

## N-ASETİL-L-SİSTEİN-NAOH'İN TÜBERKÜLOZUN TANISINDA KULLANILAN POLİMERAZ ZİNCİRLEME REAKSİYONU YÖNTEMİNİN DUYARLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

EFFECT OF N-ACETYL-L-CYSTEIN-NAOH ON THE SENSITIVITY OF POLYMERASE CHAIN REACTION USED FOR THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

*Mehmet Sait TEKEREKOĞLU\*, Rıza DURMAZ\**

**ÖZET:** Bu çalışma, klinik örneklerin homojenizasyonu ve dekontaminasyonunda kullanılan N-asetil-L-sistein-NaOH (NALC-NaOH) aşamasının tüberküloz tanısında kullanılan polimeraz zincirleme reaksiyonu (PZR)'nin duyarlılığı üzerine olumsuz etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Tüberküloz ön tanısı almış hastalardan alınan 147 balgam, 72 idrar ve 52 steril vücut sıvısı olmak üzere toplam 271 klinik örnek ile *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv standart suşundan hazırlanan 10<sup>6</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>2</sup> ve 10<sup>1</sup> cfu/ml yoğunluktaki bakteri süspansiyonları NALC-NaOH ile işlenmeden önce ve işlendikten sonra DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA örnekleriyle yapılan PZR denemelerinde NALC-NaOH ile işlenmemiş balgam örneklerinde PZR duyarlılığı %95, NALC-NaOH ile işlenenlerde ise %41 olarak bulunmuştur. İdrar örneklerinde bu oran sırasıyla %93 ve %31, steril vücut sıvılarında ise %89 ve %11 olarak belirlenmiştir. Standart bakteri yoğunlukları ile yapılan 14 ayrı denemede NALC-NaOH ile işleme almanın PZR duyarlılığını özellikle düşük bakteri yoğunluklarında (10<sup>2</sup> ve 10<sup>1</sup> cfu/ml) önemli derecede azalttığı gözlenmiştir.

*Anahtar kelimeler: N-asetil-L-sistein-NaOH, polimeraz zincirleme reaksiyonu, tüberküloz.*

**SUMMARY:** This study was performed to evaluate the effect of N-acetyl-L-cystein-NaOH (NALC-NaOH) on the sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) used for diagnosis of tuberculosis. A total of 271 clinical specimens (147 sputum, 72 urine and 52 sterile body fluid samples) obtained from the patients suspected for tuberculosis and dilutions (10<sup>6</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>2</sup> and 10<sup>1</sup> cfu/ml) prepared from *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv standard strain were used for DNA isolation before and after treatment with NALC-NaOH. The sensitivities of PCR performed with the DNA samples extracted from sputum samples were 95%

\* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

and 41% before and after treatment with NALC-NaOH respectively. These values were found to be 92% and 31% in urine samples, 89% and 11% in sterile body fluids respectively. Similar decline in PCR sensitivity was observed with the 14 experiments performed by standard dilutions of mycobacterial suspensions especially at lower bacterial concentrations ( $10^2$  and  $10^1$  cfu/ml) after treatment with NALC-NaOH.

*Key words: N-acetyl-L-cystein-NaOH, polymerase chain reaction, tuberculosis.*

## GİRİŞ

Tüberküloz bir enfeksiyon hastalığı olması yanında sosyal bir hastalık olup, günümüzde tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen önemini korumaya devam etmektedir. Bugün sadece az gelişmiş yada gelişmekte olan ülkeler değil, gelişmiş ülkelerin de en büyük problemlerinden birisi durumuna gelmiştir<sup>1-3</sup>.

Klasik tüberküloz tanısı, klinik belirtiler, radyolojik görünüm, tüberkülin deri testi sonucunun değerlendirilmesi, klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda aside dirençli basil görülmesi ve bakterinin besiyerinde üretilmesiyle mümkün olmaktadır. Tüberküloz basilinin kısa sürede tanımlanması, ilaç direncinin saptanması ve enfeksiyon kaynağının belirlenmesi etkin bir tedavi için büyük önem taşımaktadır<sup>4-7</sup>. Günümüzde ise tüberküloz tanısında kısa sürede sonuç alınmasına olanak sağlayan moleküler biyoloji teknikleri kullanılmaya başlanmıştır. Polimeraz zincirleme reaksiyonu (PZR) bu amaçla kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir<sup>1,8-11</sup>. Ancak yaygın olarak denenmesine karşın PZR yönteminde arzulanan özgüllük ve duyarlılık henüz elde edilememiştir<sup>11-12</sup>. Bunda örnekte bulunabilecek inhibitörler başta olmak üzere homojenizasyon, DNA izolasyonu, çoğaltma ve sonuçların gözlenmesinde uygulanan koşulların önemli etkisi vardır.

Bu çalışmada, tüberküloz ön tanısıyla PZR laboratuvarına gönderilen klinik örneklerin homojenizasyonu ve dekontaminasyonunda kullanılan N-asetil-L-sistein-NaOH (NALC-NaOH) aşamasının, PZR'nun duyarlılığı üzerine olumsuz etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

*Klinik örnekler:* Çalışma, tüberküloz şüpheli hastalardan alınan 147 balgam, 72 idrar ve 52 steril vücut sıvısı (plevral mayii, torasentez mayii, peritoneal sıvı, parasentez mayi ve beyin omurilik sıvısı) olmak üzere toplam 271 örnek üzerinde yapıldı.

Standart bakteri yoğunlukları: *M. tuberculosis* H<sub>37</sub> Rv standart suşundan hazırlanan ve mililitresinde yaklaşık  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  ve  $10^1$  bakteri bulunan örneklerle 14 ayrı deney gerçekleştirildi. Belirtilen bakteri yoğunlukları sağlıklı Tıp Fakültesi öğrencilerinden alınan balgam ve idrar örnekleri içerisinde iki seri halinde hazırlandı. Bir seri NALC-NaOH ile işlendikten sonra, diğer seri ise direkt olarak DNA izolasyonunda kullanıldı.

Örneklerin işlenmesi:

a) *NALC-NaOH uygulanmadan homojenizasyon*: Balgam örneklerinin tamamı vida kapaklı tüplere konulduktan sonra üzerine 1 ml steril distile su eklenerek 10 saniye vorteksle homojenize edildi. Homojen hale gelen örneğin 1ml'si ependorf tüpe alınarak DNA izolasyonunda kullanıldı, kalan kısmı ise NALC-NaOH ile işleme alındı.

b) *NALC-NaOH uygulanması*: Balgam örneklerinin tamamı, idrar ve steril vücut sıvılarının çökeltileri 50 ml'lik steril vida kapaklı tüplere konuldu. Üzerine hacmi kadar NALC-NaOH eklenerek homojenizasyon ve dekontaminasyon için oda ısısında 20 dakika bekletildi. Bu safhadan sonra fosfat tamponu ile nötralizasyon yapılmadı. Daha sonra, tüpe alabildiği kadar (~ 40 ml) steril distile su eklendi ve santrifüj edilerek çöktürme işlemi uygulandı. Üst sıvı tamamen atıldıktan sonra pellet üzerine 1.5 ml steril distile su konularak vorteksle homojenizasyonu sağlandı<sup>13</sup>. Buradan 1ml ependorf tüpe alınarak DNA izolasyonunda kullanıldı. Geri kalan kısım Löwenstein-Jensen kültür ortamına ekim ve boyamada kullanıldı (Steril vücut sıvıları bu araştırmaya özgü olarak incelenen klinik örnek sayısını artırmak amacıyla idrar gibi işlenmiştir).

*DNA izolasyonu*: Yukarda bahsedilen yöntemlerle homojenizasyon ve yoğunlaştırma işlemlerinden geçirilen örneklerden 1ml ependorf tüpüne alınarak 13.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısım, dipte 100 µl kalacak şekilde, içinde dezenfektan bulunan bir kaba döküldükten sonra, örnek üzerine proteinaz K çözeltisinden (400 mg/ml) 100 µl ilave edildi. Bu karışım 5 saniye vortekslelendikten sonra 56°C'lik su banyosunda bir gece tutuldu. Bir saat -30°C 'de bekletildi ve 10 dakika kaynatıldı. Standart fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonu işlemleri uygulandı. DNA pelleti 25 µl DNaz ve RNaz içermeyen steril distile suda homojenize edildi.

*Çoğaltma*: *M. tuberculosis* kompleksi genomunda bulunan IS6110 gen bölgesi üzerindeki 123 baz çiftlik kısmı çoğaltan T<sub>4</sub> (CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG) ve T<sub>5</sub> (CTC GTC CAG GGC CGC TTC GG) primerleri kullanılarak standart koşullarda çoğaltma sağlandı<sup>11</sup>.

*Çoğaltma sonucunun gözlenmesi*: Çoğaltma ürünü brom fenol mavisi içeren yükleme tamponu içerisinde 3/4 oranında seyreltildi. Bu karışımın 6 µl'si, içinde etidyum bromür bulunan %2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. UV ışık altında DNA molekül ağırlık standartı (FX 174, Hae III ile kesilmiş) ve kontroller (pozitif ve negatif) yardımıyla oluşan bantların değerlendirilmesi yapıldı.

## B U L G U L A R

Direk mikroskopik incelemede 147 balgam örneğinin 41'inde (%28), 72 idrar örneğinin 16'sında (%22) ve 52 steril vücut sıvısının 9'unda (%17) aside dirençli bakteri (ARB) pozitif bulundu. Bu örneklerden NALC-NaOH ile muamele edilmeyenler ile muameleden sonra hazırlanan homojenatlardan elde edilen DNA ekstraksiyon ürünlerine uygulanan PZR yöntemiyle alınan sonuçlar Tablo I, II ve III'de görülmektedir.

Tablo I: Balgam Örneklerine Ait Mikroskopi ve PZR Sonuçlarının Karşılaştırılması

PZR	Mikroskopik inceleme		Toplam
	Pozitif	Negatif	
<i>NALC-NaOH uygulanmadan</i>			
Pozitif	39	5	44
Negatif	2	101	103
<b>Toplam</b>	<b>41</b>	<b>106</b>	<b>147</b>
<i>NALC-NaOH uygulandıktan sonra</i>			
Pozitif	17	0	17
Negatif	24	106	130
<b>Toplam</b>	<b>41</b>	<b>106</b>	<b>147</b>

Tablo II: İdrar Örneklerine Ait Mikroskopi ve PZR Sonuçlarının Karşılaştırılması

PZR	Mikroskopik inceleme		Toplam
	Pozitif	Negatif	
<i>NALC-NaOH uygulanmadan</i>			
Pozitif	15	8	23
Negatif	1	48	49
<b>Toplam</b>	<b>16</b>	<b>56</b>	<b>72</b>
<i>NALC-NaOH uygulandıktan sonra</i>			
Pozitif	5	1	6
Negatif	11	55	66
<b>Toplam</b>	<b>16</b>	<b>56</b>	<b>72</b>

Tablo III: Steril Vücut Sıvılarına Ait Mikroskopi ve PZR Sonuçlarının Karşılaştırılması

PZR	Mikroskopik inceleme		Toplam
	Pozitif	Negatif	
<i>NALC-NaOH uygulanmadan</i>			
Pozitif	8	3	11
Negatif	1	40	41
<b>Toplam</b>	<b>9</b>	<b>43</b>	<b>52</b>
<i>NALC-NaOH uygulandıktan sonra</i>			
Pozitif	1	0	1
Negatif	8	43	51
<b>Toplam</b>	<b>9</b>	<b>43</b>	<b>52</b>

Görüldüğü gibi steril vücut sıvısı örneklerine NALC-NaOH ile homojenizasyon uygulanması, PZR yöntemiyle alınan pozitiflik oranı anlamlı derecede azaltmıştır.

Löwenstein-Jensen besiyerinde kültürü yapılan balgam örneklerinin 23'ünde üreme saptandı ve üreyen bakteriler, *M. tuberculosis* kompleksine özgül primerlerle çoğaltma işlemine alınarak tüberküloz basili oldukları kanıtlandı. Kültür pozitif 23 örneğin 20'sinde NALC-NaOH uygulanmadan yapılan PZR pozitif iken, NALC-NaOH uygulandıktan sonra yalnızca 15 örnekle pozitif sonuç alındı. Aynı şekilde ARB pozitif idrar örneği kültürlerinden 6'sında (%9) ve steril vücut sıvısı örneklerinden 2'sinde (%4) kültürde saptandı ve bunların hepsinde NALC-NaOH uygulanmadan yapılan PZR pozitif iken, NALC-NaOH uygulamasından sonra yapılan PZR negatif bulundu.

Bütün klinik örnekler birlikte değerlendirildiğinde, örneklerin 66'sında (%24.3) ARB ve 31'inde (%11.4) kültür pozitifliği belirlendi. ARB pozitif örneklere göre PZR yönteminin duyarlılığı ve NALC-NaOH'ın buna etkisi Tablo IV'de verilmiştir.

Tablo IV: ARB Pozitif Örneklerde NALC-NaOH Aşamasının PZR Yönteminin Duyarlılığına Etkisi

Klinik örnek	PZR yönteminin duyarlılığı		P
	NALC-NaOH ile işlenmemiş N (%)	NALC-NaOH ile işlenmiş N (%)	
Balgam	39/41 (95)	17/41 (41)	<0.05
İdrar	15/16 (93)	5/16 (31)	<0.05
Steril vücut sıvısı	8/9 (89)	1/9 (11)	<0.05
<b>Toplam</b>	<b>62/66 (94)</b>	<b>23/66 (35)</b>	<b>&lt;0.05</b>

Kültür pozitif toplam 31 klinik örneğin 28'inde (%90) NALC-NaOH ile işleme alınmadan yapılan PZR ile pozitif sonuç alınırken, NALC-NaOH işlemi uygulamasından sonra PZR pozitifliği 15'e (%48) düşmüştür. İki oran arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p <0.05).

Standart bakteri yoğunlukları ile yapılan 14 denemeye ait bulgular Tablo V'de görülmektedir.

## TARTIŞMA

Tüberküloz basilinin varlığını kısa sürede saptamaya yönelik çeşitli moleküler yöntemler denenmektedir<sup>14,15</sup>. Bu yöntemlerden birisi de nükleik ait çoğaltma tekniklerinden olan polimeraz zincirleme reaksiyonu (PZR)'dur. PZR, mikroskop ve kültür yöntemiyle saptanması zor ya da olanaksız olan herhangi bir örnekteki tüberküloz basilinin saptanmasında en fazla umut veren yöntemlerin başında gelmektedir. Ancak yanlış negatiflik ve pozitiflikler yöntemin en önemli dezavantajlarıdır. Yalancı pozitiflikler çoğunlukla bir önceki deney sırasında çoğaltılan ve ortamda kalan çoğaltma ürünü veya başka bir örneğe ait

Tablo V: Standart Bakteri Yoğunluklarına Uygulanan NALC-NaOH Aşamasının PZR Duyarlılığına Etkisi

PZR	Standart Bakteri Yoğunluğu							
	10 <sup>6</sup>		10 <sup>4</sup>		10 <sup>2</sup>		10 <sup>1</sup>	
	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>NALC-NaOH uygulanmadan</i>	14	0	14	0	10	4	3	11
<i>NALC-NaOH uygulandıktan sonra</i>	13	1	11	3	3	11	1	13

mikobakteriyel DNA'nın çoğaltma tüpüne karışmasıyla meydana gelmektedir<sup>16,17</sup>. Diğer taraftan klinik örnekler içerisinde bulunan oldukça farklı komponentler ve örneklerin işlenmesinde kullanılan kimyasal maddeler de enzimatik reaksiyonlarda inhibitör etki yaparak yalancı negatif sonuçların alınmasına neden olabilmektedir<sup>12,17,18</sup>. Bütün bu olaylar farklı araştırmacılar tarafından kullanılan PZR ile değişik sonuçların alınmasını açıklamaktadır. Bu faktörlerin etkisine ilaveten, uygulanan çoğaltma koşulları, klinik örneklerin durumu ve sonuç gözlemede kullanılan yöntemlere bağlı olarak, bu testin duyarlılığı %67-100, özgüllüğü ise %23-100 arasında bildirilmektedir<sup>4,5,12,16,19</sup>.

NALC-NaOH ile yaptığımız denemelerde, örneklerin bu madde ile işlenmesi halinde PZR yönteminin duyarlılığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmalar kaydedilmiştir. NALC-NaOH'ın bu etkinliği, klinik örneklerde olduğu gibi standart bakteri süspansiyonları üzerinde yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir. NALC-NaOH ile muamele edilmeden yapılan PZR denemesinde ARB pozitif örneklerin %94'ünde pozitif sonuç alınırken, bu madde ile muameleden sonra pozitiflik %35'e inmiştir. Mililitresinde 10<sup>2</sup> bakteri bulunan örnekle yapılan 14 ayrı denemede NALC-NaOH'ın deneye girmesi halinde pozitiflik oranı %71'den %21'e inmektedir.

NALC-NaOH ile dekontaminasyondan sonra ve çöktürme işleminden önce fosfat tamponu ile nötralizasyon uygulamasının fosfat tuzlarının birikimine yol açtığı ve bunların da PZR'yi inhibe ettiği bilinmektedir<sup>15</sup>. Bu durumda çökeltinin en az üç kez Tris-EDTA gibi başka bir tampon veya su ile yıkanması veya DNA'nın reçine yardımıyla saflaştırılması önerilmektedir. Ancak çalışmamızda fosfat tamponu ile nötralizasyon yapılmamıştır. Bu durum da pH'nın yükselmesine ve PZR'yi inhibe etmesine yol açabilir. NALC-NaOH'ın inhibitör etkisinin pH'dan kaynaklanabileceği düşünülerek, işlenmiş örneklerin pelletlerinin pH'sı ölçülmüş ve pH:7-9 arasında olduğu gözlenmiştir. pH'sı yüksek olanlar örnekler distile su ile yıkanmış ancak yıkamanın PZR sonucunu değiştirmedeği kaydedilmiştir (Bu denemelerin sonuçları burada gösterilmemiştir).

Yapılan çalışmalarda balgam örneklerinin dekontaminasyonu, homojenizasyon ve konsantrasyonunda NALC-NaOH, NaOH, sodium lauryl sulfate-NaOH

ve sputolysin-NaOH protokolleri uygulandığında, *M. tuberculosis*'e özgü PZR duyarlılığının %3-52 oranında azaldığı kaydedilmektedir<sup>20-22</sup>.

Örnek işlemede kullanılan yöntem ve maddelerin inhibitör etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla birçok araştırma yapılmıştır. Bir çalışmada, örnek hazırlamada chatrope-silica metodu kullanıldığında, PZR yönteminin duyarlılığı %75, özgüllüğü %100 olarak saptanmış ve kloroform metodu kullanıldığında yöntemin duyarlılığının %92, özgüllüğünün ise %99 olduğu bildirilmiştir<sup>23</sup>. Noordhoek ve arkadaşları<sup>12</sup>, DNA izolasyonu ve saflaştırılmasında farklı yöntemlerin kullanıldığı yedi laboratuvarın sonuçlarını değerlendirmişler, kullanılan yöntemlerin farklılığına göre testin duyarlılık ve özgüllüğünün önemli ölçüde değiştiğini göstermişlerdir.

Bu çalışmada NALC-NaOH yönteminin inhibitör etkisinden kaçınmak amacıyla, balgam örneklerinin homojenizasyonunda vorteks yöntemi kullanılmış ve sonuçta testin duyarlılığında anlamlı derecede artış gözlenmiştir. Buradan hareketle balgam gibi homojenizasyon gerektiren tüm klinik örneklerin NALC-NaOH ile işlenmeden, uygulaması kolay vorteks yöntemiyle homojenize edilerek DNA izolasyonuna geçilmesinin yararlı olacağı kanısındayız. Ayrıca idrar gibi homojenizasyon gerektirmeyen örneklerin çökeltilerine dekontaminasyon uygulanmadan DNA izolasyonuna geçilmesi PZR'nin duyarlılığını artıracaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Bilgehan H: Klinik Mikrobiyoloji, s: 330-358. 1996, 9. Baskı. Barış Yayınları, İzmir.
2. Kocabaş A: Akciğer tüberkülozu, s: 396-428. Topçu AW, Doğanay M (Eds), Infeksiyon Hastalıkları. 1996, Nobel Tıp Kitabevi, Bursa.
3. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN: *Mycobacteria*, pp: 263-272. In: Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 1995, 20<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall International Inc. U.S.A.
4. Moore DF, Curry JI: Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplicor PCR. J Clin Microbiol 1995, 33: 2686-2691.
5. Beige J, Lokies J, Schaberg T, et al: Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. J Clin Microbiol 1995, 33: 90-95.
6. Cartuyvels R, Ridder CD, Jonckheere S, Verbist L, Eldere JV: Prospective clinical evaluation of amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test as a screening method in a low-prevalence population. J Clin Microbiol 1996, 34: 2001-2003.
7. Bennedsen J, Thomsen VO, Pfyffer GE, et al: Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 1996, 34: 1407-1411.
8. Yajko DM, Wagner C, Tvere VJ, Kocagöz T, Hadley WK, Chambers HF: Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the amplicor PCR assay. J Clin Microbiol 1995, 33: 1944-1947.
9. Kox LFF, Rhienthong D, Miranda AM et al: A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clin Microbiol 1994, 32: 672-678.
10. Kirchner P, Rosenau J, Springer B, Teschner K, Feldman K, Böttger EC: Diagnosis of mycobacterial infections by nucleic acid amplification. 18-months prospective study. J Clin Microbiol 1996, 34:304-312.
11. Durmaz R, Durmaz B, Günal S: Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. Turk J Med Sci 1997, 27: 291-295.

12. Noordhoek GT, Kolk AHJ, Bjune G et al: Sensitivity and specificity of the PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: A blind comparison study among seven laboratories. J Clin Microbiol 1994, 32: 277-284.
13. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (Eds): Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, pp: 893-952, 1997, 5<sup>th</sup> ed. JB Lippincott Company, Philadelphia.
14. Eisenach DK, Sifford MD, Donald M, Joseph HB, Crawford JT: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. Am Rev Respir Dis 1991, 144: 1160-1163.
15. Kocagöz T: Yeni laboratuvar yöntemleri ile tüberküloz tanısı, s: 29-33. Tümbay E (Ed), 1. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu Kitabı. 1996, Bursa.
16. Durmaz R: Moleküler yöntemlerin uygulanmasında karşılaşılan sorunlar, s: 78-85. IV Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu Kitabı. 1998, Ankara.
17. Persing DH, Cimino GD: Amplification product inactivation method, pp: 105-121. In: Persing DM, Smith TF, Tenover TC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications. 1993, ASM Press, Washington DC.
18. Greenfield Z, White TJ: Sample preparation methods, pp: 122-137. In: Persing DM, Smith TF, Tenover TC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications. 1993, ASM Press, Washington DC.
19. Abe C, Hirano K, Wada M, et al : Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. J Clin Microbiol 1993, 31: 3270-3274.
20. Nolte FS, Methock B, Jr McGowan JE, et al: Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. J Clin Microbiol 1993, 31: 1777-1782.
21. Leckie GW, Erickson DD, He Q, et al : Method for reduction of inhibition in a *Mycobacterium tuberculosis*-specific ligase chain reaction DNA amplification assay. J Clin Microbiol 1998, 36: 764-767.
22. Amicosante M, Richeldi L, Trenti G, et al : Inactivation of polymerase inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* DNA amplification in sputum by using capture resin. J Clin Microbiol 1995, 33: 629-630.
23. Stuart MW, Ruth M, Pamela MN, Peter DGF, Neil GS, Alister V: Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol 1993, 31: 776-782.