1 test ve diğerleri) özgül problemler üzerinde yer alan floresan boyaların uyarılması sonrasında, ortamdaki özgül DNA miktarına bağlı olarak yayılan ışımının bir sinyal alıcı aracılığıyla bilgisayar ortamında grafiğe dönüştürülmesiyle anlık yorumlanabilmektedir. PCR ürünlerinin, bir membran şeride (strip) bağlı bulunan oligonükleotid problemlere ters hibridizasyonu prensibine dayalı, internal amplifikasyon bandı bulunan, DNA•STRIP® teknolojisi ile üretilen “GenoType® Mycobacteria Direct Test (Hain Lifescience, Almanya)” ve “Inno-LIPA Mycobacteria (Innogenetics NV, Belçika)” şeritleri, nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon (NASBA) tekniği esasına dayalı olarak, günümüz mikobakteri laboratuvarlarında hasta örnekleri ve sıvı kültür ortamlarından *M.tuberculosis*'in hızlı tanısında kullanılabilir^{3,11,16,17}.

Son yıllarda tüberkülozun rutin laboratuvar tanısında güvenle kullanılacak moleküler yöntem arayışları hızla devam etmektedir. Hasta örneklerinden çalışılarak klinik tanıyı desteklemede büyük bir umut olmayı hedefleyen, yeni hızlı moleküler tüberküloz tanı testlerinden günümüzde yüz güldürücü sonuçlar alınabilmektedir. Bunlar arasında eş zamanlı olarak *M.tuberculosis* varlığı ile rifampin direncini hasta örneğinde saptayabilen, otomatize, “semi-nested” gerçek zamanlı PCR yöntemiyle çalışan ve amplifiye ürünü “molecular beacon assay” prensibi ile hiçbir müdahaleye gerek kalmaksızın saptayabilen Xpert MTB/RIF (Cefid, Sunnyvale, ABD) testinin, yayma pozitif solunum örnekleriyle yapılan ilk çalışmalarında %99'a varan yüksek bir duyarlılık gösterebildiği belirtilmektedir^{4,8,18}. Halen üzerinde çalışmaların olduğu hızlı tanı testlerinden biri de pahalı bir cihaz gerektirmeyen, özgüllüğü oldukça yüksek, izotermal olarak çoğaltma yapabilen ve değerlendirmeyi ultraviyole floresan ile görsel veya bulanıklılığı gerçek zamanlı olarak okuma esaslı gerçekleştirebilen “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP; Eiken Chemical Co. Ltd., Japonya)” tekniğidir^{13,17}. “DNA Chip Teknolojisi” ürünler (CapitalBio

Mycobacteria Identification Array, Çin Halk Cumhuriyeti) ise, mikobakteriden PCR ile elde edilen amplikonların, çok sayıda farklı oligonükleotid prob içeren minyatür analitik araçlar üzerinde, kendine uyan prob ile hibridize olması sonrasında, ortama yayılan floresan sinyallerin bir tarayıcı tarafından saptanmasıyla gerçekleşmesi prensibine dayalı testlerdir¹⁹. Yeni bir NAA testi olan "Hyplex TBC PCR test (BAG Health Care, Almanya)", multipleks PCR sonrası özgül oligonükleotid problemleri ile hibridizasyon ve ELISA ile saptama prensibine dayalı, yayma pozitif örneklerde yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip, düşük maliyetli, kalitatif bir testtir⁵. Bunların dışında *M. tuberculosis* kompleksinin 16S rRNA'larını hedef alan floresanla işaretli peptid nükleik asit problemleri kullanılarak doku ve klinik örneklerde tür düzeyinde saptama yapabilen PNA-FISH (Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization) yöntemi tanıda kullanılabilir²⁰.

MOLEKÜLER TİCARİ SİSTEMLERİN KLİNİK KULLANIMLARINA YÖNELİK ÖNERİLER ve TEST PERFORMANSLARI

Ticari sistemlerin konvansiyonel tekniklere göre en önemli avantajları, daha hızlı (2-6 saat içerisinde) sonuç verebilmeleri ve emniyetli ve güvenilir olmalarının yanı sıra kontaminasyon risklerinin düşük, buna bağlı olarak yayma pozitif örneklerde duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olmasıdır. Ayrıca, birçoğunun teknik olarak otomatize veya yarı otomatize olması, reaktif ve standartlarının kullanıma hazır olması, laboratuvar kullanımını kolaylaştıran diğer faktörlerdir. En önemli dezavantajları ise pahalı olmaları, çoğunun henüz FDA onayı almamış olması ve bir kısmının da faz çalışmalarının tamamlanmamış olmasıdır. Bunların yanı sıra, direkt muayenesi negatif balgam örnekleri ile solunum dışı örneklerde duyarlılıklarının özgüllüklerine göre düşük ve değişken olması, çok az basil içeren ve homojen bir dağılımın olmadığı örneklerin dekontaminasyonu sırasında uygun dilüsyonun yapılamayışı veya hatalı dekontaminasyon işlemi sırasında oluşan basil kayıpları sonrası gerçekleştirilen bu testlerle yalancı negatif sonuç alınabilmesi ticari testlerin diğer dezavantajlarıdır. Bazen ekstraksiyon işlemleri sırasında hedefin yetersiz ekstraksiyonu ve örneklerde bulunabilen nükleaz ve proteazların, amplifikasyonu inhibe ederek yalancı negatif sonuçlara neden olabilmeleri, moleküler ticari sistemlerin önemli diğer sorunlarıdır. Direkt muayene ve kültür negatifliği olduğu halde az miktarda basil çıkarımının olduğu durumlarda alınan pozitif sonuca klinisyenin tam olarak güvenememesi de önemli bir sorundur^{3,6,8,16,21}. Mikrobiyal yük, basil-konak savunması ve ilaç tedavisi arasındaki etkileşimin bir sonucudur. Mikobakteri DNA'sının moleküler tespitinin, uygulanan tedavinin başarısı veya başarısızlığının yanı sıra relapsını öngörme potansiyeline katkısı yönünden incelemeler yapılmıştır. Tedavinin seyri boyunca mikrobiyal yükün kantitatif takibi, prognostik öngörülerde bulunma ve tedavi rejimi ile süresini kişiselleştirmek için önemli olabilir. Her ne kadar tedavi öncesi ARB yayma, koloni sayısı ve kantitatif PCR ile genomun kopya sayısına yönelik karşılaştırmalı çalışmalar, başlangıçtaki basil miktarı ile ilişkili bulunmasına rağmen tedavi süresince veya sonrasında, ARB'deki negatifleşme oranı ve DNA miktarındaki azalmanın canlı koloni sayısındaki azalma ile ilişkili olmadığı yönündedir. Aslında bu sonuç, yaygın akciğer harabiyetine yol açan ağır kaviter hastalığı olan hastalarda, pozitif yaymaların yıllarca persistan kaldığının bilinmesinden dolayı şaşırtıcı değildir. Bu bilgiler ışığında FDA, ≥ 7 gün veya son 12 ay içerisinde antitüberkü-

loz ilaç almamış hastalara ait sadece yayma pozitif solunum örnekleri için NAA testlerinin kullanımını önermektedir³.

Tüberkülozlu hastaların tanısız gecikmelerinde önemli kısaltmalar sağladığından DSÖ, NAA testlerine ait bazı hızlı tanı kitlerinin, ulusal kontrol programları kapsamında kullanılması kararını (bu kapsamda ticari sistemlerin kullanımı konusu halen tartışmalı olmasına rağmen), ilgili ülkelerin Sağlık Bakanlıklarına bırakarak ticari sistemlerin kontrol programları kapsamında kullanımlarının önünü açmıştır²². Özellikle tüberküloz olma olasılığı çok yüksek veya çok düşük olanlarda tanı amaçlı NAA esaslı testlerin rutin kullanımı konusu, kaynakların maliyet-etkin kullanımına uygun olmadığı için önerilmemektedir. Ancak bu testlerin, direkt muayenesi negatif olmasına rağmen klinisyen tarafından tüberküloz olma olasılığı yüksek şüpheli hastaların özellikle solunum yolu örneklerinde tanısız amaçla kullanımı konusu oldukça değerlidir. Bunun yanı sıra; yayma pozitifliğinin *M.tuberculosis*'e ait olduğunu doğrulamada, tüberküloz açısından yüksek riske sahip ciddi bir hastalığı olanlarda ve kaynağı bilinmeyen akciğer hastalığı bulunanlarda tüberkülozu elimine etmek amacıyla tercih edilmesi ve klinik şüpheli hastalardan biyopsi, cerrahi veya diğer invaziv işlemlerle alınmış materyallerden tanıyı desteklemede NAA testlerinin kullanımlarının yararlı olabileceği ifade edilmektedir^{14,23}.

Yayma pozitif solunum yolu örneklerinde Gen-Probe AMTDT'nin rutin uygulanmasına yönelik maliyet-etkinliğin değerlendirildiği bir çalışmanın analiz raporunda, bu uygulamanın çoğu hastane için maliyet-etkin olmasının beklenmemesi gerektiği, ancak referans merkezlerine ait laboratuvarlar için maliyet-etkin olabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca raporda, kurumlarda NAA testlerinin rutin kullanımlarına yönelik maliyet-etkinlik değerlendirilirken; göreceli olarak toplumdaki tüberküloz prevalansının, kurumda işlem gören yıllık yayma pozitif örnek sayısının, günlük olarak solunum izolasyonuna gereksinim duyulan hasta sayısının ve test reaktiflerinin maliyetinin, birim test maliyeti üzerine etkili olan önemli değişkenler olarak ele alınması gerektiği bildirilmiştir. Raporda, bu değişkenlerden en az ikisinin NAA testleri için uygun olması halinde, tüberkülozun standart tanı yöntemlerinin değerlendirilmesinde bu testlerin maliyet-etkin bir seçenek olabileceği ifade edilmektedir. Çalışmada, yalancı negatif NAA test sonuçlarının maliyet üzerine olan etkinliklerinin değerlendirilememiş olmasının önemli bir eksiklik olduğu, ayrıca böyle bir sonucu esas alarak hastaya yatış planlaması yapılmasının da, hasta ve hastane için bedelinin ağır olabileceği belirtilmiştir. Bu amaçla, bahsedilen bu değişkenlerin tümünün dikkate alındığı ciddi prospektif çalışmalara halen gereksinim duyulmaktadır¹⁴.

Ticari olarak mevcut moleküler testlerin kullanımında maliyete yönelik kaygılar hep ön planda olmuştur. Bu durum, özellikle ekonomik kaynakları kısıtlı ve tüberküloz insidansının yüksek olduğu gelişmekte olan ülkeler için önemlidir. Bu yüzden, küresel tüberküloz yönetim stratejilerinde bu testlerin kullanımına yönelik maliyet-etkinlik analizlerinin geliştirilmesi için sürekli bir mücadele gerekmektedir. Bu testlerin, özellikle CDC kılavuzlarında yer alan tanısız stratejilerin uygulandığı ve Amerikan Toraks Cemiyeti (ATS)'nin sınıf 2 ve 3 standartlarını yakalayan, konvansiyonel yöntemlerin kullanımında yüksek standartlara sahip, yayma pozitif örnek sayısı ≥ 500 /yıl ve yayma pozitif örneklerde göreceli

tüberküloz prevalansının %70, solunum izolasyonuna ait günlük maliyeti yaklaşık 100 Amerikan doları (USD) olan referans merkezlerinde veya sağlık kurum laboratuvarlarında hızlı tanıyı desteklemek üzere kullanımı konusu genel olarak kabul gören ve maliyet-etkin bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, bu sistemlere ait mevcut ticari ürünlerin tarama amaçlı kullanılmaları kesinlikle önerilmemektedir^{4,9,14}.

CDC'nin, NAA esaslı ticari moleküler sistemlerin kullanıldığı laboratuvarlarda tüberkülozun hızlı tanısına yönelik katkı amacıyla 2000 yılında hazırlanmış olduğu algoritma rehberi, 2009 yılında güncellenerek tanıda kullanıma sunulmuştur. Buna göre, şüpheli akciğer tüberkülozlu her bir hastadan en az bir solunum yolu örneğinde NAA testi çalışılması önerilmektedir. EZN boyaması ile direkt mikroskopi ve mikobakteri kültürü için hastalardan üç ayrı günde sabah balgam örneği alınmalıdır. İlk örnekte direkt muayenede ARB sonucu ile NAA test sonuçları birarada değerlendirildiğinde sonuç pozitif ise, hastanın tüberkülozlu olduğu kabul edilir ve test tekrarına gerek yoktur. Eğer ilk balgam ARB pozitif, ancak NAA test sonucu negatif ise örnekte inhibitör varlığı araştırılmalıdır. Araştırma sonucu herhangi bir inhibitör madde tespit edilemezse ikinci bir balgam örneği ile NAA test tekrarı yapılmalıdır. İkinci balgamda da ARB pozitif, NAA test sonucu negatif bulunup herhangi bir inhibitör madde saptanmazsa, hastanın muhtemelen tüberküloz dışı mikobakteri ile enfekte olduğu kabul edilir. Eğer inhibitör varlığı tespit edilmişse bu durumda NAA test sonucunun tanı değeri yoktur. Böyle bir durumda ikinci balgam örneğinde NAA test işlemi tekrarlanmalıdır (test tekrarının üçten fazla yapılmasının yararı yoktur). Laboratuvar değerlendirmelerinde boyalı preparatın direkt mikroskopisi ve NAA test sonuçlarının her ikisi negatif bulunan, ancak klinik olarak tüberküloz şüpheli hastalarda bu sonuç, tüberkülozu elimine etmede yeterli değildir⁶.

Erken ve doğru tanı, tüberkülozun kontrolü ve yönetiminde kritik bir aşamadır. Tüberkülozun NAA testi ile başarılı tanısı için esas belirleyici faktör, mikobakteri DNA'sının kazeifiye granülomlardan sekresyonlara geçmesi ve steril vücut sıvılarına veya dokulara yayılmasıdır³. Tanı amacıyla 1990'lı yılların başlarından bu yana NAA testlerinin etkinliğini araştıran yüzlerce çalışma gerçekleştirilmiştir. Bunların çok büyük bir bölümü akciğer tüberkülozundaki kullanımlarına yönelik araştırmalardan oluşmaktadır. Günümüzde, tüberkülozda NAA testlerinin kullanımına yönelik geçmişte yapılmış çalışmalara ait çeşitli verilerin baz alındığı meta-analizler ile moleküler testlerin direkt tanıdaki etkinliklerinin yanı sıra, sonuçları üzerine etki eden olumsuz koşullar değerlendirilebilmektedir. Bu meta-analizlerin ve incelemelerin değerlendirilmeleri sonucu, çalışmaların çoğunda, klinik olarak tüberkülozun her iki formunun tanısı için NAA testlerinin özgüllüklerinin tahmin edilenden çok daha fazla olduğu anlaşılmıştır. Aynı çalışmalarda bu testlerin duyarlılıklarının ise özgüllüklerinin aksine çok daha düşük ve oldukça değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir^{12,16}. Duyarlılıklar, tüberkülozun "paucibacillary" formlarında (direkt muayene negatif akciğer ve akciğer dışı tüberkülozda) çok daha düşük, direkt muayenesi pozitif akciğer tüberkülozunda daha yüksek bulunmuştur. Meta-analizlerin neredeyse tamamında tespit edilen diğer bir veri ise, solunum örnekleri için "in-house" PCR'ye ait sonuçların özgüllük ve duyarlılıklarının çok değişkenlik gösterdiği (duyarlılık: %9.4-100; özgüllük: %5.6-100; p< 0.001) ve ticari NAA testlerine ait sonuçlarla uyumadığı yönündedir²⁴.

Akciğer tüberkülozunun tanısına yönelik, ticari olarak mevcut NAA testlerinin solunum yolu örneklerindeki performanslarının değerlendirildiği bir meta-analiz ve meta-regresyon çalışmasında, duyarlılığın %85 (değişim aralığı %36-100), özgüllüğün %97 (değişim aralığı %54-100) olduğu ortaya konmuştur¹⁶. Bu oranlardaki heterojenliğin nedenlerine yönelik meta-regresyon çalışmasında; "threshold" etkisinin önemli olduğu ($p=0.01$) ve balgam dışındaki diğer solunum yolu örneklerinin varlığının önemli olduğu saptanmıştır. Bu gözlemler esas alındığında, akciğer tüberkülozunun tanısında konvansiyonel testlerin yerine tek başına ticari NAA testlerinin kullanımı önerilmemektedir^{11,16}.

Roche AmpliCor MTB, Gen-Probe AMTDT, BD ProbeTecTMET MTB Direct Detection Test (DDT) ve gerçek zamanlı PCR esaslı ticari sistemlerin, klinik örneklerden tüberküloz tanısındaki performanslarını araştıran çalışmalarda; bu sistemlerin, direkt muayenesi pozitif solunum örneklerindeki duyarlılıklarının %90-100, özgüllüklerinin %74-100; direkt muayenesi negatif solunum örneklerinde ise duyarlılıklarının %33.3-95.9, özgüllüklerinin %80.3-100 arasında değiştiği bildirilmiştir. Rapor edilen genel duyarlılık oranları AmpliCor MTB, AMTDT, DDT ve Cobas TaqMan MTB için sırasıyla %83-96.7, %85.7-97.8, %60.7-100 ve %73-91.5 olarak saptanmıştır^{11,15,21,25-27}. Bu testlerin klinik şüphesi yüksek (≥ 75), yayma pozitif solunum örnekleri için duyarlılık ve özgüllükleri ise sırasıyla > 95 ve %95-100; yayma negatif solunum örnekleri için %79.3-85 ve %80.3-99 olarak bildirilmiştir^{3,11,25}. DNA•STRIP[®] teknolojisi ile üretilen, "GenoType[®] Mycobacteria Direct Test" in klinik kullanımındaki etkinliğini araştırmaya yönelik solunum örnekleriyle yapılmış kültür sonuçlarına dayalı benzer çalışmalarda duyarlılık %93-97, özgüllük %90 olarak bildirilmiştir^{28,29}.

Hasta örneğinden doğrudan çalışılan bir başka hızlı moleküler tanı testi olan Xpert MTB/RIF testinin performansı üzerine yapılan çalışmalarda, testin duyarlılığının yayma ve kültür pozitif akciğer tüberkülozlu hastalarda %96-100 ve yayma negatif, kültür pozitif tüberkülozlu hastalarda ise %68.6-90 arasında değiştiği; bakterideki rifampin direncinin %98-99.1 oranında doğru tanımlandığı ve MTB/RIF testinin özgüllüğünün %98.1-99.2 arasında olduğu bildirilmiştir. Ayrıca testin duyarlılığı akciğer tüberkülozlu, HIV pozitif hastalarda %93.9, HIV negatif hastalarda ise %98.4 olarak bulunmuştur^{4,8,9,18,30}.

Şüpheli akciğer tüberkülozlu TB'lu hastalarda tanıya yönelik ticari NAA testleri ve "in-house" testlerin performanslarının araştırıldığı çalışmalardan Xpert MTB/RIF testi ile yapılan çalışmalarda, testin duyarlılığının genel olarak %53-77.3, özgüllüğünün %98.2 olduğu saptanmıştır^{31,32}. Benzer şekilde diğer NAA testlerinin kullanıldığı çalışmalarda direkt muayenesi pozitif olan solunum dışı örnekler için bu testlerin duyarlılıkları %27-86, özgüllükleri %87.5-100 arasında saptanırken, direkt muayenesi negatif olanlarda ise bu oranlar, sırasıyla %17 ve %71 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalarda örnek türüne göre testlerin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla; plevral sıvı için %27.3-81 ve %90-100; plevral biyopsi için %52.6-90 ve %100; lenf nodları için %71.6-87.5 ve %75-100; beyin omurilik sıvısı için %31.4-56 ve %98; idrar için %55.6-95.6 ve %98.1-98.9 ve cilt biyopsisi için %60-80 ve %100 olarak bildirilmiştir^{3,11,25}.

Günümüzde tüberkülozun laboratuvar tanısında halen tartışmalı olan PCR yönteminin etkinliğini ortaya koymayı amaçlayan farklı meta-analiz çalışmalarında, testin ortala-

ma duyarlılığı %85, ortalama özgüllüğü ise %95 olarak belirtilmektedir⁸. Benzer şekilde ülkemizden tüberküloz şüpheli hastalara ait solunum örnekleri ile solunum dışı örneklerden *M.tuberculosis*'in varlığının saptanmasına yönelik gerçekleştirilen ve üç yıllık bir süreci kapsayan retrospektif bir çalışmada da, PCR yönteminin duyarlılığı solunum örneklerinde %72 iken solunum dışı örneklerde %76 olarak bildirilmiştir³³.

Tüberkülozun tanısında PCR ile ticari NAA testlerine ait performansların karşılaştırılması olarak değerlendirildiği çalışmalara ait sonuçların uyum oranı yaklaşık %90.8 olarak bulunmuştur. Genel olarak tüberkülozun hızlı tanısına yönelik NAA testleriyle yapılan performans çalışmalarında en sık dikkati çeken özellik, saptanan duyarlılık (%36-100) ve özgüllük (%54-100) oranlarının heterojenliğidir ($p < 0.001$). Kullanılan "in-house" PCR yönteminin saptanan duyarlılık oranlarıyla rutin laboratuvara tek başına önemli bir katkı sağlamaktan uzak olduğu, ancak şüpheli olgularda solunum dışı örneklerde tanıya katkısı olabileceği düşünülürken, solunum örneklerinde gerek PCR'nin gerekse ticari NAA testlerinin ancak kültürü destekleyici bir tanı aracı olabileceği değerlendirilmektedir^{16,24}.

NÜKLEİK ASİT ÇOĞALTMA ESASLI YÖNTEMLERE AİT DEĞERLENDİRMELER

Nükleik asit çoğaltma (NAA) esaslı yöntemler, tüm dünyada yaygın olarak kullanılmalarına karşın, klinik mikobakteriyolojide devrim yaratabilmiş değildir. Mikroskopik incelemeyle desteklenmiş kültür, altın standart olmaya devam etmektedir. Çoğaltmaya dayalı yöntemlerin tanıda kullanımına yönelik kısıtlamaların en önemli nedeni, yapılan meta-analizlerde özgüllüklerinin yüksek bulunmasına rağmen duyarlılık oranlarının oldukça heterojen oluşu ve tanısız doğruluğa katkısının klinik olarak tatmin edici olmayışdır^{12,16}. "In-house" PCR ile NAA esaslı ticari sistemlerin hasta örneklerinden tüberkülozun tanısına yönelik performanslarının araştırıldığı kapsamlı çalışmaların genelinde yapılan değerlendirmelerde saptanan farklı duyarlılık oranları, merkezler arası örneklemelerdeki metodolojik farklılıklar ile uygulamada tercih edilen NAA test prosedürlerindeki heterojenliğe bağlı olabilmektedir^{16,24,34}. Örneklemelerdeki metodolojik farklılıklar arasında; test işlemine alınacak örnek tipi ve sayısı, örneğe uygulanacak ARB boyama yöntemi, değerlendirmelerde referans yöntem olarak esas alınan kültür yöntemiyle ilgili kurumlardaki farklı uygulama standartları, örneğin alındığı hastada tüberküloz şüphesinin düzeyi, örneklemeye yapılmış hastanın tüberküloz tedavisi altında olup olmadığı, çalışmalarda kullanılan örneklem yöntemi, hastaya ait veri toplama yöntemi, bağımsız gözlem uygulaması, klinik veya demografik verilerle kontrol gruplarına ait kültür sonuçları yer almaktadır. Ayrıca, yayma pozitif/negatif örnekle çalışma, çoğaltılmak istenen hedef bölge, DNA saflaştırma yöntemi, çoğaltma tekniği, "in-house" çalışmalarda araştırmacıların tasarladıkları farklı protokoller, çalışmada pozitif ve negatif kontrol kullanımı, internal kontrol kullanımı, "carry-over" kontaminasyon için dUTP-UNG kullanımı ile ampikonların varlığını saptamada kullanılan yöntem ve "threshold" belirleme, uygulamalar sırasında sistemlere ait duyarlılık ve özgüllükleri etkileyen diğer önemli farklılıklardır^{12,16,21,24}. Bunlar arasında, özellikle bakterilerin örneklerde homojen dağılımının olmaması, etkin olmayan nükleik asit saflaştırma yöntemlerinin kullanılması ve bazen de örnekte inhibitör varlığı, duyarlılıklardaki farklılıkların en kritik parametreleridir. Bu inhibitörlerin insidansı, solunum yolu

örneklerinde %4'ten, solunum dışı örneklerde %18.6'ya kadar değişmektedir³. Bakterilerin yoğun olmadığı klinik örneklerde, moleküler çoğaltma yöntemleriyle bunların saptanma şansı da düşüktür. Fenol kloroform ile saflaştırma yöntemi, en iyi verimi sağlama-sına karşılık, zaman alıcı ve karmaşık olması, bulaş riskini yükseltmesi dezavantajlarıdır. Bir çoğaltma yöntemi seçilirken, bir internal kontrolün de kullanılması, dikkate alınması gereken çok önemli bir uygulamadır. Çoğaltma yöntemlerinin özgüllüğü genelde iyi olmakla birlikte yalancı pozitiflik olasılığı, hem mikrobiyologlar hem de klinisyenler tarafından göz ardı edilmemelidir. Uzun süren ve sık olarak yan etkileri görülen tüberküloz tedavisine, sadece pozitif bir NAA testi sonucuna bakarak başlanmamalıdır. Yalancı pozitif sonucun en büyük nedeni bazen preanalitik, ancak daha ziyade analitik aşamada örneğin kontaminasyonudur. Çalışma ortamının sık sık %10'luk çamaşır suyu ile silinmesi ve çalışma yapılmadığı sırada pipetlerin, pipet uçlarının ve çalışma yüzeylerinin ultraviyole ışığına tabii tutulması gibi uygulamaların yapılması önemli olmakla birlikte, uygulayıcıların eğitimi de kontaminasyonun engellenmesinde önemli rol oynamaktadır³⁵.

Farklı çoğaltma yöntemlerini değerlendiren çok sayıda çalışma ile doğrudan karşılaştırmanın yapıldığı az sayıda çalışmanın hiçbiri, özellikle solunum yolu örnekleri için optimize edilmiş, standardize haldeki hazır kitlerin birbirlerine belirgin bir üstünlüğünü gösterebilmiş değildir. Tümü, yüksek düzeyde özgüllüğe, ancak istenilen düzeyde olmayan duyarlılığa sahiptir. Bu kapsamda yakın dönemlerde gerçekleştirilen kalite kontrol çalışma sonuçları, daha önceki çalışmalara ait sonuçlarla karşılaştırıldığında, hasta örneklerinde *M.tuberculosis* tespitinde NAA testlerine ait performansların göreceli olarak arttığını göstermiştir. Bu çalışmalarda, yanlış pozitiflik oranlarındaki azalmanın önemli olduğu, ancak yayma negatif örneklerdeki uygulamalara ait çok sayıda prosedürün halen beklenen yeterlilikte bir duyarlılığa sahip olmadığı gözlenmiştir³⁴.

SONUÇ

Tüberküloz tanısındaki hızlı ve güvenilir yöntemlere artan gereksinim, günümüzde moleküler tanısal prosedürlerin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygınlaşmasına ve çoğunlukla konvansiyonel testlerin yanında, güçlü tamamlayıcı roller üstlenmelerine yol açmıştır. Yakın gelecekte, amplifikasyon tekniklerinin duyarlılık, özgüllük ve tanısal hızlarındaki gelişmeler ve ulusal kontrol programları kapsamında hedeflenen tedaviye yönelik katkılarının, tüberküloz epidemilerini önlemede oldukça önemli bir yer tutabileceği beklenmektedir. Ancak NAA tekniklerindeki umut verici gelişmelere rağmen bu testlerin, mikroskopi ve kültür gibi konvansiyonel testlerin rutin uygulamalarda yerlerini alabilmeleri mümkün görünmemektedir. Bu testlerin, laboratuvarlarda rutin uygulamaya girebilmesi için kalite kontrol sonuçlarının referans merkezlerce düzenli olarak takip edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kalite kontrol programları kapsamında, hazırlanan referans materyallerin ve etkinlik programlarının düzenli olarak yaygınlaştırılması ile hasta örneklerinden tüberküloz tanısı amacıyla kullanılacak moleküler tanı testlerinin duyarlılıklarının geliştirilmesi hedeflenmelidir. Ayrıca, her kurum kendi bünyesinde testlerin maliyet-etkinlik araştırmasını mutlaka yapmalı ve bu konuda etkili olabilen değişkenleri dikkate alarak bunu gerçekleştirmelidir.

Sonuç olarak; rutin uygulamada şüpheli klinik örneklerden tüberkülozun hızlı tanısında tek başına NAA testlerine güvenilemeyeceği ve bu testlerin tarama amaçlı kesinlikle kullanılmaması gerektiği, ancak konvansiyonel testlerle birlikte kliniği desteklemede oldukça değerli olabildiği düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

1. Sürücüoğlu S. Ekstrapulmoner tüberküloz tanısında karşılaşılan sorunlar ve çözüm önerileri. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. 23 Kasım 2006, Kızılcahamam, Ankara. Sempozyum Kitabı, s: 138-41.
2. Lange C, Mora T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology* 2010; 15(2): 220-40.
3. Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24(11): 711-20.
4. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010; 363(11): 1005-15.
5. Hofmann-Thiel S, Turaev L, Hoffmann H. Evaluation of the hyplex TBC PCR test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *BMC Microbiol* 2010; 10:95.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58(1): 7-10.
7. Moore DF, Guzman JA, Mikhail LT. Reduction in turnaround time for laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis by routine use of a nucleic acid amplification test. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52(3): 247-54.
8. Alp A. Tüberkülozun laboratuvar tanısında güncel durum. *Hacettepe Tıp Derg* 2011; 42(1): 28-33.
9. Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49(12): 4138-41.
10. Köksalan OK. Günümüzde tüberküloz tanısı/güçlükleri. *ANKEM* 2010; 24(Ek 2): 61-3.
11. Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New diagnostic methods for tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22(2): 174-82.
12. Greco S, Rulli M, Girardi E, Piersimoni C, Saltini C. Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and meta-regression. *J Clin Microbiol* 2009; 47(3): 569-76.
13. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6(3): 423-32.
14. Dowdy DW, Maters A, Parrish N, Beyrer C, Dorman SE. Cost-effectiveness analysis of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test as used routinely on smear-positive respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 41(3): 948-53.
15. Piersimoni C, Scarparo C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41(12): 5355-65.
16. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One* 2008; 3(2): e1536.
17. Kocagöz T. Tüberküloz tanısında moleküler yöntemler, s: 118-33. Özkar Ş, Kılıçaslan Z (ed), Tüberküloz. 2010, 1. Baskı. Türk Toraks Derneği Kitapları, Sayı 11. AVES Yayıncılık, İstanbul.
18. Small PM, Pai M. Tuberculosis diagnosis-time for a game change. *N Engl J Med* 2010; 363(11): 1070-1.
19. Zhu L, Jiang G, Wang S, et al. Biochip system for rapid and accurate identification of mycobacterial species from isolates and sputum. *J Clin Microbiol* 2010; 48(10): 3654-60.
20. Lefmann M, Schweickert B, Buchholz P, et al. Evaluation of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for identification of clinically relevant mycobacteria in clinical specimens and tissue sections. *J Clin Microbiol* 2006; 44(10): 3760-7.

21. Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2006; 61(9): 783-90.
22. Köksalan OK. Direncin saptanmasında güncel moleküler yöntemler. XXXIV. Mikrobiyoloji Kongresi. 7-11 Kasım 2010, Girne, KKTC, Kongre Kitabı, s: 164.
23. Lin CB, Chou HW, Lin WC, et al. Is it appropriate to routinely use a nucleic acid amplification test for the diagnosis of tuberculosis? *Kaohsiung J Med Sci* 2011; 27(4): 138-43.
24. Flores LL, Pai M, Colford JM Jr, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol* 2005; 5: 55.
25. Laraque F, Griggs A, Slopen M, Munsiff SS. Performance of nucleic acid amplification tests for diagnosis of tuberculosis in a large urban setting. *Clin Infect Dis* 2009; 49(1): 46-54.
26. Ozkutuk A, Kirdar S, Ozden S, Esen N. Evaluation of Cobas Amplicor MTB test to detect *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *New Microbiol* 2006; 29(4): 269-73.
27. Yang YC, Lu PL, Huang SC, et al. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49(3): 797-801.
28. Kiraz N, Saglik I, Kiremitci A, Kasifoglu N, Akgun Y. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex obtained from sputum samples. *J Med Microbiol* 2010; 59(Pt 8): 930-4.
29. Syre H, Myneedu VP, Arora VK, Grewal HM. Direct detection of mycobacterial species in pulmonary specimens by two rapid amplification tests, the gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and the genotype mycobacteria direct test. *J Clin Microbiol* 2009; 47(11): 3635-9.
30. Ciftci IH, Aslan MH, Asik G. Evaluation of Xpert MTB/RIF results for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(1): 43-7.
31. Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *J Clin Microbiol* 2011; 49(4): 1202-5.
32. Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaitre N. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49(5): 1772-6.
33. Alp A, Hascelik G. Is PCR an essential method for the diagnosis of tuberculosis in a routine laboratory. American Society for Microbiology 110th General Meeting, May 23-27, 2010, San Diego, California, USA. Abstracts Book, C155.
34. Noordhoek GT, Mulder S, Wallace P, van Loon AM. Multicentre quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic amplification methods. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(4): 295-301.
35. Tortoli E, Palomino JC. New diagnostic methods, pp: 448-94. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V (eds), *Tuberculosis 2007, From Basic Science to Patient Care*. 2007, 1st ed. Available from: www.TuberculosisTextbook.com