

Postmortem Tüberküloz Tanısında Parafine Gömülü Dokularda İki Farklı Gerçek Zamanlı PCR Sisteminin Karşılaştırılması*

Comparison of Two Different Real-Time PCR Systems in Postmortem Diagnosis of Tuberculosis in Paraffin-Embedded Tissues

Gülhan YAĞMUR¹, Nurhan ALBAYRAK², Taner DAŞ³, Muzaffer YILDIRIM³, Ayşe ÖZGÜN³, Yalçın BÜYÜK⁴

¹ İstanbul Adli Tıp Kurumu, Postmortem Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.

¹ Istanbul Forensic Medicine Institute, Postmortem Microbiology Laboratory, Istanbul, Turkey.

² Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Ankara.

² Public Health Agency of Turkey, Tuberculosis Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

³ İstanbul Adli Tıp Kurumu, Histopatoloji Şubesi, İstanbul.

³ Istanbul Forensic Medicine Institute, Histopathology Unit, Istanbul, Turkey.

⁴ İstanbul Adli Tıp Kurumu, Otopsi Şubesi, İstanbul.

⁴ Istanbul Forensic Medicine Institute, Autopsy Unit, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışma, 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (4-7 Haziran 2014, Ankara)'nde bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 09.05.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 12.09.2014

ÖZET

Tüberküloz (TB) dünyada halen morbidite ve mortalitesi yüksek olan enfeksiyonlardan biridir. Ülkemizde de yüzlerce insan tanısı konulamadan veya dirençli suşlar nedeniyle bu hastalıktan kaybedilmektedir. Bu nedenle TB sonucu kaybedilen olguların postmortem tanımlanması önemlidir. Tüberkülozun tanısında, klasik yöntemlerin yanı sıra moleküler yöntemler de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, postmortem *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonu tanısında parafine gömülü dokularda iki farklı gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) sisteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, otopsi sonrası histopatolojik olarak TB ile uyumlu bulgular (nekrotizan granülomatöz iltihap, jelatinöz kazeöz pnömoni, nekrotik fibröz nodüller) gösteren 37 olgunun (31 erkek, 6 kadın; yaş aralığı: 25-85 yıl) parafine gömülü 40 doku örneği (35 akciğer, 2 beyin, 2 kalp, 1 lenf bezi) alınmıştır. Dokuların ksilen ve etil alkol ile deparafinizasyon işleminden sonra DNA izolasyonu QIAasympphony DSP Virus/Pathogen Midi kit ile QIAasympphony cihazında, DNA'nın amplifikasyon işlemi de Artus® *M. tuberculosis*

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Gülhan Yağmur, İstanbul Adli Tıp Kurumu, Postmortem Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Bahçelievler 34196, İstanbul, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 212 454 1500, **E-posta (E-mail):** gyagmur1970@hotmail.com

RG-PCR kiti kullanılarak Rt-PCR yöntemiyle Rotor-Gene® Q cihazında (Qiagen, Almanya) yapılmıştır. Eş zamanlı olarak, deparafinizasyon işleminden sonra örnekler kartuş içine yerleştirilerek DNA izolasyonu ve Rt-PCR işlemi Xpert® MTB/RIF (Cepheid, ABD) sistemiyle uygulanmıştır. Parafine gömülü 40 doku örneğinin 17'si Qiagen ile, 20'si ise Xpert sistemi ile pozitif bulunmuştur. *M.tuberculosis* DNA'sı, örneklerin 13'ünde (%32.5) her iki yöntemle de pozitif, 16'sında (%40) her iki yöntemle de negatif bulunmuş; buna göre yöntemler arasındaki uyum %72.5 (29/40) olarak belirlenmiştir. Xpert yöntemiyle pozitif bulunan yedi (%17.5) örnek Qiagen sistemiyle negatif saptanırken, Qiagen sistemiyle pozitif bulunan dört (%10) örnek Xpert yöntemiyle negatif sonuç vermiştir. Xpert MTB/RIF yöntemiyle pozitif sonuç veren toplam 20 örnekten 15'inin rifampisine duyarlı, üçünün ise dirençli olduğu saptanmıştır. *M.tuberculosis* DNA'sı düşük pozitif saptanan iki örnekte ise rifampisin direnci tespit edilememiştir. Postmortem olgularda *M.tuberculosis* enfeksiyonlarının tanımlanması, ülkemizin epidemiyolojik verilerine katkıda bulunacaktır. Bu olgularda TB tanısının konulması için etkin örnekleme ile Ziehl-Neelsen boyama ve kültür yapılması önemlidir; ancak postmortem mikrobiyolojik örneklemelerin yapılamadığı olgularda, parafine gömülü dokularda *M.tuberculosis* DNA'sının gösterilmesi, PCR sistemleri arasındaki farklılıklara rağmen, tanılabilir değer taşımaktadır. Sonuç olarak verilerimiz, parafine gömülü dokularda *M.tuberculosis* DNA'sının saptanmasında Xpert MTB/RIF sisteminin, hem rifampisin direncini belirlemesi, hem de daha kısa süre içinde ve daha fazla sayıda pozitif sonuç saptaması nedeniyle, avantajlı olduğunu düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: Postmortem; *Mycobacterium tuberculosis*; tanı; Xpert® MTB/RIF; Qiagen®.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is one of those infections with high morbidity and mortality in all around the world. Hundreds of people died from this disease without diagnosed or due to resistant strains in Turkey. Therefore, it is important to identify postmortem cases who have died from tuberculosis. Molecular methods have been widely used as well as conventional methods in the diagnosis of tuberculosis. The aim of this study was to compare the two different real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) system in the postmortem diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infections in paraffin-embedded tissues. A total of 40 paraffin-embedded tissue samples [lung (n= 35), brain (n= 2), heart (n= 2), lymph node (n= 1)] in which histopathologic findings consistent with TB (necrotizing granulomatous inflammation, gelatinous caseous pneumonia, necrotic fibrous nodul) obtained from 37 autopsy cases (31 male, 6 female; age range: 25-85 yrs) were included in the study. Paraffin-embedded tissues were deparaffinized with xylene and ethyl alcohol and then DNA isolation was done with QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi kit in the QIAAsymphony device. DNA amplification process was performed by Rt-PCR using the kit Artus® *M. tuberculosis* RG-PCR in the Rotor-Gene® Q device (Qiagen, Germany). Likewise, after deparaffinization process, samples placed in the cartridge and isolation and Rt-PCR was performed by Xpert® MTB/RIF (Cepheid, USA) system, simultaneously. Seventeen and 20 out of the 40 paraffin-embedded tissues yielded positive results with Qiagen and Xpert system, respectively. *M.tuberculosis* DNA was found positive in 13 (32.5%) and negative in 16 (40%) of the samples by both of the systems, exhibiting 72.5% (29/40) of concordance. On the other hand, seven (17.5%) samples that were positive with Xpert system yielded negative result with the Qiagen, while four (10%) samples that were positive with Qiagen yielded negative result with the Xpert system. Of the 20 positive cases detected with Xpert MTB/RIF system, 15 were found rifampicin-susceptible, and three were rifampicin-resistant. In two samples in which *M. tuberculosis* DNA was low positive, rifampicin resistance could not be detected. The identification of *M.tuberculosis* infections in postmortem cases will contribute epidemiological data in Turkey. In these cases, effective sampling and diagnosing of *M.tuberculosis* infections by acid-fast stain and culture methods are crucial. However, in cases without microbiological sampling the detection of *M.tuberculosis* DNA in paraffin-embedded tissues with PCR, although there are differences between PCR systems has diagnostic value. In conclusion, our data indicated that Xpert MTB/RIF system is more favourable to detect *M.tuberculosis* DNA in paraffin-embedded tissues, with the advantages of determination of rifampicin resistance, and detection of more positive results within a shorter time.

Key words: Postmortem; *Mycobacterium tuberculosis*; diagnosis; Xpert® MTB/RIF; Qiagen®.

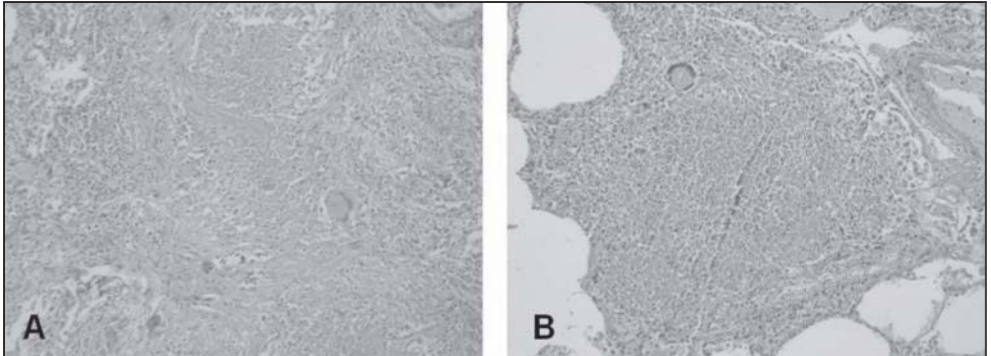
GİRİŞ

Tüberküloz (TB) halen bütün dünyada yaygın olarak görülen ve önemini koruyan ölümcül bir enfeksiyon hastalığıdır. TB hastalığı, dünyada enfeksiyon hastalıklarından ölüm nedenleri arasında AIDS'den sonra ikinci sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2013 raporuna göre; 2012 yılında 8.6 milyon yeni TB olgusu meydana geldiği, bunlardan 1.3 milyonun bu hastalıktan öldüğü bildirilmektedir¹. Bu ölüm oranı göz önüne alındığında, hastalığın büyük çoğunluğunun doğru tanı ve uygun tedavi sağlanmasıyla önemli ölçüde azalacağı vurgulanmaktadır^{1,2}.

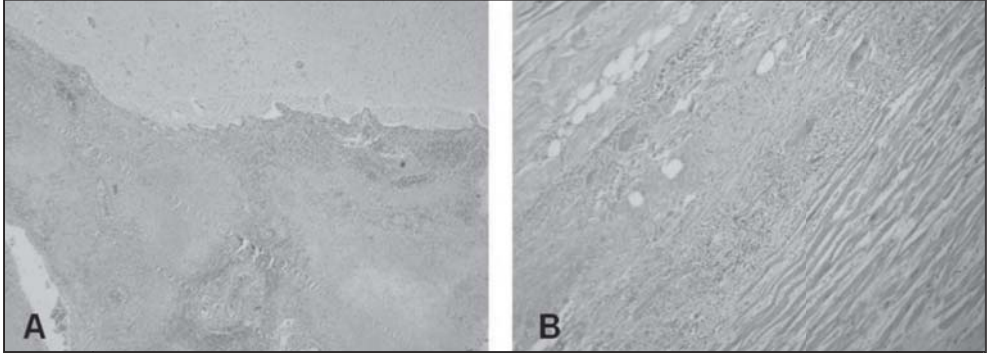
TB tanısında kullanılan geleneksel bakteriyolojik yöntemlerin yanında, son yıllarda sıklıkla kullanılmaya başlanan moleküler yöntemlerle hastalığın tanısının doğru ve daha hızlı bir şekilde konulması hedeflenmektedir³. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bu amaçla kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Bununla birlikte *Mycobacterium tuberculosis* DNA'sının gösterilmesinde kullanılan PCR sistemlerinin duyarlılıkları arasında bazı farklılıklar söz konusudur. Bu farklılıklar, kullanılan primer ve enzim farklılıklarına ve/veya ortamda bulunan inhibitörlere bağlı olabilir; dolayısıyla yanlış negatif sonuçlar alınabilir². Özellikle parafine gömülü dokulardan yapılan PCR çalışmalarında, deparafinizasyon işlemlerinin farklılığı ve PCR için standardizasyonun sağlanmasındaki zorluklardan dolayı özgüllük ve duyarlılık farklılıkları bildirilmiştir^{4,5}. Bu çalışmada, postmortem olguların histopatolojik olarak TB ile uyumlu bulgular gösteren parafine gömülü doku örneklerinde, *M.tuberculosis* tayini için Artus® *M.tuberculosis* RG PCR ve Rotor-Gene® Q (Qiagen, Almanya) sistemi ile Xpert® MTB/RIF (Cepheid, ABD) gerçek zamanlı PCR sistemlerinin duyarlılıklarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, otopsi yapılan 37 olgunun, histopatolojik olarak TB ile uyumlu bulgular gösteren (nekrotizan granümatöz iltihap, jelatinöz kazeöz pnömoni, nekrotik fibröz nodüller) parafine gömülü 40 doku örneği (35 akciğer, 2 beyin, 2 kalp, 1 lenf bezi) kullanıldı (Resim 1 ve 2).



Resim 1. A) Akciğer dokusunda nekrotizan granümatöz iltihap; B) Akciğer dokusunda jelatinöz kazeöz pnömoni (Hematoksilen eozin x 20).



Resim 2. A) Beyin dokusunda nekrotizan granülatöz iltihap (Hemotoksilen eozin x 10); B) Kalp dokusunda nekrotizan granülatöz iltihap (Hematoksilen eozin x 20).

Deparafinizasyon İşlemi

Histopatolojik olarak TB ile uyumlu bulgular gösteren parafin bloklardan 10 mikrotomluk 3-4 adet kesit alınarak 2 ml'lik endorf tüplerinin içine konuldu. Tüplerin üzerine 1.5 ml ksilen eklenerek kuvvetlice vortekslenildi ve 8000 g'da 5 dakika santrifüj edildi. Tüplerin üzerindeki sıvı atılarak 1.5 ml ksilen eklendi ve işlem tekrarlandı. Üst kısımdaki sıvı atıldıktan sonra üzerine bu kez 1.5 ml etil alkol (%96-100) ilave edildi ve vortekslenildikten sonra 8000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Tüpün üzerinde biriken alkol uzaklaştırıldıktan sonra doku üzerinde kalan alkolün uçması için tüplerin kapakları açılarak 15 dakika 37°C'de bekletildi. Üzerlerine 20 µl proteinaz K ve 600 µl ATL tampon eklenen tüpler, vortekslenildikten sonra 56°C'de 24 saat inkübe edildi. Arada bir vortekslenen örnekler doku tamamen eridikten sonra izolasyon işlemine alındı⁶.

Qiagen® Sistemi ile Gerçek Zamanlı PCR (Rt-PCR)

Parafine gömülü doku örneklerinde ksilen ve etil alkol ile deparafinizasyon işleminden sonra, DNA izolasyonu QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi kit (Qiagen, Almanya) ile QIAAsymphony cihazında, DNA'nın amplifikasyon işlemi Artus® *M.tuberculosis* RG PCR kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak Rt-PCR yöntemiyle Rotor-Gene® Q cihazında (Qiagen, Almanya) firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Ana karışım (master mix) 15 µl olarak hazırlandı; üzerine 10 µl DNA eklenerek 25 µl son hacim elde edildi. PCR tüplerine; 95°C'de 2 dakika, 95°C'de 15 saniye, 64°C'de 30 saniye, 72°C'de 20 saniye olacak şekilde 40 döngü uygulandı.

Xpert® MTB/RIF Sistemi ile Rt-PCR

Xpert® MTB/RIF çalışması için örnekler endorf tüplerin içinde Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarına gönderildi. Burada yapılan deparafinizasyon işleminden sonra, DNA izolasyonu ve Rt-PCR için örnekler önce sistemin öngördüğü kartuşların içine transfer edilerek Xpert cihazına yerleştirildi. Cihazda DNA izolasyon işleminden sonra "semi-nested" amplifikasyon yapılarak Rt-PCR işlemi gerçekleştirildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 37 olgunun 6'sı kadın, 31'i erkek olup yaş aralığı 25-85 yıldır. Olguların akciğer dokularının makroskopik görünümünde TB hastalığını düşündüren bulgular (nodüler lezyonlar, kavernöz yapılar, plevral kalınlaşma, pürülan sıvı çıkışı, akciğer ve plevrada yapışıklıklar) saptanmıştır. Olguların ayrıntılı hikaye ve klinik bilgilerine ulaşılamamakla birlikte, 20'sinin evinde veya dışarıda ölü bulunduğu, 3'ünün solunum yetmezliği veya pnömoni kliniği ile hastanede öldüğü, 5'inin TB tanısı olarak hastanede tedavi sırasında kaybedildiği, 9'unun ise hastanede başka bir nedenle tedavi altındayken (trafik kazası, intihar vb.) öldüğü bildirilmiştir.

Parafine gömülü 40 doku örneği deparafinizasyon işlemini takiben Qiagen® ve Xpert® MTB/RIF sistemi ile *M.tuberculosis* DNA'sı açısından incelenmiştir. Örneklerin 29'u (%72.5) her iki yöntemle de aynı sonucu vermiş (16'sı negatif, 13'ü pozitif), çalışılan yöntemler ile elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak Tablo I'de sunulmuştur.

Qiagen sistemiyle negatif bulunan iki kalp örneğinde Xpert MTB/RIF yöntemiyle düşük düzeyde pozitiflik saptanmıştır (Tablo II). Xpert MTB/RIF yöntemiyle pozitif bulunan 20 örneğin 15'i rifampisine duyarlı, 3'ü ise dirençli olarak saptanmıştır (Tablo II). *M.tuberculosis* DNA'sı düşük pozitif saptanan 2 örnekte ise rifampisin direnci tespit edilememiştir. En az bir sistemle pozitif bulunan örneklerin histopatolojik bulguları ve her iki sistemin sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo II'de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

TB halen dünyada morbidite ve mortalitesi en yüksek enfeksiyon hastalıklarından biridir¹. Bu anlamda tanısı konulmadan veya dirençli *M.tuberculosis* enfeksiyonları sonrası kaybedilen olguların postmortem tanısı ve bildirimi önem kazanmaktadır⁷. Postmortem olguların TB tanısında da Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama ve konvansiyonel kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Özsoy ve arkadaşları⁸, 302 otopsi olgusundan sadece üçünde EZN ve kültür pozitifliği bildirmişlerdir. Otopsi sırasında postmortem örnekleme yapılırken TB hastalığının tanınması ve basil ihtiva eden bölgeden örnekleme yapılması, boyama ve kültür duyarlılığını artırmada önemlidir. Ancak çoğu zaman otopsi sırasında mikrobiyolojik örnekleme yapılırken eksiklikler yaşanmaktadır. Dolayısıyla postmortem mikrobiyolojik örnekleme yapılamamış olgularda histopatolojik olarak TB ile uyumlu bulgular gösteren parafine gömülü dokulardan PCR çalışılması, *M.tuberculosis* enfeksiyonlarını tanımlamada kullanılabilecek önemli yöntemlerden biridir. Marchetti ve arkadaşları⁹, HIV pozitif olguların otopsi sonrası parafine gömülü doku örneklerinden yaptıkları çalışmada, dört farklı PCR yöntemini karşılaştırmışlar ve kültürü yapılmamış

Tablo I. Xpert® ve Qiagen® Sistemleri ile Alınan Sonuçların Karşılaştırılması (n= 40)

		Xpert® MTB/RIF	
		Pozitif, n (%)	Negatif, n (%)
Qiagen®	Pozitif, n (%)	13 (32.5)	4 (10)
	Negatif, n (%)	7 (17.5)	16 (40)

Tablo II. Pozitif Doku Örneklerinde Histopatoloji, Xpert® ve Qiagen® Sistemi ile Alınan Sonuçlar

No	Örnek	Histopatoloji	QIAGEN (CT değeri)	XPert MTB/RIF	RIF duyarlılığı
1	Akc	NGİ	Negatif	Düşük	Duyarlı
2	Kalp	NGİ	Negatif	Çok düşük	TE
3	Akc	JKP	Pozitif (28.1)	Orta	Dirençli
4	Akc	NGİ	Pozitif (33.2)	Çok düşük	Dirençli
5	Akc	NGİ	Pozitif (34.2)	Negatif	
6	Akc	NGİ	Pozitif (36.0)	Düşük	Dirençli
7	Akc	NGİ	Pozitif (27.0)	Çok düşük	Duyarlı
8	Akc	NGİ	Pozitif (29.0)	Yüksek	Duyarlı
9	Akc	NGİ	Pozitif (32.5)	Negatif	
10	Akc	JKP	Pozitif (28.2)	Düşük	Duyarlı
11	Akc	JKP	Pozitif (31.1)	Orta	Duyarlı
12	Akc	NGİ	Pozitif (34.2)	Düşük	Duyarlı
13	Akc	NGİ	Pozitif (36.5)	Çok düşük	Duyarlı
14	Akc	NGİ	Negatif	Çok düşük	TE
15	Kalp	NGİ	Negatif	Çok düşük	Duyarlı
16	Akc	JKP	Pozitif (35.9)	Düşük	Duyarlı
17	Akc	NGİ	Negatif	Çok düşük	Duyarlı
18	Akc	NGİ	Negatif	Düşük	Duyarlı
19	Akc	NGİ	Pozitif (32.5)	Negatif	
20	Akc	JKP	Pozitif (31.5)	Düşük	Duyarlı
21	Akc	NGİ	Pozitif (26.5)	Düşük	Duyarlı
22	Akc	NFN	Pozitif (33.0)	Çok düşük	Duyarlı
23	Akc	NGİ	Negatif	Çok düşük	Duyarlı
24	Akc	NGİ	Pozitif (27.7)	Negatif	

Akc: Akciğer; NGİ: Nekrotizan granümatöz iltihap; JKP: Jelatinöz kazeöz pnömoni; NFN: Nekrotik fibröz nodüller;
TE: Tespit edilemeyen; CT: "Cycle Threshold"; RIF: Rifampisin.

veya kültürde üremesi olmamış olgularda retrospektif olarak PCR yapılmasının faydalı olacağı kanısına varmışlardır.

Çeşitli klinik örneklerin parafine gömülü dokularından yapılan PCR çalışmalarında %67-75 arasında farklı duyarlılık değerleri bildirilmiştir¹⁰⁻¹². Bu çalışmalarda PCR sonuçları boyama veya kültür pozitifliği ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Tarnag ve arkadaşları¹³ ise, EZN boyama ve kültür negatifliğinin olduğu olgularda, parafine gömülü dokularda yapılacak olan PCR yönteminin yararlı ve hızlı tanıda kullanılabilecek bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır³. Parafine gömülü dokulardan deparafinizasyon işlemi esnasında dokunun tam olarak erimemesine bağlı olarak basillerin ortaya çıkarılamaması, fazla ısı ve parafine bağlı olarak da basillerin kaybı nedeniyle yanlış negatiflikler

meydana gelebilmektedir. Bu nedenle parafine gömülü dokularla yapılan bazı çalışmalarda, deparafinizasyon ve PCR işlemi sırasında standardizasyonun tam yapılamaması nedeniyle duyarlılığın azaldığı bildirilmiştir^{5,14}. Bununla birlikte *M.tuberculosis* DNA'sının saptanmasında PCR'nin duyarlılığının istenilen düzeyde yüksek olmadığı, kültürün halen altın standart olarak kabul edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır^{15,16}. Bu amaçla son yıllarda ticari olarak geliştirilen *M.tuberculosis* kompleks ve rifampisin direncini tek bir testle 2 saatten kısa bir sürede saptayabilen Xpert MTB/RIF yöntemi umut verici gibi görünmektedir. Bu yöntemle DNA izolasyonu, amplifikasyon ve mutasyon saptama işlemleri tek kartuş içinde gerçekleştirilmektedir¹⁷. Xpert MTB/RIF sistemiyle yapılan çalışmalarda testin duyarlılığının yüksek olduğu belirtilmiştir^{18,19}.

Çalışmamızda, otopsileri yapılmak için gönderilen olguların çoğunun evde veya dışarıda ölü bulunmuş olması, hastanede ölenlerin ise ayrıntılı klinik ve radyolojik bilgilerine ulaşılamaması nedeniyle, çoğu olgunun otopsi antemortem TB tanıları bilinmeden yapılmıştır. Bu durum da, otopsi sırasında *M.tuberculosis* enfeksiyonu olan olgulardan, standart EZN ve kültür için örnek alınmaması halinde, parafine gömülü dokulardan PCR çalışılmasını değerli kılmaktadır. *M.tuberculosis* enfeksiyonları açısından antemortem tanıları yapılamayan olguların postmortem tanılarının konulması ve ilaç direncinin tayin edilmesi ülkemiz verilerine katkıda bulunacaktır.

Çalışmamızda postmortem olguların histopatolojik olarak TB ile uyumlu bulgular gösteren dokularında, Qiagen sistemiyle çalışılmış olan örneklerin Xpert MTB/RIF sistemiyle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ancak olguların sadece 10'unda EZN boyama ve kültür yapılmış olması nedeniyle bu konvansiyonel yöntemler karşılaştırmaya dahil edilememiştir. Otopsi sırasında olguya ait klinik bilginin olmaması ve TB şüphesi uyandıran makroskopik bulguların değerlendirilememesi nedeniyle postmortem örneklerden kültür yapılmadığı düşünülmüştür. Kullandığımız iki sistemin sonuçları 29 (72.5) örnek için uyumlu bulunmuş, ancak 11 (%27.5) örnekte farklı sonuçlar elde edilmiştir (Tablo I). Bu durumun; sistemlerde kullanılan primerlerin farklı olması, kesit alınan parafine gömülü doku örneklerindeki kesit farklılıkları veya deparafinizasyon işlemi sırasında basillerin kaybına bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Bununla birlikte karşılaştırma sonucunda Xpert MTB/RIF yöntemiyle daha fazla pozitiflik yakalandığı görülmektedir. Ayrıca bu sistem rifampisin direncini de göstererek dirençli *M.tuberculosis* suşlarını saptaması adına da avantaj sunmaktadır. Xpert MTB/RIF yöntemi izolasyon ve PCR işlemini birlikte ve daha kısa süre içinde gerçekleştirdiğinden, rifampisin direncini göstermesi gibi avantajları ile parafine gömülü doku örneklerinde de tercih edilebilecek bir sistem gibi görünmektedir. Ancak bu sistemlerin parafine gömülü dokularla yapılan çalışmalarda duyarlılıklarının ortaya konması için, altın standart olan kültür ile karşılaştırmalı çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bununla birlikte çalışmamız postmortem *M.tuberculosis* enfeksiyonlarının tanımlanmasında, parafine gömülü dokularda PCR yöntemi ile ülkemizde yapılan ilk çalışma özelliği taşımaktadır. Sonuç olarak, postmortem olgularda *M.tuberculosis* enfeksiyonu tanısının konulması için etkin mikrobiyolojik örnekleme ile EZN boyama ve kültür yapılması önem arz etmektedir. Ancak postmortem mikrobiyolojik örnekleme yapılamadığı olgularda, parafine gömülü dokularda *M.tuberculosis* DNA'sını göstermek, PCR sistemleri arasındaki farklılıklara rağmen tanısal değere sahiptir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2013. WHO, Geneva, Switzerland. Available at: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Tekerekoğlu MS, Durmaz R, Özerol İH. *Mycobacterium tuberculosis*'in laboratuvar tanısı. Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 2000; 7(2): 171-6.
3. Mishra PK, Gorantla VR, Bhargava A, Varshney S, Vashistha P, Maudar KK. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues and biopsies of gastrointestinal specimens using real-time polymerase chain reaction system. Turk J Gastroenterol 2010; 21(2): 129-34.
4. Ruiz-Manzano J, Manterola JM, Gamboa F, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded pleural biopsy specimens by commercial ribosomal RNA and DNA amplification kits. Chest 2000; 118(3): 648-55.
5. Senturk N, Sahin S, Kocagoz T. Polymerase chain reaction in cutaneous tuberculosis: is it a reliable diagnostic method in paraffin-embedded tissues? Int J Dermatol 2002; 41(12): 863-6.
6. Chan PK, Chan DP, To KF, Yu MY, Cheung JL, Cheng AF. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. J Clin Pathol 2001; 54(5): 401-3.
7. Pavic I, Radulovic P, Bujas T, Peric Balja M, Ostojic J, Balicevic D. Frequency of tuberculosis at autopsies in a large hospital in Zagreb, Croatia: a 10-year retrospective study. Croat Med J 2012; 53(1): 48-52.
8. Özsoy S, Demirel B, Albay A, Kisa O, Dinç AH, Safalı M. *Tuberculosis* prevalence in forensic autopsies. Am J Forensic Med Pathol 2010; 31(1): 55-7.
9. Marchetti G, Gori A, Catozzi L, et al. Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: comparison of four amplification assays. J Clin Microbiol 1998; 36(6): 1512-7.
10. Luo RF, Scahill MD, Banaei N. Comparison of single-copy and multicopy real-time PCR targets for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded tissue. J Clin Microbiol 2010; 48(7): 2569-70.
11. Hillemann D, Galle J, Vollmer E, Richter E. Real-time PCR assay for improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-embedded tissues. Int J Tuberc Lung Dis 2006; 10(3): 340-2.
12. Baba K, Pathak S, Sviland L, et al. Real-time quantitative PCR in the diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded pleural tissue in patients from a high HIV endemic area. Diagn Mol Pathol 2008; 17(2): 112-7.
13. Tarng DC, Su WJ, Huang TP. PCR diagnosis on formalin-fixed, paraffin embedded tissues with acid-fast stain and culture negativity in chronic dialysis patients of cervico-mediastinal tuberculous lymphadenitis. Nephrol Dial Transplant 1998; 13(6): 1543-6.
14. Lee HS, Park KU, Park JO, Chang HE, Song J, Choe G. Rapid, sensitive, and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by real-time PCR on paraffin-embedded human tissues. J Mol Diagn 2011; 13(4): 390-4.
15. Alp A. Tüberkülozun laboratuvar tanısında güncel durum. Hacettepe Tıp Derg 2011; 42(1): 28-33.
16. Dundar D, Sayan M, Arslan Z, Tamer GS, Dundar V. Routine using pattern and performance of diagnostic tests for tuberculosis on a university hospital. Am J Med Sci 2010; 339(3): 244-8.
17. Durmaz R. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında direncin belirlenmesinde moleküler yöntemler/ son gelişmeler. ANKEM Derg 2010; 24(Ek 2): 64-70.
18. 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.
19. Blakemore R, Story E, Helb D, et al. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. J Clin Microbiol 2010; 48(7): 2495-501.