

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LABORATUVAR YAPIMI BİR PCR YÖNTEMİ İLE *MYCOBACTERIUM*
***TUBERCULOSIS* KOMPLEKSİNİN SAPTANMASI**

Uzm. Bio. Veli TATO

Mikrobiyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LABORATUVAR YAPIMI BİR PCR YÖNTEMİ İLE *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS KOMPLEKSİNİN SAPTANMASI

Uzm. Bio. Veli TATO

Mikrobiyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Alpaslan ALP

ANKARA
2024

**LABORATUVAR YAPIMI BİR POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)
YÖNTEMİ İLE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKSİNİN
SAPTANMASI**

Uzm. Bio. Veli Tato

Danışman: Prof. Dr. Alpaslan Alp

Bu tez çalışması 11/07/2024 tarihinde jürimiz tarafından “Mikrobiyoloji Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Özgen Eser (imza)

Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Zeynep Sarıbaş (imza)

Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Dolunay Gülmez Kıvanç (imza)

Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Aydın Karaarslan (imza)

Ankara Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Ali Albay (imza)

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

23 Temmuz 2024

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

11 /7/2024

Uzm. Bio. Veli Tato

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Alpaslan ALP danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

(İmza)

Uzm. Bio Veli TATO

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca engin bilgisi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, fikirlerimi destekleyip çalışmalarımda yanımda olan, karşılaştığım zorluklarda yeni çözümler üretilip beni cesaretlendiren değerli tez danışmanım Prof. Dr. Alpaslan Alp'e çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyelerine teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

İstatistiki hesaplamalarda yardımcı olan Hacettepe Üniversitesi Biyoinformatik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Erdem Karabulut'a, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, desteğiyle beni cesaretlendiren ve sürekli yanımda olan manevi ağabeyim Fatih Sarıkaya'ya, tüberküloz laboratuvarındaki çalışmalarım da bana destek olan Sevda Coşkun'a, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarındaki çalışmalarım da bana destek olan Gülten Nur Sarı'ya çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca yanımda olan ve büyük bir sabırla beni sürekli destekleyen kıymetli eşime, evimizin huzur kaynakları çocuklarım Ekin ve Asya'ya çok teşekkür ederim.

TDK-2023-20650 numaralı bu projeye destek veren Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Uzm. Bio. Veli TATO

ÖZET

Tato, V. Laboratuvar Yapımı Bir Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle *Mycobacterium tuberculosis* Kompleksinin Saptanması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2024. Bu çalışmanın amacı, *senX3-regX3* gen sistemi hedef alınarak ve özgün primerler kullanılarak geliştirilen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time PCR) testinin, MTBK'nin saptanmasındaki etkinliğini ortaya koymaktır. Bu amaçla, MTBK için özgül ve iyi korunmuş bir bölge olan *senX3-regX3* gen bölgesini hedef alan iki farklı primer-prob seti tasarlanmıştır. Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarında TB tanısı konmuş hastaların balgam örneklerinden izole edilen 20 MTBK izolatının saf kültürlerine sekizer adet seri dilüsyon yapılarak elde edilen 160 örnek kullanılmıştır. Yirmi adet negatif kontrol grubu izolatının eklenmesiyle toplam örnek sayısı 180 olmuştur. MTBK *senX3* ve *regX3* hedef gen bölgeleri için tasarlanmış primer ve prob setleri ile geliştirilmiş olan iki farklı laboratuvar yapımı ('in-house') gerçek zamanlı PCR testi örneklerle uygulanmıştır. Örnekler eş zamanlı olarak altın standart kültür yöntemi olarak Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerine de ekilmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda *senX3* gen bölgesinin hedef alındığı laboratuvar yapımı gerçek zamanlı PCR testinin duyarlılığı %95,8; özgüllüğü ise %95 olarak saptanmıştır. *regX3* gen bölgesinin hedef olarak alındığı laboratuvar yapımı gerçek zamanlı PCR testinde ise duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %97,5 ve %90 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışmada MTBK saptanması amacıyla geliştirilen laboratuvar yapımı gerçek zamanlı PCR tanı testi için hedef olarak seçilen *senX3-regX3* gen bölgesi ile ümit verici sonuçlar alınmıştır. Bu bölgenin farklı moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesinde iyi bir hedef bölge olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi, gerçek zamanlı PCR, *senX3*, *regX3*, laboratuvar yapımı test.

Destekleyen kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi, Proje No: TDK-2023-20650.

ABSTRACT

Tato, V. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex by A Laboratory-Made Polymerase Chain Reaction (PCR) Method. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, PhD Thesis in Microbiology, Ankara, 2024.

The aim of this study is to demonstrate the effectiveness of the real-time PCR method, developed by targeting the *senX3-regX3* gene system and using specific primers, in detecting MTBC pathogen. For this purpose, two different primer-probe sets were designed targeting the *senX3-regX3* gene region, which is a specific and well-conserved region for MTBC. In this study, 160 samples obtained by preparing eight serial dilutions of pure cultures of 20 MTBC isolates isolated from sputum samples of patients diagnosed as tuberculosis at Hacettepe University Hospitals Central Laboratory were used. With the addition of twenty negative control group isolates, the total number of samples became 180. Two different laboratory-made real-time PCR tests developed with primer and probe sets designed for MTBC *senX3* and *regX3* target gene regions were applied to the samples. The samples were simultaneously inoculated on Löwenstein-Jensen (LJ) medium as the gold standard culture method and the results were compared. As a result of the study, the sensitivity of the laboratory-made ('in-house') real-time PCR test targeting the *senX3* region was found to be 95.8% and the specificity was found to be 95%. The sensitivity and specificity for the laboratory-made real-time PCR test targeting the *regX3* gene region, were found to be 97.5% and 90%, respectively. As a result of this study, promising results were obtained with the *senX3-regX3* gene region selected as the target for the laboratory-made real-time PCR diagnostic test developed for the detection of MTBK. It is thought that this region may be a good target region for the development of different molecular diagnostic methods.

Key Words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* complex, real-time PCR, *senX3*, *regX3*, laboratory-made test.

Supporting organization: Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit, Project No: TDK-2023-20650.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tüberkülozun Tarihçesi	4
2.2. MTBK'nin Genel Özellikleri	6
2.3. Virülans Faktörleri	9
2.4. <i>M. tuberculosis</i> 'in Genomik Yapısı	13
2.5. Epidemiyoloji	15
2.6. Patogenez	18
2.7. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısı	21
2.7.1 Bakteriyolojik Tanı	21
2.7.2 İmmünolojik Tanı	26
2.7.3 Moleküler Tanı	27
2.7.4 Tüberküloz Tanısında Kullanılan Yenilikçi Yaklaşımlar	32
3. GEREÇ ve YÖNTEM	35
3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler	35
3.2. Örneklerin Seri Dilüsyonlarının Hazırlanması	36
3.3. Kültür	36
3.4. DNA İzolasyonu	36
3.5. Primer ve Probların Tasarlanması	37
3.6. Laboratuvar Yapımı Gerçek Zamanlı PCR Testinin Optimizasyonu	40
3.7. Gerçek Zamanlı PCR	41
3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi	42
4. BULGULAR	43
4.1. Kültür Sonuçları	43

4.2. senX3 Hedef Bölgesi için Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları	43
4.3. regX3 Hedef Bölgesi için Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları	47
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	58
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER	
EK-1 ETİK KURUL ONAYI	
EK-2 TEZ ORJİNALLİK RAPORU	
9. ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER ve KISALTMALAR

AG	Arabinogalaktan
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacilli Calmette-Guerin
Bç	Baz çifti
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats
ÇİD-TB	Çok ilaca dirençli tüberküloz
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
ELİSA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GC	Guanin-Sitozin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IFN-γ	İnterferon-gamma
INH	İzoniyaizid
LAM	Lipoarabinomannan
LM	Lipomannan
LJ	Löwenstein-Jensen
MGIT	Mycobacterium Growth Indicator Tube
MIRU	Mikobakteriyel Serpiştirilmiş Tekrar Üniteleri
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MTBK	Mycobacterium tuberculosis kompleksi
NALC	N-asetil-L-sistein
NAOH	Sodyum Hidroksit
NGS	Next Generation Sequencing (Yeni nesil dizileme)
PCR	Polimeraz Zincir (chain) Reaksiyonu
PG	Peptidoglikan
PIM	Fosfatidil-miyo-inositol mannosid
RIF	Rifampisin
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
TB	Tüberküloz
TDM	Trehalose dimycolate

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. <i>M. tuberculosis</i> 'in hücre duvar yapısı.	7
2.2. Mikobakterilerin virülansın da rol oynayan yapılar.	10
2.3. İki bileşenli düzenleyici sistem.	11
2.4. <i>senX3-regX3</i> intergenik bölge.	13
2.5. <i>M. tuberculosis</i> H37Rv genomu.	14
2.6. MTBK'nin filogenetik analizi.	15
2.7. 2010-2022 yılları arasında tüberküloza bağlı ölümlerin bölgelere göre dağılımı.	16
2.8. TB'nin bulaşması. TB hava yoluyla kişiden kişiye bulaşmaktadır.	19
2.9. Akciğer tüberkülozunun patofizyolojisi.	20
2.10. Aside dirençli boyama yöntemi ile boyanmış mikobakteri görüntüsü.	22
2.11. Floresan boyama yöntemi ile boyanmış mikobakteri görüntüsü.	23
2.12. LED mikroskobu.	23
3.1. <i>senX3</i> hedef bölgesi için tasarlanmış primer ve prob dizilerinin <i>M. tuberculosis</i> <i>senX3</i> gen dizisi üzerindeki yerleşimi.	38
3.2. <i>regX3</i> hedef bölgesi için tasarlanmış primer ve prob dizilerinin <i>M. tuberculosis</i> <i>regX3</i> gen dizisi üzerindeki yerleşimi.	39
4.1. 7 no'lu izolata ait <i>senX3</i> PCR sonuçlarının ekran görüntüsü.	44
4.2. 7 no'lu izolata ait <i>regX3</i> PCR sonuçlarının ekran görüntüsü.	47

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (MTBK) türlerinin genel özellikleri.	8
2.2. <i>M. tuberculosis</i> 'te bulunan iki bileşenli düzenleyici sistemler.	12
2.3. Mikobakterilerin üretilmesi amacıyla kullanılan besiyerleri.	24
2.4. Tüberküloz tanısında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması.	27
3.1. Çalışmada negatif kontrol olarak kullanılan TDM türlerinin sayıları.	35
3.2. <i>senX3</i> ve <i>regX3</i> hedef gen bölgelerinin saptanması için kullanılan primer dizileri.	37
3.3. <i>senX3</i> ve <i>regX3</i> hedef gen bölgelerinin saptanması için kullanılan prob dizileri.	38
3.4. <i>M. tuberculosis</i> H37Rv referans suş DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı PCR optimizasyon çalışması sonucunda elde edilen Ct değerleri.	41
4.1. <i>senX3</i> hedef bölgesi için gerçek zamanlı PCR sonuçları ve Ct değerleri.	45
4.2. <i>senX3</i> PCR ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması.	46
4.3. Altın standart kültür yöntemi ile kıyaslandığında <i>senX3</i> PCR tanı testinin analiz sonuçları (S:180).	47
4.4. <i>regX3</i> hedef bölgesi için gerçek zamanlı PCR sonuçları ve Ct değerleri	48
4.5. <i>regX3</i> PCR ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması.	49
4.6. Altın standart kültür yöntemi ile kıyaslandığında <i>regX3</i> PCR tanı testinin analiz sonuçları (S:180).	50

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin (MTBK) neden olduğu insan sağlığını tehdit eden bulaşıcı bir hastalıktır. Bu yüzden TB hastalığı dünya için ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2022 yılında yayımlanan raporunda, 10.6 milyon yeni tüberküloz olgusunun ortaya çıktığı ve bu olguların 1.6 milyonunun ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (1). Bu nedenle DSÖ tüberkülozla mücadele kapsamında, 2035 yılına kadar tüberkülozun neden olduğu ölümleri %95 oranında ve yeni tüberküloz olgularının ortaya çıkmasını da %90 oranında azaltmayı hedeflemektedir. Belirlenen bu hedeflere ulaşmak için tedavinin yanında, hızlı ve doğru tanı koyma da önemli bir yer tutmaktadır (2).

TB hastalığı Türkiye'de de önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. DSÖ'nün 2021 Küresel Tüberküloz Raporunda Türkiye'de 2021 yılı tahmini tüberküloz görülme sıklığı 15 (100.000 nüfusta), ölüm oranı ise 0,55 (100.000 nüfusta) olarak belirlenmiştir (3). 2020 yılında kayıt altına alınan tüberküloz sayısı 8.925 olarak bildirilmiştir (4). Bu veriler tüberküloz hastalığının ülkemizde hem toplum sağlığı hem de ekonomik açıdan önemli bir sorun olmaya devam ettiğini göstermektedir.

TB ile mücadelede erken ve doğru tanı önemli yer tutmaktadır. Rutin mikrobiyolojik tanı laboratuvarları, tüberküloz tanısı amacıyla altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemlerini ve aside dirençli boyama yöntemlerini kullanmaktadır. Fakat bu yöntemlerin bazı dezavantajları vardır. Kültür yöntemi, tüberküloz basilinin saptanması ve tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir referans yöntem olmasına rağmen, sonuçlanması zaman almaktadır (5). Bu durum doğru tedavinin başlanmasını geciktirerek hastalığın yayılmasına neden olabilmektedir. Aside dirençli boyama yöntemi ise klinik örnekte bulunan bakteri yükünden önemli ölçüde etkilendiğinden düşük duyarlılığa sahiptir. Özellikle düşük bakteri yoğunluğu, basillerin gözden kaçmasına ve hatalı negatif sonuca neden olabilmektedir (6). Bu yöntemin bir diğer dezavantajı ise, mikobakterilerin kümeleşme eğiliminden dolayı yanlış negatif sonuçlara yol açabilmesidir (7). Bu nedenlerden dolayı bütün bu olumsuzlukların üstesinden gelmek için bilim dünyasında moleküler

tanı yöntemlerine olan ilgi artmıştır. Böylece tanı laboratuvarları enfeksiyona neden olan mikroorganizmaları hızlı şekilde tanımlamak için nükleik asitlerin çoğaltılmasına dayalı tanımlama testlerini kullanmaya başlamıştır (8). Nükleik asit çoğaltma işlemi için birçok yöntem kullanılabilmesine rağmen, günümüzde gerçek zamanlı PCR yöntemi en yaygın kullanılan yöntemdir (8). Yapılan farklı çalışmalarda bu yöntemin MTBK DNA'sını saptamada kullanılabileceği gösterilmiştir (9, 10).

Nükleik asit ekstraksiyon yöntemine ek olarak, hedef olarak seçilecek gen bölgesi de mikroorganizmaların saptanmasında kullanılacak testlerin duyarlılığını etkileyecek en önemli etkenlerden biridir. Flores ve ark. (8) tarafından yapılan bir çalışmada, MTBK'ni laboratuvar yapımı ('*in-house*') PCR yöntemleri ile saptamaya çalışan 64 farklı yayın incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda PCR için seçilen hedef bölgenin MTBK saptanmasında önemli bir yere sahip olduğu görülmüştür. Bu yayında değerlendirilen 64 çalışmada da görüldüğü gibi, bugüne kadar MTBK'nin PCR ile saptanmasında en yaygın şekilde kullanılan hedef gen bölgesi *IS6110* tekrar dizisidir (11, 12). Ancak yapılan farklı çalışmalarda bazı MTBK suşlarında bu bölgenin eksik olması nedeniyle, *IS6110* tekrar dizisinin hedef olarak seçildiği testlerde hatalı negatif sonuçların alınabildiği belirtilmiştir (13-15). *IS6110* tekrar dizisi yanında, MTBK'nin PCR ile saptanmasında kullanılabilen diğer hedef bölgeleri *16S rRNA* ve *mtp40* genleridir. Bu hedef bölgelerinin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda *mtp40* geninin hedef olarak seçildiği testlerde de hatalı negatif ve pozitif sonuçların alınabildiği gösterilmiştir (16, 17). Ayrıca, *16S rRNA* hedef bölgesinin tüberküloza neden olmayan mikobakteri türlerinde de bulunması nedeniyle, tüberküloza yol açan mikobakterileri tek başına tanımlayamamaktadır (18). Tüm bu nedenlerle MTBK'nin PCR ile saptanmasında yeni hedef bölgelerin kullanılmasıyla, testin duyarlılık ve özgüllüğünün artırılabilceği düşünülmektedir. Yeni hedef bölge adaylarından biri olan *senX3-regX3* gen sistemi, MTBK'nde tanımlanan ilk iki bileşenli düzenleyici bileşendir (19). Magdalena ve ark. (18) tarafından yapılan çalışmada bu bölgenin MTBK'nde yüksek oranda korunduğunu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu gen sisteminin MTBK'nde enerji metabolizması, hücre duvarı yapımı

ve hücre içi düzenlemelerde görev alan birçok genin ifadesini kontrol etmesinin yanı sıra, basilin virülansına da katkıda bulunduğu bildirilmiştir (20-23).

Tüm bu nedenler çerçevesinde şekillenen bu çalışmada, senX3-regX3 gen bölgesi hedef alınarak gerçek zamanlı bir PCR yöntemi tasarlanmıştır. Bu amaçla Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarında tüberküloz tanısı konmuş hastaların balgam örneklerinden izole edilen 20 izolata sekizer adet seri dilüsyon yapılarak elde edilen örnekler kullanılmış ve özgün primerler tasarlanarak geliştirilmiş olan gerçek zamanlı PCR yönteminin MTBK'ni saptamadaki etkinliği araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tüberkülozun Tarihçesi

MTBK'nin tarihsel serüveni çok eskiye dayanmaktadır. Mycobacterium cinsinin 150 milyon yıl önce ortaya çıktığı varsayılmaktadır. MTBK'nin ilk atalarının üç milyon yıl önce Afrika'da yaşayan hominidleri enfekte ettiği bildirilmiştir (24). İşleyen evrimsel süreç ile birlikte bu ilk atalar değişikliğe uğrayarak 20 bin yıl önce MTBK'nin günümüzde yaşayan modern türlerinin atasını ortaya çıkarmıştır (25, 26).

Tüberküloz enfeksiyonunun ilk kanıtlarına M.Ö. 2400 yıllarındaki Mısır mumyalarında rastlanmıştır. Mumyaların iskeletlerinde tüberküloza özgü iskelet bozuklukları görülmüştür. Tüberküloza özgü bu iskelet bozuklukları Mısır sanat eserlerine de yansıtılmıştır (27, 28). Tüberkülozu anlatan ilk yazılı belgelere ise 3300 yıl önce Hindistan'da rastlanmıştır (29, 30). Ulaşılan bu kaynaklarda tüberküloz farklı isimlerde tanımlanmıştır. Tesniye ve Levi kitaplarında tüberkülozu anlatmak için 'schachepheh' kelimesi kullanılmıştır (31). Antik Yunan zamanında ise 'Phtisis' olarak adlandırılmıştır. Hipokrat 'Phtisis'i genç yetişkinlerde ölüme neden olan bir hastalık olarak adlandırmıştır. Tüberküloz hastalığını anlamaya yönelik ilk çalışmalar bu dönemde yapılmaya başlanmıştır. Yunanistan'da tüberkülozun bulaşıcı olduğunu ilk öne süren Isokrates olmuştur. Bunun yanında Aristoteles domuzlarda ve öküzlerde de bulaşıcı olduğunu öne sürmüştür. MS 174 yılında Roma imparatorunun kişisel doktoru olan Yunan Clarissimus Galen tüberkülozun belirtileri arasında ateş, terleme, öksürük ve kanlı balgam olduğunu söyleyip, hastalığın tedavisi için temiz hava, süt ve deniz yolculuğunu önermiştir (32-34). Roma İmparatorluğu'nun çöküşünden sonra ortaya koyulan bilimsel kanıtlar, tüberkülozun 19. yy.a kadar Avrupa'da da yaygın bir hastalık olduğunu göstermiştir (35).

Orta Çağ ve takibinde yeni çağa gelindiğinde ise tüberküloz ile ilgili bilgiler daha da artmaya başlamıştır. Orta Çağ'da Fransa ve İngiltere'de bu hastalık kralın kötülüğü (king's evil) olarak adlandırılmıştır. Bu dönemde hastalığın kralın dokunuşu ile iyileşeceğine inanılmaktaydı (36). Fransa ve İngiltere krallarının başlattığı kralın

dokunuşu uygulaması İngiltere’de 1714 yılında sonlanırken, Fransa’da 1825 yılına kadar devam etmiştir (37). Kralın dokunuşu uygulamasına karşı ilk alternatif tedaviyi Fransız cerrah Guy de Chauliac (1363) önermiş ve boyun bölgesindeki hastalıklı bezin damarlara ve sinirlere zarar vermeden cerrahi olarak çıkarılması gerektiğini belirtmiştir (38). Bu hastalığın bulaşıcı doğasına ait ilk net tanım 16. yy.’da Girolamo Fracastoro tarafından yapılmıştır (39). Francis Sylvius tarafından 1679 yılında kaleme alınan eserde (Opera Medica) bu hastalığı taşıyan insanlarda hastalığın apse, kavite ve ampiyeme doğru ilerlediği yazılmıştır (40). Bu hastalığın bulaşıcı doğasına ait ilk resmi atıf 1699 yılında Lucca Cumhuriyeti tarafından yayınlanan bir fermanda yapılmıştır. 1735 yılında ise hastaların zorunlu olarak bilgilendirilmesi ve izole edilmesi gerektiği bildirilmiştir (39).

Tüberküloz hastalığını tarif etmek için kullanılan tükenme (consumption) ve erime ‘‘Phthisis’’ terimleri 19. yy. ortasına kadar kullanılmaya devam etmiştir. Tüberküloz 18. yy.’da Batı Avrupa’da gençler arasında daha çok ölüme neden olduğu için gençliğin soyguncusu (the robber of youth) olarak adlandırılıyordu. Aynı yüzyılda bu hastalıktan etkilenen insanların yüzünün solgun olarak görünmesi beyaz veba olarak adlandırılmasına da neden olmuştur (33, 41). Yüzyıl sonra Avrupa ve Amerika’daki her dört ölümden birinin nedeninin tüberküloz kaynaklı olduğu bilindiği için, bu hastalık ölümlerin kaptanı olarak adlandırılmıştır. İskoç patolog Matthew Baille 1793 yılında, bu hastalığın neden olduğu peynir benzeri abselere tüberkül adını vermiştir (42). Tüberküloz terimini ise ilk kez Johann Lukas Schönlein kullanmıştır (33).

19. yy. başlarında tüberküloz hastalığının etiyopatolojik kökeni hakkında bilim dünyasında oldukça farklı bilimsel tartışmalar yapılmıştır. Güney Avrupa’da hastalığın bulaşıcı olduğu belirtilirken, Kuzey Avrupa’da bu hastalığın kalıtsal ve kanser türü olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında ‘Phthisis’ ve tüberküloz hastalıklarının farklı hastalık olduğu ve belirtilerinin aynı olduğu tartışılmıştır (37). Fransız Theophile Laennec 1819 yılında, tüberkülozun klinik belirtilerinin plörezi ve pulmoner kavitasyon olduğunu belirtmiştir (33). Tüberkülozun akciğerlerde ilk olarak miliyer (darı tohumu benzeri) olarak ortaya çıktığı, daha sonra kazeöz (peynir benzeri) forma

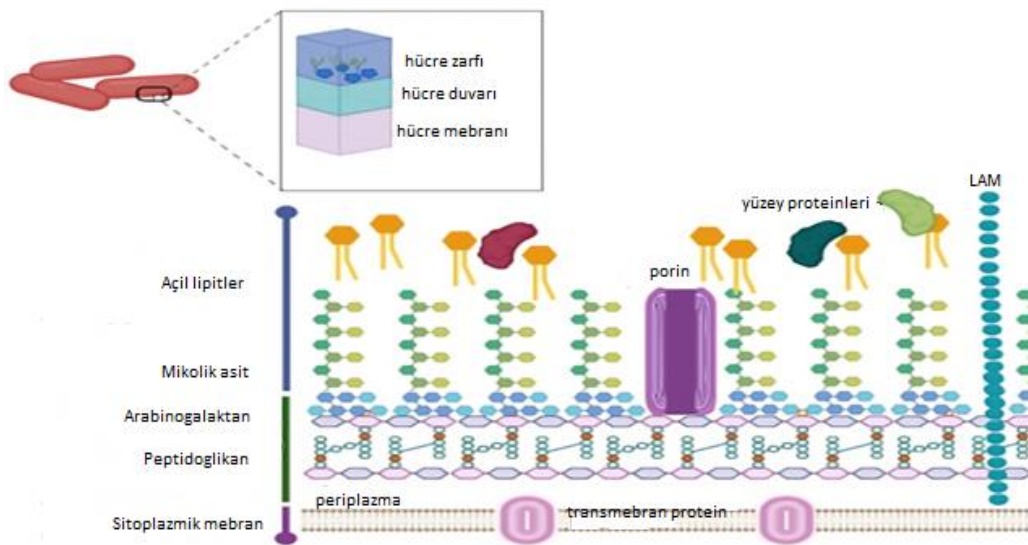
doğru ilerlediği ve en sonunda kavite oluşumu olduğu belirtilmiştir (33). MTBK'nin akciğer dışında gastrointestinal sistemi, kemikleri, eklemleri, sinir sistemini, lenf düğümlerini, genitoüriner sistemi ve deriyi de enfekte edebileceği belirtilmiştir (43, 44).

Tüberküloz hastalığının klinik belirtileri ile ilgili bilgilerin ortaya çıkmaya başlamasıyla birlikte bu hastalığa neden olan etkenin izolasyonu ile ilgili çalışmalar da hız kazanmaya başlamıştır. Alman doktor Philip Friedrich Hermann Klencke 1849 yılında tüberküloz basilinin insan ve hayvan formlarını deneysel olarak çoğaltmayı başarmıştır (45). Theodor Albrecht Edwin Klebs 1867 yılında, steril şişelerde saklanan yumurta akına tüberküloz basilini enjekte ederek bu basili izole etmeye çalışan ilk bilim adamı olmuştur (46). Tüberküloz basilini ilk kez izole eden bilim insanı Robert Koch olmuştur. Robert Koch tüberkülozla mücadelede önemli bir dönüm noktası olan bu sonucu 24 Mart 1882'de Berlin'deki Fizyoloji Derneği'ne sunmuştur. Robert Koch ayrıca tüberkülozun bulaşıcı etiyolojisinin aydınlatılmasına da katkıda bulunmuştur. Elde ettiği bu bilimsel sonuçlar nedeniyle 1905 yılında Nobel Tıp Ödülü'ne layık görülmüştür. Tüberküloz hakkında elde edilen bu bilimsel bilgiler tüberkülin deri testleri, Albert Calmette ve Camille Guérin (BCG) aşısı ve anti-tüberküloz ilaçların geliştirilmesine zemin hazırlamıştır (47).

2.2. MTBK'in Genel Özellikleri

Mycobacteriaceae ailesi çok çeşitli bakteri türlerini kapsamaktadır. MTBK'ne ait türler bu aile içinde yer almaktadır. Son yıllarda güncellenmiş olan bilgilere göre MTBK, insanlar ve hayvanlarda tüberküloz enfeksiyonuna neden olan genetik olarak yakından ilişkili olan dokuz türden oluşmaktadır (48). Bu türler *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii* ve *Mycobacterium caprae*'dir (48). Sonradan bu yedi türe ek olarak, iki yeni tür olan *Mycobacterium orygis* ve *Mycobacterium mungi* de MTBK içine alınmıştır (49). Kompleks içinde yer alan bu bakteri türleri spor oluşturmeyen, aerobik ve hareketsiz basillerden

oluşmaktadır (50). Mikobakteri ailesinde yer alan türlerin en önemli özelliği hücre duvarlarının diğer bakterilerde bulunmayan benzersiz ve kompleks bir yapıya sahip olmasıdır. Hücre geçirgenliğini etkileyen bu yapı, sitoplazmik membran, hücre duvarı ve dış katman olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır (51) (Şekil 2.1). Bu yapıların en önemli özelliği yüksek miktarda lipit içermesidir (52, 53). Bu yapılardan sitoplazmik membran bakteriye yapısal bütünlük ve destek sağlamaktadır (52). Sitoplazmik membran, arabinogalaktan (AG) ile kovalent bağlar oluşturan peptidoglikan (PG) tabaka tarafından sarılmıştır (52). PG tabaka dış etkenlere karşı bakteriyi koruyan fiziksel bir bariyer görevi görmektedir (54). Bu yapılara ek olarak diğer önemli bir bileşen mikolik asitlerdir. Mikolik asitler bakteriye hidrofobik özellik kazandırarak bakteriyi hidrofilik antibiyotiklere, oksidatif hasara ve komplemana karşı korumaktadır (55). Mikolik asitler esas olarak kompleks glikolipitlerle birlikte dış zarı oluşturmaktadır (52). Bu kompleks glikolipitler, konak hücre reseptörü ile etkileşime girerek basilin hücre içine alınmasında önemli rol oynarlar. Bu kompleks glikolipitlerin en önemlilerinden biri olan trehaloz dimikolat (TDM), kord faktörü olarak da bilinen önemli bir virülans faktörüdür (55). Mikobakteri hücre duvarının tüm bu özellikleri bakterinin zorlu koşullarda hayatta kalmasında önemli rol oynamaktadır (54, 55).



Şekil 2.1. *M. tuberculosis*'in hücre duvar yapısı (51).

MTBK içinde yer alan türlerin bir diğer önemli özelliği de üreme dinamiklerinin ve adapte oldukları konakların farklılık göstermesidir. Bu kompleks içinde yer alan türler genel olarak yavaş ürerler. Bu kompleks içinde bulunan türlerin adapte olduğu konak popülasyonları oldukça çeşitlilik göstermektedir. Örneğin *M. bovis* sığırlarda, *M. caprae* keçi ve koyunlarda, *M. pinnipedii* deniz aslanları ve foklarda, *M. microti* tarla farelerinde ve *M. orygis* ceylanlarda hastalığa neden olmaktadır (56, 57). MTBK üyelerinin özelliklerine genel bir bakış Tablo 2.1’de gösterilmektedir.

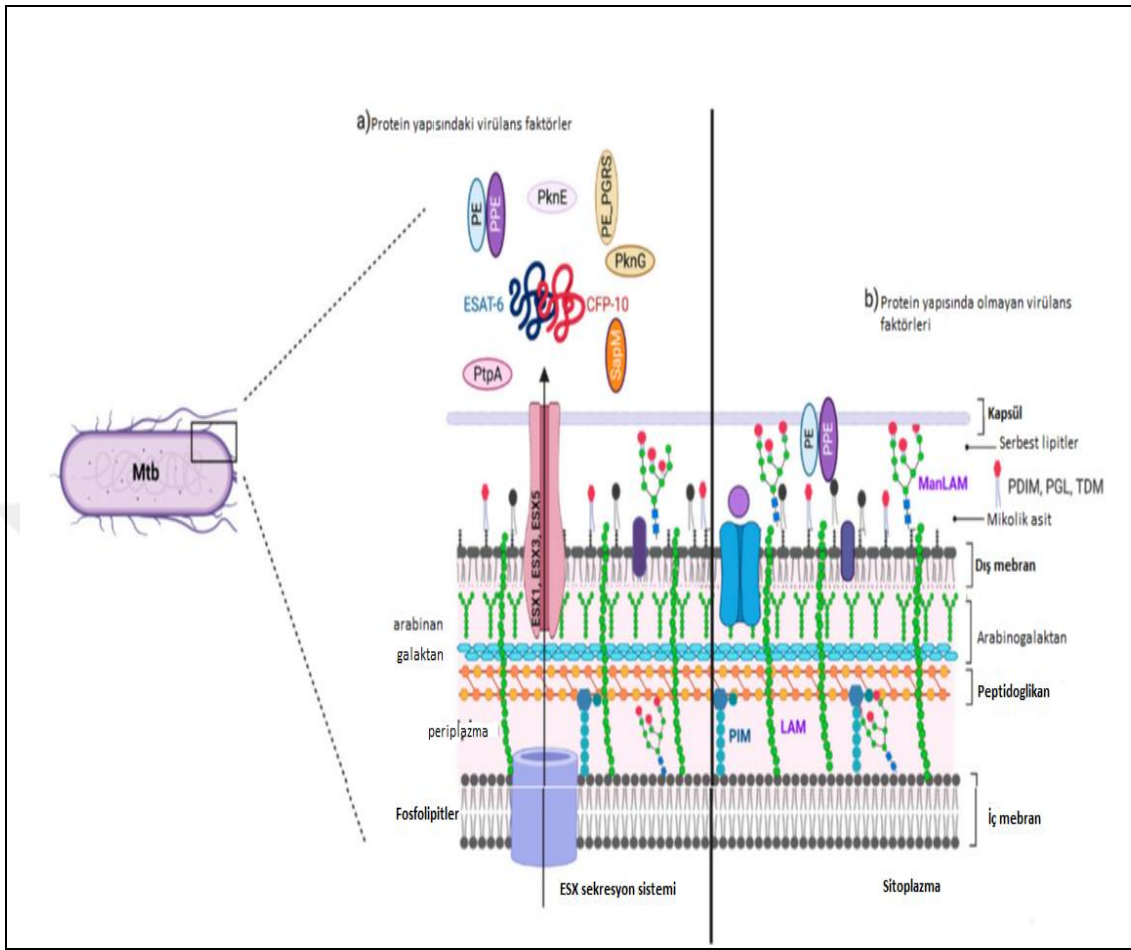
Tablo 2.1. *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBK) türlerinin genel özellikleri (48, 49).

MTBK türleri	Genel özellikleri
<i>M. tuberculosis</i>	- dünya üzerinde en yaygın tür. - dünya nüfusunun 1/4’ünü enfekte etmiştir. - insanlarla temas halindeki hayvanlara bulaşabilir.
<i>M. canettii</i> ve <i>M. africanum</i>	- <i>M. tuberculosis</i> ile yakın ilişkilidir.
<i>M. bovis</i>	- insanlarda tüberküloza neden olabilir. - genellikle Afrikalı hastalardan izole edilmektedir. - geniş bir konak yelpazesi vardır.
<i>M. bovis</i> var BCG	- <i>M. bovis</i>’in mutant formudur. - erken çocuklukta kullanılan tek aşının kaynağıdır.
<i>M. caprae</i>	- keçilerden izole edilmiştir.
<i>M. microti</i>	- kemirgenlerden kaynaklanan patojendir. - insanlarda hastalığa neden olabilir.
<i>M. pinnipedii</i>	- deniz aslanı ve fokları enfekte eder.
<i>M. mungi</i>	- fareleri enfekte eder.
<i>M. orygis</i>	- ceylan ve antilopları enfekte eder.

2.3. Virölans Faktörleri

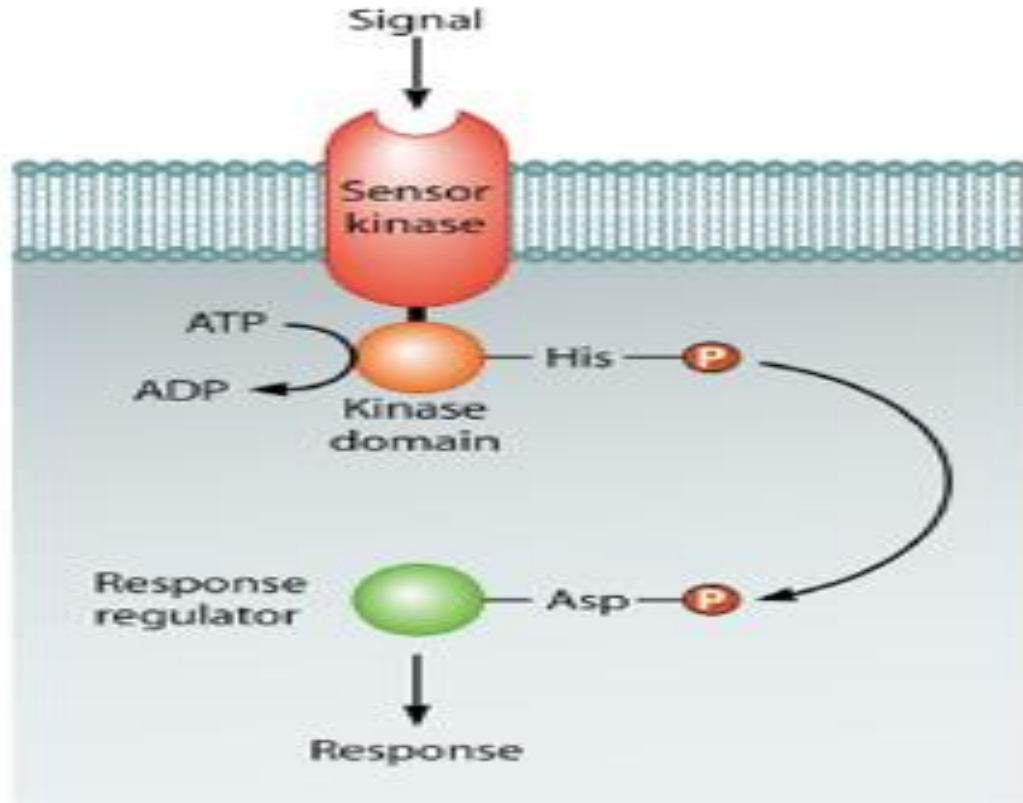
M. tuberculosis ağırlıklı olarak solunum yolunu etkileyen hücre içi bir patojendir. Konak bağışıklık sisteminden kaçmak için hücre içine yerleşerek hayatta kalmaya çalışır (58). *M. tuberculosis*'in hayatta kalmasında ve hastalık oluşturmada, sahip olduğu virölans faktörleri önemli rol oynamaktadır. *M. tuberculosis*'in en önemli özelliği hastalık oluştururken toksinleri ya da enzimleri kullanmaması, bunun yerine daha çok virölansla ilişkili gen ürünleri üzerinden bu işlemleri yürütmesidir (59).

Mikobakteriyel virölans faktörleri protein ve protein olmayan virölans faktörleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Protein olmayan virölans faktörlerine lipitler, glikolipitler, glikanlar, nükleik asitler ve metabolitler örnek olarak verilebilir. *M. tuberculosis* lipit açısından zengin bir hücre duvarına sahiptir (60). Fosfatidil-miyo-inositol mannosidler (PIM'ler) duvar yapısında en çok bulunan glikolipitlerdir. Bu glikolipitler lipomannan (LM) ve lipoarabinomannanın (LAM) öncüleridir. LM'ler Toll-benzeri reseptör-2 ve 4 aracılığı ile makrofajların aktivasyonunda önemli rol oynarlar (61). LAM'lar ise arabinoz kalıntılarına bağlı LM'lardan oluşmaktadır. Bu yapı konak hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerle etkileşime girerek bakterinin hücre içine alınmasında önemli rol oynar (62, 63). Bunların yanı sıra mikobakterilerin hücre duvarının kalınlığını etkileyen ve virölansda önemli rol oynayan diğer bir yapı mikolik asitlerdir. Bu yapı trehaloz şekerlere (trehalose-6,6'-dimikolat) bağlanarak önemli bir virölans faktör olan kord faktörünü oluşturur (63). Protein yapısında olmayan bu virölans faktörlerinin çoğu hücre yüzeyinde bulunan yapılardır. Protein yapısında olmayan bu virölans faktörleri, bakterinin konak hücre ile etkileşime girmesinde, hücre içine alınmasında ve hücre içinde hayatta kalmasında önemli rol oynarlar (60). Mikobakterilerde bulunan diğer önemli virölans faktörleri protein yapısındadır. Yapılan çalışmalarda protein yapısındaki bu virölans faktörlerinin konak immün yanıtını manipüle ederek bakterinin hayatta kalmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (59, 64). Mikobakterilerin patojenitesinde önemli rol oynayan virölans faktörleri Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Mikobakterilerin virülansın da rol oynayan yapılar (59).

Bu virülans faktörlerinin yanı sıra, iki bileşenli düzenleyici sistemler de patojenik bakterilerin virülansında önemli rol oynayan faktörler arasındadır (65). İki bileşenli düzenleyici sistemlerin ilk bileşeni, özgül bir uyarıya cevap verebilen bir algılayıcı kinazdır. İkinci bileşen ise belirli genlerin ekspresyonunu kontrol edebilen bir düzenleyicidir. Algılayıcı protein uyarım sonrasında otofosforilizasyona uğrar ve sonrasında bu fosfat, düzenleyici proteine transfer edilir. Düzenleyici, DNA bağlayan bir proteindir ve gen ekspresyonunu arttırabilir veya azaltabilir (66) (Şekil 2.3.).

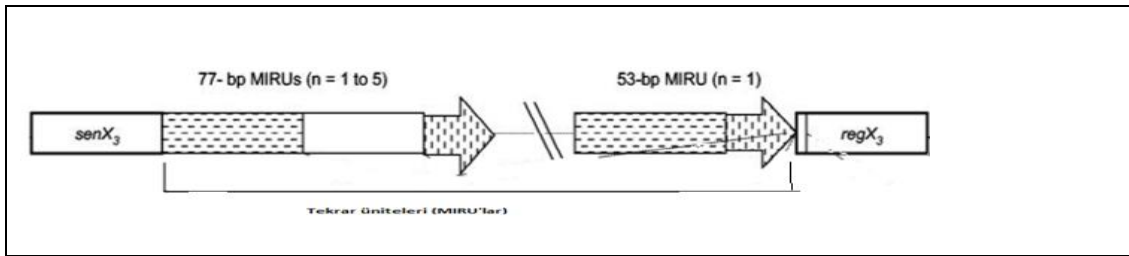


Şekil 2.3. İki bileşenli düzenleyici sistem (66).

M. tuberculosis'te çok sayıda iki bileşenli düzenleyici sistem vardır (Tablo 2.2) (66). Bu düzenleyici sistemlerin birçoğunun işlevi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışma kapsamında PCR hedef bölgesi olarak seçilen *senX3-regX3* intergenik bölgesi, MTBK'nde tanımlanan ilk iki bileşenli düzenleyici sistemdir (19). Bu düzenleyici sistemin MTBK'in virülansının yanı sıra inorganik fosfat yetersizliğinde hayatta kalmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (67). Fosfat yetersizliğinde *senX3* algılayıcı kinaz otofosforile olur. Bu aktivasyonla birlikte bu fosfat grubu *regX3*'e aktararak ilgili genlerin ifadesi düzenlenir. Bu intergenik bölgenin en önemli özelliği, *senX3* ve *regX3* genleri ve bu genler arasında bulunan 3 adet Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU) dizisi ile birlikte bir operonu oluşturmasıdır (Şekil 2.4) (68). Bu operon, bisistronik operon olarak görev yapmaktadır. Bunun yanı sıra operonda bulunan MIRU dizileri MTBK'nin genotiplendirme çalışmalarında da kullanılmaktadır (69).

Tablo 2.2. *M. tuberculosis*'te bulunan iki bileşenli düzenleyici sistemler (70).

Gen	Rolü	Görevi
<i>SenX3</i>	Algılayıcı	Virülans, fosfat alımı, solunum
<i>RegX3</i>	Düzenleyici	Gen ekspresyonu düzenlenmesi
<i>tcrA</i>	Düzenleyici	
<i>HK1</i>	Algılayıcı	
<i>HK2</i>	Algılayıcı	
<i>PhoP</i>	Düzenleyici	Esx-1 komponentlerinin salgılanması
<i>PhoR</i>	Algılayıcı	
<i>NarS</i>	Algılayıcı	
<i>NarL</i>	Düzenleyici	
<i>PrrA</i>	Düzenleyici	Hücre içi enfeksiyona adaptasyon
<i>PrrB</i>	Algılayıcı	
<i>MprA</i>	Düzenleyici	Stres yanıtı
<i>MprB</i>	Algılayıcı	
<i>KdpD</i>	Algılayıcı	Potasyum alımı
<i>KdpE</i>	Düzenleyici	
<i>TrcR</i>	Düzenleyici	
<i>TrcS</i>	Algılayıcı	
<i>MtrA</i>	Düzenleyici	DNA replikasyonu, hücre bölünmesi
<i>MtrB</i>	Algılayıcı	
<i>TcrX</i>	Düzenleyici	
<i>TcrY</i>	Algılayıcı	
<i>PdtaS</i>	Algılayıcı	
<i>PdtaR</i>	Düzenleyici	

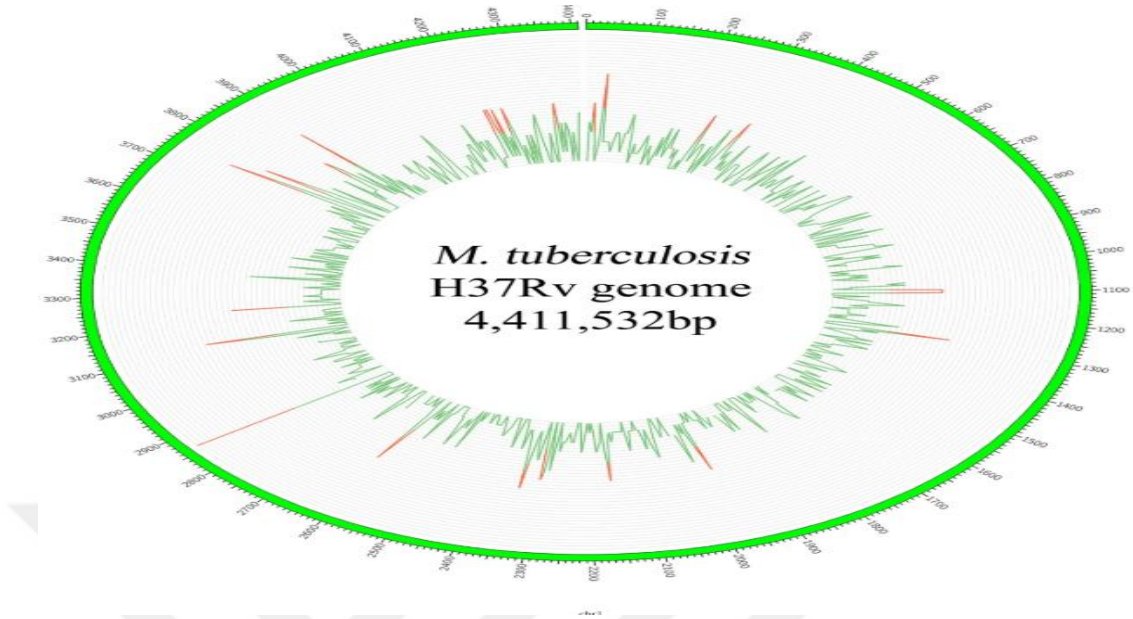


Şekil 2.4. *senX3-regX3* intergenik bölge (71).

2.4. *M. tuberculosis*'in Genomik Yapısı

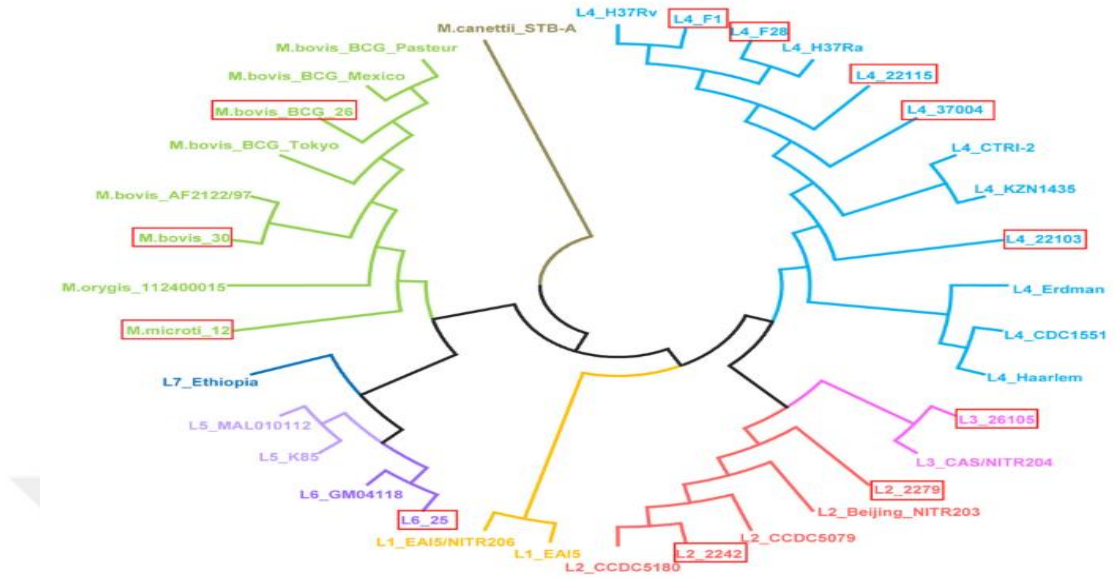
M. tuberculosis genom dizisinin ilk kez 1998 yılında yayınlanmasıyla birlikte MTBK'nde bulunan türler ile kapsamlı genomik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (72). Farklı moleküler tekniklerden yararlanarak yapılan bu çalışmalarla, MTBK'nde bulunan türler arasındaki genetik çeşitliliğin oldukça yüksek olduğu görülmüştür (73). Sonraki çalışmalarla bu genetik çeşitliliğin nedenleri de yavaşça aydınlatılmaya başlamıştır. Genetik çeşitliliğe neden olan birkaç faktör tanımlanabilmiştir. Kompleks içindeki bu genetik çeşitliliğe genomda bulunan *IS6110* bölgesinin sayısının oldukça büyük etkisi vardır. Bunun yanında polimorfik guanin-sitozin (GC) açısından zengin bölgelerin sayısı ve fark bölgeleri olarak bilinen kısa DNA dizilerinin de bu farklılıkta büyük etkisi olduğu bildirilmiştir (74, 75). Bütün bu faktörler gen ifadesinde önemli rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin ifadesini değiştirerek, konak yatkınlığı ve patojenitelerinde farklılık oluşmasına neden olmuştur (26, 76).

M. tuberculosis'in genomu guanin (G) ve sitozin (C) bazları açısından oldukça zengindir ve 4.411.532 baz çifti içermektedir (Şekil 2.5). 4000 gen ihtiva eden MTBK'nin genomunun yaklaşık %61'inin bu bazlardan oluştuğu bildirilmiştir (77).



Şekil 2.5. *M. tuberculosis* H37Rv genomu (78).

Genel olarak MTBK dokuz (L1-L9) filogenetik soya bölünmektedir (Şekil 2.6). Bu soy farklılıklarını dağıldıkları coğrafik bölge farklılıkları belirlemektedir. Bu soylardan L1 soyu Hint okyanusu ve Filipinler bölgesinde, L2 soyu Doğu Asya bölgesinde, L3 soyu Doğu Afrika ve Hindistan bölgesinde bulunmaktadır. L4 soyu Amerika ve Avrupa bölgesinde keşfedilmiştir. Buna ek olarak L5 ve L6 soyları (*M. africanum* soyları) Batı Afrika bölgesinde bulunmaktadır. L7 soyu ise Afrika boynuzu bölgesinde bulunmaktadır. L8 soyu ve L9 soyu ise Doğu Afrika bölgesinde bulunmaktadır (79, 80). İnsanlarda tüberküloz hastalığına daha çok L1-L4 ve L7 soyları neden olmaktadır (26, 73, 81). Ülkemizde tüberküloz hastalığına neden olan *M. tuberculosis* basili ise L4 soyu içinde bulunmaktadır (82). Bu farklı filogenetik soylar spoligotipleme profillerine bağlı olarak alt soylara da ayrılabilir (83).



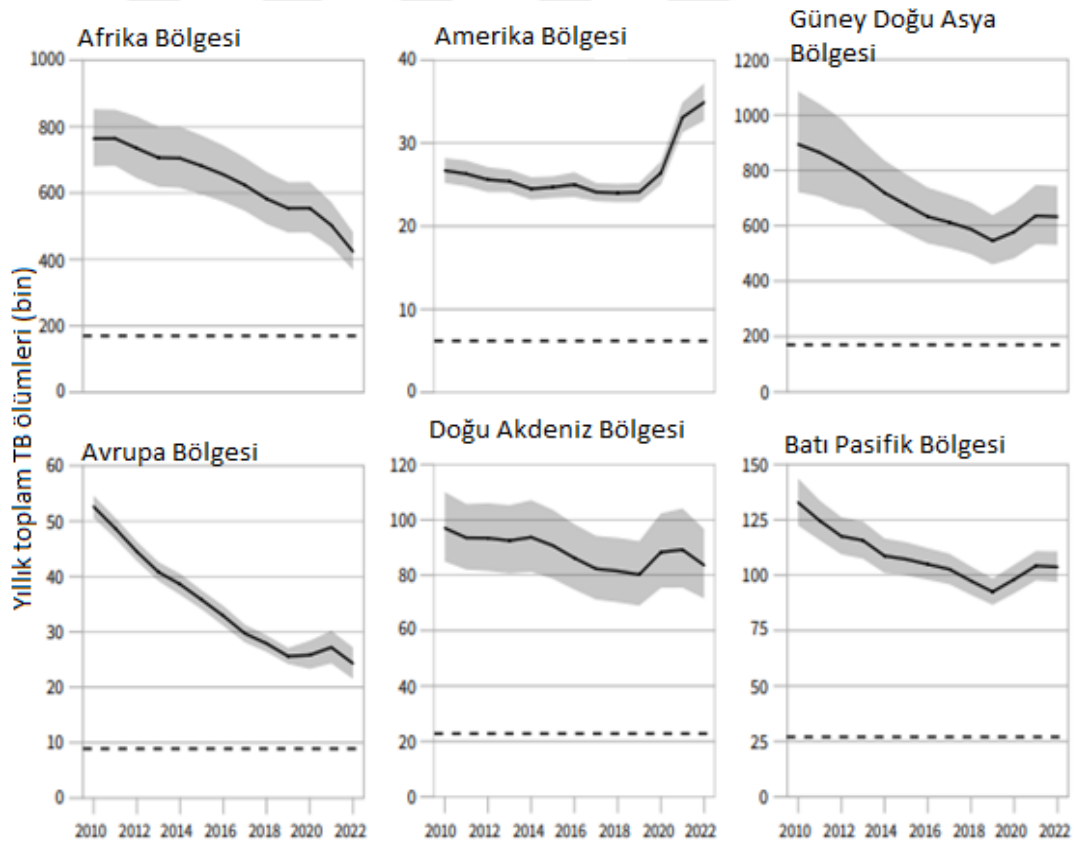
Şekil 2.6. MTBK'nin filogenetik analizi (84).

2.5 Epidemiyoloji

Tüberküloz, sağlık sorunlarına ve ölümlere neden olan bulaşıcı bir hastalıktır. Koronavirüs salgınına kadar tek bir enfeksiyon ajanının neden olduğu ölümler listesinde İnsan İmmün Yetmezlik Virüsünün (HIV) üzerinde ilk sırada yer almıştır (1). DSÖ'nün 2022 yılında yayınladığı küresel tüberküloz raporunda, 10,6 milyon kişinin tüberküloza yakalandığı ve bunların 1,6 milyonunun öldüğü bildirilmiştir (1). Dünya nüfusunun yaklaşık %22'sinin *M. tuberculosis* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Enfekte bireylerin yaklaşık olarak %10'nunda ise bağışıklık sisteminde meydana gelen anormalliklere bağlı olarak aktif TB hastalığı gelişmektedir. Tüberküloz hastalarının havaya verdikleri basilin sağlıklı bireyler tarafından solunmasıyla yayılan bu hastalık, akciğerleri etkilemesinin yanı sıra vücudun farklı organlarında da hastalık oluşturabilmektedir.

DSÖ'nün belirlediği politikalar çerçevesinde bu patojenle mücadelede önemli ilerlemeler yaşanmış olsa da, bazı olumsuz durumlar bu hastalık ile mücadeleyi oldukça zorlaştırmıştır. Olumsuz ekonomik şartlar, HIV ile yaşayan birey sayısının artması ve ilaç direncinin artması bu hastalıkla mücadeleyi oldukça olumsuz etkilemektedir (85, 86). Sosyoekonomik şartların, tüberkülozun dünyadaki dağılımı

üzerinde büyük bir etkisi vardır. Tüberküloz en çok sosyoekonomik durumun kötü olduğu sahra altı Afrika, Hindistan ve Güneydoğu Asya ülkelerinde görülürken, sosyoekonomik durumun daha iyi olduğu ABD, Kanada, Batı Avrupa, Japonya ve Avusturalya’da daha az görülmektedir (Şekil 2.7). Bunun yanı sıra ilaç direnci ve HIV enfeksiyonu da bu patojenle mücadeleyi olumsuz etkileyen ve maliyeti artıran diğer önemli faktörlerdir. İlaç direnci tüberkülozla mücadelede önemli yer tutan tedavinin etkinliğini bozarak hastalığın yayılmasına neden olmaktadır. HIV enfeksiyonu ise tüberküloz enfeksiyonunun aktif hastalık haline dönüşmesine zemin hazırlamaktadır. 2022 yılında TB HIV’li hastalarda dahil toplam 1,3 milyon kişinin ölümüne neden olmuştur. Bu ölümlerin 1,13 milyonunu HIV (-) bireyler oluştururken, 167.000’ini HIV (+) bireyler oluşturmuştur (87).



Şekil 2.7. 2010-2022 yılları arasında tüberküloza bağlı ölümlerin bölgelere göre dağılımı (87).

Tüberkülozun neden olduğu ölümleri azaltmanın önündeki bir diğer engel ise tanısı konulamayan hastaların uygun tedaviyi alamamasıdır. Her yıl 30 bin hastanın tanısı konulamadığı için gözden kaçtığı tahmin edilmektedir (88). Bunun için tanısı konamayan bu hastaların teşhisini yapabilecek stratejilerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Bu stratejiler arasında radyolojik tarama, semptom araştırmaları ve balgam taraması gibi yaklaşımlar gösterilmektedir (89, 90). Özellikle temas öyküsü olan, HIV pozitif olan ve sosyoekonomik durumu kötü olan popülasyonları hedef alan yaklaşımların bu amaca ulaşmada büyük yarar sağlayabileceği düşünülmektedir. Tanısı koyulamayan hastaların çoğunun Hindistan, Çin ve Endonazya'nın sosyoekonomik durumu kötü olan bölgelerinden olduğu bildirilmiştir (88). Bu bölgeleri öncelikli olarak hedef alan tarama stratejileri geliştirilebilir. Böylece dünya üzerinde tanısı konulmamış kayıp hastalara ulaşmada erken tanı ve tedavi açısından büyük bir avantaj sağlanabilir.

Tüberküloz küresel ölçekte neden olduğu sağlık sorunları gibi ülkemizde de önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Ülkemizde tüberküloz hasta verileri daha önce verem savaş dispanserlerinden aylık olarak gönderilen veriler üzerinden raporlanırken, 2006 yılından itibaren Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi uygulanarak hastalar bireysel olarak kayıt altına alınıp raporlanmaya başlanmıştır (91). Sağlık Bakanlığı tarafından 2021 yılında yayınlanan Verem Savaş Raporunda 2020 yılı için toplamda 8.925 TB hastası bildirilmiştir. Aynı raporda, bu TB hastalarının 87'sinin (%1,0) HIV (+) olduğu tespit edilmiştir (4). Bunun yanında ilaç direnci de ülkemiz için halen potansiyel bir tehlikedir. DSÖ ülkemizi çok ilaca dirençli tüberküloz açısından oldukça yüksek hasta yüküne sahip ülkeler arasına koymasa da, ilaca dirençli hastalar halen ülkemizde de bildirilmektedir (91). 2020 yılında ülkemizde %10,1'lik bir oranla en çok izoniyazid (INH) direnci görülmüştür. Çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) oranı yeni olgularda %2,2 iken, önceden tedavi görmüş olgularda %8,6 olarak belirlenmiştir. Her ne kadar en çok direnç önceden tedavi görmüş hastalarda görülse de, 2010 yılından sonra düşüş yaşanmaya başlanmıştır (4).

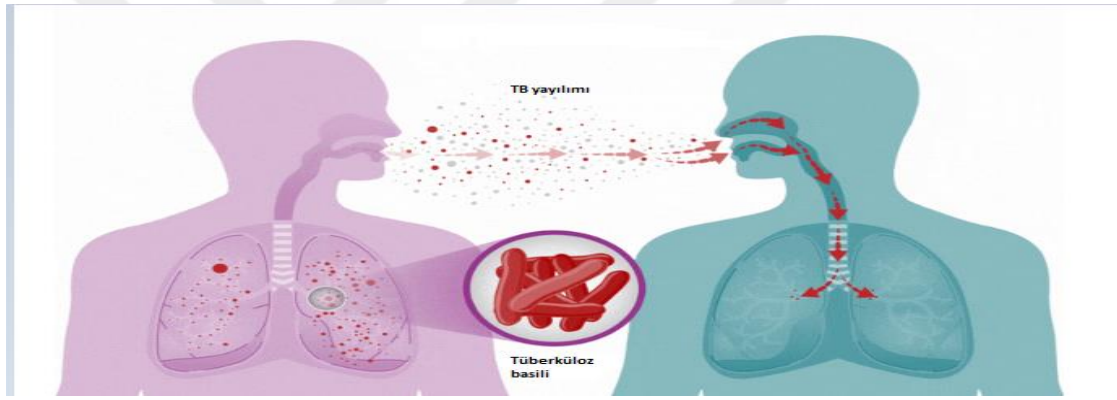
DSÖ'nün 2035 yılına kadar bu hastalığı bitirmek için belirlediği ilk hedefi, hasta sayılarını azaltmak ve mücadelede artan maliyetleri en aza indirmek olmuştur. Bu hedef DSÖ'nün 2016 yılından 2030 yılına kadar sürdürebilir kalkınma hedefi olmuştur (92). Fakat COVID-19 salgını tanı ve tedaviye erişimi sınırlayarak bu sürdürebilir kalkınma hedefini olumsuz etkilemiştir. Bu pandemi, tüberküloz hastalarının tanı testlerine erişimini engelleyerek yeni tüberküloz hastalarının sayısında düşüşe neden olmuştur. 2019 yılında yeni tanı konulan hasta sayısı 7,1 milyonken, 2020 yılında %18 düşüşle 2012 yılındaki seviye olan 5,8 milyona düşmüştür. 2021 yılına gelindiğinde ise kısmi toparlanma yaşanarak yeni tanı konulan hasta sayısı 6,4 milyona yükselmiştir (1). Tanı konulan hasta sayılarındaki bu düşüşler hastalığın daha çok yayılmasına ve daha fazla ölümlerin yaşanmasına neden olacaktır. Sonuç olarak bu durum DSÖ'nün tüberkülozu sonlandırma stratejisini olumsuz etkileyecektir.

Küresel ölçekte elde edilen epidemiyolojik veriler tüberküloz hastalığının halen önemli bir sorun olmaya devam ettiğini göstermektedir. Bu epidemiyolojik veriler bir yandan MTBK'nin neden olduğu sorunu ortaya koyarken, diğer taraftan dünya ülkelerinin bu hastalıkla mücadelesine önemli katkı sağlamaktadır. Fakat COVID-19 salgını başta tüberküloz hastalığı olmak üzere dünyada birçok alanı olumsuz olarak etkilemiştir. Bu durum yeni yol haritalarının geliştirilmesine zemin hazırlamıştır. Bütün bu veriler ışığında, bu patojenle mücadelede halen yürünmesi gereken önemli bir yol olduğu görülmektedir. Özellikle tanı ve tedavi ile ilgili moleküler epidemiyolojik çalışmalara oldukça ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

2.6. Patogenez

Tüberküloz hastalığı, tüberküloz basili içeren aerosoller aracılığı ile yayılır. Bu aerosoller aktif tüberküloz hastalığını taşıyan hastaların hapşırması ya da öksürmesi ile dışarı salınır (Şekil 2.8) (93). Ortama salınan bu partiküller yeni bir konak tarafından solunduğu zaman solunum sistemi aracılığı ile akciğerlere ulaşır. Akciğerlerde doğal immün sistem hücreleri enfeksiyon oluşumunu engellemek için aktive olmaya başlar. Bu aktivasyonla birlikte doğal bağışıklığın önemli bir elemanı olan alveolar makrofajlar basilleri fagosite ederek ortadan kaldırmaya çalışır. Alveolar

makrofajlar bu basilleri yok etmede başarısız olursa basiller çoğalarak makrofaj hücrelerinin patlamasına neden olur. Böylece serbest kalan basiller en yakın alveolar makrofajlar tarafından tekrar fagosite edilir. Bu döngü bu şekilde devam ederken, lenfositler ile birlikte immün yanıtta rol oynayan diğer hücreler enfeksiyon bölgesine hareket eder ve hücresel yanıt aktive edilir (93). Hücresel yanıtla birlikte bakterinin çoğalması ve yayılması sınırlandırılır (94). Bu aşamada hastalık herhangi bir semptom göstermezken, basiller granülom denen yapılar içinde tutulur (95). Bağışıklık sisteminde sonradan meydana gelen bozulmalar granülom içindeki basillerin serbest hale geçmesine neden olarak hastalığın yeniden aktifleşmesine ve klinik semptom vermesine neden olur (95).

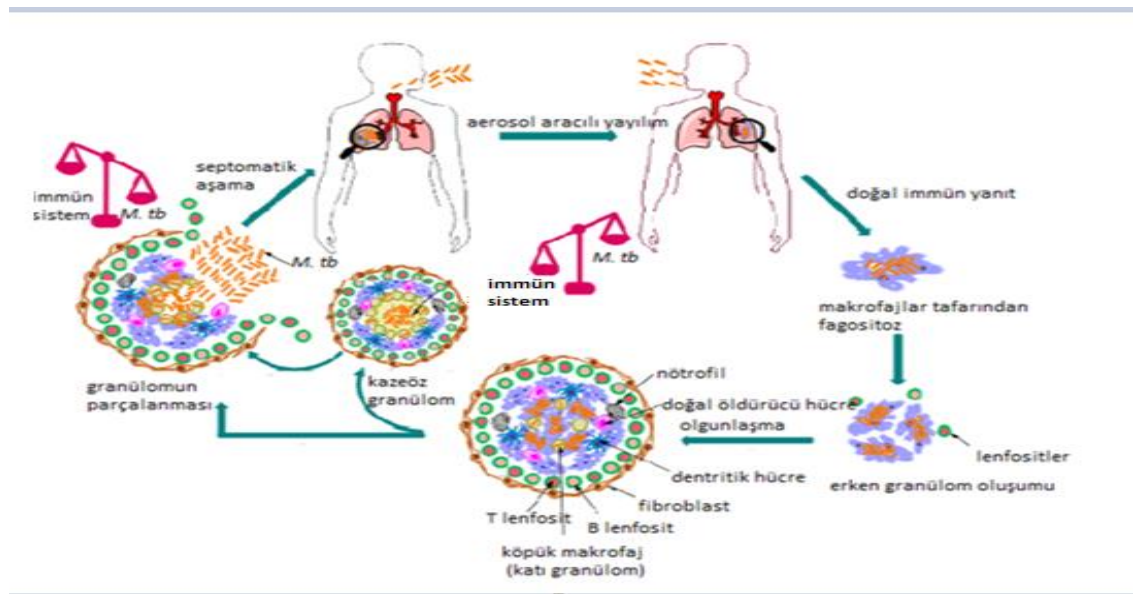


Şekil 2.8. TB'nin bulaşması. TB hava yoluyla kişiden kişiye bulaşmaktadır (96).

Granülom, makrofajların ve diğer bağışıklık hücrelerinin oluşturduğu, bakterinin yayılmasını engelleyen amorf bir yapıdır. Bu yapı akciğer tüberkülozunun temel bir özelliğidir (95). Bağışıklık sistemi tam olan bireylerde oluşan granülom, basilleri tam anlamıyla ortadan kaldırmasa da yayılımı önleyerek aktif hastalığın gelişimini engellemektedir (94). Bu durumda konak hastalık belirtisi göstermezken basiller latent fazda tutulur. Ancak bazen basiller kullandıkları stratejilerle bağışık yanıttan kaçarak hayatta kalabilmektedirler. Bu durum, basillerin hayatta kalarak yavaşça çoğalmasına ve aktif hastalığın gelişmesine katkı sağlamaktadır (94). Aktif hastalığa doğru ilerleme aşamasına bağlı olarak granülom morfolojileri de farklılık göstermektedir (97). Bu morfolojiler katı granülom, nekrotik granülom ve kazeöz granülom olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Hastalık gelişiminin erken aşamasında oluşan katı granülom akciğer

dokusunda hasara yol açar. Dolayısıyla tüberküloz hastalığı ile hem histolojik hem de patolojik olarak ilişki içindedir. Nekrotik bir merkezden yoksun olan bu granülom, tipik olarak fibrotik dokuyla çevrili olmasının yanında başta T lenfositler olmak üzere enfeksiyon kontrolünde önemli rol oynayan diğer bağışıklık hücrelerini de içermektedir (97). Hastalık ilerledikçe katı granülomun merkezindeki hücreler nekroza uğrayarak nekrotik granülomu oluşturur. Bu nekrotik granülomun merkezinin sıvılaşmasıyla birlikte kazeöz granülomlar meydana gelir (Şekil 2.10) (97-100).

Granülom morfolojisinde meydana gelen değişikliklere ek olarak granülom içinde bulunan makrofaj hücreleri de farklı morfolojlara değişebilmektedir (101). Kazeöz granülom oluşumu ile birlikte makrofajlar içinde lipid damlacıkları biriktirerek köpük makrofaj denen morfolojiye değişirler. Köpük makrofajlar nekrotik merkezin etrafını sararak bakterinin yayılımını sınırlandırır (102). Bunun yanında köpük makrofajların içinde biriktirilen yağ asitlerinin konağın lipid metabolizmasında düzensizlik meydana getirerek hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (101). Bu etkiyi hastalığın son aşamasında granülom yumuşamasına neden olup, kavite oluşumunu sağlayarak göstermektedirler. Bu durum, basillerin aktive olmasına ve yeni konaklara yayılmasına neden olur (Şekil 2.9) (101, 103).



Şekil 2.9. Akciğer tüberkülozunun patofizyolojisi (104).

Tüberküloz patogeneğinde etkili olan diğerk önemli bir faktör de konak bağışıklık sisteminin durumudur. Özellikle bağışıklık sistemini baskılayan HIV enfeksiyonunun aktif tüberküloz hastalığının gelişimindeki önemi bilinmesine rağmen, bu enfeksiyon dışındaki diğerk bazı durumlar da hastalığın yeniden aktive olmasına neden olabilmektedir. Bunlara yetersiz beslenme, alkol bağımlılığı, kemoterapi ve bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar örnek olarak verilebilir (94). Bütün bu durumlar, konak bağışıklık sisteminde bozulmaya neden olup, granülom içinde hareketsiz tutulan basilin aktive olup çoğalmasına neden olmaktadır (102). Çoğalan basiller akciğerk tüberkülozu gelişmesine ve kaviter lezyonların oluşmasına neden olur (94, 97). Bu aşamada hastalık bulaşıcı ve semptomatik hale gelir.

2.7. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısı

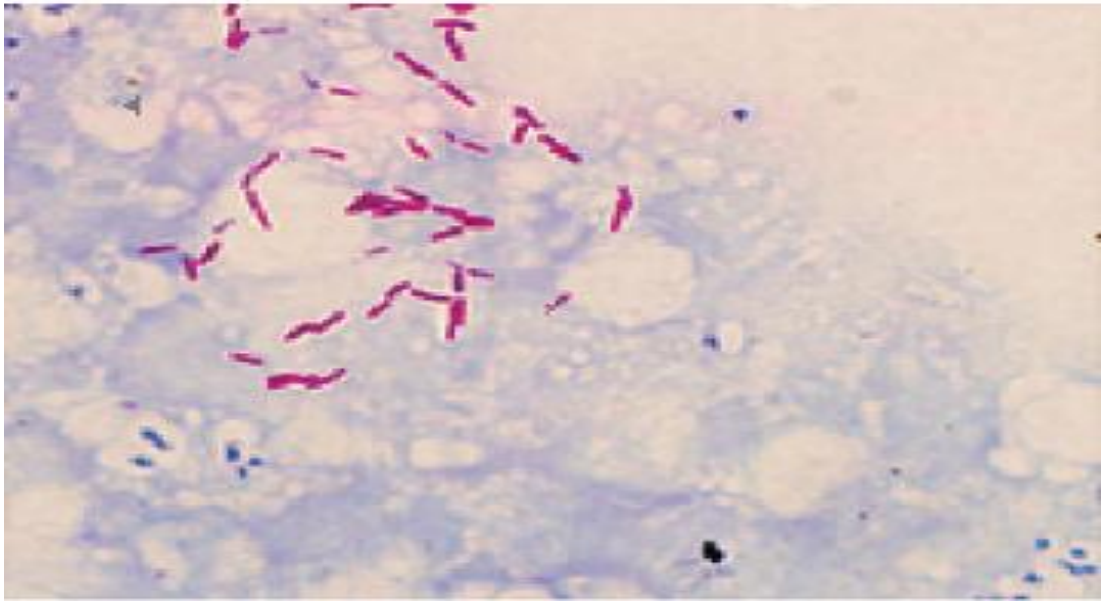
Tüberküloz hastalığı ile mücadelede hızlı ve doğru tanı oldukça önemli bir yere sahiptir (105). Hızlı ve doğru tespit, hastalığın yayılmasının önlenmesi yanında doğru tedavinin uygulanmasına da zemin hazırlamaktadır. Bu kapsamda DSÖ 2015 yılında, tanıyı ön planda tutarak, tüberkülozu durdurma stratejisini revize ederek tüberkülozu sonlandırma stratejisine geçmiştir (106). Tüberküloz hastalığının tanısında birçok yöntemden yararlanılmaktadır. Tüberküloz tanısında kullanılan yöntemler arasında bakteriyolojik, immünolojik ve moleküler tanı yöntemleri yer almaktadır. Kullanılan her yöntemin avantajları ve dezavantajları olması yanında, kesin tanı bu patojenin kültürde üretilmesiyle konulmaktadır.

2.7.1 Bakteriyolojik Tanı

Mikroskopik İnceleme

Direkt mikroskopik inceleme, birçok ülkede halen temel tanı testi olarak kullanılmaya devam etmektedir. Bu uygulamada en sık kullanılan yöntem, aside dirençli boyama yöntemidir. Bu yöntemde mikobakterilerin hücre duvarında bulunan yüksek lipit içeriğinden yararlanır. Bu lipit tabaka bir bariyer görevi görerek, asit-alkol ile yapılan renk giderme işlemine karşı direnç sağlayarak tüberküloz basilinin mikroskop altında görünür hale gelmesine aracılık eder (Şekil 2.10) (106). Boyalı

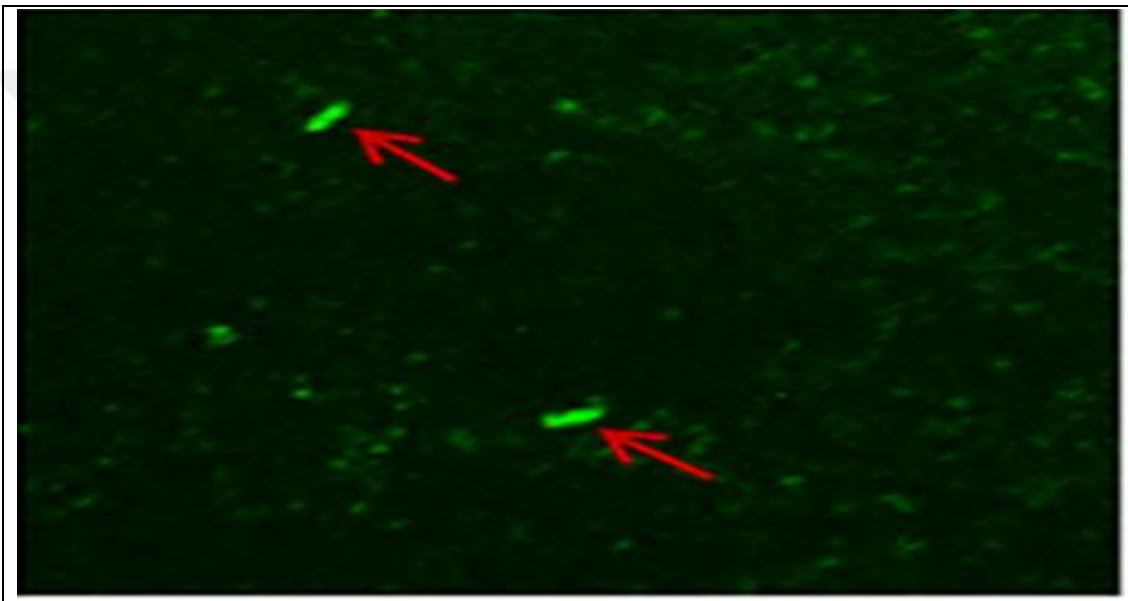
yayma preparatların mikroskopik incelemesinde aside dirençli basillerin görülebilmesi için örneğin mililitresinde en az 5000 basilin olması gereklidir. Direkt mikroskopik incelemenin en önemli sınırlamaları, duyarlılığının düşük olması ve tüberküloz dışı mikobakteri ayırımını yapamamasıdır. Yapılan çalışmalar duyarlılığın %20-%80 arasında değiştiğini göstermektedir (106). Özgüllüğü ise tüberküloz dışı mikobakterilerin görülme sıklığının düşük olduğu yerlerde %98'e kadar çıkabilmektedir (107). Mikroskopik inceleme sonuçlarını etkileyebilecek faktörler örneğin türü, yaymanın kalınlığı, boyama sırasında dekolorizasyon süresi ve incelemeyi yapan kişinin tecrübesidir.



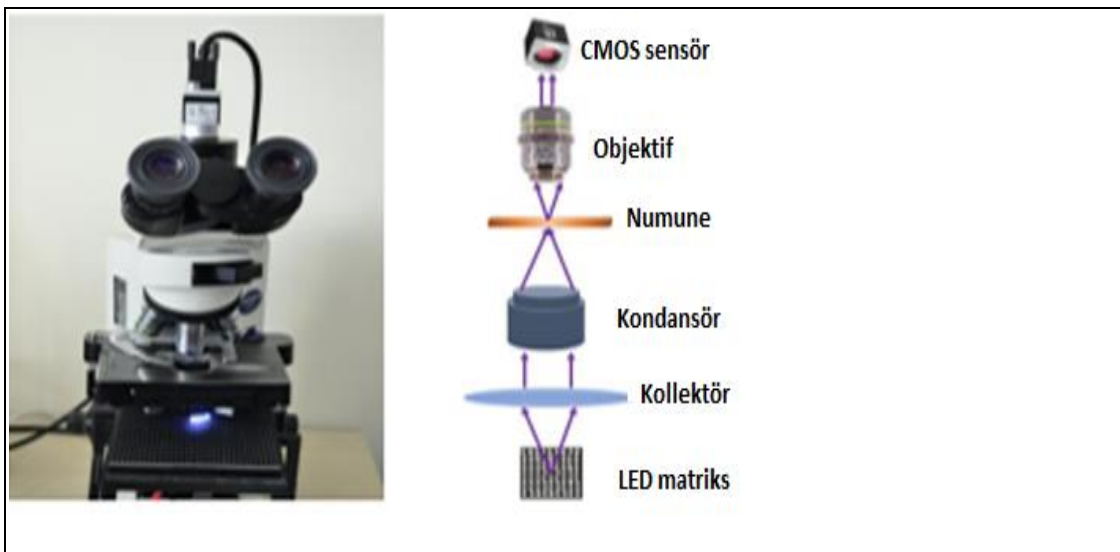
Şekil 2.10. Aside dirençli boyama yöntemi ile boyanmış mikobakteri görüntüsü (108).

Floresan mikroskobunun kullanıma girmesiyle direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığında artış izlenmiştir (Şekil 2.11). Floresan mikroskopisinin en büyük sınırlaması kullanılan floresan boyanın özgül olmayan bir bağlanma gösterebilmesidir (109). Floresan mikroskobunda ışık kaynağı olarak oldukça hassas ve pahalı olan basınçlı lambalar kullanılmaktadır (110). Bu durum floresan mikroskobunun kullanımını sınırlamıştır. Fakat zamanla daha sağlam ve pil ömrü uzun olan ışık yayan diyotlar (LED) geliştirilmiştir. Böylece DSÖ geleneksel floresan mikroskobu yerine

LED mikroskobunun kullanımını önermiştir (şekil 2.12) (106). Yakın zamanda yayma mikroskobisinde yenilik içeren çalışmalar da yapılmıştır. Bu çalışmalardan birisi Datta ve ark. (111) tarafından yapılan çalışmadır. Bu çalışmada boyama işlemi için floresan diasetat kullanılmıştır. Sonuç olarak bu boyama yönteminin canlı hücreleri boyadığı ve tedavi izleminde etkin olduğu bildirilmiştir. Mikroskobik incelemenin otomatik hale getirilmesi dahil bu yenilikçi yaklaşımların rutin kullanımı için halen daha fazla doğrulamaya ihtiyaç vardır.



Şekil 2.11. Floresan boyama yöntemi ile boyanmış mikobakteri görüntüsü (112).



Şekil 2.12. LED mikroskobu (113).

Direkt mikroskopik inceleme ucuz, hızlı ve tüberküloz insidansı yüksek olan yerlerde duyarlılığı yüksek olan bir testtir. Ucuz ve erişiminin kolay olması nedeniyle, gelişmemiş ülkelerde kullanım için halen avantajlı bir testtir. Bunların yanı sıra direkt mikroskopik incelemenin en önemli sınırlaması, basil yükü düşük olan numunelerde duyarlılığının düşük olması ve buna ek olarak ölü ve canlı hücre ayrımını yapamaması nedeniyle tedavi izleminde kullanılamamasıdır. Bu nedenlerle bu testin dezavantajlı kısımlarının halen iyileştirilmeye ihtiyacı vardır.

Kültür

Kültür yöntemi tüberküloz basilini izole etmenin yanı sıra ilaç duyarlılığını ortaya koymada kullanılan altın standart bir yöntemdir (106). Geleneksel olarak kullanılan kültür ortamları katı ve sıvı olarak ikiye ayrılmaktadır (Tablo 2.3). Katı besiyerleri daha ucuz ve diğer mikroorganizmalar tarafından kontaminasyona daha az açıktır. Bunun yanı sıra sıvı besiyerleri ise daha hızlı, hassas ve otomasyona daha uygun besiyerleridir (114-116).

Tablo 2.3. Mikobakterilerin üretilmesi amacıyla kullanılan besiyerleri.

Besiyeri çeşidi	Besiyerinin adı
Katı besiyeri	Löwenstein-Jensen Petragnani Ogawa Middlebrook 7H10 Middlebrook 7H11
Sıvı besiyeri	BACTEC MGIT sistemi MB/BacT ALERT sistemi Versa TREK Myco Dubos tween albümin Middlebrook 7H9

Kültür yapılması amacıyla alınan klinik örnekler normal flora ile kontamine olduğu için, kültür öncesi uygulanan dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi oldukça önemlidir. Rutin tanı laboratuvarlarında dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi için

çoğunlukla sodyum hidroksit (NaOH) ve N-asetil-L-sistein (NALC) yöntemi kullanılmaktadır (117). Kültür öncesi uygulanan bu ön işlemden kullanılan solüsyonların uygun konsantrasyonda ve uygun süreyle uygulanması kültür verimliliğini oldukça etkilemektedir.

Pozitif sonuç elde edilen kültürlerin bir sonraki aşamada MTBK veya tüberküloz dışı mikobakteri olarak tanımlanması, uygulanacak tedavinin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Bu ayrımı yapmak için geleneksel olarak kullanılan biyokimyasal yöntemler uzun zaman aldıkları için erken müdahalenin önünde bir engel oluşturmaktadır (118, 119). Bu yüzden daha hızlı tanımlama yapacak alternatif yöntemlere ihtiyaç doğmuştur. Bu yöntemlerden birisi tüberküloz basilinin çoğaldığı sırada salgıladığı MPT-64 proteinini saptamaya yönelik olan yöntemdir. Bu yöntemde, immünokromatografik prensipten yararlanılarak MPT-64 proteini saptamaya çalışılır. Brent ve ark. (120) tarafından yapılan bir meta-analiz çalışmasında bu yöntemin MTBK'ni saptama duyarlılığının %98.1 ile %98.6 arasında, özgüllüğünün ise %99.2 ile %100 arasında değiştiği belirtilmiştir. Pozitif kültürlerin ayırımında kullanılan bu immünokromatografik yöntemin bir diğer avantajı da hızlı ve basit olmasıdır. Bütün bu nedenlerden dolayı DSÖ pozitif kültürlerden hızlı tanımlama için bu yöntemi önermiştir (121).

Kültür yönteminin duyarlılığının yüksek olması, altın standart tanı yöntemi olarak kullanılmaya devam etmesini sağlamıştır. Bununla birlikte bu yöntemin bazı dezavantajları da mevcuttur. Bu dezavantajlarından biri, basil yükü düşük olan klinik örneklerde yanlış negatif sonuç verebilmesidir. Diğer bir dezavantajı ise sonuçların verilmesinin uzun zaman almasıdır. Tüberküloz basili yavaş çoğalan bir bakteri olduğu için kültürün sonuçlanması 4 ile 6 hafta sürebilmektedir (122). Ek olarak kültür yöntemi biyogüvenlik kabini ve eğitilmiş personel gerektiren bir yöntem olduğu için sosyoekonomik açıdan geri kalmış olan ülkelerde kullanımı sınırlı olan bir yöntemdir.

2.7.2 İmmünolojik Tanı

İmmünolojik tanı yöntemlerinde konak immün yanıt hücreleri veya patojenin kendisine ait olan antijenik yapılar hedef alınmaktadır.

Antikor Tespiti

Antikor tespit yönteminde, bu patojene özgül olarak oluşturulan antikorlar hedef olarak alınmaktadır. Bu tanı yöntemi yeterli duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmadığı için DSÖ tarafından önerilmemektedir (123).

Antijen Tespiti

Antijen tespit yönteminde klinik örneklerde bulunan patojene ait antijenik yapılar hedef olarak alınmaktadır. Bu testte prensip olarak ‘Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay’ (ELISA) yönteminden yararlanılmaktadır. MTBK’nin hücre duvarında bulunan lipoarabinomannan (LAM) tüberküloz tanısında kullanılan önemli bir antijenik yapıdır (124). Li ve ark. (125) tarafından yapılan meta-analiz çalışmasında, tüberküloz tanısında LAM’ı hedef alan yanal akış tanı testlerinin performansı incelenmiştir. FujiLAM adı verilen bu tanı testlerinin, erişkinlerde duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %70 ve %93 çıkarken, çocuklarda duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %51 ve %87 olarak bulunmuştur(125). Bu çalışma, duyarlılıkta istenilen düzeyin yakalanabilmesi için bu tanı testinin halen geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

İnterferon-Gamma (IFN- γ) Salınım Testleri

Bu testte, MTBK’ne özgü antijenlere maruz kalan lenfositler tarafından salgılanan interferon-gamma (IFN-G) sitokini kullanılmaktadır. Bu testin en önemli özelliği daha önceden yapılmış BCG aşısı ve pek çok atipik mikobakterilerin neden olduğu enfeksiyonlardan etkilenmemesidir (126). Ticari olarak T-SPOT.TB (T-SPOT; Oxford Immunotec, İngiltere) ve Quantiferon-TB (QFT; Qiagen, Almanya) olmak üzere iki test mevcuttur (127). Bu ticari testlerin en önemli avantajı patojen antijenine özgül

konak yanıtı ölçüldüğü için basil yüküne bağlı olmamasıdır. Bunun yanında latent tüberküloz hastalığını ortaya çıkarmada oldukça önemli bir testtir. Tüberküloz tanısında kullanılan yöntemlerin önemli özellikleri Tablo 2.4’de gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Tüberküloz tanısında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması (106).

Özellik	Xpert MTB/RIF	Mikroskopi	Kültür
Maliyeti	Pahalı	Ucuz	Pahalı
Testin uygulama kolaylığı	Yüksek	Yüksek	Düşük
Duyarlılık	Yüksek	Düşük	Yüksek
Özgüllük	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Avantaj	Hızlı, basit, ilaç direnci tespiti	Hızlı, basit	Tüm ilaç direncinin tespiti
Dezavantaj	Canlı ve ölü basil ayrımının yapılamaması	Canlı ve ölü basil ayrımının yapılamaması	Sonuçların geç çıkması

2.7.3 Moleküler Tanı

Moleküler tanı yöntemleri, tüberküloz hastalığının geleneksel tanısının sınırlamalarına alternatif olarak geliştirilmiş tanı yöntemleridir. Moleküler yöntemler özellikle tanımlama süresinin kısa olması nedeniyle hastalığın kontrol altına alınmasında önemli role sahiptir. Moleküler tanı yöntemlerinde nükleik asitlerin çoğaltılması ve

hibridizasyon başta olmak üzere birçok teknikten yararlanılmaktadır. Tüberküloz hastalığının tanısında nükleik asit çoğaltma testlerini baz alan yöntemlerde en yaygın olarak kullanılan hedef IS6110 bölgesidir (128). Bunun yanı sıra *M. tuberculosis*'in ribozomal RNA'sını (rRNA) ve deoksiribonükleik asidini (DNA) hedef alan testler de mevcuttur (129). Nükleik asitlerin çoğaltılmasına dayalı prensibi temel alan ve DSÖ tarafından önerilen ticari testlerden biri, Xpert/RIF MTB (Cepheid, Sunnyvale, Kaliforniya, ABD) testidir. Bunun yanında FDA tarafından yayma pozitif örneklerde kullanım için önerilen iki ticari test daha bulunmaktadır. Bu testler 'Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) Test' (Gen-Probe, Inc) ve 'Amplicor Mycobacterium tuberculosis Test' (Roche Molecular Systems, Inc) testleridir (129).

Gerçek Zamanlı PCR

Çoğaltılan ürünlerin elektroforez yapılmaksızın saptanmasına yönelik olarak yapılan çalışmalar sonucunda, gerçek zamanlı PCR yöntemi ve otomatize PCR sistemleri geliştirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, istendiğinde kantitatif sonuç da alınabilen bir PCR yöntemidir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır. Gerçek zamanlı PCR'da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının saptanması çeşitli şekillerde yapılabilmektedir (130).

'SYBR Green' Boyası Kullanılarak Real-Time PCR ile Amplifikasyonun Saptanması:

Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan 'SYBR green' miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresan miktarında artış gözlenir. 'SYBR green' yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandığında floresan veren bir boyadır. Ancak floresan artışı her zaman özgül çoğalmayı göstermeyebilir. Çünkü ortamda hedef DNA bulunmadığı

durumlarda ‘SYBR green’ primerlerin kendi aralarında gerçekleşebilecek bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda bu yapılara katılarak floresan oluşumuna neden olabilmektedir. Böyle durumlarda elde edilen floresan ışımının istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile gerçekleştiği, yoksa primer dimer oluşumu ile ortaya çıkmış özgül olmayan bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için “melting curve” (erime eğrisi) analizi yapılır. Her çift sarmal DNA kendine özgü “melting temperature, T_m ” (çift sarmal DNA’nın %50’sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PCR amplifikasyonu sonrasında sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresan ışım miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirlerinden ayrılmaya başlayınca ‘SYBR green’ boyası serbest kalır ve floresan miktarı azalmaya başlar. Erime eğrisinden yararlanılarak T_m derecesi hesaplanır. Klinik örneğe ait T_m derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün T_m derecesiyle karşılaştırılarak PCR sonucu elde edilen ürünün özgül ürün olup olmadığına karar verilir. T_m dereceleri aynı ise, aranan hedef bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirilmiş demektir. Farklı T_m dereceleri saptanması durumunda, elde edilen amplifikasyonun özgül olmayan bir ürüne ait olduğu sonucuna varılır (131).

Özgül Problar Kullanılarak Gerçek Zamanlı PCR ile Amplifikasyonun Saptanması (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer):

Özgül problardan biri 3’ ucundan floresan boya ile işaretli (donör boya), diğeri 5’ ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretlidir. Problar hedef bölge üzerinde birbirine yakın yere (1-5 nükleotit uzaklıkta) bağlanır ve işaretli uçlar yan yana gelmiş olur. İki boyanın yakınlaşmasıyla açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresan ışım oluşumuna neden olur. Oluşan floresan ışım miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine (PCR ile oluşan ürün miktarına) bağlı olarak artar (132).

TagMan probları kullanılarak Gerçek Zamanlı PCR ile Amplifikasyonun Saptanması:

Bu sistemde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli TaqMan problemleri kullanılır. Probun 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunur. Prob tek sarmal hale getirilen hedef bölge üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef bölge arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturmaması, 3' ucundaki baskılayıcı florokrom madde tarafından engellenir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için TaqDNA polimeraz enzimi 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' ucundan itibaren yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her döngüde üretilen ürün arttıkça, floresan ışımada miktarında artma gözlenir (133).

Xpert MTB/RIF Testi

Bu test, klinik örneklerden doğrudan MTBK'ni saptayan ve rifampisin (RİF) direncini ortaya çıkaran gerçek zamanlı PCR temelli bir moleküler tanı yöntemidir. RİF direncini ortaya koymak için *rpoB* geni hedef olarak alınmaktadır. Bu testin en büyük avantajlarından birisi bütün test tek bir kartuş içinde yürütüldüğünden çapraz kontaminasyon riskinin olmaması ve sonuçların iki saat gibi kısa bir sürede alınmasıdır (134, 135).

Yapılan çalışmalar bu testin hem tanı, hem de ilaç duyarlılığını ortaya çıkarmada yüksek bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Boehme ve ark. (136) tarafından yapılan çalışmada yayma ve kültür sonuçları pozitif olan örneklerde duyarlılığı %99,8 bulunurken, yayması negatif, kültürü pozitif olan örneklerde ise duyarlılık %99,2 olarak bulunmuştur. Bunun yanında aynı çalışmada bu testin ilaç direncini saptamadaki etkinliği de araştırılmıştır. İlaç direncini saptamak için yaygın olarak kullanılan fenotipik testlerle yapılan karşılaştırmada bu testin RİF direncini %97,6 duyarlılık ve %98 özgüllükle saptayabildiği gösterilmiştir. Bu test bu avantajları yanında bazı dezavantajlara da sahiptir. En önemli dezavantajı ölü ve canlı basilleri ayırt edememesi nedeniyle tedavi etkinliği takibinde kullanılamamasıdır (137).

Xpert Ultra, Xpert MTB/RIF testinin yeni bir versiyonudur. Geliştirilen bu testte birden çok hedef (*IS6110* ve *IS1081*) bulunduğu için duyarlılığı Xpert MTB/RIF testine göre daha yüksektir. Yapılan modifikasyonlar aracılığı ile duyarlılık %83'den %88'e çıkarılmıştır. DSÖ 2017 yılında çocuk ve erişkinlerde HIV enfeksiyonu varlığına bakılmaksızın bu testin başlangıç tanı testi olarak kullanılabileceğini belirtmiştir (106). Bu testin yanında yaygın ilaç direncini de ortaya çıkarabilen Xpert MTB XDR-TB testi, geliştirilen bir diğer testtir. 2020 yılında piyasaya sürülen bu testin halen klinik olarak daha çok doğrulanması gerekmektedir (106).

‘Hot-Start PCR’: PCR’da karşılaşılan en önemli sorunlardan biri, özgül olmayan çoğaltmaların meydana gelmesidir. Bunun en önemli nedenlerinden biri primerlerin daha ilk amplifikasyon basamağından önce, özgül olmayan bölgelere bağlanmasıdır. ‘Hot-Start PCR’ yöntemi, bu bağlanmalar sonrasında sentezin başlamasını önleyebilmek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yöntemde amaç, Taq polimeraz enziminin 94°C’lik denatürasyon basamağından sonra çalışmaya başlamasını sağlamaktır. Böylece ilk denatürasyon öncesindeki olası özgül olmayan primer bağlanmaları, Taq polimeraz henüz işlev görmediği için sentez ile sonuçlanmayacaktır. Taq polimerazın denatürasyon basamağı sonrasında çalışmaya başlamasını sağlayabilmek için kullanılan stratejilerden bir tanesi, sıcaklık 94°C’ye çıkarılıncaya kadar enzim aktivitesini durduracak Taq polimeraza özgül monoklonal antikoların kullanılmasıdır. Denatürasyon sıcaklığına çıkıldığında enzim üzerindeki inhibitör etki ortadan kalkmakta ve normal çalışmasına başlamaktadır. Diğer bir strateji ise, 94°C’de tetiklenen konformasyonel değişikliklerle normale dönebilen modifiye edilmiş inaktif Taq polimeraz enziminin kullanılmasıdır.

Döngü Aracılı İzotermal Çoğaltma (Loop-Mediated Isothermal Amplification: LAMP)

Bu test izotermal bir amplifikasyon yöntemidir. Hedef bölgenin çoğaltılması için sıcaklık döngüsüne ihtiyaç duyulmayan bir yöntemdir. Bu yöntemde *gyrB* ve 16S rRNA bölgeleri hedef olarak kullanılmaktadır. Xpert MTB/RIF testi ile benzer bir

özgüllükte olmasına rağmen duyarlılığı biraz daha düşüktür. En büyük avantajlarından biri, termal döngü cihazına ihtiyaç duyulmaması nedeniyle maliyetinin düşük olmasıdır. DSÖ tanı performansından dolayı yayma mikroskopunun yerine alternatif olarak önermiştir (106). Günümüzde moleküler hasta başı test geliştirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

‘Line Probe Assay’ (LPA)

M. tuberculosis DNA’sını hedef alan bu testte ilaç direnci ile ilgili genetik mutasyonlar taranmaktadır. Bu testi diğer moleküler yöntemlerden ayıran en önemli özelliği katı bir yüzey üzerine oturtulmuş propların kullanılmasıdır. Çoğaltılan hedef bölgeler bu proplar tarafından yakalanarak sonuçlar kolorometrik olarak belirlenir. Ticari olarak iki kiti bulunmaktadır. Bunlar GenoType MTBDRplus 1.0 (Hain Lifescience) ve INNO-LiPA Rif TB (Innogenetics) kitleridir. Bunların yanında geliştirilen yeni bir LPA testi olan GenoType MTBDRplus 2.0 testi yayma pozitif örneklerde duyarlılığı oldukça yüksek olan bir testtir. Ayrıca florokinolonlar ve ikinci basamak ilaç direnci ile ilişkili mutasyonları saptayabilen versiyonları da bulunmaktadır.

2.7.4 Tüberküloz Tanısında Kullanılan Yenilikçi Yaklaşımlar

Tüberkülozda tanı alanı halen geliştirilmesi gereken önemli bir alandır. Bunun için halen pek çok bilim insanı araştırmalara devam etmektedir. Bu yenilikçi çalışmalar arasında ‘Clustred Regularly Interspaced Palindromic Repeats’ (CRISPR)-Cas teknolojisi, dizileme, kütle spektrometresi, yapay zeka ve makine öğrenimi gösterilebilir.

CRISPR-Cas teknolojisinin genom düzenlemede önemli bir araç olabileceğinin keşfinden sonra, bu sistem bileşenlerinin mikroorganizmaların tanısındaki etkinliğini araştıran çalışmalar da yapılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalardan biri Zhang ve ark. (138) tarafından yapılan çalışmadır. Bu çalışmada *M. tuberculosis*’i saptamak için CRISPR-Cas sistemi bileşenlerinden yararlanılmıştır. Geliştirilen bu testin duyarlılığı %88 ve özgüllüğü %94 olarak bulunmuştur. Geliştirilen bu tanı testinin bir diğer

önemli özelliği de, 1,5 saat içinde sonuç vermesi ve kompleks bir cihaza ihtiyaç duymamasıdır. Halen bu alanla ilgili özellikle duyarlılığı yükseltecek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yeni nesil dizileme tanımlamada umut veren bir diğer yöntemdir. İlaç direncine neden olan mutasyonları saptamasının yanında, fenotipik duyarlılık testlerine göre oldukça hızlı bir yöntemdir (139). Bir diğer avantajı ise genomun dizisi hakkında bilgi vermesi nedeniyle birden fazla ilaca karşı direnci ortaya çıkarabilme potansiyelinin olmasıdır. Bu yüzden DSÖ yeni nesil dizileme yönteminin ilaç direncinin saptanmasında kullanımı ile ilgili bir kılavuz yayınlamıştır. Bu yöntem şimdiden Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve İngiltere gibi gelişmiş ülkelerde ilaç direncinin saptanmasında fenotipik duyarlılık testlerinin yerini almaya başlamıştır. Bu yöntemin önündeki en büyük engel yüksek maliyetidir. Maliyetinin düşürülmesi, bu yöntemin gelişmekte olan ülkeler de dahil olmak üzere birçok ülkede kullanımının önünü açacaktır.

Diğer bir yenilikçi yöntem kütle spektrometresidir. Yapılan çalışmalar, bu yöntemin tanımlamada yüksek bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (140-142). En önemli özelliklerinden birisi dizileme ve hibridizasyona dayalı diğer yöntemlere kıyasla daha hızlı olmasıdır. Gonzalo ve ark. (143) tarafından yapılan bir çalışmada *M. tuberculosis* basili 10 dakika gibi kısa bir süre içinde tanımlanabilmiştir. Ayrıca bu yöntemin bir diğer önemli avantajı da, tedavi etkinliğinin takibinde yüksek bir potansiyele sahip olmasıdır (144).

Son zamanlarda birçok alanda kullanımıyla dikkat çeken bir diğer teknoloji yapay zeka teknolojisi. Yapay zekanın tanı alanında kullanılmasında en yaygın kullanılan strateji, laboratuvar verilerini kullanan makine öğreniminden yararlanılarak uzman sistemlerin oluşturulmasıdır. Yapılan bazı çalışmalarda makine öğreniminin akciğer tüberkülozunu ve ilaç direncini tahmin etmede klinisyenlere yardımcı olabildiği bildirilmiştir. Jaeger ve ark. (145) tarafından yapılan çalışmada görüntü verilerini kullanan yapay zeka sisteminin ilaca duyarlı ve dirençli tüberküloz basillerini saptamada yüksek bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir. Yapılan başka bir

Çalışmada ise laboratuvar verilerini kullanan makine öğreniminin aktif tüberküloz hastalığını saptamada etkili olduğu bildirilmiştir (146). Yapay zeka gelecek için umut veren bir teknoloji olmasına rağmen, tanıda rutin olarak kullanılabilmesi için doğrulama açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı'nda TB tanısı konmuş hastaların balgam örneklerinden izole edilen 20 MTBK izolatının saf kültürlerine sekizer adet seri dilüsyon yapılarak elde edilen toplam 160 örnek kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, 14 adet tüberküloz-dışı mikobakteri izolatı, 3 adet *Escherichia coli* izolatı ve 3 adet *Staphylococcus aureus* izolatı olmak üzere toplam 20 örnek negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Böylece çalışma kapsamında kullanılan toplam örnek sayısı 180 olmuştur. Çalışmada negatif kontrol olarak kullanılan TDM türleri *M. abscessus*, *M. simiae*, *M. lentiflavum*, *M. gordonae*, *M. avium* ve *M. scrofulaceum*'dur (147). Kullanılan bu TDM türlerinin sayıları Tablo 3.1'de görülmektedir.

Gerçek zamanlı PCR testleri uygulanırken pozitif kontrol olarak *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) suşu kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Çalışmada negatif kontrol olarak kullanılan TDM türlerinin sayıları.

TDM türü	Sayı
<i>M. abscessus</i>	3
<i>M. simiae</i>	3
<i>M. lentiflavum</i>	3
<i>M. gordonae</i>	3
<i>M. avium</i>	1
<i>M. scrofulaceum</i>	1
Toplam	14

Çalışma kapsamında kullanılmış olan örneklerin toplanmış olduğu hastalara ait bilgi ve veriler kayıt altına alınmamış ve kullanılmamıştır. Hacettepe Üniversitesi

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 20.04.2021 tarihli kararında, çalışma protokolünün etik açıdan incelendiği ve çalışmanın mikrop izolatları üzerinde gerçekleştirilecek olması nedeniyle Etik Kurul onayına gerek duyulmayacağı belirtilmiştir (Proje No: GO 21/253).

3.2. Örneklerin Seri Dilüsyonlarının Hazırlanması

Kültürde üretilmiş ve -80°C 'de muhafaza edilmiş olan 20 MTBK izolatı, oda ısısında çözüldükten sonra Middlebrook 7H9 sıvı besiyerine pasajlanarak yeniden üretilmiştir. Örneklerin seri dilüsyon işlemi için Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri kullanılmıştır. Üremiş bakteri süspansiyonu, yoğunluğu 0,5 McFarland (1×10^8 CFU/ml) standart bulanıklığına denk gelecek şekilde ayarlanmış ve bu süspansiyondan bir tüp içerisine 1 ml alınarak seri dilüsyon başlangıç örneği olarak kullanılmıştır. Seri dilüsyonların hazırlanmasında kullanılmak üzere içinde 900 μl Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri bulunan yedi tüp hazırlanmıştır. İlk tüpten 100 μl örnek alınarak ikinci tüpe aktarılmıştır. Bu tüp içerisindeki örnek vorteks ile çalkalandıktan sonra 100 μl örnek alınarak ikinci tüpe aktarılmıştır. Bu işlemlere son tüpe ulaşmaya kadar devam edilerek 10^{-1} cfu/mL, 10^{-2} cfu/mL, 10^{-3} cfu/mL, 10^{-4} cfu/mL, 10^{-5} cfu/mL, 10^{-6} cfu/mL, 10^{-7} cfu/mL, ve 10^{-8} cfu/mL şeklinde seri dilüsyon hazırlama işlemi tamamlanmıştır. Böylece 20 örneğin sekiz adet seri dilüsyonu tamamlanarak toplam 160 örnek elde edilmiştir.

3.3. Kültür

Çalışmada altın standart kültür yöntemi olarak LJ besiyeri kullanılmıştır (148). Hazırlanan seri dilüsyon tüplerinden 100 μl örnek alınarak LJ besiyerine ekim yapılmış ve 37°C 'de altı hafta boyunca inkübe edilmiştir.

3.4. DNA İzolasyonu

Seri dilüsyonları hazırlanmış örnekler ve negatif kontrol örnekleri için DNA izolasyon işlemi ısı bloğu kullanılarak sıcaklık etkisiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla örnekler 4000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımları 2ml'lik

bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu örneklerin üzerine 300µl Tris-EDTA (TE) tamponu eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır. Bu aşamadan sonra tüpler ısı bloğuna yerleştirilerek 100°C’de 20 dakika bekletilmiştir. Bunu takiben örnekler 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımları yeni bir tüpe aktararak, PCR işlemi için kullanılabilecek kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.5. Primer ve Probların Tasarlanması

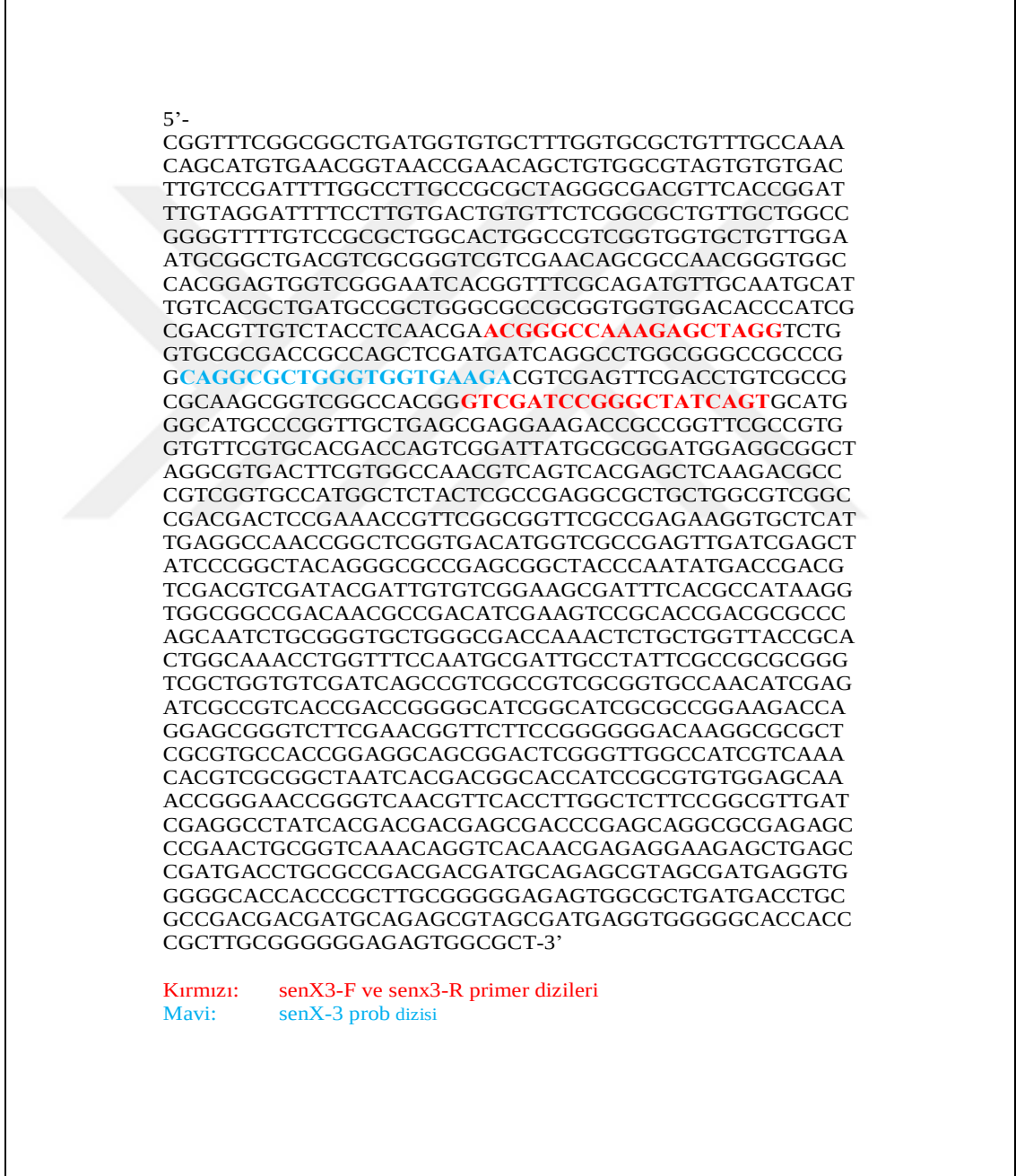
Çalışmada, MTBK’nin *senX3* ve *regX3* genleri için iki ayrı primer ve prob seti tasarlanmıştır. Primerler tasarlanmadan öncelikle MTBK genomunda ilgili gen bölgeleri için, ‘Basic Local Alignment Search Tool’ (BLAST) üzerinden tarama yapılmış ve üzerinde çalışılacak olan gen dizileri belirlenmiştir. Çalışmaya özgün ve özgül primer ve problar tasarlamak amacıyla MTBK genomunun *senX3* ve *regX3* gen bölgeleri hedef bölge olarak belirlendikten sonra ‘Primer 3’ yazılımı kullanılmıştır. Bu aşamada yazılımın araştırmacılara önerdiği varsayılan parametreler temel alınarak çalışılmıştır. Yazılım ara yüzüne ilgili gen dizileri girildikten sonra elde edilen farklı primer ve prob setleri, her iki gen bölgesi için BLAST ile kontrol edilerek araştırmada kullanılmak üzere uygun primer ve prob dizileri belirlenmiştir. Çalışmada kullanılması planlanan iki setin her biri bir çift primer ve bir adet prob içermektedir. *senX3* ve *regX3* hedef gen bölgelerinin saptanması için tasarlanan *senX3*-F, *senX3*-R, *regX3*-F, *regX3*-R primerleri ile *senX3*-P ve *regX3*-P problemlerinin dizileri sırasıyla Tablo 3.2 ve Tablo3.3’de sunulmuştur.

Tablo 3.2. *senX3* ve *regX3* hedef gen bölgelerinin saptanması için kullanılan primer dizileri.

Primer	Dizi
<i>senX3</i> -F	ACGGGCCAAAGAGCTAGG
<i>senX3</i> -R	ACTGATAGCCCGGATCGAC
<i>regX3</i> -F	CCGATGTATGCAAGCAGTTG
<i>regX3</i> -R	TTGGTCACGTAGTCGTCAGC

Tablo 3.3. *senX3* ve *regX3* hedef gen bölgelerinin saptanması için kullanılan prob dizileri.

Prob	Dizi
<i>senX3</i> -P	5'-6-FAM-CAGGCGCTGGGTGGTGAAGA-BHQ-1-3'
<i>regX3</i> -P	5'-6-FAM-TCGACAAGGTGGTCGGCCTG-BHQ-1-3'



Şekil 3.1. *senX3* hedef bölgesi için tasarlanmış primer ve prob dizilerinin *M. tuberculosis senX3* gen dizisi üzerindeki yerleşimi.

5'-
 CCGGCGTTGATCGAGGCCTATCACGACGACGAGCGACCCGAGCA
 GGCGCGAGAGCCCGAACTGCGGTCAAACAGGTCACAACGAGAGG
 AAGAGCTGAGCCGATGACCTGCGCCGACGACGATGCAGAGCGTA
 GCGATGAGGTGGGGGCACCAACCGCTTGCAGGGGAGAGTGGCGC
 TGATGACCTGCGCCGACGACGATGCAGAGCGTAGCGATGAGGTG
 GGGGCACCAACCGCTTGCAGGGGAGAGTGGCGCTGATGACCTG
 CGCCGACGACGATGCAGAGCGTAGCGATGAGGAGGAGTGGCGCT
 GATGACCAGTGTGTTGATTGTGGAGGACGAGGAGTCGCTGGCCG
 ATCCGCTGGCGTTTCTGCTGCGCAAGGAGGGCTTTGAGGCCACGG
 TGGTGACCGATGGTCCGGCAGCTCTCGCCGAGTTCGACCGGGCCG
 GCGCCGACATCGTCCTGCTCGATCTGATGCTGCCTGGGATGTCCG
 GTACCGATGTATGCAAGCAGTTGCGCGCTCGGTCCAGCGTTCCG
 GTGATCATGGTGACCGCCCGGATAGCGAGATCGACAAGGTGG
 TCGGCCTGAGCTGGGCCTGACGACTACGTGACCAAGCCCTA
 TTCGGCACGCGAGTTGATCGCACGCATCCGCGCGGTGCTGCGC
 CGTGCGGCGACGACGACTCGGAGATGAGCGATGGCGTGCTGGA
 GTCCGGGCGCGTTTCGCATGGATGTGGAGCGCCATGTCGTCTCGGT
 GAACGGTGACACCATCACGCTGCCGCTCAAGGAGTTCGACCTGCT
 GGAATACCTGATGCGCAACAGCGGGCGGGTGTGACTCGCGGAC
 AACTGATCGACCGGTCTGGGGTGCGGACTACGTGGGCGACACC
 AAGACGCTCGACGTCCATGTCAAGCGGTGCGCTCCAAGATCGA
 AGCCGACCCGGCTAACCCGGTTCACCTTGGTGACGGTGCGCGGGCT
 GGGCTACAACTCGAGGGCTAGCGGACGCCGACAACCTTGGCGA
 CTGTCTGGTTCGGCTACGGCCAGTGCCATCGCCATGATGGACAGCT
 GCGGGTTCACCTCCGGGCAGCTGGGCAGGATCGAGGCGTCGGCA
 ACCCACACGCCCTCGACGCCGCGCAGCCGGCCCGTCGCGTCGACC
 GGACAAAGCTGCTCGTCGGCGCCGGCGGCCGCGGTGCCCGTCGG
 ATGGAAGGCGGCCAGGTGCAGGCTTCTGGGGTTGGCTCGGCGCA
 GCACATCCTGCAGCTCGGGCAGGACCGCATCGGTGGGGCGCCG
 GGGATACCGGTC-3'

Kırmızı: regX3-F ve regx3-R primer dizileri
 Mavi: regX-3 prob dizisi

Şekil 3.2. *regX3* hedef bölgesi için tasarlanmış primer ve prob dizilerinin *M. tuberculosis regX3* gen dizisi üzerindeki yerleşimi.

3.6. Laboratuvar Yapımı Gerçek Zamanlı PCR Testinin Optimizasyonu

Tasarlanan primer ve problemlerin kullanılacağı laboratuvar yapımı gerçek zamanlı PCR testinin optimizasyon çalışması için *M. tuberculosis* H37Rv referans suşunun sekiz farklı dilüsyondaki konsantrasyonları kullanılmıştır. Liyofilize halde temin edilmiş olan reaksiyon bileşenleri, üretici firmanın önerileri doğrultusunda steril distile su ile çözülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Deneyler için tüm PCR hazırlık işlemleri biyogüvenlik düzey-2 (BGD-2) kabinlerde yapılmıştır. Tüm basamaklar soğuk blok üzerinde yapılmıştır. Her iki primer seti için reaksiyonlarda kullanılan konsantrasyonlar ve hacimler aynıdır. Tüm deneylerde kontaminasyon kontrolü için negatif kontrol ve reaksiyon kontrolü için pozitif kontrol tüpleri test edilmiştir.

Gerçek zamanlı PCR cihazında kullanılacak olan programda, primer bağlanması ve sentez basamaklarının tek bir basamak halinde yapılabilmesi için farklı sıcaklıklar denenmiş ve 60°C’de en iyi sonuçların alındığı gözlenmiştir. PCR reaksiyon karışımı toplam 20µl olacak şekilde, 4µl 5x ‘Hot Start PCR’ miksi, 0.8µl F-primer, 0.8µl R-primer, 1µl prob, 10.4µl distile su ve 3µl hedefDNA ile hazırlanmıştır. *senX3* ve *regX3* hedef bölgeleri için *M. tuberculosis* H37Rv referans suş DNA’sı kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı PCR çalışması sonucunda elde edilen Ct değerleri Tablo 3.4.’te verilmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda düşük bakteri konsantrasyonu içeren dilüsyonlara doğru ilerlendikçe, daha yüksek Ct değerleri elde edildiği gözlenmiştir. Yüksek Ct değerlerinin düşük DNA kopyası anlamına geldiği göz önünde tutularak, uygulanan programın çalışmada kullanılacak olan PCR programı olarak kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 3.4. *M. tuberculosis* H37Rv referans suş DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı PCR optimizasyon çalışması sonucunda elde edilen Ct değerleri.

H37Rv suşu	Dilüsyon miktarları							
	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷	10⁻⁸
senX3 Ct Değeri	18,43	22,42	25,78	28,31	31,33	34,49	35,29	36,4
regX3 Ct Değeri	18,95	23,3	26,88	29,41	32,37	35,95	36,17	37,03

Böylece optimizasyon çalışmaları sonrasında gerçek zamanlı PCR programı, ilk denatürasyon basamağı için 95°C'de 10 dakika, sonrasında ise 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 1 dakika 40 döngü olacak şekilde programlanmıştır.

3.7. Gerçek Zamanlı PCR

Primer tasarımının ardından üretici firmadan liyofilize halde temin edilen primer ve probların gerçek zamanlı PCR reaksiyonlarında kullanılabilmesi için üretici firmanın önerisi doğrultusunda steril ve iyonlarından arındırılmış su ile çözünmesi sağlanmıştır. Her primer ve prob önerilen farklı miktarlarda su ile çözülerek stok primer solüsyonları hazırlanmıştır.

senX3 ve *regX3* hedef bölgelerinin çoğaltma ve saptama işlemleri CFX 96 gerçek zamanlı PCR cihazı (Bio-Rad, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyon karışımı toplam 20µl olacak şekilde, 4µl 5x 'Hot Start PCR' miksi, 0.8µl F-primer, 0.8µl R-primer, 1µl prob, 10.4µl distile su ve 3µl hedef DNA ile hazırlanmıştır. Her bir PCR çalışmasında birer adet pozitif kontrol (*M. tuberculosis* H37Rv suşu) ve negatif kontrol kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PCR cihazı ilk denatürasyon basamağı için 95°C'de 10 dakikaya ayarlanmış, sonrasında 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 1 dakika

40 döngü tamamlanacak şekilde programlanmıştır. Elde edilen PCR sonuçlarının değerlendirilmesi için aynı cihazın yazılımı kullanılmıştır.

3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmada istatistiksel analizler için kümülatif veri gerçek zamanlı PCR cihazından elde edilen sonuçlara dayanmaktadır. Bu çalışmada istatistiksel analizlerde MedCalc's paket programlarından faydalanılmıştır. Altın standart test olarak Löwenstein-Jensen kültür yöntemi kullanılmış, etkinliği test edilen laboratuvar yapımı gerçek zamanlı PCR yönteminin performans değerlendirmesinde ise duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (pozitif kestirim oranı) ve negatif prediktif değer (negatif kestirim oranı) kullanılmıştır. Sonuçlar arasındaki uyumun derecesini ölçmek için Cohen'in Kappa katsayısı kullanıldı. Analiz boyunca istatistiksel anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ alınmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışma kapsamında 20 MTBK izolatının sekizer adet seri dilüsyonu ve 20 adet negatif kontrol olmak üzere toplam 180 örnek kullanılmıştır. Örneklerle laboratuvar yapımı gerçek zamanlı PCR yöntemi uygulanmış ve elde edilen sonuçlar altın standart yöntem olarak seçilen Löwenstein-Jensen kültür yöntemi sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Bulgular bölümünde her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar yer almaktadır. Ayrıca, LJ kültür sonuçları referans kabul edilerek gerçek zamanlı PCR yönteminin analitik performansına dair istatistikî analiz sonuçları sunulmuştur.

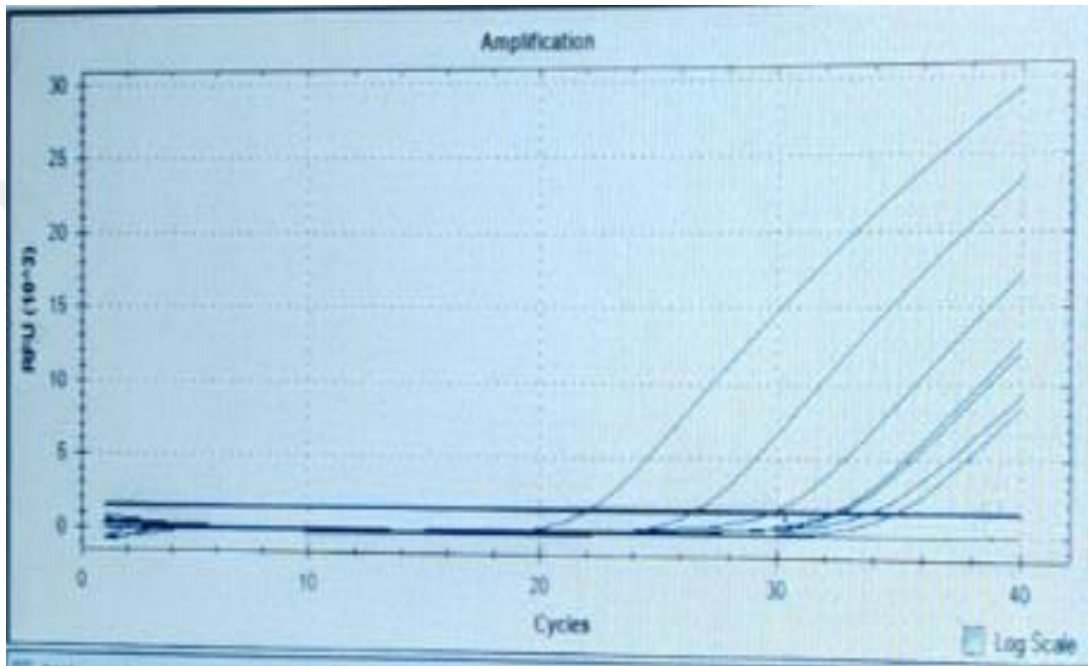
4.1. Kültür Sonuçları

senX3 ve *regX3* gen bölgeleri hedef alınarak geliştirilen laboratuvar yapımı gerçek zamanlı PCR yönteminin etkinliğinin değerlendirilebilmesi için, altın standart referans yöntem olarak LJ besiyeri kullanılmıştır. Bu amaçla, her iki bölgenin test edilmesi amacıyla hazırlanan seri dilüsyon örneklerinden 100µl alınarak LJ besiyerine ekim yapılmıştır. Besiyerleri 37°C’de 6 hafta boyunca inkübe edilmiştir. Üreme gözlenen örnekler, Kinyoun aside dirençli boyama yöntemi ile boyanıp aside dirençli basil varlığı açısından doğrulandıktan sonra kayıt altına alınmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 10⁻¹’den 10⁻⁶’ya kadar olan ilk 6 dilüsyonda LJ besiyerinde üreme olduğu gözlenmiştir. Ancak 10⁻⁷ ve 10⁻⁸ dilüsyonlarında LJ besiyerinde herhangi bir üreme görülmemiştir.

4.2. *senX3* Hedef Bölgesi için Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

senX3 gen bölgesinin hedef olarak alındığı gerçek zamanlı PCR testi, sekizer adet seri dilüsyonu yapılmış 20 örnekten elde edilen toplam 160 örneğe uygulanmış ve örneklerin 118’inden (%73,7) pozitif sonuç elde edilmiştir. Yirmi izolatın ilk dört dilüsyonunun (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) tamamında PCR sonucu pozitif çıkmıştır. İki izolatın 10⁻⁵ dilüsyonunda gerçek zamanlı PCR sonucu negatif çıkarken, üç izolatın 10⁻⁶ dilüsyonunda gerçek zamanlı PCR sonucu negatif çıkmıştır. İzolatların 10⁻⁷ dilüsyonlarında sadece üç örnekte pozitif sonuç elde edilirken, 10⁻⁸ dilüsyonlarında

gerçek zamanlı PCR pozitifliği saptanmamıştır. 10^{-7} dilüsyonunda pozitif sonuç elde edilen gruptaki izolatlardan biri olan 7 no'lu izolata ait *senX3* PCR sonuçlarının ekran görüntüsü şekil 4.1'de görülmektedir. *senX3* gen bölgesinin hedef olarak seçildiği gerçek zamanlı PCR testi ile tüm örnek dilüsyonlarında elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1. 7 no'lu izolata ait *senX3* PCR sonuçlarının ekran görüntüsü.

Tablo 4.1. *senX3* hedef bölgesi için gerçek zamanlı PCR sonuçları ve Ct değerleri.

senX3 PCR	Dilüsyon oranları							
İzolat No	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷	10⁻⁸
1	21,33	26,27	29,44	33,65	N	N	N	N
2	28,95	29,36	30,09	31,68	31,95	N	N	N
3	19,68	23,91	29,64	31,15	31,37	33,57	N	N
4	25,45	28,52	31,03	36,67	N	N	N	N
5	22,93	25,59	29,41	31,16	33,67	35,79	N	N
6	22,15	25,07	29,13	31,82	32,68	31,4	33,32	N
7	21,88	26,26	29,91	32,37	33,33	32,3	33,21	N
8	19,47	23,45	25,4	29,93	34,49	36,65	N	N
9	20,05	25,77	29,49	32,36	34,92	34,14	N	N
10	19,78	23,81	26,68	31,4	34,43	35,37	N	N
11	21,21	24,31	28,37	30,11	34,08	38,15	N	N
12	21,14	26,31	29,33	34,28	38,12	39,02	N	N
13	20,72	23,36	27,47	29,17	39,36	39,33	N	N
14	24,02	25,77	30,12	32,5	34,55	38,01	N	N
15	23,82	26,32	29,23	33,5	38,12	39,27	N	N
16	22,85	24,96	29,17	32,29	34,2	38,12	N	N
17	23,1	26,39	29,66	32,95	33,03	33,2	33,74	N
18	22,33	24,59	27,72	31,09	33,87	38,09	N	N
19	21,59	24,84	28,6	31,62	37,58	37,33	N	N
20	20,2	23,11	25,94	29,82	38,1	38,96	N	N

N. Negatif

Negatif kontrol grubu olarak kullanılan 20 örneğin tamamında *senX3* gen bölgesinin hedef alındığı gerçek zamanlı PCR testi ile negatif sonuç alınmıştır.

Yirmi örnekten hazırlanan 160 seri dilüsyon örneği ve negatif kontrol grubu olarak kullanılan 20 örnekle birlikte çalışma kapsamında *senX3* gerçek zamanlı PCR testinin etkinliğini test etmek amacıyla kullanılan toplam örnek sayısı 180 olmuştur. Tüm örneklerden elde edilen sonuçların altın standart yöntem olarak kullanılan LJ besiyeri sonuçları ile karşılaştırılması sonucunda, 115 örnekten (%63,8) her iki yöntemle de pozitif sonuç elde edildiği gözlenmiştir. Elli yedi örnekte (%31,6) her iki yöntemle de negatif sonuç alınmıştır. Kültür sonucunun pozitif, PCR sonucunun negatif bulunduğu örnek sayısı 5 (%2,7) olarak saptanmış; kültür sonucunun negatif, PCR sonucunun pozitif bulunduğu örnek sayısı ise 3 (%1,6) olarak saptanmıştır. *senX3* gen bölgesinin hedef olarak seçildiği gerçek zamanlı PCR testi ile altın standart yöntem olarak kullanılan LJ besiyeri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. *senX3* PCR ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması.

		Kültür		TOPLAM
		Pozitif	Negatif	
<i>senX3</i> PCR	Pozitif	115	3	118
	Negatif	5	57	62
TOPLAM		120	60	180

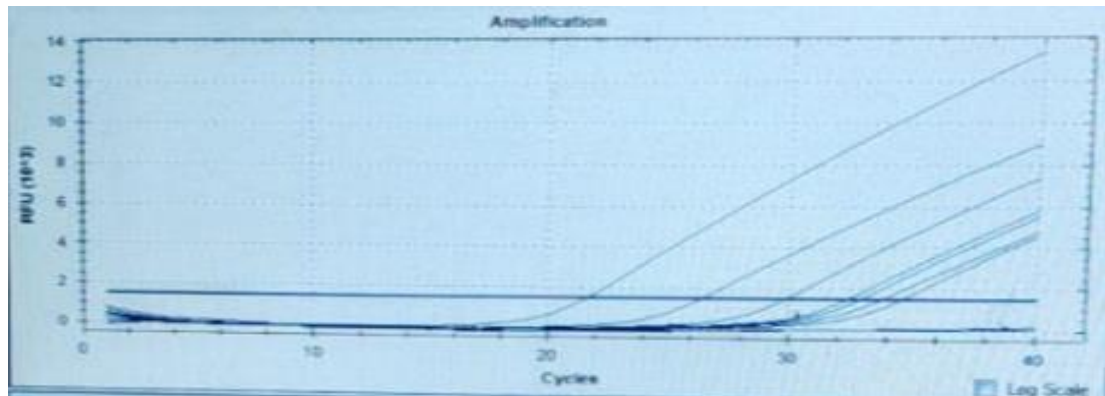
Tablo 4.3.’te test sonucuna ilişkin farklı istatistiklere göre test performans verileri görülmektedir. Analiz sonuçlarına göre *senX3* gerçek zamanlı PCR tanı testi 180 örneğin 172’sini doğru saptamıştır (115 pozitif sonuç, 57 negatif sonuç). Teste ilişkin duyarlılık oranının %95,8; özgüllük oranının ise %95 olduğu tespit edilmiştir. *senX3* gerçek zamanlı PCR tanı testinin pozitif prediktif değeri %97,4; negatif prediktif değeri ise %91,9 olarak saptanmıştır.

Tablo 4.3. Altın standart kültür yöntemi ile kıyaslandığında *senX3* PCR tanı testinin analiz sonuçları (S:180).

İstatistik	Değer (%)	95% Güven Aralığı
Duyarlılık	95,8	90,0% - 98,4%
Özgüllük	95,0	85,1% - 98,6%
Pozitif Prediktif Değer	97,4	92,1% - 99,3%
Negatif Prediktif Değer	91,9	81,4% - 96,9%
Kappa Katsayısı	0,80	

4.3. *regX3* Hedef Bölgesi için Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

regX3 gen bölgesinin hedef olarak alındığı gerçek zamanlı PCR testi, sekizer adet seri dilüsyonu yapılmış 20 örnekten elde edilen toplam 160 örneğe uygulanmış ve örneklerin 123'ünden (%76,8) pozitif sonuç elde edilmiştir. Yirmi izolatın ilk dört dilüsyonunun (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) tamamında PCR sonucu pozitif çıkmıştır. Bir izolatın 10^{-5} dilüsyonunda gerçek zamanlı PCR sonucu negatif çıkarken, 2 izolatın 10^{-6} dilüsyonunda gerçek zamanlı PCR sonucu negatif çıkmıştır. İzolatların 10^{-7} dilüsyonlarında toplam 6 örnekte pozitif sonuç elde edilirken, 10^{-8} dilüsyonlarında gerçek zamanlı PCR pozitifliği saptanmamıştır. 10^{-7} dilüsyonunda pozitif sonuç elde edilen gruptaki izolatlardan biri olan 7 no'lu izolata ait *regX3* PCR sonuçlarının ekran görüntüsü şekil 4.2'de görülmektedir. *regX3* gen bölgesinin hedef olarak seçildiği gerçek zamanlı PCR testi ile tüm örnek dilüsyonlarında elde edilen sonuçlar Tablo 4.4'te görülmektedir.



Şekil 4.2. 7 no'lu izolata ait *regX3* PCR sonuçlarının ekran görüntüsü.

Tablo 4.4. *regX3* hedef bölgesi için gerçek zamanlı PCR sonuçları ve Ct değerleri.

regX3 PCR	Dilüsyon oranları							
İzolatlar	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷	10⁻⁸
1	20,13	24,35	27,32	31,77	36,79	39,62	N	N
2	22,3	23,97	30,32	31,46	31,36	N	N	N
3	18,84	22,79	28,13	33,76	34,47	35,07	35,26	N
4	24,34	27,27	29,82	34,99	N	N	N	N
5	22,18	25,11	29,11	30,66	33,02	34,66	35,01	N
6	22,07	24,91	28,84	31,24	32,79	32,29	33,11	N
7	21,9	25,91	28,45	31,2	32,14	32,43	33,26	N
8	18,91	22,34	24,08	28,58	33,41	35,18	N	N
9	19,31	24,67	28,71	31,02	33,48	33,23	N	N
10	19,29	22,87	25,81	30,11	33,63	34,2	N	N
11	20,7	23,6	27,48	29,07	33,06	37,37	N	N
12	19,99	25,5	29,11	33,85	37,61	38,33	N	N
13	20,3	23,03	27,25	29,19	35,61	38,9	N	N
14	22,65	25,7	29,46	32,07	34,19	37,69	N	N
15	22,43	25,23	28,18	32,38	34,58	39,28	N	N
16	21,51	23,65	27,42	30,38	33,04	35,24	N	N
17	21,88	24,88	29,21	32,23	32,61	32,13	33,82	N
18	21,47	24,41	27,58	30,95	33,88	35,9	N	N
19	21,41	24,34	27,47	30,47	34,61	34,74	34,52	N
20	19,23	22,88	25,89	29,81	38,15	38,24	N	N

N. Negatif

Negatif kontrol grubu olarak kullanılan 20 örneğin tamamında *regX3* gen bölgesinin hedef alındığı gerçek zamanlı PCR testi ile negatif sonuç alınmıştır.

Yirmi örnekten hazırlanan 160 seri dilüsyon örneği ve negatif kontrol grubu olarak kullanılan 20 örnekle birlikte çalışma kapsamında *regX3* gerçek zamanlı PCR testinin etkinliğini test etmek amacıyla kullanılan toplam örnek sayısı 180 olmuştur. Tüm örneklerden elde edilen sonuçların altın standart yöntem olarak kullanılan LJ besiyeri sonuçları ile karşılaştırılması sonucunda, 117 örnekten (%65) her iki yöntemle de pozitif sonuç elde edildiği gözlenmiştir. Elli dört örnekte (%30) her iki yöntemle de negatif sonuç alınmıştır. Kültür sonucunun pozitif, PCR sonucunun negatif bulunduğu örnek sayısı 3 (%1,6) olarak saptanmış; kültür sonucunun negatif, PCR sonucunun pozitif bulunduğu örnek sayısı ise 6 (%3,3) olarak saptanmıştır. *regX3* gen bölgesinin hedef olarak seçildiği gerçek zamanlı PCR testi ile altın standart yöntem olarak kullanılan LJ besiyeri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5. *regX3* PCR ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması.

		Kültür		TOPLAM
		Pozitif	Negatif	
regX3 PCR	Pozitif	117	6	123
	Negatif	3	54	57
TOPLAM		120	60	180

Tablo 4.6’da test sonucuna ilişkin farklı istatistiklere göre test performans verileri görülmektedir. Analiz sonuçlarına göre *reg X3* gerçek zamanlı PCR tanı testi 180 örneğin 171’ini doğru saptamıştır (117 pozitif sonuç, 54 negatif sonuç). Teste ilişkin duyarlılık oranının %97,5; özgüllük oranının ise %90 olduğu tespit edilmiştir. *regX3* gerçek zamanlı PCR tanı testinin pozitif prediktif değeri %95,1; negatif prediktif değeri ise %94,7 olarak saptanmıştır.

Tablo 4.6. Altın standart kültür yöntemi ile kıyaslandığında *regX3* PCR tanı testinin analiz sonuçları (S:180).

İstatistik	Değer (%)	95% Güven Aralığı
Duyarlılık	97,5	%92,3 - 99,3
Özgüllük	90,0	%78,8 - 95,8
Pozitif Prediktif Değer	95,1	%89,2 - 98,0
Negatif Prediktif Değer	94,7	%84,4 - 98,6
Kappa Katsayısı	0,88	



5. TARTIŞMA

Günümüzde tüberkülozun halen önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmesinin en önemli nedenlerinden biri, yeni olgu saptama oranlarının düşük düzeylerde kalmasıdır. Geç saptanan her olgunun, bulaş kaynağı olma süresi uzamaktadır. Ulusal tüberküloz kontrol programlarının en önemli bileşenleri hızlı tanı, etkili tedavi ve bulaşın önlenmesidir. Hasta kişilerin tüberküloz basilini bulaştırmalarını önleyebilmek için, tüberküloz tanısının kısa sürede konması ve zaman kaybetmeden tedaviye başlanması gerekmektedir. Bu nedenle tüberküloz tanısının hızlı bir şekilde konması, tüberkülozla savaş programının önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Laboratuvar tanısını hızlı ve doğru bir şekilde sağlayacak yeni yöntemlere olan ihtiyaç artmıştır.

Tüberküloz tüm mücadelelere rağmen önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Dünya çapında yaşanan COVID-19 salgını bu hastalıklı mücadeleyi oldukça olumsuz yönde etkilemiştir (149). DSÖ, 2023 yılında yayınladığı uluslararası tüberküloz raporunda, 2022 yılında 7,5 milyon kişiye ilk defa tüberküloz tanısı konduğunu ve 1,30 milyon kişinin de tüberküloz hastalığına bağlı olarak öldüğünü belirtmiştir. Bu sayılar, DSÖ'nün 1995 yılından beri bildirdiği en yüksek sayılardır. Sayıların bu denli yüksek olması, pandeminin tanı ve tedaviye erişimi engellemesine bağlanmıştır (87). Pandeminin neden olduğu bu olumsuzluklar, DSÖ'nün bu hastalıkla mücadelede belirlediği hedeflerin sapmasına da neden olmuştur. 2018-2022 yılları arasında 40 milyon kişinin tedavi edilmesi planlanırken bu sayı 34 milyonda kalmıştır. Bu beş yıllık süre içinde tüberkülozla mücadele için iki milyar dolar yatırım planlanırken, bu miktar sadece bir milyar dolarda kalmıştır. Bu olumsuzlukların üstesinden gelmek için DSÖ bu hastalıkla mücadelede tanı ve tedaviyi öncelikli alanlar olarak belirlemiştir (90).

Tüberküloz tanısında pek çok gelişmiş yöntem olmasına rağmen hızlı, doğru ve maliyeti düşük tanımlama yöntemlerinin geliştirilmesindeki zorluk halen önemini korumaktadır. Bu patojeni tanımlamada geleneksel tanı yöntemleri önemli yer tutmaktadır. Dünya çapında en yaygın kullanılan geleneksel tanı yöntemleri kültür ve yayma mikroskopisidir. Kültür temelli tanı yöntemlerinde sonucun alınması oldukça

uzun zaman almaktadır. Bu durum doğru tedaviyi geciktirerek hastalığın daha da ilerlemesine neden olmaktadır. Böylece hem sağlık açısından hem de ekonomik açıdan birçok kayıp yaşanmaktadır. Kültür yönteminin bir diğer dezavantajı ise düşük gelirli ülkelerde laboratuvar alt yapısının yetersiz olması ve tecrübeli personele ihtiyaç duyulması nedeniyle gerekli laboratuvar standartlarına ulaşamamasıdır. Kültür yönteminde sıvı bazlı otomatik kültür sistemlerinin geliştirilmesi sonuçlanma süresi açısından önemli iyileştirmeler sağlasa da, zaman açısından istenilen düzey yakalanamamıştır (115).

Yayma mikroskopisi, ucuz bir yöntem olması ve maliyetinin düşük olması nedeniyle tüberküloz hastalığının tanısının konmasında yaygın olarak kullanılan diğer bir yöntemdir. Ancak bu yöntemin pozitif saptama oranı düşüktür. Yapılan çalışmalarda, kullanılan klinik numune ve konsantrasyona bağlı olarak bu yöntemin duyarlılığının %20 ile %80 arasında değişiklik gösterdiği vurgulanmıştır (150, 151). Bunun yanı sıra yayma mikroskopisinde basillerin görülebilmesi için klinik numunenin 1ml'sinde minimum 5000 basil olması gerekmektedir (152). Bu durum daha az sayıda basil bulunan klinik numunelerin hatalı negatif olarak raporlanmasına neden olmaktadır. Bütün bu nedenler daha doğru ve hızlı sonuç veren tanı testlerinin geliştirilmesi ihtiyacını zorunlu hale getirmiştir. Yapılan bilimsel çalışmalar, gerçek zamanlı PCR yönteminin klasik laboratuvar testlerine göre hem daha hızlı hem de daha yüksek duyarlılıkla sonuç verdiğini göstermiştir (153-155). Böylece tüberküloz hastalığının klinik tanısı ve takibinde moleküler yöntemlerin kullanımı giderek artmaya başlamıştır (156). Bütün bu nedenler çerçevesinde şekillenen bu çalışmada, tüberküloz hastalığının tanısına odaklanılarak duyarlılığı yüksek ve hızlı sonuç alınabilen laboratuvar yapımı bir tanı testi geliştirilmeye çalışılmıştır.

Moleküler tanımlama alanında görülen ilerlemeler tüberküloz hastalığının moleküler düzeyde saptanmasında oldukça umut vaat etmektedir. Aktif tüberkülozun moleküler tanısı için iki temel yaklaşımdan yararlanılmaktadır. Bunlardan birisi prob temelli yaklaşım, diğeri ise dizileme yöntemidir. GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, California, USA) ve Anyplex Plus MTB/NTM/MDR-TB testi (Seegene

Technologies, Concord, California, ABD) DSÖ tarafından önerilen ve yaygın olarak kullanılan prob temelli iki ticari kittir (157, 158). Bu testlerin en büyük avantajı sonuçlanma süresinin haftalar yerine saatlere düşürülmesidir. GeneXpert MTB/RIF testi 2 saat sürerken, Anyplex Plus MTB/NTM/MDR-TB testi 3 saat sürmektedir (159-161). Bizim çalışmamızda geliştirilen moleküler tanı testi 110 dakikada sonuçlanmaktadır. Bu durum, geliştirdiğimiz bu laboratuvar yapımı tanı testinin sonuçlanma süresinin yaygın olarak kullanılan diğer iki moleküler testte göre avantajlı olduğunu göstermektedir.

Moleküler tanı testlerinin tanımlamada yararlandıkları temel çıkış noktası, hedef mikroorganizmaya özgü olup diğer mikroorganizmalarda bulunmayan genom bölgelerinin hedef olarak alınmasıdır. Bu yüzden MTBK'ne özgül DNA dizilerinin tanımlamada kullanılması duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek tanı testlerinin geliştirilmesinde oldukça önemli yere sahiptir (162). *M. tuberculosis* genomunda farklı hedef gen bölgelerini kullanan birçok hızlı tanı testi geliştirilmiştir (153). Geliştirilen tanı testlerinde en yaygın olarak kullanılan hedefler *IS6110* ve *IS1081* bölgeleridir. Bu bölgelerin bakteri genomundaki sayıları değişiklik göstermektedir. *IS6110* bölgesi mikobakteri genomunda 17 kopya olarak bulunurken, *IS1081* bölgesinin sayısı 5-7 arasında değişmektedir (163, 164). Tanımlamada bu bölgeleri hedef alan tanı testlerinin duyarlılığı daha yüksek bulunmuştur (165). Fakat yaygın olarak kullanılan *IS6110* bölgesi, özgüllüğünün düşük olmasından dolayı tüberküloz tanısında soru işaretlerine neden olabilmektedir (153, 166, 167). Yapılan çalışmalar bunun diğer mikroorganizmalarda *IS6110* bölgesine benzer dizilerin bulunmasından kaynaklandığını bildirmiştir (164). Bunun yanında Moatter ve ark. (168) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise bu bölgenin bulunmadığı *M. tuberculosis* suşlarının olduğu bildirilmiştir. Bu tür durumlar hatalı sonuçların ortaya çıkmasına neden olarak doğru tanı ve tedavinin gecikmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada sadece MTBK'nde bulunup, diğer mikobakteri türlerinde bulunmayan senX3-regX3 intergenik bölgesi hedef alınmıştır. Çalışma sonucunda geliştirilen gerçek zamanlı PCR tanı testinin duyarlılık ve özgüllüğü senX3 gen bölgesi için sırasıyla %95,8 ve %95; regX3 gen bölgesi için ise sırasıyla %97,5 ve %90 olarak bulunmuştur.

Geliştirilen moleküler tanı testi ile, referans *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra suşu ile pozitif sonuç alınırken, negatif kontrol olarak kullanılan *M. abscessus*, *M. simiae*, *M. lentiflavum*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *E. coli* ve *S. aureus* suşları ile negatif sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlar geliştirilen bu tanı testinin hatalı pozitif sonuçların önüne geçilmesinde yüksek bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Tüberküloz tanısında duyarlılığı yüksek olan tanı testlerinin geliştirilmesi bu hastalıkla mücadelede oldukça önemli olan diğer bir noktadır. MTBK'ni tanımlamak için geliştirilen tanı testlerinin özgüllükleri yüksek olmasına rağmen tanısal duyarlılık ile ilgili istenilen düzeye ulaşamamıştır. Tanı testlerinin duyarlılığını iyileştirmenin bir diğer önemli unsuru genom düzeyinde yeni hedeflerin belirlenmesidir. *senX3-regX3* intergenik bölgesi MTBK'nin tanısında kullanılan yeni bir bölgedir. Bu bölgenin tüberkülozu tanısındaki etkinliği ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Broccolo ve ark. (153) tarafından yapılan çalışmada *senX3-regX3* bölgesinin *M. tuberculosis*'i tanımlamadaki duyarlılığının %94, özgüllüğünün %100 olduğu belirtilmiştir. Lee ve ark. (169) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise %74 duyarlılık ve %98.5 özgüllük elde edildiği belirtilmiştir. En son Yaghoubi ve ark. (170) tarafından yapılan çalışmada ise bu bölgenin tedavi yanıtı izleminde kültür ile yüksek bir uyum sağladığı vurgulanmıştır.

Bu çalışmada, MTBK için özgül ve iyi korunmuş bir bölge olan *senX3-regX3* gen bölgesini hedef alan iki farklı primer-prob seti tasarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen moleküler tanı testinin daha ileri çalışmalar için bir prototip model olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Gerçek zamanlı PCR temelli moleküler tanı testleri kültür yöntemine göre daha hızlı sonuç elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Ancak laboratuvara kabul edilen her örneğin hemen çalışılması, personel yetersizliği ve her çalışma için kullanılan kontrollerin getirdiği yüksek maliyet nedeniyle çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Bu durumda örnekler laboratuvar koşullarına göre belirli bir sayıya ulaşılan kadar biriktirilmekte ve toplu olarak çalışılmaktadır. Böylece moleküler tanı testinin 'hızlı sonuç' verebilme potansiyeli azalmaktadır. Bu nedenle teknolojik olarak hızla gelişmekte olan günümüz dünyasında maliyeti yükseltmeden

hızlı ve pratik uygulamalara ihtiyaç vardır. Bu amaçla hasta başı moleküler testlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmaya başlamıştır (171). Çalışmamızda geliştirilen gerçek zamanlı PCR testi için hedef alınan *senX3-regX3* gen bölgelerinin, bu tür hasta başı moleküler tanı testleri için de kullanılması düşünülmektedir. Böylece geliştirilecek olan hızlı ve pratik moleküler testler sayesinde doğru tanı hızlı bir şekilde sağlanabilecek ve uygun tedaviye daha kısa sürede başlanması sağlanacaktır. Buna ek olarak kültür pozitif örneklerde MTBK ve TDM ayrımı için yapılan ek test ihtiyacının ortadan kaldırılması da mümkün olabilecektir.

Kültür yöntemleri tanı ve ilaç duyarlılığını ortaya koymada halen altın standart yöntem olsa da moleküler yöntemlerin hızlı ve erişilebilir olması bu yöntemleri oldukça avantajlı hale getirmiştir (11, 165). Geleneksel olarak kullanılan kültür yöntemlerinin sonuçlanma süresi 4-6 hafta süre almaktadır (172). Bu çalışmada geliştirilen moleküler tanı testini duyarlılık, özgüllük ve sonuçlanma süresi açısından kültür yöntemi ile karşılaştırmak amacıyla, hazırlanan seri dilüsyon örnekleri aynı zamanda LJ katı besiyerine de ekilmiştir. LJ besiyerinde altı haftalık inkübasyon süresi sonrasında 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyonlarında üreme gözlenirken, 10^{-7} ve 10^{-8} dilüsyonlarında üreme olmamıştır. Bu durumun, her seri dilüsyonla seyreltilen bakteri sayısının son iki dilüsyonda katı besiyerinde üremeye yeterli olmayacak seviyeye düşmesi nedeniyle ortaya çıkmış olabileceği düşünülmüştür. Çalışma kapsamında altın standart kültür yöntemi olarak katı bir besiyeri değil de sıvı bazlı bir besiyeri, örneğin MGIT sistemi seçilmiş olması durumunda muhtemelen daha düşük dilüsyonlarda da üreme saptanabileceği düşünülmüştür (173). Bu çalışmada geliştirilen gerçek zamanlı PCR tanı testi sonuçları incelendiğinde, *senX3* hedef bölgesi için ilk dört dilüsyonda tüm sonuçların pozitif olduğu görülmektedir. 10^{-5} dilüsyonda 20 örneğin 18'inde, 10^{-6} dilüsyonda 20 örneğin 17'sinde pozitif sonuç alınmıştır. Kültürde üremenin gözlenmediği 10^{-7} dilüsyonunda ise *senX3* PCR yöntemiyle 3 örnekte pozitif sonuç elde edilmiştir. Kültürde üremenin gözlenmediği 10^{-8} dilüsyonunda *senX3* PCR yöntemiyle de pozitif sonuç saptanmamıştır. *regX3* hedef bölgesi için geliştirilen gerçek zamanlı PCR tanı testi sonuçları incelendiğinde ise, yine ilk dört dilüsyonda tüm sonuçların pozitif olduğu görülmektedir. 10^{-5} dilüsyonda 20 örneğin 19'unda, 10^{-6}

dilüsyonda 20 örneğin 18'inde pozitif sonuç alınmıştır. Kültürde üremenin gözlenmediği 10^{-7} dilüsyonunda regX3 PCR testiyle 6 örnekte pozitif sonuç elde edilmiştir. Kültürde üremenin gözlenmediği 10^{-8} dilüsyonunda regX3 PCR yöntemiyle de pozitif sonuç saptanmamıştır. Tüm bu sonuçlar, bu çalışmada geliştirilen laboratuvar yapımı PCR tanı testinin sonuçlanma zamanı açısından altın standart olarak kullanılan kültür yöntemine göre avantajlı olduğunu, duyarlılık açısından ise rekabet edebilir düzeyde olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada MTBK saptanması amacıyla geliştirilen laboratuvar yapımı gerçek zamanlı PCR tanı testi için hedef olarak seçilen senX3-regX3 gen bölgesi ile ümit verici sonuçlar alınmıştır. Bu bölgenin farklı moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesinde iyi bir hedef bölge olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda prototip model olarak geliştirilen gerçek zamanlı PCR testinin, rutin tanıda kullanılabilmesi için iyileştirilmesi gereklidir. Bu testin uygulanması için gerçek zamanlı PCR cihazına ihtiyaç duyulması, testin önündeki en önemli sınırlayıcı engel olarak görünmektedir.

Karmaşık cihazlara duyulan ihtiyacın ortadan kaldırılabilmesi, geliştirilen tanı testinin hasta başı tanı testi olarak tasarlanmasına da olanak tanıyacaktır. Bu nedenle tasarlanan bu prototip tanı testinin geliştirilmesi ve sıcaklık döngüsüne ihtiyaç duymayan teknolojilerle birleştirilmesi hedeflenmektedir. Bu teknolojilere kart testleri örnek olarak verilebilir. Geliştirilen laboratuvar yapımı moleküler tanı testi bu teknoloji ile entegre edilerek sonuçların değerlendirilmesi görselleştirilebilir. Bu sayede hem testin kısa sürede sonuçlandırılabilmesi hem de testin gerektiğinde hastaların kendileri tarafından uygulanabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında düşük maliyetle geliştirilecek olan testler, kaynakları sınırlı ülkelerde kullanım açısından da bir avantaj sağlayacaktır.

Tüberkülozu kontrol çabaları, tanı testlerinin arzu edilen hız ve doğruluk seviyelerine çıkamaması nedeniyle sektöre ugramaktadır. Tanının gecikmesi tüberküloz hastalığının yayılmasına, buna bağlı olarak morbitite ve mortalitenin artmasına neden

olmaktadır (174, 175). Moleküler tanımlama testleri hastalık etkeninin hızlı şekilde ortaya konması için güçlü bir potansiyele sahiptir. Bu yöntemlerle sonuçlar saatler içinde elde edilmektedir. Ancak bu avantajın değerlendirilebilmesi için, yapılan testlerin her durumda vakit kaybetmeden uygulanabilecek pratiklikte olması gerekmektedir. Özellikle kültür yöntemlerine erişimi olmayan bölgeler için kullanılabilecek bu tür moleküler tanı testleri, bu patojeni daha ucuz ve daha hızlı tanımlama imkanı sağlayacaktır. Bu çalışma kapsamında senX3-regX3 hedef bölgesini hedef alan primer ve problerle tasarlanan laboratuvar yapımı gerçek zamanlı PCR tanı testinin tüberküloz tanısında yüksek bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Bundan sonraki aşamada, geliştirilen bu tanı testinin doğrudan hastadan alınmış klinik örneklerle uygulanması, testin geleceğe yönelik potansiyeline ilişkin daha detaylı bilgi sağlayacaktır. Ancak esas klinik faydanın, prototip niteliğinde olan bu testin hasta başı test şekline dönüştürülebilmesiyle sağlanacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1- Doğru ve hızlı tanı tüberküloz hastalığı ile mücadelede önemli bir adımı oluşturmaktadır. DSÖ, basil yükü düşük klinik numunelerdeki MTBK'ni tanımlamak için mikroskop yaymasına alternatif olarak moleküler testlerin kullanılabileceğini belirtmiştir. Günümüze kadar MTBK'ini tanımlamak için geliştirilen moleküler testlerin çoğunda IS6110 bölgesi hedef alınmıştır. MTBK'inde senX3-regX3 bölgesini hedef alarak geliştirilen moleküler tanı testleri oldukça sınırlıdır. senX3-regX3 bölgesini gerçek zamanlı PCR hedefi olarak alan bu çalışma sonucunda geliştirilen moleküler tanı testinin düşük basil yüküne sahip olan seri dilüsyon örneklerinde saptama etkinliğinin yüksek olduğu görülmüştür.

2- Bu çalışmada, MTBK için özgül ve iyi korunmuş bir bölge olan senX3-regX3 gen bölgesini hedef alan iki farklı primer-prob seti tasarlanmıştır. Her iki gen bölgesini hedef alan laboratuvar yapımı gerçek zamanlı PCR tanı testi ile hemen hemen eşit düzeyde duyarlılık ve özgüllük sonuçları elde edilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak kullanılan TDM izolatlarında testlerin tamamı negatif olarak sonuçlanmıştır. Bunun yanı sıra *E. coli* ve *S. aureus* izolatları ile de negatif sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar yeni geliştirilen moleküler tanı testinin kültür yöntemi ile rekabet edebilecek düzeyde olduğunu göstermiştir.

3- Mikrobiyoloji laboratuvarlarında tüberkülozun tanımlanmasında en yaygın kullanılan yöntemlerden biri altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemidir. Ancak kültür yöntemi ile sonuç alınması oldukça zaman almaktadır. Bu çalışmada geliştirilen moleküler tanı testini duyarlılık, özgüllük ve sonuçlanma süresi açısından kültür yöntemi ile karşılaştırmak amacıyla, hazırlanan seri dilüsyon örnekleri aynı zamanda LJ katı besiyerine de ekilmiştir. LJ besiyerinde altı haftalık inkübasyon süresi sonrasında ilk altı dilüsyonda üreme gözlenirken, son iki dilüsyonda üreme olmamıştır. Bu durumun, her seri dilüsyonla seyreltilen bakteri sayısının son iki dilüsyonda katı besiyerinde üremeye yeterli olmayacak seviyeye düşmesi nedeniyle ortaya çıkmış olabileceği düşünülmüştür. Çalışma kapsamında altın standart kültür yöntemi olarak katı bir besiyeri değil de sıvı bazlı bir besiyeri, örneğin MGIT sistemi

seçilmiş olması durumunda muhtemelen daha düşük dilüsyonlarda da üreme saptanabileceği sonucuna varılmıştır. Çalışmada geliştirilen gerçek zamanlı PCR tanı testi ile elde edilen sonuçlar kültür sonuçları ile rekabet edebilir düzeydedir. Hatta bazı örneklerde kültür ile negatif sonuç elde edilen 10^{-7} dilüsyonda da pozitif PCR sonucu alınmıştır.

4- Tüberkülozun moleküler tanısında IS6110 bölgesi en yaygın olarak kullanılan PCR hedef bölgesidir. Bu bölgenin avantajı, MTBK genomunda birden fazla sayıda bulunmasıdır. Bu durum hedef olarak bu bölgeyi kullanan tanı testlerinin duyarlılığında bir artışa neden olurken, kantitatif olarak bakteri sayısının belirlenmesini amaçlayan testler için bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bu çalışmada hedef bölge olarak kullanılan senX3-regX3 gen bölgesi ise MTBK genomunda sadece bir kopya olarak bulunmaktadır. Bu nedenle yüksek duyarlılık ve özgüllüğün yanında, laboratuvar yapımı bu testin gerektiğinde güvenilir bir şekilde kantitatif olarak da kullanılabilecek bir potansiyele sahip olduğu düşünülmüştür.

5- Tedavi takibinde moleküler yöntemlerden yararlanılarak yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bunun en büyük nedeni ölü bakterilerin de bu testlerle saptanmasıdır. Bu çalışmada tasarlanan primer ve problemlerle MTBK tanısı yüksek duyarlılık ve özgüllükle gerçekleştirilmiştir. Bu primer ve problemlerin senX3-regX3 gen bölgesini mRNA seviyesinde hedef alacak şekilde tasarlanabilmesi, tedavi takibinde bu tür testlerin kullanılabilmemesinin önünü açacaktır.

6- Klinik örneklerde patojenlerin tanısı amacıyla kullanılan moleküler testlerin en büyük dezavantajlarından biri, hasta başı tanı testlerine uyarlanması oldukça zor olmasıdır. Çalışma kapsamında seçilen hedef gen bölgesi ile yüksek duyarlılık ve özgüllük sonuçları elde edilmiştir. Bu nedenle aynı bölgeyi hedef alarak izotermal amplifikasyon tekniğine uygun primerlerin tasarlanmasıyla yeni bir hasta başı moleküler tanı testi geliştirilebilir.

7- Bu çalışma kapsamının genişletilerek, çok sayıda klinik örnekle gerçekleştirilmesi, testin yerel ölçekte kullanım potansiyeline katkı sağlayacaktır. Ulaşılması planlanan hedef, bu tür testlerin hasta başı moleküler test olarak kullanılabilirlikte pratikliğe uygun maliyetle dönüştürülebilmesidir. Böylece geliştirilecek tanı kitleri enfeksiyon hastalıklarının kontrol altına alınmasını kolaylaştıracak, dışa bağımlılığı azaltacak, ve ülkemize ekonomik açıdan büyük katkı sağlayacaktır.



7. KAYNAKLAR

1. World Health Organization, Global Tuberculosis Report, ISBN 978-92-4-006172-9. 2022.
2. 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.
3. World Health Organization, Global Tuberculosis Report, ISBN 978-92-4-003702-1 . 2021.
4. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Tüberküloz Dairesi Başkanlığı, Türkiye'de Verem Savaşı 2021 Raporu, Sağlık Bakanlığı Yayın No:1205. Ankara; 2021.
5. Morgan MA, Horstmeier CD, DeYoung DR, Roberts GD. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. *J Clin Microbiol.* 1983;18(2):384-8.
6. Al-Zamel FA. Detection and diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7(9):1099-108.
7. Tadele A, Beyene D, Hussein J, Gemechu T, Birhanu A, Mustafa T, et al. Immunocytochemical detection of Mycobacterium Tuberculosis complex specific antigen, MPT64, improves diagnosis of tuberculous lymphadenitis and tuberculous pleuritis. *BMC Infect Dis.* 2014;14:585.
8. 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.
9. Patel RJ, Fries JW, Piessens WF, Wirth DF. Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1990;28(3):513-8.
10. Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V, Lecossier D, Rauzier J, Bocart D, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol.* 1989;3(7):843-9.
11. Sharma K, Appannanavar SB, Modi M, Singh M, Sharma A, Varma S. Role of multiplex polymerase chain reaction using IS6110 and Protein b for the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis: North India. *Indian J Pathol Microbiol.* 2015;58(1):27-30.
12. Nghiem MN, Nguyen BV, Nguyen ST, Vo TT, Nong HV. A Simple, Single Triplex PCR of IS6110, IS1081, and 23S Ribosomal DNA Targets, Developed for Rapid Detection and Discrimination of Mycobacterium from Clinical Samples. *J Microbiol Biotechnol.* 2015;25(5):745-52.
13. Yuen LK, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B. Characterization of Mycobacterium tuberculosis strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J Clin Microbiol.* 1993;31(6):1615-8.
14. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(8):1987-95.

15. Sahadevan R, Narayanan S, Paramasivan CN, Prabhakar R, Narayanan PR. Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe. *J Clin Microbiol.* 1995;33(11):3037-9.
16. Weil A, Plikaytis BB, Butler WR, Woodley CL, Shinnick TM. The *mtp40* gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2309-11.
17. Liebana E, Aranaz A, Francis B, Cousins D. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 1996;34(4):933-8.
18. Magdalena J, Vachee A, Supply P, Locht C. Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 1998;36(4):937-43.
19. Wren BW, Colby SM, Cubberley RR, Pallen MJ. Degenerate PCR primers for the amplification of fragments from genes encoding response regulators from a range of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 1992;78(2-3):287-91.
20. Supply P, Magdalena J, Himpens S, Locht C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol.* 1997;26(5):991-1003.
21. Rifat D, Bishai WR, Karakousis PC. Phosphate depletion: a novel trigger for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *J Infect Dis.* 2009;200(7):1126-35.
22. Rickman L, Saldanha JW, Hunt DM, Hoar DN, Colston MJ, Millar JB, et al. A two-component signal transduction system with a PAS domain-containing sensor is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314(1):259-67.
23. Parish T, Smith DA, Kendall S, Casali N, Bancroft GJ, Stoker NG. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2003;71(3):1134-40.
24. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2005;1(1):e5.
25. Kapur V, Whittam TS, Musser JM. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old? *J Infect Dis.* 1994;170(5):1348-9.
26. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(6):3684-9.
27. Zimmerman MR. Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy. *Bull N Y Acad Med.* 1979;55(6):604-8.
28. Morse D, Brothwell DR, Ucko PJ. Tuberculosis in Ancient Egypt. *Am Rev Respir Dis.* 1964;90:524-41.
29. Cave A, Demonstrator A. The evidence for the incidence of tuberculosis in ancient Egypt. *British Journal of Tuberculosis.* 1939;33(3):142-52.

30. Brown L. The story of clinical pulmonary tuberculosis. The Radiological Society of North America; 1941.
31. Daniel VS, Daniel TM. Old Testament biblical references to tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 1999;29(6):1557-8.
32. Pease AS. Some remarks on the diagnosis and treatment of tuberculosis in antiquity. *Isis.* 1940;31(2):380-93.
33. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med.* 2006;100(11):1862-70.
34. Bynum H. Spitting blood: the history of tuberculosis: OUP Oxford; 2012.
35. Roberts CA, Buikstra JE. The bioarchaeology of tuberculosis: a global perspective on a re-emerging disease: University Press of Florida; 2003.
36. Murray JF, Rieder HL, Finley-Croswhite A. The King's Evil and the Royal Touch: the medical history of scrofula. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2016;20(6):713-6.
37. Frith J. History of tuberculosis. Part 1-phthisis, consumption and the white plague. *Journal of Military and Veterans Health.* 2014;22(2):29-35.
38. Gurunluoglu R, Gurunluoglu A. Paul of Aegina: landmark in surgical progress. *World J Surg.* 2003;27(1):18-25.
39. Sabbatani S. [Historical insights into tuberculosis. Girolamo Fracastoro's intuition on the transmission of tuberculosis and his opponents. History of an idea]. *Infez Med.* 2004;12(4):284-91.
40. Saeed BW. Malignant tuberculosis. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2006;18(3):1-2.
41. Segen JC. The dictionary of modern medicine: CRC Press; 1992.
42. Dormandy T. The white death: a history of tuberculosis. 1999.
43. Duffin J. To see with a better eye: a life of RTH Laennec: Princeton University Press; 2014.
44. Daniel TM. Rene Theophile Hyacinthe Laennec and the founding of pulmonary medicine. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8(5):517-8.
45. Baroukh M. Il favoloso innesto. Storia sociale della vaccinazione. Bari: La Terza; 1996.
46. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017;58(1):E9-E12.
47. Gradmann C. Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin. *Med Hist.* 2001;45(1):1-32.
48. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffre A, Sabio y Garcia J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence.* 2013;4(1):3-66.
49. Pfyffer GE. *Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. Manual of Clinical Microbiology* 2015. p. 536-69.
50. Fong I, Fong I. Emerging and difficult to treat nontuberculous mycobacteria infections. *Current Trends and Concerns in Infectious Diseases.* 2020:289-317.

51. Grzegorzewicz AE, de Sousa-d'Auria C, McNeil MR, Huc-Claustre E, Jones V, Petit C, et al. Assembling of the *Mycobacterium tuberculosis* Cell Wall Core. *J Biol Chem*. 2016;291(36):18867-79.
52. Singh P, Rameshwaram NR, Ghosh S, Mukhopadhyay S. Cell envelope lipids in the pathophysiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol*. 2018;13:689-710.
53. Ghazaei C. *Mycobacterium tuberculosis* and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *J Res Med Sci*. 2018;23:63.
54. Maitra A, Munshi T, Healy J, Martin LT, Vollmer W, Keep NH, et al. Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(5):548-75.
55. Singh G, Kumar A, Maan P, Kaur J. Cell Wall Associated Factors of *Mycobacterium tuberculosis* as Major Virulence Determinants: Current Perspectives in Drugs Discovery and Design. *Curr Drug Targets*. 2017;18(16):1904-18.
56. van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(4):653.
57. Smith NH, Kremer K, Inwald J, Dale J, Driscoll JR, Gordon SV, et al. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of theoretical biology*. 2006;239(2):220-5.
58. Lee J, Boyce S, Powers J, Baer C, Sasseti CM, Behar SM. CD11cHi monocyte-derived macrophages are a major cellular compartment infected by *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*. 2020;16(6):e1008621.
59. Ramon-Luing LA, Palacios Y, Ruiz A, Téllez-Navarrete NA, Chavez-Galan L. Virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis* as modulators of cell death mechanisms. *Pathogens*. 2023;12(6):839.
60. Holzheimer M, Buter J, Minnaard AJ. Chemical synthesis of cell wall constituents of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemical reviews*. 2021;121(15):9554-643.
61. Doz E, Rose S, Nigou J, Gilleron M, Puzo G, Erard F, et al. Acylation determines the toll-like receptor (TLR)-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor-, and SIGNR1-independent negative regulation of pro-inflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(36):26014-25.
62. Turner J, Torrelles JB. Mannose-capped lipoarabinomannan in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Pathogens and disease*. 2018;76(4):fty026.
63. Torrelles JB, Schlesinger LS. Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis*. 2010;90(2):84-93.
64. Rahlwes KC, Dias BR, Campos PC, Alvarez-Arguedas S, Shiloh MU. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence*. 2023;14(1):2150449.
65. Dziejman M, Mekalanos JJ. Two-component signal transduction and its role in the expression of bacterial virulence factors. *Two-Component Signal Transduction*. 1995:303-17.
66. Bretl DJ, Demetriadou C, Zahrt TC. Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *MMBR*. 2011;75(4):566-82.

67. Rifat D, Karakousis PC. Differential regulation of the two-component regulatory system *senX3-regX3* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*. 2014;160(6):1125-33.
68. Supply P, Magdalena J, Himpens S, Loch C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular microbiology*. 1997;26(5):991-1003.
69. Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTR plus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(8):2692-9.
70. Parish T. Two-component regulatory systems of mycobacteria. *Molecular genetics of Mycobacteria*. 2014:209-23.
71. Broccolo F, Scarpellini P, Locatelli G, Zingale A, Brambilla AM, Cichero P, et al. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* load by two real-time calibrated PCR assays. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(10):4565-72.
72. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393(6685):537-44.
73. Galagan JE. Genomic insights into tuberculosis. *Nat Rev Genet*. 2014;15(5):307-20.
74. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol*. 2002;46(3):709-17.
75. Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics *bacille Calmette-Guerin* attenuation. *J Infect Dis*. 2003;187(1):117-23.
76. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet*. 2013;45(10):1176-82.
77. Kanabalan RD, Lee LJ, Lee TY, Chong PP, Hassan L, Ismail R, et al. Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. *Microbiol Res*. 2021;246:126674.
78. Liu F, Hu Y, Wang Q, Li HM, Gao GF, Liu CH, et al. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *BMC Genomics*. 2014;15(1):469.
79. Brites D, Loiseau C, Menardo F, Borrell S, Boniotti MB, Warren R, et al. A New Phylogenetic Framework for the Animal-Adapted *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Front Microbiol*. 2018;9:2820.
80. Ngabonziza JCS, Loiseau C, Marceau M, Jouet A, Menardo F, Tzfadia O, et al. A sister lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex discovered in the African Great Lakes region. *Nat Commun*. 2020;11(1):2917.

81. Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(7):537-44.
82. Brynildsrud OB, Pepperell CS, Suffys P, Grandjean L, Monteserin J, Debech N, et al. Global expansion of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation. *Sci Adv*. 2018;4(10):eaat5869.
83. Streicher EM, Victor TC, van der Spuy G, Sola C, Rastogi N, van Helden PD, et al. Spoligotype signatures in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*. 2007;45(1):237-40.
84. Zhu L, Zhong J, Jia X, Liu G, Kang Y, Dong M, et al. Precision methylome characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) using PacBio single-molecule real-time (SMRT) technology. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(2):730-43.
85. Wright A, Zignol M, Van Deun A, Falzon D, Gerdes SR, Feldman K, et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002-07: an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *Lancet*. 2009;373(9678):1861-73.
86. Corbett EL, Marston B, Churchyard GJ, De Cock KM. Tuberculosis in sub-Saharan Africa: opportunities, challenges, and change in the era of antiretroviral treatment. *Lancet*. 2006;367(9514):926-37.
87. World Health Organization, Global Tuberculosis Report, ISBN 978-92-4-008385-1. 2023.
88. World Health Organization, Global Tuberculosis Report, ISBN 978-92-4-001313-1. 2020.
89. Golub JE, Mohan CI, Comstock GW, Chaisson RE. Active case finding of tuberculosis: historical perspective and future prospects. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;9(11):1183-203.
90. Corbett EL, Bandason T, Duong T, Dauya E, Makamure B, Churchyard GJ, et al. Comparison of two active case-finding strategies for community-based diagnosis of symptomatic smear-positive tuberculosis and control of infectious tuberculosis in Harare, Zimbabwe (DETECTB): a cluster-randomised trial. *Lancet*. 2010;376(9748):1244-53.
91. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Tüberküloz Dairesi Başkanlığı, Türkiye'de Verem Savaşı 2020 Raporu, Sağlık Bakanlığı Yayın No:1205. Ankara; 2020.
92. Lonnroth K, Raviglione M. The WHO's new End TB Strategy in the post-2015 era of the Sustainable Development Goals. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2016;110(3):148-50.
93. Leung AN. Pulmonary tuberculosis: the essentials. *Radiology*. 1999;210(2):307-22.
94. Luies L, Du Preez I. The echo of pulmonary tuberculosis: mechanisms of clinical symptoms and other disease-induced systemic complications. *Clinical microbiology reviews*. 2020;33(4):10.1128/cmr. 00036-20.
95. Schluger NW. The pathogenesis of tuberculosis: the first one hundred (and twenty-three) years. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32(4):251-6.
96. Center for Disease Control and Prevention, Tuberculosis: Causes and How It Spread. 2024 [erişim tarihi : 02.04.2024]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/tb/causes/index.html>.

97. Gengenbacher M, Kaufmann SH. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(3):514-32.
98. Reece ST, Kaufmann SH. Floating between the poles of pathology and protection: can we pin down the granuloma in tuberculosis? *Curr Opin Microbiol.* 2012;15(1):63-70.
99. Hunter RL. Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review. *Tuberculosis (Edinb).* 2011;91(6):497-509.
100. Dorhoi A, Kaufmann SH. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. *Semin Immunopathol.* 2016;38(2):153-66.
101. Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol.* 2009;10(9):943-8.
102. Chai Q, Zhang Y, Liu CH. Mycobacterium tuberculosis: an adaptable pathogen associated with multiple human diseases. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2018;8:158.
103. Grosset J. Mycobacterium tuberculosis in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):833-6.
104. Alsayed SSR, Gunosewoyo H. Tuberculosis: Pathogenesis, Current Treatment Regimens and New Drug Targets. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6).
105. Gill CM, Dolan L, Piggott LM, McLaughlin AM. New developments in tuberculosis diagnosis and treatment. *Breathe (Sheff).* 2022;18(1):210149.
106. Huang Y, Ai L, Wang X, Sun Z, Wang F. Review and Updates on the Diagnosis of Tuberculosis. *J Clin Med.* 2022;11(19).
107. Pai M, Nicol MP, Boehme CC. Tuberculosis Diagnostics: State of the Art and Future Directions. *Microbiol Spectr.* 2016;4(5).
108. Wu J, Lu L, Zhang L, Ding Y, Wu F, Zuo W, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in P2X7 Gene Are Associated with Serum Immunoglobulin G Responses to Mycobacterium tuberculosis in Tuberculosis Patients. *Dis Markers.* 2015;2015:671272.
109. Boyd JC, Marr JJ. Decreasing reliability of acid-fast smear techniques for detection of tuberculosis. *Ann Intern Med.* 1975;82(4):489-92.
110. Foulds J, O'Brien R. New tools for the diagnosis of tuberculosis: the perspective of developing countries. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998;2(10):778-83.
111. Datta S, Sherman JM, Bravard MA, Valencia T, Gilman RH, Evans CA. Clinical evaluation of tuberculosis viability microscopy for assessing treatment response. *Clin Infect Dis.* 2015;60(8):1186-95.
112. Zheng R, Xu F, Huang X, Wang J, Feng Y, Huang J, et al. Evaluation of Aptamer Fluorescence Microscopy in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *Microbiol Spectr.* 2022;10(4):e0260221.
113. Minion J, Sohn H, Pai M. Light-emitting diode technologies for TB diagnosis: what is on the market? *Expert review of medical devices.* 2009;6(4):341-5.

114. Chien HP, Yu MC, Wu MH, Lin TP, Luh KT. Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4(9):866-70.
115. Rageade F, Picot N, Blanc-Michaud A, Chatellier S, Mirande C, Fortin E, et al. Performance of solid and liquid culture media for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical materials: meta-analysis of recent studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(6):867-70.
116. Baylan O. Culture based diagnostic methods for tuberculosis. *Mikrobiyoloji bulteni.* 2005;39(1):107-24.
117. Hassan AA, Khan IUH, Ganz S, Wehrend A, Failing K, Eisenberg T, et al. Assessing efficacy of N-Acetyl-L-Cysteine-Sodium Hydroxide on bacterial viability and enhanced recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine colostrum. *J Microbiol Methods.* 2020;175:105968.
118. Procop GW. Laboratory Diagnosis and Susceptibility Testing for *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr.* 2016;4(6).
119. Orikiriza P, Nyehangane D, Atwine D, Kisakye JJ, Kassaza K, Amumpaire JM, et al. Evaluation of the SD Bioline TB Ag MPT64 test for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex from liquid cultures in Southwestern Uganda. *Afr J Lab Med.* 2017;6(2):383.
120. Brent AJ, Mugo D, Musyimi R, Mutiso A, Morpeth S, Levin M, et al. Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MPT64 assays for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in liquid culture. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4343-6.
121. Oommen S, Banaji N. Laboratory diagnosis of tuberculosis: Advances in technology and drug susceptibility testing. *Indian J Med Microbiol.* 2017;35(3):323-31.
122. Shah NS, Moodley P, Babaria P, Moodley S, Ramtahal M, Richardson J, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance by the microscopic-observation drug-susceptibility assay. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(10):1427-33.
123. Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, Schiller I, Laal S, Ramsay A, et al. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2011;8(8):e1001062.
124. Strohmeier GR, Fenton MJ. Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes Infect.* 1999;1(9):709-17.
125. Li Z, Tong X, Liu S, Yue J, Fan H. The Value of FujiLAM in the Diagnosis of Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Public Health.* 2021;9:757133.
126. Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med.* 2007;146(5):340-54.
127. Metcalfe JZ, Everett CK, Steingart KR, Cattamanchi A, Huang L, Hopewell PC, et al. Interferon-gamma release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 4(Suppl 4):S1120-9.

128. Tiwari S, Nataraj G, Kanade S, Mehta P. Diagnosis of pediatric pulmonary tuberculosis with special reference to polymerase chain reaction based nucleic acid amplification test. *Int J Mycobacteriol.* 2015;4(1):48-53.
129. Nurwidya F, Handayani D, Burhan E, Yunus F. Molecular Diagnosis of Tuberculosis. *Chonnam Med J.* 2018;54(1):1-9.
130. Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-time polymerase chain reaction: Current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis. *Genes.* 2022;13(12):2387.
131. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC biotechnology.* 2003;3:1-13.
132. Chauhan DS, Sharma R, Parashar D, Sharma P, Das R, Chahar M, et al. Early detection of multidrug resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with in-house designed fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes using real-time PCR. 2016.
133. Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaître N. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS 6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *Journal of clinical microbiology.* 2011;49(5):1772-6.
134. Venter R, Derendinger B, De Vos M, Pillay S, Dolby T, Simpson J, et al. *Mycobacterial* genomic DNA from used Xpert MTB/RIF cartridges can be utilised for accurate second-line genotypic drug susceptibility testing and spoligotyping. *Scientific reports.* 2017;7(1):14854.
135. Ciftçi IH, Aslan MH, Aşık G. Evaluation of Xpert MTB/RIF results for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Mikrobiyoloji bulteni.* 2011;45(1):43-7.
136. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med.* 2010;363(11):1005-15.
137. Theron G, Venter R, Calligaro G, Smith L, Limberis J, Meldau R, et al. Xpert MTB/RIF results in patients with previous tuberculosis: can we distinguish true from false positive results? *Clinical Infectious Diseases.* 2016;62(8):995-1001.
138. Zhang X, He X, Zhang Y, Chen L, Pan Z, Huang Y, et al. A new method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* based on the CRISPR/Cas system. *BMC Infect Dis.* 2023;23(1):680.
139. Lee RS, Pai M. Real-Time Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: Are We There Yet? *J Clin Microbiol.* 2017;55(5):1249-54.
140. Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):2875-9.
141. Alcolea-Medina A, Fernandez MTC, Montiel N, Garcia MPL, Sevilla CD, North N, et al. An improved simple method for the identification of *Mycobacteria* by MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption- Ionization mass spectrometry). *Sci Rep.* 2019;9(1):20216.

142. ALBAY A, HOŞBUL T, UÇARMAN SN, ÖZCAN H, TEKİN K, ARSLANTÜRK A. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Tanımlanmasında Üç Farklı Protein Ekstraksiyon Protokolü ve Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonUçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi Etkinliğinin Araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni. 2022;56(2):206-17.
143. Gonzalo X, Broda A, Drobniewski F, Larrouy-Maumus G. Performance of lipid fingerprint-based MALDI-ToF for the diagnosis of mycobacterial infections. Clin Microbiol Infect. 2021;27(6):912 e1- e5.
144. Mao L, LaCourse SM, Kim S, Liu C, Ning B, Bao D, et al. Evaluation of a serum-based antigen test for tuberculosis in HIV-exposed infants: a diagnostic accuracy study. BMC Med. 2021;19(1):113.
145. Jaeger S, Juarez-Espinosa OH, Candemir S, Poostchi M, Yang F, Kim L, et al. Detecting drug-resistant tuberculosis in chest radiographs. Int J Comput Assist Radiol Surg. 2018;13(12):1915-25.
146. Luo Y, Xue Y, Song H, Tang G, Liu W, Bai H, et al. Machine learning based on routine laboratory indicators promoting the discrimination between active tuberculosis and latent tuberculosis infection. Journal of Infection. 2022;84(5):648-57.
147. Özçolpan OO, Sürücüoğlu S, Özkütük N, Çavuşoğlu C. Klinik Örneklerden Soyutlanan ve DNA Dizi Analizi ile Tanımlanan Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Dağılımı*[Distribution of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens and identified with DNA sequence analysis]. Mikrobiyol Bul. 2015;49(4):484-93.
148. Ceyhan İ ŞH, Gülnur Tarhan G. Tüberkülozun Tanısında %2 Ogawa Besiyerinin Löwenstein-Jensen Besiyeri ile Karşılaştırılması ve Değerlendirilmesi. Mikrobiyoloji bülteni. 2012;46(1):33-38.
149. Erdem HA, Sanlidag G, Cinar E, Yasar M, Pullukcu H, Tasbakan MS, et al. Dost mu Dusman mi? COVID-19 Enfeksiyonu Tanili Hastalarda BCG ASISI ve Latent Tüberküloz Friend or Foe? Evaluation of BCG Vaccine and Latent Tuberculosis Infection Effect in Patients Diagnosed with COVID-19 Infection. MIKROBIOLOJİ BULTENİ. 2021;55(3):300-10.
150. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161(4 Pt 1):1376-95.
151. Tuberculosis Division International Union Against T, Lung D. Tuberculosis bacteriology--priorities and indications in high prevalence countries: position of the technical staff of the Tuberculosis Division of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Int J Tuberc Lung Dis. 2005;9(4):355-61.
152. Ai JW, Zhou X, Xu T, Yang M, Chen Y, He GQ, et al. CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for Mycobacterium tuberculosis. Emerg Microbes Infect. 2019;8(1):1361-9.
153. Broccolo F, Scarpellini P, Locatelli G, Zingale A, Brambilla AM, Cichero P, et al. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of Mycobacterium tuberculosis load by two real-time calibrated PCR assays. J Clin Microbiol. 2003;41(10):4565-72.

154. Bruijnesteijn Van Coppenraet E, Lindeboom JA, Prins JM, Peeters MF, Claas EC, Kuijper EJ. Real-time PCR assay using fine-needle aspirates and tissue biopsy specimens for rapid diagnosis of mycobacterial lymphadenitis in children. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(6):2644-50.
155. Takahashi T, Nakayama T. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):1029-39.
156. ÖZKÜTÜK N, SÜRÜCÜOĞLU S. Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul* 2014; 48 (2): 223-232. *Mikrobiyol Bul*. 2014;48(2):223-32.
157. Gursoy NC, Yakupogullari Y, Tekerekoglu MS, Otlu B. [Evaluation of the diagnostic performance of Xpert MTB/RIF test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance in clinical samples]. *Mikrobiyol Bul*. 2016;50(2):196-204.
158. ALP A, SARIBAŞ Z. Klinik örneklerden *Mycobacterium tuberculosis* saptanmasında Anyplex Mtb/Ntm testinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2019;53(4):355-63.
159. Millman AJ, Dowdy DW, Miller CR, Brownell R, Metcalfe JZ, Cattamanchi A, et al. Rapid molecular testing for TB to guide respiratory isolation in the U.S.: a cost-benefit analysis. *PLoS One*. 2013;8(11):e79669.
160. Chaisson LH, Roemer M, Cantu D, Haller B, Millman AJ, Cattamanchi A, et al. Impact of GeneXpert MTB/RIF assay on triage of respiratory isolation rooms for inpatients with presumed tuberculosis: a hypothetical trial. *Clin Infect Dis*. 2014;59(10):1353-60.
161. Lippincott CK, Miller MB, Popowitch EB, Hanrahan CF, Van Rie A. Xpert MTB/RIF assay shortens airborne isolation for hospitalized patients with presumptive tuberculosis in the United States. *Clin Infect Dis*. 2014;59(2):186-92.
162. SOINI H, VILJANEN MK. Gene amplification in the diagnosis of mycobacterial infections. *APMIS*. 1997;105(1-6):345-53.
163. Zheng H, Lu L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhu G, et al. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One*. 2008;3(6):e2375.
164. Thakku SG, Lirette J, Murugesan K, Chen J, Theron G, Banaei N, et al. Genome-wide tiled detection of circulating *Mycobacterium tuberculosis* cell-free DNA using Cas13. *Nat Commun*. 2023;14(1):1803.
165. Nghiem MN, Nguyen BV, Nguyen ST, Vo TTB, Nong HV. A simple, single triplex PCR of IS6110, IS1081, and 23S ribosomal DNA targets, developed for rapid detection and discrimination of mycobacterium from clinical samples. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015;25(5):745-52.
166. Chawla K, Gupta S, Mukhopadhyay C, Rao PS, Bhat SS. PCR for *M. tuberculosis* in tissue samples. *J Infect Dev Ctries*. 2009;3(2):83-7.
167. Miller MB, Popowitch EB, Backlund MG, Ager EP. Performance of Xpert MTB/RIF RUO assay and IS6110 real-time PCR for *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2011;49(10):3458-62.
168. Moatter T, Mirza S, Siddiqui MS, Soomro IN. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin embedded intestinal tissue specimens by polymerase chain reaction:

characterization of IS6110 element negative strains. Journal of Pakistan Medical Association. 1998;48(6):174.

169. 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.

170. Yaghoubi A, Emami A, Ghazvini K, Asnaashari AM, Akhlaghi S, Gholubi A, et al. Quantitative evaluation senx3-regx3 gene of Mycobacterium tuberculosis by real-time RT-PCR assays for monitoring the response to anti-TB therapy. Gene Rep. 2022;28:101642.

171. Alp A. Recent advances in molecular point of care tests. Mikrobiyoloji Bulteni. 2022;56(3).

172. Yan L, Xiao H, Zhang Q. Systematic review: Comparison of Xpert MTB/RIF, LAMP and SAT methods for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Tuberculosis (Edinb). 2016;96:75-86.

173. KUNDURACIOĞLU A, KARASU I, BİÇMEN C, ÖZSÖZ A, ERBAYCU AE. Yayma Negatif Tüberküloz Olgularının Tanısında MTD Gen-Probe® Testi, BACTEC 960™ Sistemi ve Löwenstein-Jensen Kültür Yöntemlerinin Performansının Karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul. 2013;47(3):417-31.

174. Shin SS, Keshavjee S, Gelmanova IY, Atwood S, Franke MF, Mishustin SP, et al. Development of extensively drug-resistant tuberculosis during multidrug-resistant tuberculosis treatment. Am J Respir Crit Care Med. 2010;182(3):426-32.

175. Kim CK, Shin SY, Kim HJ, Lee K. Drug Resistance Patterns of Multidrug- and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in Korea: Amplification of Resistance to Oral Second-line Drugs. Ann Lab Med. 2017;37(4):323-6.

8. EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAYI


T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 336
Konu :
20.04.2021

Doç. Dr. Alparslan ALP
Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Doç. Dr. ALP,

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz GO 21/553 kayıt numaralı ve *"Laboratuvar Yapımı Bir PCR Yöntemi ile Mycobacterium tuberculosis Kompleksi'nin Saptanması"* başlıklı proje Kurulumuzun 20.04.2021 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup, çalışmanın mikrop izolatları üzerinde tamamlanacağı görülmüştür. Gönüllü insanlar üzerinde gerçekleştirilecek nitelikte olmayan bu tip çalışmalar Etik Kurulların kapsamı dışında kalmaktadır.

Bu yazı ilgili protokolün etik açıdan incelendiğini belirtmek için Etik Kurul kararı yerine geçmek üzere hazırlanmıştır.

Bilgilerinize rica ederim

Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN
Başkan

EK
Toplantı Katılım Tutanağı

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

EK-2 TEZ ORJİNALLİK RAPORU**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Veli Tato
Ödev başlığı: Tez Son
Gönderi Başlığı: LABORATUVAR YAPIMI BİR POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (...
Dosya adı: 2024_TEZ-VEL_TATO.docx
Dosya boyutu: 7.14M
Sayfa sayısı: 88
Kelime sayısı: 18,743
Karakter sayısı: 125,523
Gönderim Tarihi: 23-Tem-2024 09:10ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2421199004

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LABORATUVAR YAPIMI BİR POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)
YÖNTEMİ İLE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKSİNİN
SAPTANMASI

Uzm. Dr. Veli TATO

Mikrobiyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2024

LABORATUVAR YAPIMI BİR POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) YÖNTEMİ İLE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKSİNİN SAPTANMASI

ORJİNAL RAPORU

% 16	% 15	% 9	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	www.mikrobiyolbul.org İnternet Kaynağı	% 3
3	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
4	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 2
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
8	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<% 1

e-journal.unair.ac.id

9. ÖZGEÇMİŞ

