

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**IRAK'TAKİ PULMONER VE
EKSTRAPULMONER TÜBERKULOZLU
HASTALARI İÇİN GENEXPERT MTB / RIF VE
TB-LAMP TEKNİKLERİ İLE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
BAKTERİSİNİN İZOLASYONU VE
MOLEKÜLER TANISI**

Yehia Kadhim JABBER BENELLAM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IRAK'TAKİ PULMONER VE EKSTRAPULMONER TÜBERKULOZLU HASTALARI İÇİN GENEXPERT MTB / RIF VE TB-LAMP TEKNİKLERİ İLE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BAKTERİSİNİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER TANISI

Yehia Kadhim JABBER BENELLAM

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Özcan ÖZKAN

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Zahid Saadoun AZİZ

Tüberküloz (Verem) tüm dünyada hayatı tehdit eden bir enfeksiyon hastalığı olarak önemli bir sağlık sorunudur. Dünya nüfusunun yaklaşık %30'u *Mycobacterium tuberculosis* ile enfektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2020 raporuna göre 2019 yılında yaklaşık 500.000 kişide rifampisine dirençli tüberküloz geliştiğini ve bunların %78'inin çoklu ilaca dirençli tüberküloz olduğunu bildirilmiştir. 2019'da 10 milyon kişi verem hastalığına yakalandı. Bu nedenle enfeksiyonun erken tanı konulması tedavinin setri bakımından oldukça önemlidir. Günümüzde *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin tespiti için DNA bazlı analizlerin geliştirilmesi, geleneksel mikroskopi ve kültüre kıyasla duyarlılığı önemli ölçüde artırmıştır. Bu çalışmada da Irak'taki akciğer ve akciğer dışı tübelkülozlu hastalarda Genexpert MTB/RIF ve TB-LAMP teknikleri ile *Mycobacterium tuberculosis* izolasyonu ve moleküler tanısının ortaya konulması amaçlanmıştır. Irak'ın orta, güney ve batı kesimlerinden Ulusal Solunum Hastalıkları Merkezi'ne başvuran hastalardan 141 adet numune balgam, vücut sıvısı gibi numuneler alındı. Numulere rutin aside dirençli basil testi yapıldı. Test sonucunda 58 (54 pulmoner + 4 ekstrapulmoner) numune pozitif olarak belirlendi. Moleküler tanı amaçlı olarak örnekler için Genexpert MTB/RIF ve TB-LAMP tekniği uygulandı. Toplam 107 akciğer örneğinden 76 örnek pozitif tanı konuldu. Ekstrapulmoner 14 örnek pozitif tanı aldı. İki vakanın rifampin direnci teşhis edildi. Ayrıca, aynı numunelerin moleküler tanısı TB-LAMP tekniği ile pulmoner tüberküloz için 70 numune pozitif ve ekstra pulmoner örneklerden de 8 numune pozitif tanı aldı. Çalışmanın sonucunda, Genexpert MTB/RIF tekniği tanıda daha özgüllük ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Irak, *Mycobacterium tuberculosis*, Tanı, Moleküler teknik.

2021, 72 sayfa

ABSTRACT

Master of Science Thesis

ISOLATION AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BACTERIA WITH GENEXPERT MTB / RIF AND TB-LAMP TECHNIQUES FOR PULMONARY AND EXTRAPULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS IN IRAQ

Yehia Kadhim JABBER BENELLAM

Çankırı Karatekin University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

BIOLOGY

Consultant: Prof. Dr. Özcan ÖZKAN

Co-Consultant: Assist. Prof. Zahid Saadoun AZİZ

Tuberculosis (TB) is an important health problem as a life-threatening infectious disease all over the world. Approximately 30% of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*. According to the World Health Organization (WHO) 2020 report, it was reported that approximately 500,000 people developed rifampicin-resistant tuberculosis in 2019, and 78% of them were multidrug-resistant tuberculosis. 10 million people contracted TB disease in 2019. Therefore, early diagnosis of infection is very important in terms of treatment. Today, the development of DNA-based assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex has significantly increased sensitivity compared to traditional microscopy and culture. In this study, it was aimed to reveal the isolation and molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* with Genexpert MTB/RIF and TB-LAMP techniques in patients with pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in Iraq. 141 specimens such as sputum and body fluid samples were taken from the patients who applied to the National Respiratory Diseases Center from central, southern and western parts of Iraq. Routine acid-fast bacilli test was performed on the samples. As a result of the test, 58 (54 pulmonary + 4 extrapulmonary) samples were determined to be positive. Genexpert MTB/RIF and TB-LAMP techniques were used for molecular diagnosis. From a total of 107 lung samples, 76 samples were diagnosed as positive. Extrapulmonary 14 samples were diagnosed as positive. Rifampin resistance was diagnosed in two cases. In addition, the molecular diagnosis of the same samples was made with the TB-LAMP technique, and 70 samples were positive for pulmonary tuberculosis and 8 samples from extra pulmonary samples were diagnosed as positive. As a result of the study, the Genexpert MTB / RIF technique has shown that it has more specificity and sensitivity in diagnosis.

Key Words: Iraq, *Mycobacterium tuberculosis* Diagnosis, Molecular technique.

2021, 72 pages

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Merhametli Allah'ın adıyla, bana verdiği her şey için Allah'a şükürler olsun. Çalışmalarımı yerine getirmek için bana güç ve irade veren Allah'a şükranlarımı sunarım. Araştırma hazırlığının sonunda, değerli danışmanlarıma, Prof. Dr. Özcan Özkan, Çankırı Karatekin Üniversitesi ve Dr. Zahid Saadoun Aziz, Maysan Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Yaşam Bilimleri Bölümü Başkanı sürekli önerileri, yardımları için çok teşekkür ederim. Solunum Hastalıkları Uzmanlık Merkezi personeline, özellikle Merkez Müdürü Dr.Ahmed Asmar Mankhi, Dr.Ahmed Majed Al-Abd'ye ve örnek alım ünitesindeki ve moleküler biyoloji ünitesinde bulunan tüm personeline içten teşekkürlerimi ve takdirlerimi sunuyorum.

Yehia Kadhım JABBER BENELLAM

Çankırı, Mart 2021

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ ONAY SAYFASI.....	ii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	
KAYNAK ÖZETLERİ	5
1.1. Tüberküloz hastalığı.....	5
1.1.1. Tüberküloz tarihi	5
1.1.2. Küresel olarak tüberküloz hastalığı	6
1.1.3. COVID-19 salgını ve TB - etkisi ve etkileri	7
1.1.4. Irak'ta tüberküloz.....	8
1.1.5. Tüberküloz ve insan genetiği.....	10
1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in bakteriyolojik özellikleri	11
1.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> sınıflandırması	13
1.4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi.....	14
1.5. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> genom organizasyonu	14
1.6. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksin genotiplendirilmesi	17
1.7. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> bulaşması	19
1.8. Patojenite	19
1.8.1. Tüberküloz belirtileri.....	22
1.8.2. Tüberküloz teşhisi	23
1.9. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in smear mikroskobu	24
1.10. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in kültürü	24
1.11. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks fenotipinin tanımlanması.....	25
1.12. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in immünolojik tanısı	26
1.13. Fenotipik ilaç duyarlılık testi.....	26
1.14. Tüberküloz tanısında yeni moleküler testler.....	27
1.14.1. Line Probe Assay (LPA)	27
1.14.2. GeneXpert MTB / RIF testi	28
1.14.3. Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) testi	28

1.14.4. Tuberkülozun tedavisi.....	29
1.14.5. Tüberkoloz aşılama	30
BÖLÜM 2	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
2.1. Materyal	32
2.1.1. Çalışma yeri, hastalar ve numuneler.....	33
2.2. Yöntem.....	35
2.2.1. Örnek toplama ve dekontaminasyon işlemi.....	35
2.2.2. Mikroskopik inceleme yöntemi	36
2.2.3. Genexpert MTB/RIF testi yöntemi.....	36
2.2.4. TB-LAMP testiyöntemi	42
BÖLÜM 3	
BULGULAR.....	46
3.1. Mikroskopik inceleme sonuçları.....	46
3.2. Genexpert MTB/RIF test sonuçları	47
3.3. TB-LAMP testi sonuçları.....	49
BÖLÜM 4	
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	53
EKLER	72
ÖZGEÇMİŞ	I

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFB	: Aside dirençli basil
BCG	: Bacillus Calmette-Guérin
BSA	: Sığır serum albümini
CDC	: Hastalık Kontrol Merkezi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EMR	: Doğu Akdeniz Bölgesi
EPTB	: Ekstrapulmoner TB
FQ	: Florokinolon
HIV	: İnsan bağışıklık eksikliği virüsü
HYB	: Hibridizasyon Tampon
ICMR	: Hindistan tıbbi araştırma konseyi
IGRA	: İnterferon Gamma Salınım Testleri
INH	: Isoniazid
IUATLD	: Uluslararası Tüberküloz ve Akciğer Hastalıkları Birliği
L.J	: Lowenstein-Jensen Besiyeri
LTB	: Gizli Tüberküloz
LTBI	: Gizli Tüberküloz Enfeksiyonu
BÖD	: Çoklu ilaca dirençli
MIRU-VNTR	: Mikobakteriyel Serpiştirilmiş Tekrarlayan Üniteler-Değişken
MTBC	: Mycobacterium tuberculosis kompleksi
MTBDR	: Mycobacterium tuberculosis laç direnci
NAAT	: Nucleic acid amplification techniques
NRL	: Ulusal Referans Laboratuvarı/Bağdat

NTP	:	Ulusal tüberkülozis Programı
PZR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PE	:	Prolin (P) Glutamik asit (E) PE
PPE	:	Prolin (P) Prolin (P) Glutamik asit (E) PPE
PTB	:	Akciğer tüberkülozu
PZA	:	Pirazinamid
rpoB	:	RNA polimeraz beta
RDBB	:	RIF direnci belirleyici bölge
BÖD-TB	:	Büyük ölçüde ilaca dirençli TB



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1.	2019 yılı küresel olarak tahmin edilen TB insidans oranları (WHO 2020).	6
Şekil 1.2.	2015-2019 yılları arasında TB insidans oranında, TB ölümlerinde ve yıkıcı maliyet (WHO 2020).	7
Şekil 1.3.	COVID-19 salgınının 2020’de küresel tüberküloz ölümleri üzerindeki beklenen etkisi (WHO 2020).	8
Şekil 1.4.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ’in neden olduğu insan enfeksiyonunun doğal seyri ve ardından klinik tüberküloz gelişimi.	11
Şekil 1.5.	Karbol-fuksin bazlı kinyoun boyası (A) ve auramin-rodamin boyası (B) ile boyanmış mikobakteriler (Caulfiel and Wengenack 2016). 40x büyütme altında floresan oramin-rodamin boyama (B) ve 100x yağ emülsiyonu altında AFB boyama.	12
Şekil 1.6.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> hücre duvarı. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ’nin antijenik yapısı, çeşitli proteinler ve polisakkaritlerden oluşur (Rageade <i>et al.</i> 2014).	12
Şekil 1.7.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv dairesel kromozom haritası (Smith, 2003).	16
Şekil 1.8.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> patojenitesi (Nunes-Alves <i>et al.</i> 2014).	21
Şekil 1.9.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> karşı immün yanıtta farklı T hücre popülasyonlarının aktivasyonunu tetikleyen farklı T hücresi işleme yolları (Kaufmann 2001).	22
Şekil 1.10.	Akciğer dışı tüberkülozdan en çok etkilenen bölgeler.	23
Şekil 1.11.	Lowenstein-Jensen üzerindeki <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kolonileri.	25
Şekil 1.12.	Line Probe Assay prensibi (Barnard <i>et al.</i> , 2012b).	27
Şekil 1.13.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> enfeksiyonu ve rifampisin direnci tespiti için Cepheid Xpert® sistemi ve MTB/RIF test kartuşu (Caulfield <i>et al.</i> 2016).	29
Şekil 1.14.	Humaloop T cihazı.	29
Şekil 2.1.	Çalışma yer tesisinden görüntüler.	34
Şekil 2.2.	Kartuş bileşenleri	37
Şekil 2.3.	Numuneyi kartuşa yerleştirme adımları.	38
Şekil 2.4.	Gerçek zamanlı büyüme eğrisi döngüsü eşiği (Ct). (Global TB program GLI, 2020)	39
Şekil 2.5.	rpoB geninin 81 bp çekirdek dizisi.	40
Şekil 2.6.	Genexpert MTB/RIF uygulama protokolünü.	41
Şekil 2.7.	TB-LAMP moleküler prensibi	43
Şekil 2.8.	TB-LAMP primerleri ile hedef genin amplifikasyonu (Parida <i>et al.</i> 2008).	44
Şekil 2.9.	TB-LAMP prosedürü.	44
Şekil 2.10.	TB-LAMP testi için pozitif ve negatif sonuçların değerlendirilmesi.	45
Şekil 3.1.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> basilin mikroskop altında görünümü (x100).	47
Şekil 3.2.	GeneXpert MTB/RIF testi sonuçlarının örnekleri.	48
Şekil 3.3.	TB-LAMP testi sonuçlarının örnekleri.	49
Şekil 3.4.	Pulmoner (PTB) ve ekstrapulmoner (EPTB) örneklerde pozitif sonuç sayısı.	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. 2019 yılı Irak'ta tüberküloz insidansı, sayısı ve oranı.	9
Çizelge 1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> taksonomisi.	13
Çizelge 1.3. Enfekte bir kişiye farklı maruz kalma türlerinden kaynaklanan tüberküloz enfeksiyon riski (Musher 2003).	20
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan materyaller.....	32
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan kitler	33
Çizelge 2.3. Numune türü ve sayısı.....	35
Çizelge 2.4. Genexpert MTB/RIF sonuçlarının yorumlanması.....	42
Çizelge 3.1. Genexpert MTB/RIF,TB-LAMP ve mikroskopik incelenen örneklerinin sayısı, türleri ve sonuçları	46
Çizelge 3.2. Örneklerin mikroskopik inceleme sonuçlarının istatistiksel analizi.	47
Çizelge 3.3. Genexpert MTB/RIF örneklerinin sonuçlarının istatistiksel analizi	48
Çizelge 3.4. TB-LAMP örneklerinin sonuçlarının istatistiksel analizi.....	50

1. GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis, verem hastalığına neden olan bakteridir. Alman doktor ve mikrobiyolog Robert Koch, 24 Mart 1882’de tüberküloza neden olan *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin keşfini duyurdu. Bu süre zarfında, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri’nde yedi kişiden biri tüberkülozdan öldü. Dr. Koch’un keşfi, bu ölümcül hastalığı kontrol altına almak ve ortadan kaldırmak için atılan en önemli adımdı. Hollandalı Hekim ve bilim adamı Franciscus Sylvius tüberküloz terimini icat ederken, bu terim Fransız Doktor Laurent Bayle tarafından tanıtıldı. Mikobakterium terimi de 1896’da Lehman ve Newnan tarafından önerildi (Seth *et al.* 2008). Bir asır sonra 24 Mart Dünya Verem Günü ilan edildi (CDC 2020).

Tüberküloz hastalığı (verem), *Mycobacterium tuberculosis* neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Verem, keşfinden günümüze kadar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde hala önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından dünyada 2012 yılında 8,3 milyon yeni tüberküloz vakasıyla birlikte 1,3 milyon ölüm rapor edilmiştir. TB hastalığının hızla yayılmasını destekleyen faktörler ve koşullar, çoğunlukla cahil ve yoksulluk çeken toplumlarda bulunan aşırı kalabalık ve kötü hijyendir. Toplumun tüm kesimleri hastalığa duyarlı olsa da, en çok yoksullar risk altındadır. Rousseau, Chekhov, Keats, Elizabeth Barrett Browning gibi bazı tanınmış şahsiyetler, yaratıcılığın zirvesinde tüberküloz nedeniyle hayatlarını kaybetmişlerdir (Ryan *et al.* 2004).

Uygulanan kontrol programlarının başarısız olması neticesinde ilaç direnci yaygınlaşmış ve çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) insan sağlığı için potansiyel bir tehdit haline gelmiştir. Özellikle son 20 yılda ÇİD-TB yüksek akciğer TB görülmüştür (Abdalla *et al.* 2009).

Mycobacterium tuberculosis (TB) ana giriş yolu akciğerler olması nedeniyle sıklıkla akciğerleri tutmaktadır. Ancak TB solunum yoluyla alındıktan sonra kan ve lenfatikler yollarla tüm doku ve organları tutabilmektedir. Bu tür TB’ye akciğer dışı tüberküloz (ADTB) denir. En sık görülen ADTB türleri lenfadenit, merkezi sinir sistemi, kemik-eklem, plevra ve perikard, genitouriner ve gastrointestinal sistem organlarını enfekte ederek hastalık oluşturabilmektedir. Böylelikle hastalığın tuttuğu organlarda ağır bir iltihap tablosu oluşur ve organların fonksiyonları bozulur. Akciğer dışı tüberkülozu en sık plevra ve ekstratorasik lenfadenit olarak görülmektedir (Cortez *et al.* 2011,

Kuan-Ting Liu *et al.* 2007, Light 2010, Mohapatra and Janmeja 2009). Ekstratorasik lenfadenit olarak en sık servikal lenf düğümlerini, ardından mediastinal, aksiller ve mezenterik lenf düğümlerini, hepatik portalı ve inguinal lenf düğümlerine tutulum olur (Sharma and Mohan 2004). Tüberküloz menenjit, menenjitin en yıkıcı şeklidir. Özellikle de gelişmekte olan ülkelerde TB hastalarının % 7-12'sinde görülür (Kulkarni *et al.* 2005). Tedavi edilmeyen TB menenjit için ölüm oranı neredeyse %100'dür ve tedavide gecikme genellikle kalıcı nörolojik hasara yol açar (Takahashi *et al.* 2008, Sharma *et al.* 2010a). Diğer taraftan az sıklıkla da kutanöz tüberküloz görülmektedir (Singal and Sonthalia 2010). Deri tüberkülozu, doku biyopsilerindeki yetersiz aside dirençli boyama nedeniyle sarkoidoz, cüzzam, mantar enfeksiyonu gibi diğer enfeksiyöz kutanöz granülomlardan ayırt etmek zordur. Skopolderma, tüm klinik tipler içinde en yaygın olanıdır ve bunu lupus, vulgaris, tüberküloz siğil ve liken izlemektedir (Bravo and Gotuzzo 2007, Singal and Sonthalia 2010).

Mycobacterium tuberculosis, ikiye bölünme süresi ortalama 15 saat olduğundan son derece yavaş büyüyen bir organizmadır. Bu nedenle kültür ile üretilerek izole edilmesi zaman alıcı bir süreçtir. Özellikle sıvı ve katı besiyerlerinde kültür ile üretilerek izole edilmesi sırasıyla 2, 6 hafta gibi uzun zaman almaktadır. HIV pozitif bireylerde kültür yoluyla enfeksiyonun doğrulanması 8 haftaya kadar uzayabilir (Hugett *et al.* 2009, (Ryan *et al.* 2004). Akciğer tüberkülozu ve diğer tüberküloz formlarında kesin tanı mikrobiyolojiktir. Bu nedenle mikroskopik tanı günümüze kadar önemini hala korumaktadır.

TB'nin erken teşhisi, hastalığın uygun şekilde kontrol edilmesine ve tedavisine katkıda bulunur. TB tanısında kullanılan mikroskopik inceleme kültür (identifikasyon, duyarlılık testi) gibi geleneksel yöntemler yanısıra moleküler yöntemler ile *M. tuberculosis* enfeksiyonu tanısında immünolojik yöntemler kullanılmaktadır. Klinik örneklerde mikroskop altında tüberküloz basillerinin saptanması, tüberküloz hastalığının tanısını koymak için en hızlı, en ucuz ve pratik bir yöntemdir. TB teşhisinde klinik örneklerde hazırlanan sürme (smear) preparatlara, asit fast boya yöntemi olan Erlich-Ziehl Neelsen (EZN) boyama yöntemi uygulanmakta ve mikroskop ile değerlendirilmektedir. Diğer taraftan florokrom boya (Auramin) ile klinik örnekte az sayıda bulunan basilin saptanabildiği, incelemenin daha hızlı ve kolay olarak yapıldığı bir boyama yöntemidir. Ancak florokrom boyama yöntemi ile pozitif olan örneklerin EZN boyama yöntemi ile de doğrulanması istenmektedir. Floresan mikroskopinde sınırlı

sürede daha fazla preparatın taranmasına ve incelenmesine olanak sağlar. Bu nedenle ZN boyamadan daha avantajlıdır (ICMR 2017, Perkins 2000).

Moleküler yöntemler içerisinde özellikle kültürü yapılamayan veya çok geç üreyen mikroorganizmalarda, kısa sürede duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek testlerle tanı konulmasını sağlayan, antibiyotik direnç genlerinin ve mutant mikroorganizmaların araştırılmasında kullanılan nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT), dünya çapında TB'nin tanısında devrim yaratmıştır. NAAT'lar hazır ticari kitleri geliştirilmiştir (Pai *et al.* 2006). En yaygın olarak kullanılan NAAT, polimer zincir reaksiyonudur (PZR). Korunan deoksiribonükleik asit (DNA), ribozomal ribonükleik asit (rRNA) veya messenger RNA (mRNA) dizilerini hedefleyen PZR kullanılarak tüberküloz teşhisi için çeşitli analizler geliştirilmiştir. En yaygın PZR hedeflerinden biri, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBC) için spesifik olan tekrarlayan Ekleme dizisi (IS) 6110'dur (Cohen *et al.* 1998), diğerleri 65 KiloDalton (kDa) antijen içerir (Pierre *et al.* 1991), IS986 (Kolk *et al.* 1992), protein antijen B (PAB) (Forbes *et al.* 1993), 23S Ribozomal DNA (rDNA) genleri (Verma *et al.*, 1994), ısı şoku proteini-65 (hsp65), hupB geni (Mishra *et al.*, 2005), devR (Chakravorty *et al.* 2006), 16 Svedberg birimi (16S) ve 23S rDNA genleri arasındaki dahili transkripsiyonlu boşluk (ITS) bölgesi (Park *et al.* 2001), mpt64 (Bhanu *et al.* 2005) ve MPB70 (Santos *et al.* 2010) tabanlı PZR'dir. Hindistan da yapılan araştırmada, IS6110, 65kDa, 38kDa protein antijenlerinin ve 85B gen dizisini PZR sonuçlarının karşılaştırılmasında sırasıyla %77, %75, %72 ve %71 hassasiyet gösterdi bildirilmiştir (Negi *et al.* 2007). Diğer taraftan, entegre bir gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu testi olan GeneXpert MTB/RIF. (Xpert, Cepheid, Sunnyvale, CA, ABD), TB'yi eş zamanlı olarak teşhis etmek ve RIF direnci belirleme bölgesindeki mutasyonların tespiti yoluyla RIF direncini tespit etmek için geliştirilmiştir. GeneXpert MTB/RIF testi DSÖ tarafından TB tanısı ve RIF direnci saptamak için önerilmektedir (Boehme *et al.* 2010, Helb *et al.* 2010, WHO 2020).

Diğer bir moleküler tanı aracı da döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) cihazı ile izotermal koşullar altında DNA'yı amplifiye eden bir tekniktir. Bst DNA polimeraz, *Bacillus stearothermophilus*'tan orta derecede termostabil bir enzimdir (Notomi *et al.* 2000). LAMP tekniği, hedef DNA'nın altı ila sekiz bölgesini tanıyan dört ila altı primer kullanarak küçük miktarlarda DNA'yı bir saatten daha kısa bir sürede 109 kopyaya yükseltebilir. Aynı anda farklı oligonükleotidler kullanarak DNA amplifikasyonunu başlatır. Sonuç olarak, teknik oldukça spesifik, hassas ve hızlıdır.

Reaksiyon ara ürünleri, birkaç ters çevrilmiş tekrarlı döngü yapılarını içerir. Üretilen büyük miktarlarda DNA, bulanıklık veya floresans gözlemlenerek sonucun görsel olarak tespit edilmesini sağlar. Jel elektroforezi veya etiketli probalar ile tespiti engeller. LAMP tekniği, diğer NAAT'lerden çok daha hızlı, verimli ve ekonomik olduğu için diğer nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinden daha üstün kabul edilir (Aryan *et al.* 2010, Neonakis *et al.* 2011).

Bu çalışmada Irak'taki akciğer ve akciğer dışı tübelkülozlu hastalarda GENEXPERT MTB/RIF ve TB-LAMP teknikleri ile *mycobacterium tuberculosis* izolasyonu ve moleküler tanısının araştırılması amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

1.1. Tüberküloz hastalığı

1.1.1. Tüberküloz tarihi

Antik çağlardan beri insanlık, en yenisi COVID-19 Corona virüsü salgını, 73.500.000 vakanın istatistiği ve 1.500.000'den fazla ölüm olan birçok salgın ve hastalığa maruz kalmıştır (WHO 2020). Tüberküloz tarihin en eski hastalıklarından biridir ve bu hastalığa lupus vulgaris, King's kötülük, Tüketim, ölüm kaptanı, phthisis ve beyaz veba gibi birçok isim verilmiştir. (M.Ö.400) Hipokrat epidemikler hakkında ilk yazılan ve daha sonra Claudius Galen bunu Roma İmparatorluğu döneminde açıkladı (Mathema *et al.* 2006).

19. yüzyılda Theophile Laennec TB'nin patogenezi anlamak için gerçekleştirdiği ilk çabalar. Daha sonra 1865'te Jean Antoine Villemin, TB'nin nasıl bulaştığını gösterdi. 1859'da Hermen Brehmer tarafından türünün ilk örneği bir sanatoryum açıldı ve burada hastalara TBC tedavisi için dinlenme, zengin bir diyet ve egzersizler önerildi. 24 Mart 1882, Robert Koch'un, Berlin Fizyoloji Derneği önünde tüberküloz hastalığına neden olan organizma olarak *Mycobacterium tuberculosis*'i göstermesiyle, TB tarihinde çok önemli bir gündü. Tüberkülin deri testi, Viyana'dan bir çocuk doktoru olan Clemens von Pirquet tarafından geliştirilmiştir. Asemptomatik çocuklarda latent TB'yi tespit etmede kullanımını gösteren kapsamlı bir çalışma iki yıl sonra yayınlandı. Test, Charles Mantoux ve Florence Siebert'in çalışmasıyla, 1908'de kanüllü iğneler ve şırıngaların tanıtılması ve 1930'larda Saflaştırılmış protein türevinin (PPD) geliştirilmesi ile geliştirildi. Hastalığın ve nedenlerinin anlaşılması arttıkça, TB'nin yayılmasını önlemek için halk sağlığı önlemleri de alındı. BCG aşısı, I. Dünya Savaşı sırasında TB'nin yayılmasını durdurmak için kullanıldı. TB bakımı ve kontrolünün modern çağı, sırasıyla 1944 ve 1952'de streptomisin ve izoniazidin keşfedilmesiyle başladı (Sakula 1983).

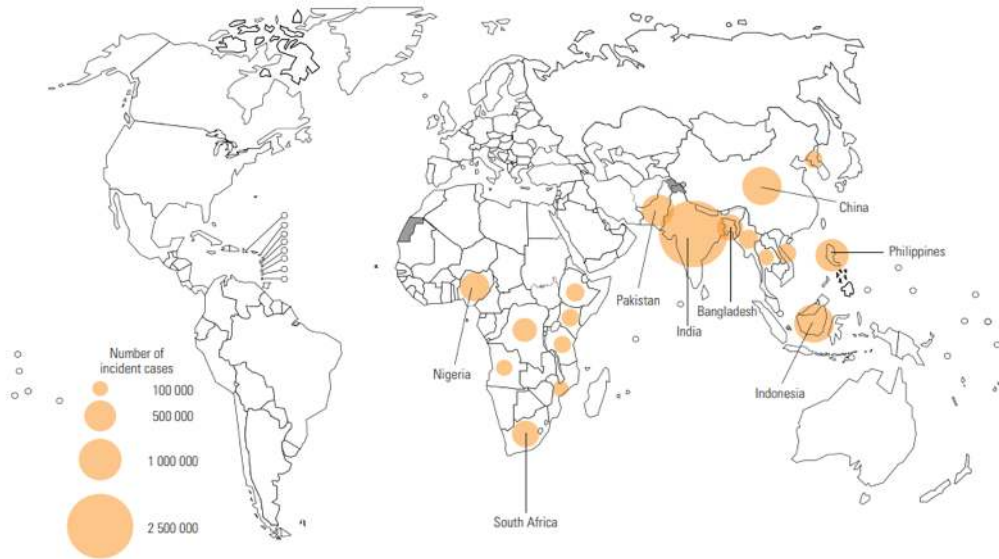
Mycobacterium cinsinin 150 milyon yıl önce ortaya çıktığı varsayılmaktadır. Tüm genom dizilimi için yeniçağ araçları ve çeşitli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının genetik analizi ve düşük mutasyon oranı, menşee zamanının tahmin edilmesine yardımcı oldu.

Mycobacterium tuberculosis'in 3 milyon yıl önce var olduğunu ve o sırada erken hominidleri enfekte etmiş olabileceğini gösteren kanıtlar vardı. Bir teori, MTBC'nin tüm üyelerinin (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii* ve *M. bovis*) 35.000 - 15.000 yıl önce ortak bir Afrikalı atadan geldiğini öne sürüyor (Kapur *et al.* 1994).

Modern *Mycobacterium tuberculosis* türleri, yaklaşık 20.000 - 15.000 yıl önce ortak bir atadan kaynaklanmış gibi görünmektedir (Brosch *et al.* 2002). *Mycobacterium tuberculosis*'in mutasyon oranı analizi, mevcut suşlar arasındaki çeşitliliğin sadece 250 ila 1.000 yıl önce ortaya çıktığını öngörür (Sreevatsan *et al.*1997).

1.1.2. Küresel olarak tüberküloz hastalığı

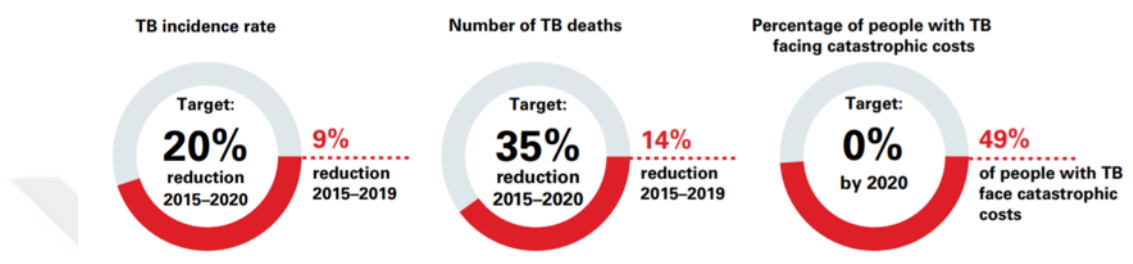
Tüberküloz, bulaşıcı hastalıklar arasında dünyanın en büyük ve en yaygın ölüm nedenlerinden biridir. Genellikle akciğerleri (TB) etkiler, ancak diğer bölgeyi de etkileyebilir (akciğer dışı TB). Verem geliştirme olasılığı, HIV ile enfekte kişiler arasında çok daha yüksektir. Tüberküloz ayrıca erkeklerde kadınlardan daha yaygındır ve çoğunlukla üretken yaş gruplarındaki yetişkinleri etkiler (CDC 2019).



Şekil 1.1. 2019 yılı küresel olarak tahmin edilen TB insidans oranları (WHO 2020).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2020 yılında yayımlanan küresel tüberküloz raporunda, 2019 yılının değerlendirilmesinde yaklaşık 500.000 kişide rifampisine dirençli TB (RD-TB) geliştiği bildirilmiştir. Ayrıca bu grupta yer alan olguların %78'i de ÇİD-TB olduğunu belirtilmiştir. Tüm dünya da en yüksek olgu oranının sırasıyla Hindistan (%27), Çin (%14) ve Rusya Federasyonu (%8) olduğu rapor edilmiştir (WHO 2020). 2019'da en az 100.000 tüberküloz vakası görülen ülkeler için tahmini tüberküloz insidans oranlarını göstermektedir (Şekil 1.1). 2019 yılında tüm dünyada yaklaşık 10 milyon kişi tüberküloz hastalığına yalanmıştır. Bu yeni tüberküloz vakalarının %11'i HIV enfeksiyonlu kişilerdir. 2018'den 2019'a kadar dünya çapında TB vakasındaki düşüş oranı sadece %1,5'dir. Ancak iki milyardan fazla insan latent tüberküloza (LTB)

yani insanların TB bakterisiyle enfekte olduğu, ancak henüz hastalığa yakalanmadıkları ve onu bulaştıramadıkları anlamına gelmektedir (WHO 2019). 2019'un sonunda, DSÖ bölgelerinin çoğu ve verem yükünün ağır olduğu birkaç ülke de TB son verme stratejisini karşılamamıştır. Şekil 1.2 de görüldüğü gibi TB insidans oranı küresel olarak düşmekle birlikte, 2015 ile 2020 arasında %20'lik bir azalma ile 2020 TB son verme stratejisini karşılayacak kadar hızlı olmamış buna karşık oldukça yüklü maliyetlere neden olmuştur (WHO 2020).



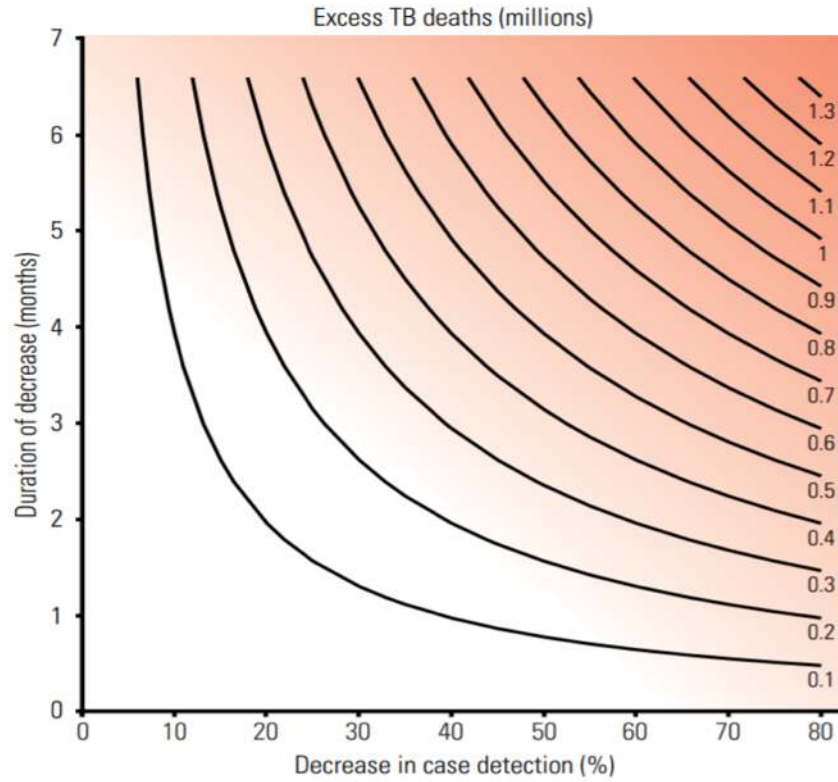
Şekil 1.2. 2015-2019 yılları arasında TB insidans oranında, TB ölümlerinde ve yıkıcı maliyet (WHO 2020).

1.1.3. COVID-19 salgını ve TB - etkisi ve etkileri

COVID-19 salgını, küresel tüberküloz yükünü azaltmada son zamanlarda kaydedilen ilerlemenin aksine, dünya çapında artan vaka sayılarıyla tüm dünyayı tehdit etmeye devam etmektedir. Küresel tüberküloz ölümlerinin sayısı yalnızca 2020'de 0,2-0,4 milyon civarında artabilir. Sağlık hizmetleri kesintiye uğraması durumunda da, tespit edilen ve tedavi edilen TB'li kişilerin sayısı 3 aylık bir süre içinde %25-50 azalır. Hindistan, Endonezya, Filipinler ve Güney Afrika'da, küresel tüberküloz vakalarının %44'ünü oluşturan dört ülke, 2020'nin ilk 6 ayında arasında TB teşhisi konan kişilerin sayısının azaldığı bildirdi (WHO 2020).

DSÖ rehberliği doğrultusunda, ülkelerin temel TB hizmetleri üzerindeki etkileri hafifletmek için gerçekleştirdiklerini bildirdikleri eylemler arasında uzaktan öneri ve destek için dijital teknolojilerin genişletilmiş kullanımı ile sağlık tesislerine ziyaret ihtiyacının azaltılması yer almaktadır. COVID-19 pandemisiyle, temel TB hizmetleri insan kaynakları, mali kaynaklar ve diğer kaynaklar üzerinde olumsuz etkileri olmuştur. Birçok ülke, GeneXpert cihazları TB için teşhis testi yerine COVID-19 testi için kullanıldığını, ulusal TB programlarındaki personelin COVID-19 çalışmalarında kullandığını bildirmiştir. Daha küçük ülkeler ise, TB hastalarına yatarak ve ayakta tedavi sağlayan sağlık tesislerinin sayısını azalttığını bildirmiştir. Bununla birlikte birçok

ülkede veri toplama ve raporlama da etkilenmiştir. COVID-19 salgınının 2020’de küresel tüberküloz ölümleri üzerindeki beklenen etkisi Şekil 1.3 te gösterilmiştir (WHO 2020).



Şekil 1.3. COVID-19 salgınının 2020’de küresel tüberküloz ölümleri üzerindeki beklenen etkisi (WHO 2020).

1.1.4. Irak’ta tüberküloz

Irak, DSÖ Doğu Akdeniz Bölgesi’nde yer alan ülkelerden biridir. Irak Planlama Bakanlığı’nın 2020 yılı tahminlerine göre Irak’ın nüfusu yaklaşık 40 milyondur. Irak’ta 100.000’de 42 TB insidansı ve %54’lük TB vakası tespit edilmiştir. Ayrıca DSÖ Doğu Akdeniz Bölgesi’ndeki TB hastalarının %3’ünü oluşturarak en yüksek TB yükü alan yedi ülkeden biridir (WHO 2019). Doğrudan Gözetimli Tedavi (DGT) stratejisi programı, 1998’den beri Irak’ta kabul edilmiştir. 2001 yılında da Irak’ın üç ili (Erbil, Süleymani ve Duhok) uygulanmıştır. DGT sonucunda, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, akciğer tüberkülozu ve akciğer dışı tüberküloz hastalarında tedavi başarı oranını artırdığı ve ekonomik yükü azalttığı iyi bir şekilde belgelenmiştir (WHO-EMRO 2015).

DSÖ ülke profiline göre, Irak, Türkiye, Suriye, İran, Suudi Arabistan ve Ürdün’den daha yüksek bir TB insidans oranına sahiptir. Ancak demografik, klinik ve

tedavi sonuçları hakkındaki bilgiler kapsamlı bir şekilde çalışılmamıştır. Tüm tüberküloz vakaları için, ülkenin vaka tanımlama oranı, çoğunlukla bazı illerdeki zayıf güvenlik durumundan dolayı %54'tür. İllerde bulunan verem klinikleri normal şekilde çalışmamaktadır (WHO-EMRO 2015).

Irak Sağlık Bakanlığı Ulusal Tüberküloz Programı (NTP) tarafından 2014 ve 2017 yılları arasında Irak'ın Kuzeyinde ve Kerkük'te yerinden edilmiş kişiler ve Suriyeli mülteciler arasında 300'den fazla verem vakası tespit edilmiştir. 2016 yılında, NTP tarafından 7246 TB vakası rapor edilmiştir. 2017 yılında NTP göre kaydedilen tüberküloz vakalarının sayısında, özellikle Musul'dan kaçan hastalar ve uzak veya ulaşılması zor bölgelerdeki yerinden edilmiş kişiler nedeniyle, teşhis ve bakımın gecikmesi veya sağlık ekipmanına erişimdeki zorluk nedeniyle tedavinin kesintiye uğradığını bildirdi (NTP 2017).

Dünya Sağlık Örgütü Küresel TB Raporu 2020'ye göre, küresel verem veri tabanında depolanan bilgilere dayalı olarak yıl boyunca kaydedilen küresel veriler, her yıl 215 ülke ve bölge tarafından sağlanmakta ve Küresel Tüberküloz İzleme ve Değerlendirme Birimi tarafından yönetilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü programında 2019 yılı Irak'ta tüberküloz insidansı, sayısı ve oranı Çizelge 1.1 de verilmiştir (WHO 2020).

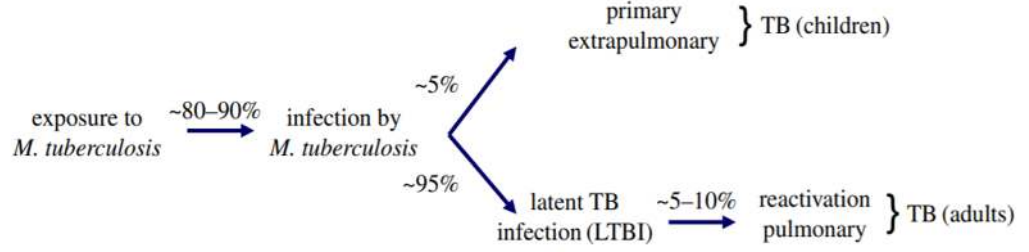
INSIDANS SAYISI VE ORANI	TANIM
16 Bin (18 Bin-14 Bin) 41.000 (36.000 - 46.000)	Toplam TB insidansı
10 (2 - 24) 1,1 Bin (810 - 1,5 Bin)	HIV-pozitif TB insidansı
1,1 Bin (810 1.5 Bin) 2.9 (2.1 - 3.9)	MDR / RR-TB insidansı
1, 9 Bin (1.6 Bin. 2.2 Bin)	İnsidans (0-14 yaş)
14 Bin (12 Bin - 16 Bin)	İnsidans (≥ 15 yıl)
7, 4 Bin (6.1 Bin - 8.6 Bin)	İnsidans (kadınlarda)
8, 8 Bin (7,2 Bin - 10 Bin)	İnsidans (erkekler)
820 (740 - 910) 2, 1 (1, 9 - 2, 3)	HIV-negatif TB mortalitesi
4 (1-10) 0,01 (0 - 0,03)	HIV-pozitif TB mortalitesi

Çizelge 1.1 2019 yılı Irak'ta tüberküloz insidansı, sayısı ve oranı.

1.1.5. Tüberküloz ve insan genetiği

M.tuberculosis ile enfekte kişilerin tamamında hastalık gelişmesine karşın enfeksiyonu geçirenlerin yalnızca %5-10'un da klinik tablo görülmektedir. Konakçı genetiği, TB'nin ve bunun klinik formlarının gelişmesinde açık bir rol oynar. Konakçı genetiğinin TB yatkınlığı üzerindeki etkisine dair erken kanıtlar, ailesel kümelenme (Puffer 1944) ve dizigotik ikizlere kıyasla monozigotikte TB'nin daha yüksek uyum oranının (Kallmann and Reisner, 1943) gözlemlenmesinden gelmektedir. 1929'da meydana gelen Lübeck kazası, aynı zamanda, konakçı genetiğinin TB riskindeki rolünün sıklıkla alıntılanan bir örneğidir (Fox *et al.* 2016). 251 yenidoğan, Calmette-Guérin basili (BCG) aşılarının istenmeyen kontaminasyonu nedeniyle *M.tuberculosis* ile kontamine BCG örnekleri ile aşılanmış bebeklerin toplam sayısının %90,8'i farklı tipte klinik verem görülmüştür. Kazadan bir yıl sonra 77 bebek ölmüş ve bu ölümlerin 69'unun verem ile ilgili olduğu doğrulanmıştır. Ancak şaşırtıcı bir şekilde, bebeklerin %9,2'sinde herhangi bir klinik belirti ortaya çıkmamıştır. Klinik olarak doğrulanmış TB vakalarının %68'i kendiliğinden iyileşmiştir. Bu olaylar, konakçı genetik faktörlerin tüberküloz duyarlılığında ve hastalığın ciddiyetinde rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (Abel *et al.* 2018, Fox *et al.* 2016). Tüberküloz patogeneziyle ilgili şu anda kabul edilen hipotez, hastalık sürecinin iki ana aşamasını içerir. İlk aşamada, maruz kalan kişiler herhangi bir klinik hastalık belirtisi olmadan *M.tuberculosis* ile enfekte olur. İn vivo tüberkülin deri testi (TST) veya *M.tuberculosis* antijenine yanıt olarak kan hücreleri tarafından ex vivo interferon γ salımı gibi bağışıklık tahlillerinde, bu bireyler pozitifliğe dönüşme (IGRA testleri) ile karakterize edilir. Bu bireylerin *M.tuberculosis* basili taşıdıkları ve TB ile gizli enfeksiyondan (LTBI) muzdarip oldukları bilinmektedir. İkinci aşamada, LTBI olarak teşhis edilenlerin bir alt kümesi, genellikle LTBI dönüşümünün ilk iki yılında TB geliştirecektir (Behr *et al.* 2018). Doğal TB enfeksiyonu dirençleri, deneklerin LTBI'ya dönüşmediği ağır *M.tuberculosis* ortamlarına maruz kalmadan çıkarılmıştır ve enfeksiyon direncinin bu fenotipinin genetik bir bileşene sahip olduğu gösterilmiştir (Abel *et al.* 2018, Dallmann-Sauer *et al.* 2018, Orlova and Schurr 2017, Simmons *et al.* 2018).

Maruziyette yüksek düzey devam etse de, insanların büyük bir kısmı (yaklaşık %10-20) enfekte olmaz ve bu nedenle hastalık asla gelişmez. Enfekte olanların yaklaşık %5'i enfeksiyondan sonraki iki yıl içinde klinik tüberküloz gelişimi; bu birincil TB özellikle çocuklarda yaygındır ve akciğer dışı hastalıkla ilişkilendirilebilir. *M. tuberculosis*'li geri



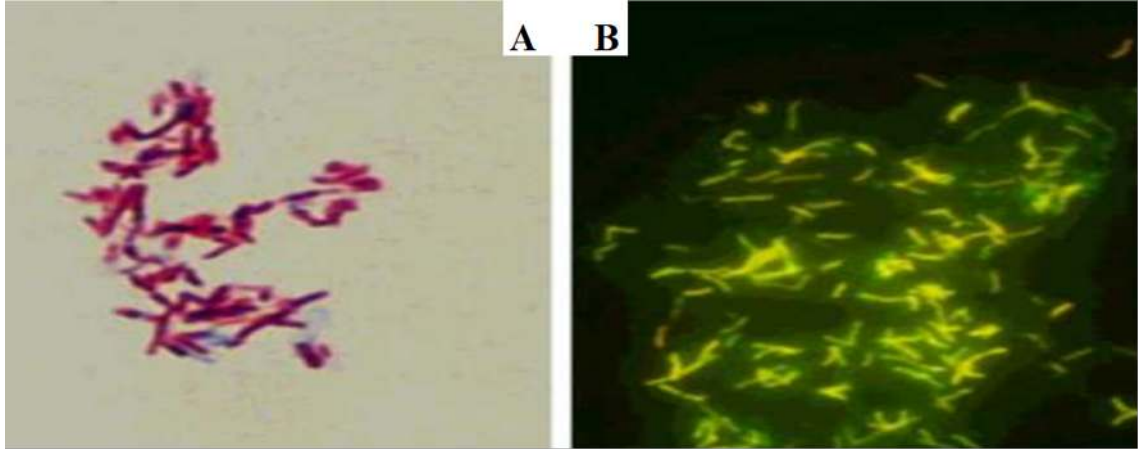
Şekil 1.4. *Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu insan enfeksiyonunun doğal seyri ve ardından klinik tüberküloz gelişimi.

kalan denekler gizli tüberküloz enfeksiyonu (LTBI) geliştirir. LTBI'li kişilerin yalnızca küçük bir kısmı (yaklaşık % 5-10), genellikle orijinal enfeksiyonun yeniden aktivasyonu nedeniyle yaşamları boyunca klinik TB geliştirir (Marais *et al.* 2009).

1.2. *Mycobacterium tuberculosis*'in bakteriyolojik özellikleri

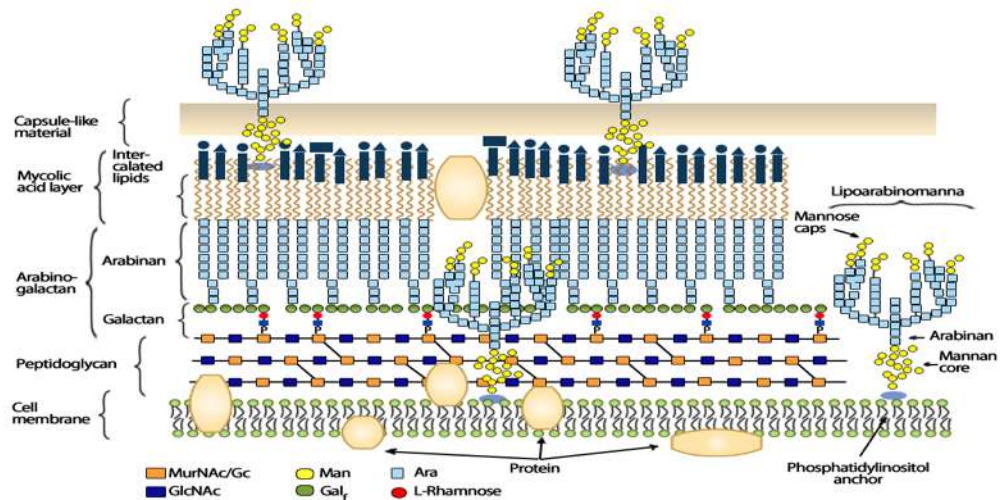
Mycobacterium tuberculosis basilleri ince, düz ya da hafif kıvrık, zorunlu aerob, kapsülsüz, spor oluşturmeyen 0.2-0.6X1-4µm büyüklüğünde hareketsiz çomakçıklardır. 12-18 saatte bölünebilen, oldukça yavaş üreyen mikroorganizmalardır. *M. tuberculosis*, %5-10 CO₂ ve pH-6.5-6.8 kültür ortamına ürerler. *M. tuberculosis* kompleks, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, ve *M. pinnipediti* türlerinden oluşur. Bu kompleks dışında kalan mikobakteriler tüberküloz dışı mikobakteriler olarak adlandırılırlar. Mikobakteri cinsine ait dünyanın en eski hastalıkları olarak bilinen tüberküloz ve lepra etkeni olan *M. tuberculosis* ve *M. lepra*edir. (Todar, 2005). Bu bakterinin kültür ortamında izole edilmesi yaklaşık 3-6 hafta sürer. Bu nedenle klinik örneklerin negatif rapor vermeden önce hazırlanan kültürlerin 6-8 hafta bekletilmesi gereklidir. Löwenstein – Jensen (LJ) kültür ortamı, özellikle *M. tuberculosis* ve diğer *Mycobacterium* türlerinin kültürü için özel olarak kullanılan bir büyüme ortamıdır. Ziehl-Neelsen, Kinyoun, floresan gibi ayırt edici boyalarla aside dirençli boyanan uzun ince basil olarak boyanırlar (Şekil 1.5). *M. tuberculosis* bu ortamında büyütüldüğünde kahverengi, granüler koloniler olarak görünür. Aside dirençli bakterinin auromin, rodamin gibi florokrom boyalarla boyandıktan sonra sarı-turuncu floresan verdiklerinden ve kolaylıkları nedeniyle de klinik örneklerde tercih edilen boyalar olmuşlardır (Ryan *et al.* 2004) (Şekil 1.5-B).

Gram pozitif bakterilerde bulunan N-asetilmuramik asit yerine, hücre duvarı, N-glikolik muramik asit peptidoglikan içerir. Uzun zincirli yağ asitleri olan ve toplam



Şekil 1.5. Karbol-fuksin bazlı kinyoun boyası (A) ve auramin-rodamin boyası (B) ile boyanmış mikobakteriler (Caulfiel and Wengenack 2016). 40x büyütme altında floresan oramin-rodamin boyama (B) ve 100x yağ emülsiyonu altında AFB boyama.

hücre duvarı kütlelerinin %60'ını oluşturan mikolik asitler ve Gram negatif bakterilerin lipopolisakkaritine benzeyen lipoarabinomannan (LAM), hücre duvarının diğer önemli bileşenleridir. Hücre duvarına hidrofobik bir kalite veren ve Gram-negatif bakterilere kıyasla bir geçirgenlik bariyeri oluşturan mikozitler ve sülfolipitler de mevcuttur. Porin molekülleri, hidrofilik besin emilimi için sulu kanallar oluşturur. Hidrofobik yüzeyi sayesinde TB, özellikle dehidrasyona ve çoğu dezenfektana karşı bağıstıktır (Şekil 1.6). Ancak ısıya duyarlıdır (65°C 15 dakika) ve ultraviyole (UV) ışınlarına duyarlıdır (Rageade *et al.* 2014).



Şekil 1.6. *Mycobacterium tuberculosis* hücre duvarı. *Mycobacterium tuberculosis*'nin antijenik yapısı, çeşitli proteinler ve polisakkaritlerden oluşur (Rageade *et al.* 2014).

1.3. *Mycobacterium tuberculosis* sınıflandırması

Aşağıdaki cinsler; *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Actinomyces* ve *Nocardia* aynı takson kapsamına girerken, mycobacterium, Mycobacteriaceae familyası olarak atanan Actinobacteria sınıfı altında bir cinstir. *M. tuberculosis* sınıflandırması Çizelge 1.2 de verilmiştir.

Alem	Bacteria
Bölüm	Actinobacteria
Sınıfı	Actinomycetales
Familya	Mycobacteriaceae
Cins	Mycobacterium
Tür	<i>M. tuberculosis</i>

Çizelge 1.2 *Mycobacterium tuberculosis* taksonomisi.

Mycobacterium türleri, metal işleme için su, toprak ve sıvı kütleleri dahil olmak üzere bir dizi habitatta bulunur (Hartmans *et al.* 2006, Tortoli 2012). *Mycobacterium* cinsi, isimleri gerçekten dağıtılmış 188 türden oluşur (Parte 2014). Tıpkı tek bir cinsten bulunan ekolojik türler kadar klinik olarak önemli olan her iki türden de büyük miktarlar göz önüne alındığında, bu organizmalar arasındaki bağlantıların anlaşılması çok önemlidir (Fedrizzi *et al.* 2017, Gao and Gupta 2012, Magee and Ward 2012, Tortoli 2012). 16S ribozomal RNA (veya 16S rRNA), Shine-Dalgarno dizisine bağlanan bir prokaryotik ribozomun 30S küçük alt biriminin bileşenidir. Bu gen bölgesinin yavaş evrim hızları nedeniyle, onu kodlayan genler 16S rRNA geni olarak adlandırılır ve filogenileri yeniden oluşturmak için kullanılır (Woese and George 1977). Woese ve George (1977) filogenetikte 16S rRNA'nın kullanılmasına öncülük eden iki kişiydi. 16S rRNA geninin birden çok dizisi tek bir bakteri (Case *et al.* 2007). *Mycobacterium* cinsi içindeki ilişkilerin en yeni anlayışının temeli, 16S rRNA gen dizilerinin ve organizmaların diğer fiziksel ve kemotaksonomik özelliklerinin incelenmesidir (Goodfellow and Magee, 1998, Hartmans *et al.* 2006, Magee and Ward 2012). 16S rRNA'ya ek olarak, gyrB (Kasai *et al.* 2000), rpoB (Tortoli 2012) ve gyrA), 16S-23S ayırıcı diziler (Roth *et al.* 1998) ve hsp65 (Kim *et al.* 2005, Tortoli *et al.* 2015) mikobakteriyel türler arasındaki ilişkileri araştırmak için de kullanılmıştır (Guillemin *et al.* 1995).

Sınırlı sayıda mikobakteriyel tür, 16S rRNA, rpoB ve hsp65 (Kim and Shin 2017) üzerinde birleştirilmiş nükleotid dizilerine veya farklı gen dizilerinden amino asit parçalarına dayanan çoklu odak dizisi analizini kullanan çeşitli deneyler

gerçekleştirilmiştir; 16S rRNA, hsp65, sodA, recA, rpoB (Adékambi and Drancourt 2004) ve hsp65, tuf, rpoB, smpB, 16S rRNA, sodA, tmRNA, (Mignard and Flandrois 2008). Bu çalışmaların sonuçları, Mycobacterium cinsinin üyeleri arasındaki ilişkiler hakkında değerli bilgiler vermektedir.

1.4. Mycobacterium tuberculosis kompleksi

Mycobacterium tuberculosis kompleks (MTBC) üyeleri arasında *M. canneti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. bovis* BCG ve *M. tuberculosis* yer alır, % 99.9'dan fazla nükleotit özdeşliğine ve özdeş 16S rRNA sekansına sahip bakteriler, MTBC üyeleri olarak sınıflandırılır. Tüm bu üyeler, konakçı aralıkları, epidemiyoloji, klinik görünüm ve laboratuvar fenotiplerinde farklılık gösterir, ancak bu farklılıklar hakkında çok az şey bilinmektedir. MTBC üyelerinin evrimi için genomik delesyonların önemli olduğu gösterilmiştir. *M. canetti*, *M. tuberculosis* ve *M. africanum* II'nin doğal konağı insandır. *M. pinnipedii*, *M. caprae*'nin konakları yüzgeç ayaklılar, keçiler, tarla fareleri ve ineklerdir. (Sreevatsan *et al.* 1997) Ancak bulaşma yetenekleri (Valway *et al.*1998), hastalık belirtileri (Dorman *et al.* 2004), immünolojik tepkiler (Manca *et al.* 2004, Reed *et al.* 2004, Chacon-Salinas *et al.* 2005), replikasyon oranı (Zhang *et al.* 1999) ve muhtemelen ilaç direnci sıklığı (Glynn *et al.*2002) ve aşılama kaçma yeteneği (Abebe *et al.* 2006).

MTBC evrimi ve genetiğinin anlaşılması, *M. tuberculosis* H37Rv'nin (Cole *et al.*1998; McEvoy *et al.* 2007) ve birkaç *M. bovis* suşunun (Garnier *et al.* 2003, Rothschild *et al.* 2001) tüm genom sekanslamasından sonra genişletildi. MTBC üyelerini incelemek için çeşitli genetik kaynaklar kullanılmıştır - parmak izi kalıbı, sekanslama, Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) ve büyük sekans polimorfizmleri (Mostowy *et al.* 2005). 16S rRNA ve 23S rRNA arasındaki bölge, oldukça polimorfik bir 275bp-ITS bölgesidir. Dizi analizi, MTBC üyelerinde tamamen korunduğunu gösterir (Mathema *et al.*2006).

1.5. Mycobacterium tuberculosis genom organizasyonu

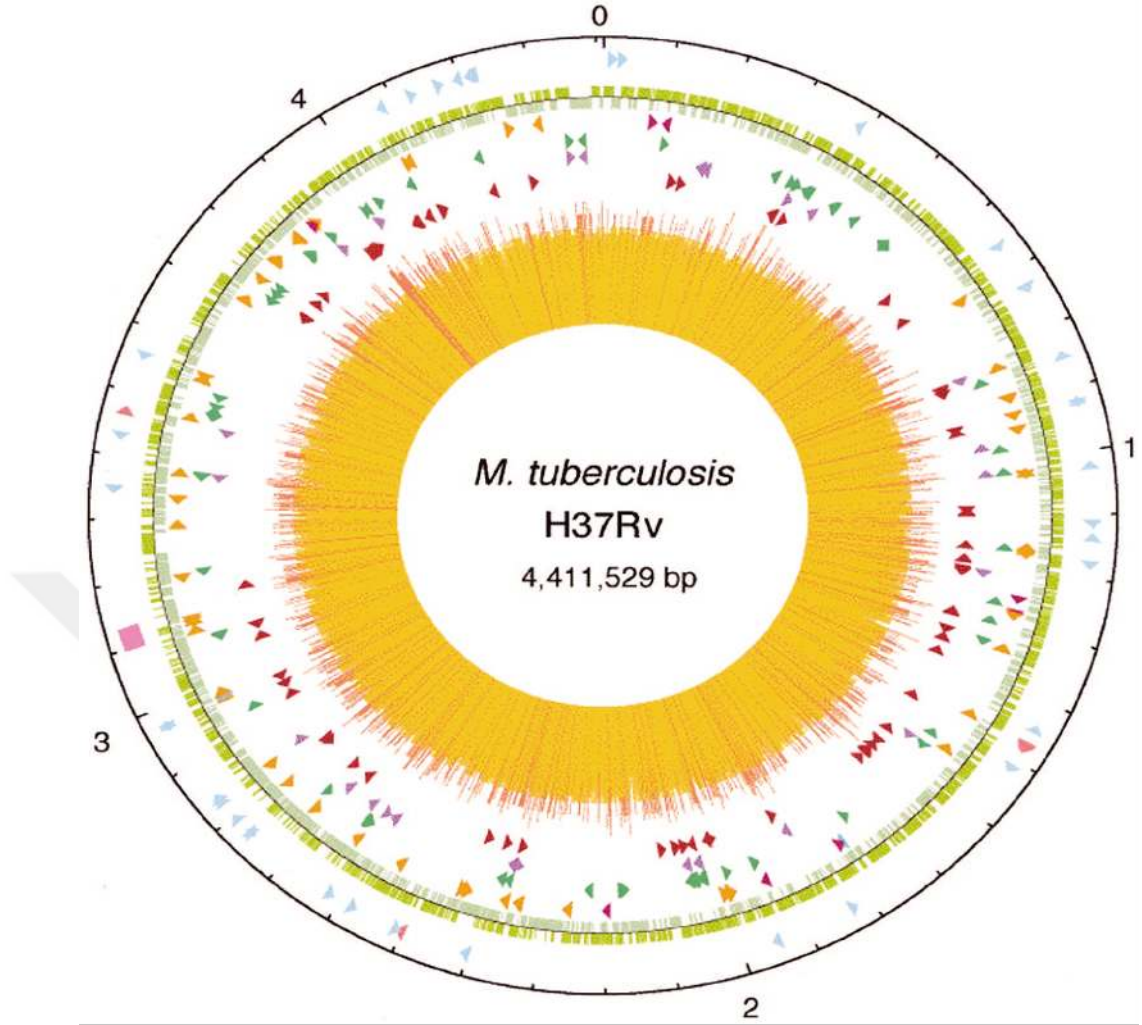
Dünya genelinde izole edilen *M. tuberculosis* suşlardaki genom çalışmalarda sağlanan değerli bilgilerle, biyolojik farklılıkların anlaşılması, karşılaştırılmasını kolaylaştırmıştır (Fleischmann *et al.* 2002). Genomik dizi analizi tamamlanan ilk *M. tuberculosis* orijini H37Rv'dir. Bu amaçla kültür ortamında yavaş üreyen basilini geliştirmek H37Rv suşunun tüm genom sekansı tanımlanmıştır. *M. tuberculosis*'in

laboratuar suşu (H37Rv) genomik analiz, genom 4000 gen içerir 4411 532 baz çiftinden (bp) oluşur (Cole 2002) ve yüksek G+C içeriği mevcuttur. Basilin aerobik yaşam şekliyle ilişkili olarak, genomunun ortalama % 65.6 oranında G+C içeriğine sahip olduğunu ortaya çıkarıldı (Cole 2002, Fleischmann *et al.* 2002).

M.tuberculosis H37Rv suşunun gen haritasının çıkarılması sonucunda toplam 20 değişken delesyona açık bölge gösterilmiştir. Bunlar 14 değişken bölge (region different-RD1-14), H37Rv için spesifik 5 değişken bölge (RvD1-5) ve *M.tuberculosis* için spesifik olan bir değişken (TbD1) bölgelerde evrimsel öneme sahip üç farklı delesyon şekillenmektedir. Birincisi mobil elementler olan, phiRv1 (RD3) ve phiRv2 (RD11) profajlar ile insersiyon dizileri IS1532 (RD6) ve IS6110 (RD5)'de delesyonel mutasyonlar şekillenir. Diğer delesyonel mutasyonlar ise bitişik insersiyon elementleri (IS6110) arasındaki homolog rekombinasyonlar sonucu ortaya çıkar. Burada arada *M.tuberculosis* için spesifik DNA dizilerinin (RvD2, RvD3, RvD4, ve RvD5) bir veya bir kaçının kaybı söz konusu olur. Gen duplikasyonu veya alan karıştırma olaylarına göre, genlerin en az %51'inin genomun %3,4'ü insersiyon dizilerinden IS, phiRv1 ve phiRv2 oluşurken gelişti (Cole 2002). Genel olarak Cole'un araştırması, IS3, IS5, IS21'e ait yaklaşık 56 kopya IS bileşeni olduğunu buldu. IS30, IS110, IS256 ve ISL3 aileleri (Cole 2002).

Ek olarak, genom dizileri, MTBC üyelerinin hızlı ve net bir şekilde tanımlanması için teşhis araçları oluşturmak için kullanılabilir. Örneğin, *Mikobakterium spp* karşılaştırmalı genomik, virülen veya zayıflatılmış türlerden farklı olan genleri veya lokusları sınıflandırmayı amaçlamaktadır (Cole 2002). Bu bulgulardan elde edilen veriler, suşları sınıflandırmak ve patojenliğin moleküler mekanizmalarını tanımlamak ve bunlara katkıda bulunmak için kullanılabilir. Yeni aşı geliştirme ayrıntıları (Cole 2002). Ravn *et al.* (2005) ve CFP-10 tarafından incelenen erken salgılanan antijenik hedef 6 kDa proteini, bunların mikobakteriyel genomun RD1 (fark bölgesi) içinde bulunduğunu belirtti. Bununla birlikte, bu proteinler, *M. avium*'da ve TB aşı suşundaki (*M. bovis* BCG) diğer birçok tüberküloz olmayan mikobakteride bulunmadığından, mikobakteri türleri arasında ayırım yapmayı kolaylaştırır (Ravn *et al.*2005).

Mycobacterium tuberculosis H37Rv referans laboratuar suşunun kromozom haritası (Camus *et al.* 2002), Dış daire ölçeği mega bazlarda tanımlar, 0, replikasyonun başlangıcıdır. İlk halkanın dışından kararlı RNA genlerinin pozisyonları (mavide tRNA'lardır ve pembe renkte diğerleridir) ve doğrudan tekrarlı bölge (pembe küp)



Şekil 1.7. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dairesel kromozom haritası (Smith, 2003).

spoligotipleme tahlilinin hedefini gösterir, ikinci halka kodlama dizisini tanımlar tel ile (saat yönünde, koyu yeşil; saat yönünün tersine, açık yeşil); üçüncü halka, tekrarlayan DNA'yı gösterir (insersiyon dizileri [IS], turuncu; 13E12 REP ailesi, koyu pembe; profilaksi, mavi) bunlar, IS6110 bazlı sınırlama parçası uzunluk polimorfizmi (IS6110 RFLF) deneyi ile hedeflenir; dördüncü halka, KKD ailesi üyelerinin konumlarını gösterir (yeşil); beşinci halka PE aile üyelerinin pozisyonlarını gösterir (mor); ve altıncı halka, Polimorfik GC açısından zengin tekrarlı dizi (PGRS) tahlili tarafından hedeflenen PGRS dizilerinin (koyu kırmızı) pozisyonlarını gösterir. Histogram kırmızı renkte %65 G + C ile G + C içeriğini temsil eder (Cole *et al.* 1998, Zumbo *et al.* 2013). IS, 2.5 kbp'den daha küçük boyutta ve bakteriyel genomda yaygın olarak dağılmış küçük mobil genetik bileşenlerdir (Chandler and Mahillon 2002). Antibiyotik direncini kodlayan genlerin barındırılmasından da sorumlu olan transpozisyon ve regülasyon ile ilgili genetik bilgi,

taşıma olarak tanımlanmaktadır (Barnard *et al.* 2004). Ana polimorfik tandem tekrarlar (MPTR) genomda bulunur ve moleküler epidemiyolojide *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılır ve ayrıca polimorfik GC açısından zengin tekrarlayan dizilemi (PGRS) içerir (Mathema *et al.* 2006). *M. tuberculosis* kompleksi içinde, tam genom dizilerinin incelenmesi farklı anlayışlar kazanmıştır. 1905'te tüberküloz H37 ilk olarak izole edildi. Bu suş, H37'nin farklı pH seviyelerinde ortamdan seri geçişiyle, farklı koloni morfolojilerine sahip iki varyanta, H37Rv (kaba) ve zayıflatılmış H37Ra (pürüzsüz) halinde ayrıştırıldı. Bu iki suş, mikobakteriyel hastalık oluşturma çalışmalarında yaygın olarak kullanılmıştır (Bifani *et al.* 2000). H37Rv karşılaştırması ve tam klinik *M. tuberculosis* genom dizileri, Tüberküloz suşları, tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) yaygın olmadığını ve genomik varyasyonun ana nedeninin ekleme veya delesyon olayları olduğunu göstermiştir. Esansiyel amino asitleri, vitaminleri ve enzimleri sentezlemek için gerekli tüm genlerin tüberkülozda bulunduğu gösterilmiştir (Cole *et al.* 1998, Fleischmann *et al.* 2002).

Çalışmalar, *M. tuberculosis*'te tekrarlayan diziler adı verilen polimorfik genomik bölgeler olduğunu göstermiştir. Birçok tekrarlayan dizinin varlığı, genomu karakterize eder. Bu polimorfik tekrar dizileri, belirli bir coğrafi konumda *M. tuberculosis* suşları arasındaki genetik çeşitlilik ile ilişkilendirilmiştir (Sreevatsan *et al.* 1997; Chandler and Mahillon, 2002). Yinelenen birimlerin iki biçimi, serpiştirilmiş tekrarlar (IR) ve sıralı tekrarlar (TR) keşfedilmiştir. IR, yerleştirme sırasına (IS) ve doğrudan tekrar (DR) bölünebilir. Alelik polimorfizmleri çok nadirdir çünkü *M. tuberculosis* kompleksinin üyeleri aynı 16SrRNA dizisini ve nükleotid dizisi benzerliğini paylaşır (Brosch *et al.* 2002, Sreevatsan *et al.* 1997). Ayrıca, *M. tuberculosis* Kompleks türlerinin farklı türleri arasında, benzer nükleotid polimorfizmlerinin yaklaşık %0.01 ila %0.03'lük bir insidansı ile büyük bir türler arası genetik homojenlik örneği ile sekanslama homolojisi genişler (Gutacker *et al.* 2002).

1.6. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksin genotiplendirilmesi

Mycobacterium tuberculosis kompleksinin genotiplendirilmesi, suşların birbirinden ayırt edilmesi, hastalığın ve izolatların toplum içinde küresel ve yerel bulaş ve yayılma dinamiklerinin ortaya çıkarılması, hastalık için risk faktörlerinin belirlenmesini, yeni enfeksiyonlar ve yeniden aktive olmuş vakalar arasında ayırım gibi son derece değerli olan bilgilere de ulaşılmasına imkan sağlamıştır (Adwoa Asante-Poku

2015). Genotipleme, önceki izolatlarla karşılaştırmaya olanak tanır ve her izolat üzerinde, hastanın nüksedip geçmediğine veya yeni bir suşla enfekte olup olmadığına karar verelebilir ve ilaç direnci geliştirebileceğini doğrulayabilir (Burman *et al.* 2009).

Moleküler yöntemlerle, patojenin evrimsel ilişkilerin, farklı durumlarda suş kökenlerinin, konakçılar arasında organizma aktarım mekanizmalarının, epidemiyolojik sürveyansın ve kontrolün incelenmesini kolaylaştırır ve ayrıca salgınların araştırılmasına yardımcı olur (Drobniewski *et al.* 2003). Son on yılda, TB Kompleks türlerini ve tüberküloz suşlarını karakterize etmek ve farklı suşlar arasındaki genetik ilişkiyi test etmek için çok sayıda moleküler yöntem geliştirilmiştir (Mathema *et al.* 2006). İdeal bir moleküler genotipleme yöntemi ucuz olmalı, oldukça ayırmacı olmalı, yürütülmesi kolay hızlı sonuçlar sağlamalı ve hassas laboratuvar karşılaştırmalarına olanak tanıyan kolay ve yorumlanabilir sonuçlar üretmelidir (Hanekom *et al.* 2008). Moleküler yöntemlerin kullanılması *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin tanısında 16S rRNA gen bölgesi diziliminin belirlenmesi için 16S-23S rRNA bölge amplifikasyonu ve reverse hibridizasyon yöntemi baz alan INNO-Lipa gibi yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler ile de tür düzeyinde tanımlamasına olanak sağlamıştır (Brosch *et al.* 2002). *Mycobacterium tuberculosis* genotiplendirmesinde, genetik varyasyonu anlamak için klasik genotipleme yöntemleri arasında IS6110 insersiyon dizilerinin dağılımının, kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP) yöntemi patojen suşlarını ayırt etmek için yaygın kullanılan ilk yöntemdir (Jagielsk *et al.* 2014). Analiz edilen suşların % 0,1' inden daha azında elementin hiç kopyası olmadığından IS6110 RFLP yöntemi *M.tuberculosis* tanısında kullanılabilinmektedir. Günümüzde de en yaygın kullanılan genotipleme metodu olarak IS6110 RFLP tiplendirmesi mikobakteri moleküler epidemiyolojisinde altın standart kabul edilmektedir. PZR'a temelli yöntemlerden Spoligotipleme (Spacer Oligotipleme), değişik sayıda sıralı tekrarlar (Variable-number tandem repeats, VNTR) tiplemesi ve mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) tiplemesi ayırım daha etkin olduğundan en yüksek tekrarlanabilme özelliği ve ayırım gücü sayesinde MIRU-VNTR yöntemi IS6110 RFLP yönteminin yerini almaktadır (Brudey *et al.* 2006, Jagielsk *et al.* 2014, Ali 2014).

1.7. *Mycobacterium tuberculosis* bulaşması

TB özellikle hastaların öksürük ve aksırıklarıyla havaya saçılan mikropların inhalasyonu, süt ve süt ürünleri gibi kontamine besinlerin tüketilmesi ve direkt temas yoluyla bulaşır (28). En önemli enfeksiyon kaynağı hasta kişilerdir. Sağlıklı taşıyıcılık yoktur. Enfeksiyon kaynağı olarak hasta sığırların rolü bizde çok sınırlıdır. Bulaşma prensip olarak direkt temasla, çoğu kez damlacık enfeksiyonu ile olur. Tozlarla veya sütle bulaşma istisnadır. Kuluçka süresi ise 4-12 haftadır.

Mycobacterium tuberculosis, bulunduğu konakçılar arasında yayılan hava kaynaklı bir patojendir. Bulaşma, yalnızca aktif TB'si olan kişilerde olmakla birlikte gizli TB enfeksiyonu olan kişilerin bulaşıcı olduğu bilinmemektedir (Kumar *et al*, 2007). Bir kişiden diğerine bulaşma olasılığı, taşıyıcı tarafından atılan damlalardaki yüksek bakteri yükü, ventilasyon etkinliği, enfekte ve enfekte olmayan kişiler arasında daha uzun maruz kalma süresi, *M. tuberculosis* virülansı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Tüberküloz suşu, enfekte olmayan bireyde bağışıklık düzeyi ve damlacıkların çekirdek boyutları ile ilişkilidir (Kang *et al*. 2011, Richeldi 2006).

Aktif akciğer TB'si olan kişiler tarafından üretilen damlacıklar, basil içerir. Damlacık, öksürme, hapşıрма, konuşma ya da şarkı söyleme sırasında nefesini veren enfekte bir kişinin solunum hareketleri ile basil yüklü damlacıklarla havaya yayılır. Damlacık buharlaşarak daha da küçük partikül oluşur. Oluşan damlacık çekirdekleri hasta olmayan kişilere solunum yolundan bulaşara hastalığa neden olur. Damlacık çekirdekleri hava akımlarında hareket edebilir ve birkaç saat havada kalabilir. TB geçişinin gerçekleşmesi için bulaşıcı bir kişiye sekiz saat maruz kalmanın gerekli olduğu tahmin edilmektedir (Musher 2003). Damlacıkların çekirdeği çap olarak 5µm'den daha küçüktür ve difüzyonlarla doğrudan alveollere bırakılır. Alveollerde kirpikler yoktur ve bu nedenle burada biriken parçacıklar mukosiliyer klirens ile uzaklaştırılmaz. En büyük damlacık çekirdekleri hava akışından düşer ve üst solunum yollarını kaplayan mukusta hapsolür. Hava yolu epitelyumu, mukozayı ağza doğru hareket ettiren ve böylece yakalanan partikülleri akciğerden uzaklaştıran kirpikler ile kaplıdır (Musher 2003, Thwaites *et al*. 2008).

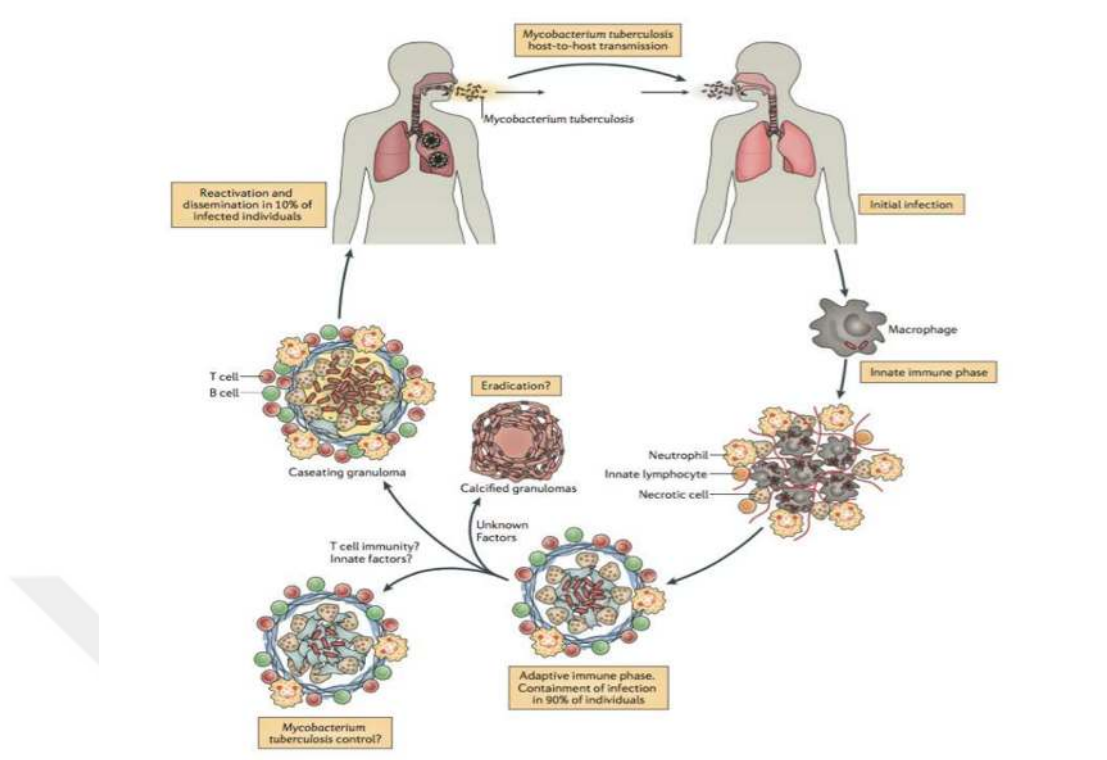
1.8. Patojenite

Mycobacterium tuberculosis zorunlu bir aerobik bakteridir. Bu nedenle klasik verem basili her zaman akciğerlerin iyi havalandırılmış üst loblarında bulunur. Bir

Temasın niteliği	Enfeksiyon riski
Hiçbiri bilinmiyor	1 / 100. 000
Gündelik sosyal iletişim	1 / 100.000
Okul ve işyeri	1 /50 - 1 /3
Huzurevi	1 / 20
Bar ve sosyal kulüp	1/ 10
Yurt	1/5
Ev	1/ 3

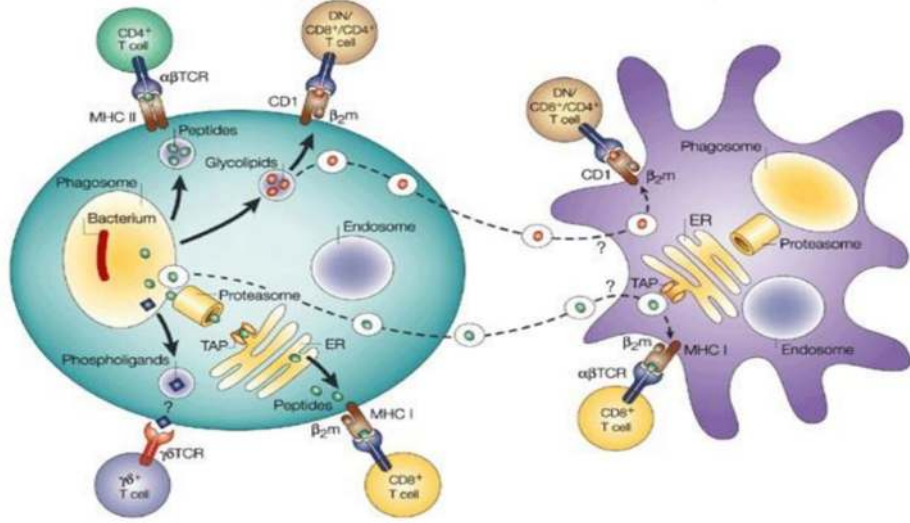
Çizelge 1.3 Enfekte bir kişiye farklı maruz kalma türlerinden kaynaklanan tüberküloz enfeksiyon riski (Musher 2003).

enfeksiyon oluşması için, kişi akciğerlerin alveollerine ulaşan basil içeren damlacık çekirdeklerini solur. Bu basiller alveolar makrofajlar tarafından yutulur. Makrofajlar, T lenfositlerini bölgeye çeken proteolitik enzimlerin ve sitokinlerin üretimini indükler (Knechel 2009). Basillerinin çoğu yok edilir veya inhibe edilir. Çok az sayıda basil hücre içinde çoğalabilir ve makrofajlar öldüğünde salınır. Yaşıyorsa, bu basiller lenfatik kanallar yoluyla veya kan dolaşımı yoluyla daha uzak dokulara ve organlara yayılabilir. TB hastalığının gelişme olasılığı en yüksek olan vücut bölgeleri, bölgesel lenf düğümleri, akciğerin tepe noktası, böbrekler, beyin ve kemik dokudur (Dheda *et al.*2010). İki ile sekiz hafta içinde makrofajlar tüberkül basilini yutar ve çevreler. Hücreler, basilleri barındıran ve kontrol altında tutan granülom adı verilen bir bariyer kabuğu oluşturur, bu gizli TB enfeksiyonu olarak bilinir. *M. tuberculosis* ile enfekte olanların yaklaşık %90'ının latent olduğu düşünülmektedir. Bağışıklık sistemi basili kontrol altında tutamazsa, basiller hızla çoğalmaya başlayarak TB'ye neden olur (Kaufmann 2001, Dye and Williams 2010). Bu süreç akciğerler, böbrekler, beyin ve kemik gibi vücudun farklı bölgelerinde meydana gelebilir. Latent kişilerin vücutlarında *Mycobacterium tuberculosis* vardır ancak hastalık yoktur. Enfeksiyonu diğer insanlara yayamazlar. Verem hastalığı olan kişiler genellikle bulaştırıcıdır ve bakterileri diğer insanlara yayabilir. Bazı insanlar diğerlerinden daha büyük risk altındayken TB hastalığı, gizli TB enfeksiyonu olan biri tarafından edinilebilir. gizli TB'li kişilerde HIV enfeksiyonu, bağışıklık sisteminin zayıflaması nedeniyle TB gelişimi için en yüksek risk faktörüdür (Dye and Williams 2010, Kawabata 1998). Bağışıklık, yaşlılık, BCG aşısı, enfeksiyonlar, yetersiz beslenme, alkolizm, sigara, AIDS, diyabet, lösemi, katı tümörler, immünsüpresif ilaç tedavileri ve genetik faktörler, TB hastalığı ve ölüm gelişme riskinin artmasında rol oynayan faktörlerden bazılarıdır (Amerikan Toraks Derneği 2000, Cole 2005, WHO 2019).



Şekil 1.8. *Mycobacterium tuberculosis* patojenitesi (Nunes-Alves *et al.* 2014).

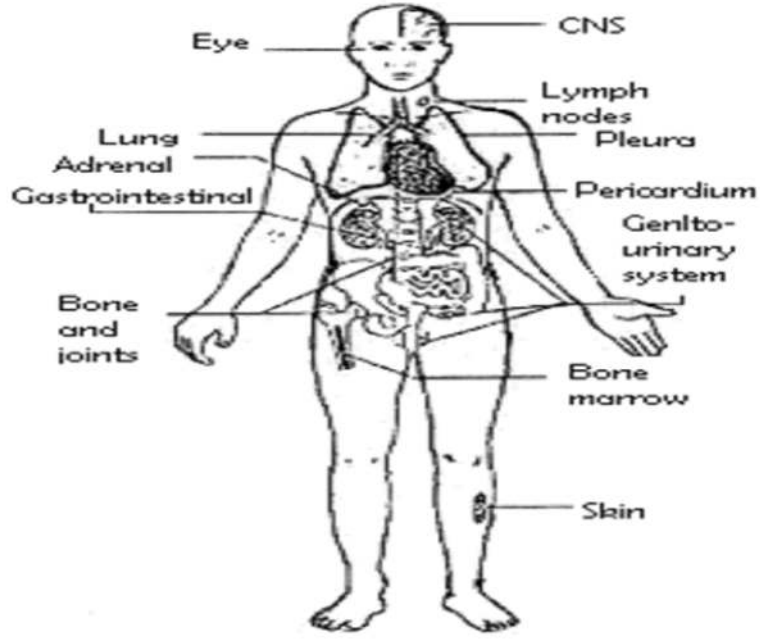
Mycobacterium tuberculosis, ilk enfeksiyondan 7 ila 21 gün sonra tercihen makrofaj fagozomunda yaşar (Todar, 2005a, Ahmad 2011). Fagozomda üretilen mikobakteriyel peptitler, doğrudan makrofaj Fc reseptörlerine bağlanır ve hücre yüzeyine yerleştirilen ana sınıf II histo-uyumluluk kompleksi (MHC II) molekülleri ile etkileşime girer (Ahmad 2011).Tüberkül basili, makrofajlar üzerindeki reseptörlere doğrudan veya dolaylı olarak tamamlayıcı reseptörler veya Fc reseptörleri aracılığıyla bağlanabilir (Todar 2005a). Tüberkül basilinin MHC II moleküllerine bağlanması, farklılaşma 4 (CD4) timus hücresi (Tcells) kümesini tetikler (Kaufmann 2001, Kaufmann and Parida 2008). Sonuç olarak, diğer makrofajlar periferik kandan birikmeye başlar; ancak bu makrofajlar inaktive olur ve *Mycobacterium tuberculosis*'i yok edemez (Ryan *et al.* 2014, Andersen *et al.* 2000). Başlıca histokompatibilite kompleksi sınıf I (MHC I) molekülleri, M. tuberculosis'u tanırlar ve sitokinler, interferon gama (IFN- γ), interleukin2, tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) ve makrofaj koloni uyarıcı faktörleri üretmek için CD4 + T lenfositleri ve Tcd lenfositleri infiltre eder (Todar 2005b, Ahmad 2011, Robert and Mahon 2015) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. *Mycobacterium tuberculosis* karşı immün yanıtta farklı T hücre popülasyonlarının aktivasyonunu tetikleyen farklı T hücresi işleme yolları (Kaufmann 2001).

1.8.1. Tüberküloz belirtileri

Tüberküloz, enfeksiyon bölgesine göre akciğer TB veya akciğer dışı TB olarak sınıflandırılır. Akciğer TB, tüberkülozun en yaygın şeklidir ve esas olarak akciğerleri tutar. Klasik semptomlar arasında göğüs ağrısı, iki hafta veya daha fazla süren inatçı öksürük, ateş, gece terlemeleri, iştahsızlık ve kilo kaybı yer alır. İnsanlar genellikle kendilerini yorgun ve rahatsız hissederler. Hastalığın sonraki aşamalarında, hava yollarından öksüren mukusta veya hemoptizide kan olabilir, ancak bu semptomlar <3 yaş çocuklarda ve HIV enfeksiyonu veya diğer immün baskılayıcı hastalıkları olan hastalarda daha az belirgin olabilir. (Lawn and Zumla 2011, Perez-Velez and Marais 2012). Akciğer dışı TB, basillerin bitişik yapılara bitişik yayılmasının bir sonucu olarak ortaya çıkar. Akciğer dışı TB, vakaların %15-30'unda görülür ve hemen hemen her organda lokalize olabilir. Hastalar genellikle anayasal semptomlarla başvurur; ateş, gece terlemeleri, kilo kaybı ve hastalığın yeri ile ilgili yerel özellikler enfeksiyonun bulunduğu yere göre değişir. Yaygın bölgelerden bazıları, tüberküloz plörezide plevra, perikarditte perikard, menenjitte merkezi sinir sistemi, lenfadenitte lenfatik sistem, omurga Pott hastalığında kemik ve eklemler ve ürogenital sistem TB'sidir (Şekil 1.10) (Sharma and Mohan 2006). Akciğer dışı TB, bağışıklığı baskılanmış kişilerde ve HIV'li kişilerde küçük çocuklarda daha sık görülür, bu vakaların %50'sinden fazlasında görülür (Golden and Vikram 2005).



Şekil 1.10. Akciğer dışı tüberkülozdan en çok etkilenen bölgeler.

1.8.2. Tüberküloz teşhisi

Tüberküloz için eksiksiz bir tıbbi değerlendirme, tıbbi bir geçmiş, fizik muayene, göğüs röntgeni ve mikrobiyolojik incelemeyi içermelidir. Tüberkülin deri testi (tüberkülin testi) ve cerrahi biyopsi de içerebilir. Direkt mikroskopi balgam muayenesinde tekrar tekrar negatif olan solunum semptomatik hastalarda tanı koymak için akciğer grafisi tanıya yardımcı olabileceği gibi, balgam üretemeyen hastalarda bakteriyolojik inceleme için de önemlidir. Genel olarak, göğüs radyografilerinde üst akciğerlerde görülen anormallikler (infiltrasyon veya boşluklar) genellikle TB'yi düşündürür, ancak kesin olarak TB için kesin değildir (Kumar *et al.* 2007, NICE 2011).

Kültürle doğrulanmış akciğer TB'si olan hastaların %9'unun normal göğüs röntgeni çektiği bulundu (Pepper *et al.* 2008). Ek olarak, solunumla ilgili olmayan TB'si olan tüm hastalar, birlikte var olan solunum TB'sini doğrulamak için göğüs röntgeni çektirmelidir (NICE 2011). Teşhis, bilgisayarlı tomografi (BT) taraması veya manyetik rezonans görüntüleme (MR) ile akciğer dışı TB için yapılır. BT taraması, TB ve akciğer dışı TB'nin, özellikle lenf düğümü ve iskelet hastalığının teşhisine yardımcı olabilir. İdrar ve kandan örnekler sistemik mikobakteriyel enfeksiyonun belirlenmesi için toplanırken, akciğer dışı TB'den şüphelenildiğinde enfekte bölgeden doku biyopsisi alınabilir (NICE 2011). Steril olmayan bölgelerde örnekler ortak flora içerebilir, bu

nedenle örnekler %4 sodyum hidroksit ile dekontamine edilmelidir. Dekontaminasyon süreci çok önemlidir çünkü *M. tuberculosis*'in benzersiz ve tanımlayıcı özellikleri yavaş bir büyüme oranına sahiptir, bu da kültüre mikobakterileri izole etmeyi zorlaştıran kirleticiler tarafından hızla domine edildiği anlamına gelir. Bunun aksine, hızla büyüyen mikroorganizmalar, mikobakterilere göre sodyum hidroksite karşı daha düşük bir dirence sahiptir, bu nedenle, sodyum hidroksite kontrollü bir şekilde maruz kalmak, tüm mikobakterileri yok etmeden kirletici maddeleri öldürebilir (Nema 2012, Pfyffer 2015).

1.9. *Mycobacterium tuberculosis*'in smear mikroskobu

TB'nin erken teşhisi, kontrolü için çok önemlidir. Mikobakterilerin hücre duvarı, belirli boyama teknikleri kullanıldığında asit-alkol ile renk giderilmesine direnmelerini sağlayan lipit bakımından zengindir. TB'yi tanımlamak için rutin olarak iki boyama tekniği kullanılır, Ziehl-Neelsen (ZN) boyası ve Auramine-O (AO) floresan boyadır. Örneklerin mikroskopisi, mikobakterileri pembeye boyayan bir ZN boyasına sahip hafif mikroskopi veya mikobakterileri sarı-yeşil boyayan bir AO boyası ile floresan mikroskopi kullanılarak gerçekleştirilebilir (Pfyffer *et al.* 2015). ZN boyasına dayalı Işık mikroskopunun en önemli özellikleri daha kolay, ucuz ve hızlı sonuç vermesi, kaynak yetersizliği olan birçok ortamda TB tanısında kullanılmaktadır. Ayrıca yansıyan güneş ışığı kullanılarak elektriğin olmadığı alanlarda da yapılabilmektedir (Nema 2012). AO boyasına dayalı floresan mikroskopi, ZN boyamasından %10 daha duyarlıdır, ancak geleneksel olarak pahalı bir floresan mikroskobu ve karanlık bir oda gerektirir (Mizuno *et al.* 2009). Bu teşhis testi için daha iyi doğruluk elde etmek için en önemli prosedür, kullanılan mikroskopi türü, örnek sayısı ve örnekleme süresidir. Sabah erken saatlerde alınan örneklerin daha fazla organizma içerdiği düşünülmekte ve tekrar alınan örnekler balgam sürüntülerinin duyarlılığının arttığını göstermiştir (Ulukanligil 2000).

1.10. *Mycobacterium tuberculosis*'in kültürü

TB tedavisi gören hastalarda *M. tuberculosis* kültürü her zaman pozitif olmamakla birlikte tanıda altın standart kabul edilir ve smear mikroskobu negatif vakaların tespiti için gereklidir. Ek olarak, İngiltere verileri, TB hastalarının yalnızca %56'sının pozitif bir kültürle doğrulandığını göstermektedir (Tiruvilumala and Reichman 2002, Sağlık Koruma Ajansı 2009). *M. tuberculosis* bakteri özellikle yavaş üremesine bağlı olarak, kültür yoğun emek gerektirir ve yavaştır, kolonilerin elde edilmesi haftalar alabilir. Kültürün hassasiyeti mikroskopiden çok daha yüksektir ve düşük mikobakteriyel yükleri

tespit edebilir (Della 2004). Tüm dünyada, Lowenstein-Jensen'in besiyeri gibi yumurta bazlı kültür besiyeri, ağırlıklı olarak *M. tuberculosis* izolasyonu için kullanılmaktadır (Şekil 1.11); ancak; Middlebrook adlı agar bazlı kültür besiyeri de kültür için kullanılır. Her iki besiyerinin de görünür kolonileri göstermesi için aşılardan itibaren 6 - 8 hafta gerekir (Naveen and Peerapur2012).

Son otuz yıldır, tüberküloz testi konusunda uzmanlaşmış laboratuvarlar, büyüme tespiti için BACTEC 460 ve BACTEC MGIT 960 sistemleri gibi ticari broth tabanlı sistemleri uygulamaya koymuştur. Mikobakteriler, katı ortama kıyasla sıvı ortamda biraz daha hızlı büyüme oranına sahiptir; sonuç olarak, sıvı büyüme ortamını içeren kültürleme yöntemleri, klinik örneklerden mikobakterilerin çoğu duyarlılığına ve hızlı bir şekilde tanımlanmasına izin verir (Chihota *et al.* 2010, Sorlozano *et al.* 2009).



Şekil 1.11. Lowenstein-Jensen üzerindeki *Mycobacterium tuberculosis* kolonileri.

1.11. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks fenotipinin tanımlanması

Geleneksel tür tanımlama süreçleri, biyokimyasal testlere, farklı ortamlardaki büyüme özelliklerine ve koloni morfolojisine bağlı olan fenotipik karakterlere dayanır. Koloni morfolojisi, düz pürüzsüz, kubbeli parlak kolonilerden kuru ve pürüzlü kolonilere kadar değişen *M. tuberculosis* kompleks türleri arasında farklılık gösterir (Pfyffer *et al.* 2015). Mikobakteriyumun tanımlanmasında kullanılan nihai avantajlı ve önemli biyokimyasal testler, niasin birikimi, nitrat indirgeme, pirazinamidaz aktivitesi, tiyofen-2-karoksilik asit hidrazid inhibisyonu ve üreaz aktivitesidir. Ek bilgi

sağlayabilen diğer testler, tellürit azaltma, tween 80 hidroliz, demir alımı ve NaCL toleransıdır. Bu biyokimyasal testler genellikle bir L.J eğiminde gerçekleştirilir ve sonuçların elde edilmesi 3 haftaya kadar gerektirir. Buna ek olarak, biyokimyasal testlerin gerçekleştirilmesi basit ve ucuz olmasına rağmen, sonuçları yorumlamak için deneyimli kişiler gerektirir ve türler arasında net bir ayrım yapmaz (Babady and Wengenack 2012, Hall and Roberts 2006).

1.12. *Mycobacterium tuberculosis*'in immünolojik tanısı

Mycobacterium tuberculosis ile enfeksiyonun tanımlanmasına yönelik geleneksel yöntemler, tüberkülin deri testi (TST) olarak saflaştırılmış protein türevinin (PPD) deri altına enjeksiyonu ve konakçı yanıtının analizidir. TST, gizli TB enfeksiyonunu tespit etmek için kullanılan en eski tanı testlerinden biridir. LTBI, aktif TB'nin klinik kanıtı olmaksızın *M. tuberculosis* antijenlerine karşı immün yanıtların varlığı olarak tanımlanır (Richeldi 2006). Buna ek olarak, daha önce BCG aşısı ile aşılanmış veya çevresel mikobakteriler ile enfekte olmuş kişilerde *M. tuberculosis* enfeksiyonunu belirleyemediği için TST'nin özgüllüğü sınırlıdır (Tissot *et al.* 2005). TST ile ilgili engel, enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) ile T lenfositlerinden interferon-gama (Interferon - γ) salımını ölçen ticari antijene özgü testlerin geliştirilmesine yol açmıştır. IFN-salım testlerinde (IGRAs), kan örnekleri BCG'de veya TB olmayan mikobakterilerde bulunmayan Mikobakterium tüberkülozis'e özgü antijenlerle karıştırılır. Bir kişi *Mycobacterium tuberculosis* ile temas halindeyse, T hücreleri antijene tepki verir ve IFN- γ salgılar (Brosch and Vincent 2007). Bununla birlikte C-reaktif protein (CRP) gibi enflamatuvar belirteçler TB'nin teşhisinde kullanılır; ancak; TB hastalarının %15'inin CRP seviyeleri normaldi (Breen *et al.* 2008). Tüberküloz için diğer merkantil duyarlı test lipo-arabinomannan'dır; TB'li hastaların idrarındaki bir dizi mikobakteriyel antijeni tespit edebilir (Hamasur *et al.* 2015).

1.13. Fenotipik ilaç duyarlılık testi

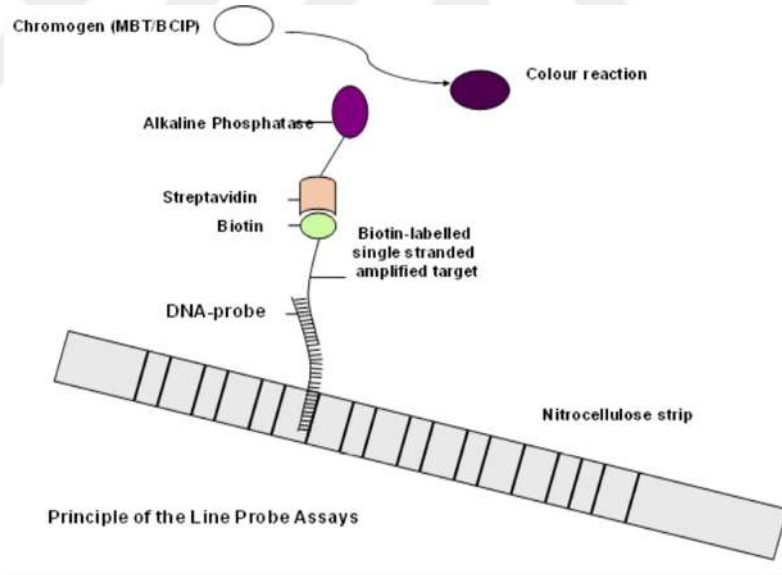
M. tuberculosis'in fenotipik ilaç duyarlılık testi (DST), ilaçların varlığında katı veya sıvı ortamda bakterilerin kültürlenmesini içeriyordu. Küresel olarak katı ortamda, fenotipik tespit çoğunlukla gerçekleştirilir ve altın standarttır, ancak bu birkaç hafta sürer (Babady and Wengenack, 2012). Mikobakterilerin büyümesini tespit etmek için ilk ticari sıvı bazlı yöntem 1980'lerde tanıtıldı. BACTEC 460 olarak adlandırılan bu cihaz, büyüme sırasında bakteriyel metabolizmanın izlenmesini içeren radyometrik bir

yöntemdir (Siddiqi *et al.* 1981). Broth tabanlı bir yaklaşım olduğundan, DST sonuçları katı ortam kullanan yöntemlere göre daha hızlı üretilebilir. Radyometrik olmayan BACTEC MGIT 960 sistemi için yöntem daha sonra daha da geliştirildi. Ticari sıvı kültürün bu iki DST yöntemi nispeten kısa bir işleme süresine sahiptir, ancak özel aletler ve maliyetli aletler gerektirir (Rusch-Gerdes *et al.* 1999).

1.14. Tüberküloz tanısında yeni moleküler testler

1.14.1. Line Probe Assay (LPA)

Son yıllarda TB, çoklu ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) ve büyük ölçüde ilaca dirençli tüberküloz (BÖD-TB) tanısı alanında önemli bilimsel gelişmeler kaydedilmiştir. DNA strip teknolojisi ile üretilen revers hibridizasyon yöntemi olan Line Probe Assay (LPA) testi mikobakterlerin moleküler tanısında kullanılmaktadır (Şekil 1.12). Kültür ortamından tüberküloz tanısını sağlayan ticari ürünlerdir. LPA testi, *M. tuberculosis* kompleksinin farklılaşması ve ilaç direnci ile birlikte hızlı tespit imkanı sağlar (WHO 2008).



Şekil 1.12. Line Probe Assay prensibi (Barnard *et al.*, 2012b).

Türlerin tanımlanması

M. tuberculosis kompleksindeki türler yakından ilişkilidir. *M. tuberculosis*'in diğer mikobakterilerden farklılaşması, TB tanısında önemli bir sağlık sorunudur. NTM'ler, insanlarda fırsatçı enfeksiyonların nedensel ajanları olarak giderek daha fazla tanınmaktadır (van Ingen *et al.* 2012). Ticari olarak GenoType MTBC (Hain Lifescience, Almanya), *M. tuberculosis* kompleks suşlarının üyelerinin hızlı bir şekilde

tanımlanmasını ve ayırt edilmesini sağlayan bir LPA'dır ve geleneksel yöntemlere kıyasla daha yüksek duyarlılık ve özgüllükle tüberküloz ve tüberküloz olmayan mikobakterileri tespit etmek için yeni perspektifler sunar.(Somoskovi *et al.* 2008).

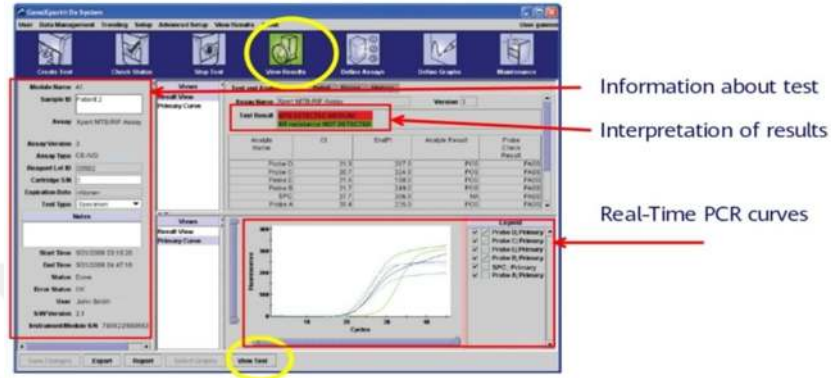
GenoType MTBC, *M. tuberculosis* kompleksinin çeşitli üyelerinin hızlı bir şekilde farklılaşmasını ve ayrıca *M. bovis* BCG'nin tanımlanmasını sağlar. Bu tahlil gyrB DNA dizisi polimorfizmlerine ve *M. bovis* BCG'nin RD1'inin varlığına veya yokluğuna dayanmaktadır. Bu sekansları hedefleyen spesifik oligonükleotidler, membran şeritleri üzerinde hareketsizleştirilir ve türler, yorum şemasına göre tanımlanabilir (Richter *et al.*, 2003, 2004)

1.14.2. GeneXpert MTB / RIF testi

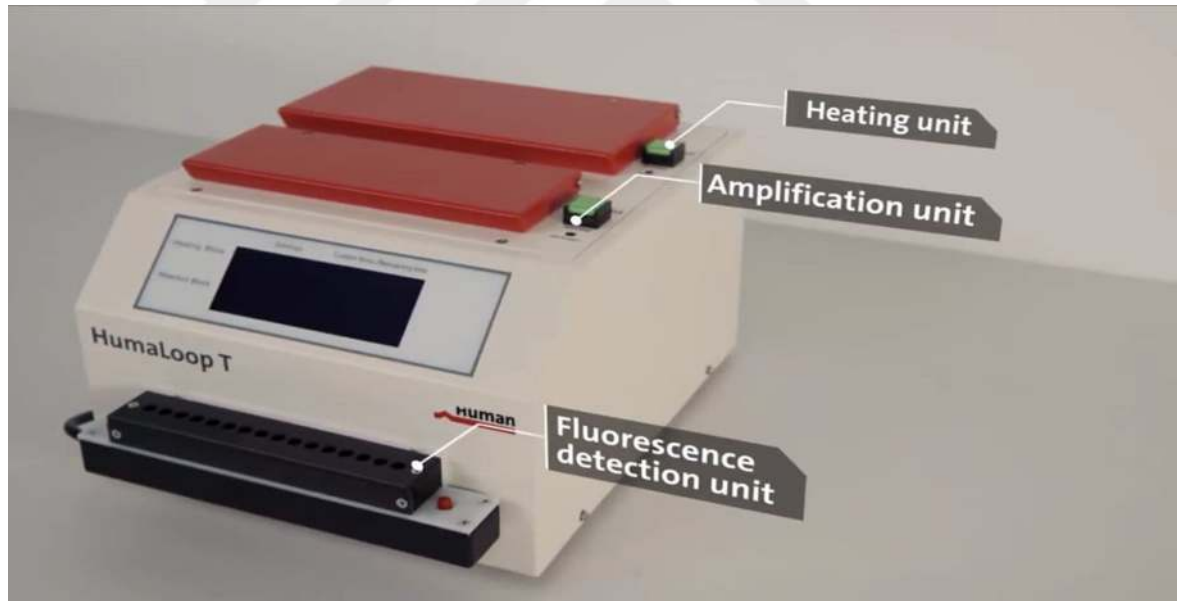
GeneXpert MTB/RIF testi tek bir işlem döngüsünde klinik örneğin işlenmesi ve semi-nested gerçek zamanlı PZR ile kapalı sistemde türtülmektedir. Xpert MTB/RIF, iki saatin altında doğrudan balgamdan TB ve rifampisin direncinin eşzamanlı tespiti için otomatik, kartuş tabanlı bir nükleik amplifikasyon testidir. Teknoloji GeneXpert platformuna dayanmaktadır. DSÖ, teknolojinin Aralık 2010'da kullanılmasını önermiştir(WHO 2016). Hasta örneklerinde *M. tuberculosis* kompleks genomunun varlığı ve Rifampisin direncinden sorumlu anahtar mutasyonların genomik dizilerinin varlığı, GeneXpert MTB / RIF (rpoB gen mutasyonu) ile belirlenebilir (Şekil 1.13) (Guillet-Caruba *et al.* 2014).

1.14.3. Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) testi

Japon Eiken kimyasal şirket tarafından geliştirilen cihaz ile (Şekil 1.14) Loop aracılı izotermal amplifikasyon anlamına gelen LAMP, basit, hızlı, spesifik ve uygun maliyetli bir nükleik asit amplifikasyon yöntemi uygulanmaktadır. Hedef gen üzerindeki 6 farklı bölgeyi tanımak için özel olarak tasarlanmış dört farklı primerin kullanılmasıyla karakterize edilir ve reaksiyon işlemi, iplik değiştirme reaksiyonu kullanılarak sabit bir sıcaklıkta ilerler. Gen amplifikasyonu ve tespiti, numuneler, primerler, sarmal yer değiştirme aktivitesine sahip DNA polimeraz ve substratların sabit bir sıcaklıkta (yaklaşık 65°C) inkübe edilmesiyle tek bir aşamada tamamlanabilir. 15-60 dakikada 109-1010 kez amplifiye edilen DNA ile yüksek amplifikasyon etkinliği sağlar. Yüksek özgüllüğü nedeniyle, amplifiye edilmiş ürünün varlığı, hedef genin varlığını gösterebilir (WHO 2016).



Şekil 1.13. *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonu ve rifampisin direnci teşhisi için Cepheid Xpert® sistemi ve MTB/RIF test kartuşu (Caulfield *et al.*2016).



Şekil 1.14. HumaLoop T cihazı.

1.14.4. Tuberkülozun tedavisi

TB, tedavi için tek bir ilaç rejiminin kullanıldığı diğer bakteriyel hastalıkların çoğunun aksine, iki nedenden dolayı kombinasyon tedavisi kullanılarak tedavi edilmiştir:

- İlaç direnci geliştirme şansını en aza indirmek.
- Birleşik ilaç etki modları, bakterileri verimli bir şekilde temizlemeye yardımcı olur.

İlaçsız verem ölüm oranları yüksektir (WHO 2014). Verem için 20. Yüz yılın

ortalarına kadar kesin bir tedavi yoktu. Etkili ilaç tedavileri ilk olarak 1940’larda formüle edildi. TB tedavisi için streptomisin (STP) sağlandı. Tüberküloza direnç, ilaç kullanılmaya başlandıktan kısa süre sonra bulundu. Daha sonra, INH, RIF, EMB ve PZA dahil olmak üzere tüberküloz tedavisinde birinci basamak ilaç olarak dört ilaç kullanıldı ve en etkili birinci basamak TBC ilacı RIF’dir (WHO 2016). Dört ilaç tedavisi, TB hastalığı tedavisine başlamak için standart bakımdır. Tek ilaç tedavisi, bu ilaca bağışık olan bir bakteri popülasyonunun gelişmesine yol açabilir. İlaça duyarlı TB hastaları 2 ay süreyle INH, RIF, PZA ve EMB veya STP kombinasyonu ile tedavi edilir, ardından 4 veya 7 ay RIF ve INH ile tedavi edilir. Altı aylık tedavi kısa süreli anti-tüberküloz tedavisi olarak adlandırılırken, latent TB hastaları 6 veya 9 ay süreyle INH veya 6 veya 9 ay süreyle INH veya 3-4 ay boyunca INH artı rifampisin veya 3 için RIF ile tedavi edilebilir (Brosch and Vincent 2007, Good 2011, WHO 2016).

ÇİD-TB hastalarının tedavisi, ilaca eğilimli vakalara kıyasla zordur; FQ ve Cm, Km veya Amk enjektabl gibi ikinci basamak anti-TB ilaçlarının kullanımını içerir. Tedavi döngüsü 6 ay yerine 18-24 ay uzatılır ve bu, ilaca dirençli TB olmayan hastaların tedavisinde kullanılanlardan daha karmaşıktır. Buna karşılık, tedavi çok daha az etkili, daha pahalı, daha zararlıdır ve ölüm oranı çok daha yüksektir (WHO 2016). 2015’in sonunda, DSÖ, hızlı standartlaştırılmış rejimde ÇİD-TB ’li hastalar için iki yeni ilacın (Bedaquiline ve Delamanid) kullanımını onayladı. Bu rejim 9 ila 12 ay sürer ve tamamlanması 2 yıla kadar sürebilen geleneksel ÇİD-TB tedavisinden çok daha az maliyetlidir. (WHO2016).

Yalnızca birincisine karşı bağışık olan BÖD-TB’ler tanımlanmıştır, bu nedenle, yaygın olarak bulunan TBC önleyici ilaçların yanı sıra en güçlü ikinci basamak anti-TB ilaçlarının bazılarıyla uğraşmak çok zordur. Aslında, BÖD-TB tedavisinin etkinliği zayıftır, bu nedenle BÖD-TB tedavisi, herhangi bir ilaç tedavisinin olmamasıyla karşılaştırılabilir (Liu *et al.* 2011).

1.14.5. Tüberküloz aşılama

Mycobacterium tuberculosis’a karşı mevcut olduğu tespit edilen tek aşı, yaklaşık 100 yıl önce kurulan aşı ile ilgilidir, Bacillus Calmette Guérin’in (BCG) çocuklarda ciddi verem formlarını önlediği gösterilmiştir (WHO 2019). İnsanlar için BCG aşısı uygulaması 1921’de başladı ve bu yıldan bu yana üç milyardan fazla insana sağlandı (Behr 2002, WHO 2019). BCG aşısı, yüksek verem vakalarının görüldüğü birçok ülkede zorunludur, iyi bir çocuk koruması sağlamak için doğumdan sonraki ilk üç gün ücretsiz

verilir ve en önemli koruyucu faydalar doğumdan sonraki ilk üç günde olup ölüm riskini azaltır, menenjit ve yeni doğanlarda ve küçük çocuklarda hastalık yayılması.ancak şu anda, enfeksiyonla veremden önce veya sonra yetişkin verem hastalığının önlenmesinde etkili hiçbir aşı yoktur. Şu anda, TB enfeksiyonunun önlenmesine yönelik klinik deneylerde 13 potansiyel aşı adayı ve LTBI'li kişilerde TB hastalığının önlenmesi için adaylar bulunmaktadır (WHO2016).



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan materyaller Çizelge 2.1’te verilmiştir. Çalışmada kullanılan kitler Çizelge 2.2’te verilmiştir.

MALZEME	ÖZELLİK	MODEL	SAYISI
Biyogüvenlik kabini		Almanya S.N.061	1
Eppendorf		Sigma, Harz / Almanya S.N.84593	1
Genexpert MTB/RIF	PCR	Cepheid Inc/USA S.N.803104	1
Barkod okuyucu		Cepheid Inc/USA	1
Bilgisayar		HP/USA	1
CD		Cepheid Inc/USA	1
Kesintisiz Güç Kaynağı(UPS)		Getx/Canada S.N.E1711005608	2
Humalooop T	PCR	HUMAN/Almanya S.N.1611- 0009B	1
Buzdolabı		National / Japonya	1
Etil Alkol	%70	CAS No. 64-17-5	1L
Fenol	% 5	LabChem/	100ml
AFB kiti		JOURILABS/Lebanon	1
Saf su			2 paket
İşaretleme kalem		Edding 8014/Almanya	2
Saatler		dijital saat/Çin	2
Makas (mini)		Haiju Laboratory Equipment Co/ Çin	1
Plastik yıkama şişeleri			4
Mikropipet		CAPP Bravo Pipette/Denmark	1
Pipet ucu		Castimolab/Türkiye	200

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan materyaller.

NO	Kiti	Şirket	Ülke
1	Genexpert MTB/RIF kiti	Cepheid Inc.	USA
a.	Kartuş	-	-
i.	Boncuk 1 (dondurularak kurutulmuş) kartuş başına 2 adet	-	-
•	Polimeraz	-	-
•	dNTP'ler (deoksinükleosit trifosfatlar)	-	-
•	Prob	-	-
•	BSA (Sığır serum albümini)	-	-
ii.	Boncuk 2 (dondurularak kurutulmuş) kartuş başına 2 adet	-	-
•	Primerler	-	-
•	Problar	-	-
•	BSA (Sığır serum albümini)	-	-
iii.	Boncuk 3 (dondurularak kurutulmuş) kartuş başına 1	-	-
•	Örnek İşleme Kontrolü (SPC) ~6.000 bulaşıcı olmayan B. globigii sporları	-	-
b.	Reaktif 1, kartuş başına 4 mL	-	-
•	Tris Tampon	-	-
•	Yüzey aktif maddeler	-	-
•	EDTA (etilendiamintetraasetik asit)	-	-
c.	Reaktif 2, kartuş başına 4 mL	-	-
•	Tris Tampon	-	-
•	Yüzey aktif maddeler	-	-
•	EDTA (etilendiamintetraasetik asit)	-	-
d.	Örnek Reaktif 1 şişe başına 8 mL	-	-
•	Sodyum hidroksit	-	-
•	İzopropanol	-	-
e.	Tek Kullanımlık Transfer Pipetleri 12	-	-
2	TB-LAMP kiti	Eiken	Japonya
a	Loopamp™ PURE DNA Ekstraksiyon Kiti(90 test)	Human - Eiken	Japonya
b	Loopamp™ MTBC Tespit Kiti(2 × 48 test)	Human - Eiken	Japonya
•	MTBC reaktif 1 (2 X 48 tüp)	-	-
•	Bst DNA polimeraz * 1	-	-
•	Deoksinükleotid trifosfatlar	-	-
•	Magnezyum sülfat	-	-
•	Calcein	-	-
•	Manganez klorür	-	-
•	Astarlar * 2	-	-
•	Pozitif kontrol MTB (PC MTB)*3 1 X 0.4 mL	-	-
•	Negatif kontrol MTB (NC MTB) 6 X 0.5 mL	-	-
•	30 µL damlalık 12 damlalık	-	-
•	ısıtma tüpleri ve adsorban tüpler	-	-

Çizelge 2.2 Çalışmada kullanılan kitler

* 1: *Bacillus stearothermophilus*'tan türetilmiş BstDNA polimeraz 5'→3'ten yoksun bir sarmal yer değiştirme DNA polimerazdır ekzonükleaz aktivitesi.

* 2: DNA gyrase alt birimi B'de (gyrB) tasarlanmış primerler ve MTBC genomunun ekleme dizisi IS6110 (IS) bölgesi HPLC ile sentezlenmiş oligonükleotitlerden saflaştırılmış DNA.* 3: PC MTB, in vitro amplifikasyondan kaynaklanan bir ürün içerir *M. tuberculosis*'in bir şablon genom DNA'sı. H37Rv (GenBank No. NC_000962) menşei.

2.1.1. Çalışma yeri, hastalar ve numuneler

Bu çalışma Irak'ta kurumsal izinler alınarak yapılmıştır (2000/1969 EK1). Bu çalışma, uluslararası standartlara göre Irak'taki ilk tüberküloz referans merkezi olan

Bağdat'taki Ulusal Solunum Merkezi'nin Moleküler Biyoloji Birimi'nde gerçekleştirildi (Şekil 2.1). Çalışmada 3 Eylül 2020 - 23 Aralık 2020 tarihleri arasında Tıp Şehri ve Bağdat'taki Solunum Hastalıkları İhtisas Merkezi'ndeki hastalardan 117 akciğer TB ve 34 akciğer dışı TB olmak üzere toplam 141 klinik örnek çalışmaya alındı (Çizelge 2.3). Kontrol numuneleri için de 10 sağlıklı insandan numune alındı. Bu çalışma, Genexpert MTB/RIF ve Loop Mediation İzotermal Amplifikasyon (TB-LAMP) kullanılarak akciğer tüberkülozu ve akciğer dışı tüberküloz modelleri için balgam ve akciğer dışı numunelerin hazırlandıktan sonra laboratuvar incelemesi yapıldı (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Çalışma yer tesisinden görüntüler.

Numune türü	Numara
Balgam	92
Bronşiyal Yıkama	10
Bronkoalveolar lavaj (BAL)	2
Mide yıkama	3
Toplam akciğer TB örnekleri	107
Plevral sıvı	16
Asit sıvısı	6
Beyin omurilik sıvısı (BOS)	4
Deri sürüntüsü	4
Lenf düğümünden sürüntü	4
İrin	2
Sinüsten sürüntü	2
Toplam akciğer dışı TB	34
Genel Toplam	141

Çizelge 2.3 Numune türü ve sayısı.

2.2. Yöntem

Tüm prosedürler ve testler, mikobakterilerin aerosol geçişini ve yayılmasını önlemek için katı aseptik koşullar altında ultraviyole ışık (UV) kullanılarak biyogüvenlik kabininde gerçekleştirildi. PZR için laboratuvar, 30 dakika UV maruziyet tabi tutuldu. Çalışmalarda laboratuvar güvenlik lurallarına uyularak işlemler yapılmıştır. Her kullanımdan önce ve sonra. laboratuvar çalışması sırasında eldivenler ve maskeler (N 95) kullanıldı. Tezgahları ve davlumbazı sterilize etmek için %5 fenol ve %70 alkol kullanılarak dekontaminasyon işlemi uygulandı. Hastaların yaş, cinsiyet, ikamet yeri, enfeksiyonun yeni mi eski mi olduğu ve hastanın aldığı tedavi gibi gerekli bilgiler alındıktan sonra hastalardan numuneler alındı. Akciğer veya akciğer dışı TB şüphesi olan hastadan alınan örnek Genexpert MTB/RIF ile ve ikinci kısım TB-LAMP analizi için iki kısma ayrıldı.

2.2.1. Örnek toplama ve dekontaminasyon işlemi

Örnek toplama ve dekontaminasyon işlemleri, laboratuvar güvenlik ve uygulama talimatına (Mankhi 2009) uygun olarak yapıldı.

Balgam örnekleri: Her hastaya örnek verme sırasında burun salgıları veya tükürükten kaçınması gerektiği açıklandıktan sonra öksürme çıkan balgamı steril kaba aktarması istendi. Her bir hastadan üç örnek toplandı. Birinci örnek hastadan merkeze geldiğinde alındı, ikincisi örnek sabah erken saatlerde kahvaltıdan önce alındı ve üçüncüsü de günün herhangi bir saatinde toplandı.

Bronkoalveolar lavaj örnekleri: Hasta balgam veremediği gibi özel durumlarda bronkoalveolar lavaj yoluyla numune alındı ve 3000rpm'de 15dk santrifüjlendi supernatant atıldı ve pellet kullanıldı.

Vücut sıvıları ve diğer örnekler: Alınan numuneler 3000rpm'de 15dk santrifüj edilerek konsantrasyon işleminden sonra supernatant atılarak pelet kullanıldı.

Tüm klinik örnekler N-asetil-L-sistein-Sodyum Hidroksit (NALC-NaOH) yöntemi ile homojenizasyon- dekontaminasyon işlemi uygulandı. Klinik örnekler konik 50ml'lik NALC içeren santrifüj tüpüne alındı. 50 ml çizgisine kadar fosfat tampon ilave edildi. Ardından 3000 rpm'de 15 dk santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve dipteki pelletin iki katı sitratlı NaOH eklendi. Vortekslendi ve 15 dk oda sıcaklığında beklitildikten sonra tekrar santrifüj edildi ve pellet kısmı kullanıldı.

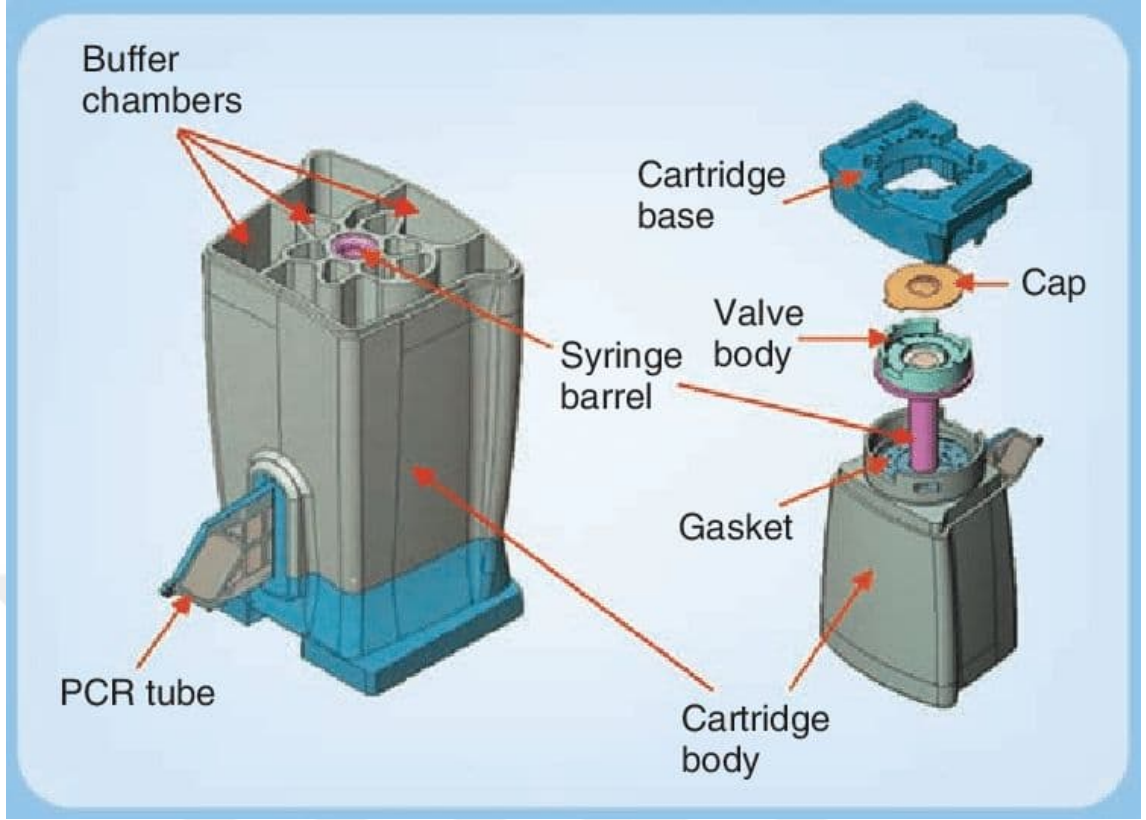
2.2.2. Mikroskopik inceleme yöntemi

Ön işleminden geçirilen örnekler öncelikle EZN (Ehrlich Ziehl Neelsen) boyama ile değerlendirildi. Ayrıca üreme olan kültürlerden boyama için örnek alındı ve EZN boyalı preparatlarda asit-fast basiller görülmesi ile kültür pozitifliği mikobakteri açısından doğrulandı.

Ön işleminden geçirilen örnekler mikroskopik inceleme yöntemi ile değerlendirildi. Steril bir bakteriyolojik öze kullanılarak pelletten yeni ve temiz bir lam üzerine yayma preparatı hazırlandı. Hazırlanan preparat havada kurutulup, alevde tespit edildi. Yayma lam preparatın üzeri tamamen kaplanacak şekilde karbol fuksin solüsyonu ile boyandı. Preparat 5 dk ara ile kabarcık oluşmayacak şekilde alttan ısıtıldı ardından su ile yıkandı. % 25 sülfürik asit solüsyonu (H₂SO₄) ile dekolorizasyon sonrası tekrar su ile yıkandı. Ardından 1 dk süre ile metilen mavisi solüsyonu ile boyandı ve su ile yıkandı. Preparat kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatıldı ve mikroskopta x100 büyütmeli objektifte incelendi. Mavi zeminde pembe kırmızı renkli basillerin görüldüğü preparatlar ARB bakımından (+) pozitif olarak değerlendirildi. Tüm bu işlemler bir saatten daha az bir sürede yapıldı.

2.2.3. Genexpert MTB/RIF testi yöntemi

Test, numune işleme, DNA ekstraksiyonu ve heminest edilmiş gerçek zamanlı PCR için gerekli tamponlar ve liyofilize reaktif boncuklarla önceden yüklenmiş tek kullanımlık çok bölmeli bir plastik kartuştan oluşur (Şekil 2.2). Tahlil kartuşu ayrıca dahili bir numune işleme ve PZR kontrolü olarak görev yapan liyofilize *Bacillus globigii* sporları içerir.



Şekil 2.2. Kartuş bileşenleri

Sporlar, örnek işleme adımı sırasında otomatik olarak yeniden süspansedilir ve işlenir, elde edilen *B. globigii* DNA'sı, PZR adımı sırasında amplifiye edilir. Standart kullanıcı arayüzü, *M.tuberculosis*'in varlığını veya yokluğunu, RIF direncinin varlığını veya yokluğunu ve *M. tuberculosis* konsantrasyonunun yarı kantitatif bir tahminini (yüksek, orta, düşük ve çok düşük) gösterir.

M. tuberculosis için negatif ve ayrıca *B. globigii* dahili kontrolü için negatif olan testler geçersiz olarak rapor edilir. PZR testi, heminest gerçek zamanlı PZR'de *M. tuberculosis* rpoB geninin 192 bp'lık bir segmentini amplifiye eder. İç kontrol hemineste *B. Globigii*, *M. tuberculosis* testi ile multiplekslenir. *M. tuberculosis*, vahşi tip rpoB geninin 81-bp RIF direncini belirleyen "çekirdek" bölgesinin tamamına tamamlayıcı olan beş üst üste binen moleküler işaret probu (A'dan E'ye problemler) kullanılarak tespit edilir (5, 7, 14). RpoB geni hedefindeki mutasyonlar, bir veya daha fazla rpoB'ye özgü moleküler işaretin hibridizasyonunu inhibe ederek karşılık gelen problemlardan gelen sinyali azaltır veya ortadan kaldırır. *M. tuberculosis*, beş rpoB'ye özgü moleküler işaretin en az ikisi, 38 olan ve en fazla iki döngü farklı olan döngü eşiği (CT) değerlerine sahip pozitif bir sinyal verdiğinde tanımlanır. *B. globigii* DNA, tek *B. globigii* moleküler

işaretçisi <38 döngü CT ürettiğinde saptanır. Çok fazla tükürük içeren, belirgin yiyecek parçacıkları olan Paan veya diğer çiğneme tütününün kalıntıları ile katı partikül bulunan bağlam örnekleri incelemeye alınmaz. Hemen kullanılacak balgam ve akciğer dışı örnekler 2-8°C’de saklandı.

GeneXpert testi için örnekler hazırlaması

Örnek toplama kabının kapağını açın, çalışma yüzeyine damlamaması için ters çevirildi. GeneXpert Reaktifini kaptaki örnek miktarına eşit bir kaseye eklendi. Genexpert Reaktif şişesinin balgam ve akciğer dışı örnekler kabına temas etmesine izin verilmedi. Şişede kalan herhangi bir GeneXpert Reaktifi varsa, sonraki testlerde kullanmak üzere saklandı. Reaktifi ekledikten sonra balgam ve akciğer dışı örnekler toplama kabının kapağı yerine takıldı ve dökülme en aza indirmek için parmaklarınızın kapağını ve gövdeyi kavradığından sıkıca tutularak saat yönünde 10-20 kez sallandı. Karışım oda 15 dakika dinlendirin. Sıvı çözelti beklerken GeneXpert kartuşu masaya dik olarak hazırlandı. Kartuş barkodla etiketlendi. Numune 10 dakika bekletildikten sonra 10-20 kez sallandı ve 5 dk bekletirelerek terara sallandı. Örnekler, balgam kümeleri olmayacak sıvılaştırılncaya kadar tekrarlandı. Balgam ve akciğer dışı örneklerini suya benzer bir kıvama gelince teste kullanıldı (Şekil 2.3). 30 dk içinde GeneXpert testi uygulamalıdır. Numuneyi hazırladıktan sonra, cihazı kullanım talimatına uygun şekilde çalıştırıldı.

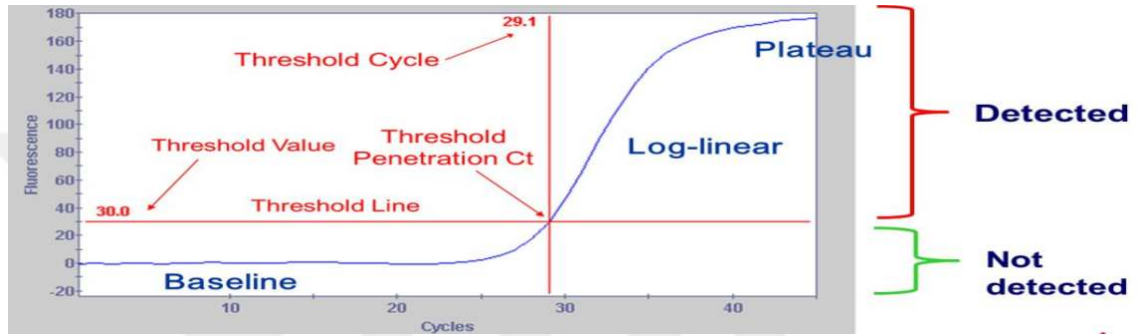


Şekil 2.3. Numuneyi kartuşa yerleştirme adımları.

Genexpert testi, DNA izolasyonu, MTB konsantrasyonu ve amplifikasyonu

sağlandı. MTBC'nin genin RNA polimeraz beta (rpoB) dizisini büyütmek için üç primer kullanıldı ve genin RIF direnç belirleme bölgesi (RRDR) içindeki mutasyonları saptamak için beş moleküler prob kullanıldı (Boehme *et al.* 2010; Darman *et al.* 2018).

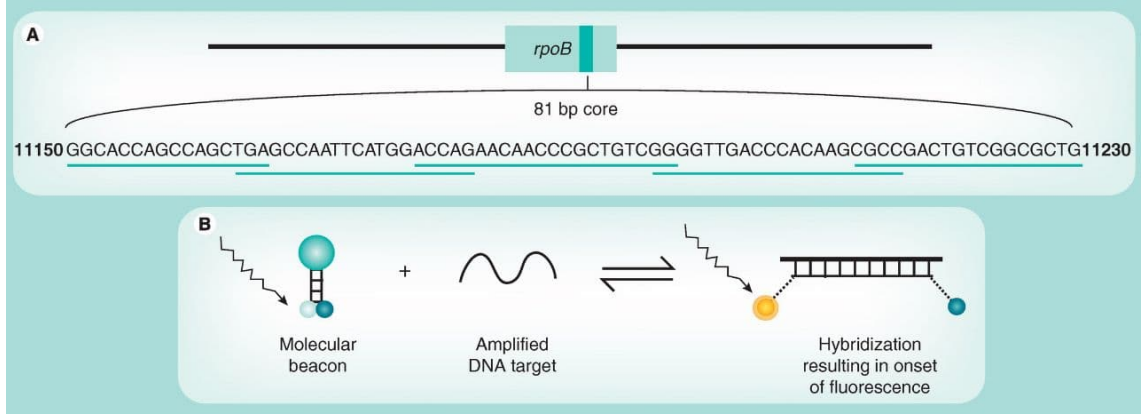
Her moleküler işaret, farklı bir florofofor ile etiketlenmiştir. MTB/RIF veri analizi için, A, B ve C probu için 39,0'lık bir maksimum döngü (Ct) ve D ve E probu için 36,0'lık bir maksimum döngü geçerliliği atanmıştır (Şekil 2.4). İki prob minimum pozitif sinyal ve 38 döngü (CT). Cihazdan elde edilen standart sonuç, *M. tuberculosis*'in varlığının veya yokluğunun ve rifampisine direnç olup olmadığının belirlendi.



Şekil 2.4. Gerçek zamanlı büyüme eğrisi döngüsü eşiği (Ct). (Global TB program GLI, 2020)

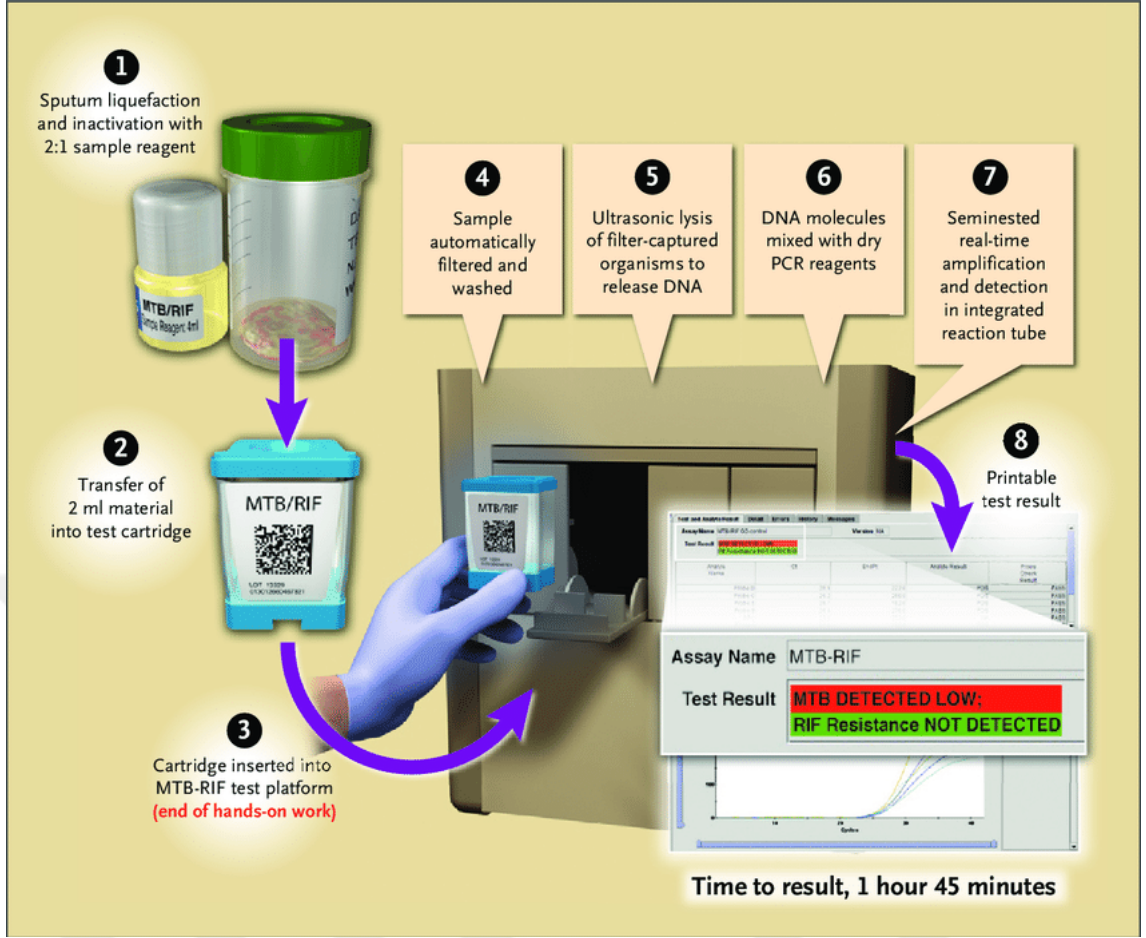
Rifampisin direnci (RD), çoklu ilaca dirençli tüberkülozun (ÇİD-TB) temel bir göstergesidir ve RD'nin %95'i, *M. tuberculosis* kompleksinin rpoB geninin 81-bp rifampisin direnci belirleme bölgesindeki (RDBB) mutasyonla ilişkilidir. Xpert MTB / RIF (Xpert) testi, MTBC ve RD ile ilişkili mutasyonları tespit eden RRDR bölgesine tamamlayıcı olan beş örtüşen moleküler işaret probu (A-E) kullanır. Problar, rpoB geninin RRDR dizisine hibritlenir: A (kodonlar 507–511), B (kodonlar 512–518), C (kodonlar 518–523), D (kodonlar 523–529) ve E (kodonlar 529–533). 13 MTBC, beş probdan en az ikisi bir döngü eşiği (Ct) ≤ 38 gösterdiğinde tespit edilir (Şekil 2.5). Bir veya daha fazla prob hibridizasyonu göstermeyen herhangi bir suş veya ilk ve son Ct arasındaki fark 3,5'ten fazla olduğunda, RD vakası olarak değerlendirilmektedir (Lawn and Nicol 2011).

B. globigii iç kontrol olarak kullanılır ve tek probu 38 döngü CT ürettiğinde pozitif kabul edilir. *M. tuberculosis* ve *B. globigii* için negatif olan tahliller geçersiz tahliller olarak rapor edilmiş ve çalışmadan çıkarılmıştır (Promod *et al.* 2012). Testin kalite Kontrolü, bir örnek İşleme Kontrolü (SPC) ve Prob Kontrol Kontrolü (PCC) içerir. Örnek İşleme Kontrolü (SPC), örneğin doğru şekilde işlendiğinden emin olur. SPC, MTB'nin yeterli şekilde işlendiğini doğrulamak için her kartuşa dahil edilen kuru spor



Şekil 2.5. *rpoB* geninin 81 bp çekirdek dizisi.

keki şeklinde bulaşıcı olmayan sporlar içerir. SPC, organizmalar mevcutsa MTB'nin parçalanması için koşulların oluştuğunu ve örnek işlemenin yeterli olduğunu doğrular. Ek olarak, bu kontrol, gerçek zamanlı PCR reaksiyonlarının numuneyle ilişkili inhibisyonunu saptar ve dahili bir pozitif kontrol görevi görür. (Cepheid 2019). MTB-negatif bir numunede, SPC pozitif olmalıdır ve pozitif bir numunede negatif veya pozitif olabilir. SPC, doğrulanmış kabul gereksinimlerini karşılıyorsa geçmektedir. Bir MTB-negatif numunede SPC gözlenmezse, test sonucu geçersizdir. Prob Kontrol Kontrolü (PCC, QC1, QC2), nested PCR testinin birinci ve ikinci reaksiyonlarının başlamasından önce, GeneXpert Enstrüman Sistemi, QC1 ve QC2 problemlerinden (reaksiyon 1) ve *rpoB* ve SPC problemlerinden gelen floresans sinyalini ölçer (reaksiyon 2) boncuk rehidrasyonunu, reaksiyon tüpü doldurmayı, prob bütünlüğünü ve boya stabilitesini izlemek için. PCC, atanan kabul kriterlerini karşılıyorsa başarılı olur (Şekil 2.6) (Cepheid 2019).



Şekil 2.6. Genexpert MTB/RIF uygulama protokolünü.

Genexpert MTB/RIF sonuçlarının yorumlanması

Genexpert MTB / RIF sonuçlarının yorumlaması Çizelge 2.4’de belirtilen kriterlere göre yapıldı (Cepheid 2019).

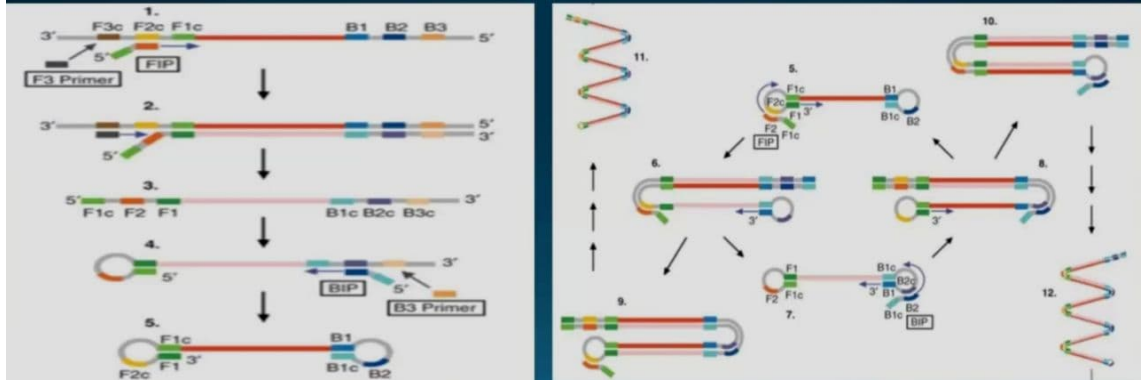
Sonuç	Yorumlama
MTB TESPİT EDİLDİ; RIF Direnci TESPİT EDİLDİ	MTB hedefi örnek içinde tespit edilir: • rpoB geninde bir mutasyon tespit edildi. • SPC: NA (uygulanamaz). SPC sinyali gerekli değildir. Çünkü MTB amplifikasyonu bununla rekabet edebilir. Kontrol: • Prob Kontrolü (QC1 ve QC2): BAŞARILI. Tüm prob kontrolü sonuçlar geçerli.
MTB TESPİT EDİLDİ; RIF Direnci TESPİT EDİLMEDİ	MTB hedefi örnek içinde tespit edilir: • rpoB geninde bir mutasyon tespit edilmemiştir. • SPC: NA (uygulanamaz). SPC sinyali gerekli değildir çünkü MTB amplifikasyonu bununla rekabet edebilir kontrol. • Prob Kontrolü (QC1 ve QC2): BAŞARILI. Tüm prob kontrolü sonuçlar geçerli.
MTB TESPİT EDİLDİ; RIF Direnci Belirsiz	MTB hedefi örnek içinde tespit edilir: • rpoB genindeki bir mutasyon nedeniyle tespit edilemedi yetersiz sinyal tespiti. • SPC: NA (uygulanamaz). SPC sinyali gerekli değildir çünkü MTB amplifikasyonu bununla rekabet edebilir Kontrol: • Prob Kontrolü (QC1 ve QC2): BAŞARILI. Tüm prob kontrolü sonuçlar geçerli.
MTB TESPİT EDİLEMEDİ	Numune içinde hedef MTB tespit edilmedi. • SPC, kabul kriterlerini karşıladı. SPC: BAŞARILI. • Probun incelenmesi (QC1 ve QC2): BAŞARILI. Tüm soruşturma incelemesi , Sonuçlar geçer.
GEÇERSİZ	MTB'nin varlığı veya yokluğu belirlenemez. SPC kabul kriterlerini karşılamıyor, numune uygun şekilde işlenmedi veya PCR engellendi. , tekrar test prosedürü. • MTB GEÇERSİZ: MTB DNA'sının varlığı veya yokluğu belirlenemiyor. • SPC: BAŞARISIZ. MTB hedef sonucu negatif ve SPC Ct geçerli aralıkta değildir. • Prob Kontrolü (QC1 ve QC2): BAŞARILI. Tüm prob kontrol sonuçları başarılı.
HATA	MTB'nin varlığı veya yokluğu belirlenemez. Testi tekrarlayın. • MTB: SONUÇ YOK • SPC: SONUÇ YOK • Prob Kontrolü (QC1 ve QC2): BAŞARILI / BAŞARISIZ. Prob kontrol hatası, hatanın kaynağı olabilir, ancak sistem bileşeni arızası gibi hatalar meydana gelebilir prob kontrolü geçse bile
SONUÇ YOK	MTB'nin varlığı veya yokluğu belirlenemez., Yeniden Test Prosedürü. SONUÇ YOK, yetersiz veri toplandığını gösterir. Örneğin, operatör devam eden bir testi durdurdu. • MTB: SONUÇ YOK • SPC: SONUÇ YOK • Prob Kontrolü (QC1 ve QC2): NA (uygulanamaz).

Çizelge 2.4 Genexpert MTB/RIF sonuçlarının yorumlanması.

2.2.4. TB-LAMP testiyöntemi

Loopamp™ MTBC Tespit Kiti, *M. tuberculosis*, *M. bovis* ve *Mycobacterium tuberculosis Complex*'e (MTBC) ait olan *M. africanum*'u saptar. Bu türler birbirinden ayırt edilemez. Hedef sekanslar gyrase B geni ve IS 6110 ekleme sekansı üzerinde bulunur.(WHO 2016). Temel amplifikasyon reaksiyonu, hedef genin altı bölgesine tamamlayıcı olan dört tip primer gerektirir (Şekil 2.7). Çift sarmallı DNA, 65°C civarında bir sıcaklıkta dinamik denge durumunda olduğundan, LAMP primerlerinden biri çift sarmallı hedef DNA'nın tamamlayıcı dizisine bağlanabilir ve sarmal yer değiştirme aktivitesi olan DNA polimeraz ile DNA sentezini başlatabilir ve tek sarmallı bir DNA'nın serbest bırakılması. Hedef amplikonun yakın bölgelerindeki FIP ve BIP primerlerinin 5 'ucunun tamamlayıcılığı nedeniyle döngü yapıları oluşur. Bu, aynı şerit üzerindeki hedef dizinin dönüşümlü olarak ters çevrilmiş tekrarlarından oluşan çeşitli boyutlu yapıların hızlı bir şekilde oluşmasına izin verir.

Firkete yapısının 5 'ucundaki tek sarmallı döngü bölgesine tamamlayıcı diziler içeren döngü primerlerinin eklenmesi, DNA sentezi için daha fazla sayıda başlangıç noktası sağlayarak reaksiyonu hızlandırır.Döngü primerleri kullanılarak, 15–30 dakika içinde 10⁹ - 10¹⁰ kez amplifikasyon sağlanabilir. TB-LAMP analizi, 8 konuma bağlanan toplam altı primer için halka primerleri içerir. Birden fazla bağlanma sahasında homojen



Şekil 2.7. TB-LAMP moleküler prensibi

sekans için bu gereklilik, bir sondanın yokluğunda bile testin spesifikliğini korur.

LAMP yöntemi, DNA ve DNA yan ürünlerinin (pirofosfat tuzları) birikmesine nispeten duyarsızdır, bu nedenle reaksiyon, büyük miktarlarda ampikon üretilinceye kadar devam eder. Bu özellik, SYBR green gibi dsDNA bağlayıcı boyaları kullanarak, çökelen magnezyum pirofosfatın neden olduğu bulanıklığı tespit ederek veya iki değerlikli katyonların varlığında söndürülen, inhibe edici olmayan bir floresan reaktifi kullanarak başarılı amplifikasyonun görünür tespitini mümkün kılar.(WHO 2016).

LAMP'ta kullanılan primerler

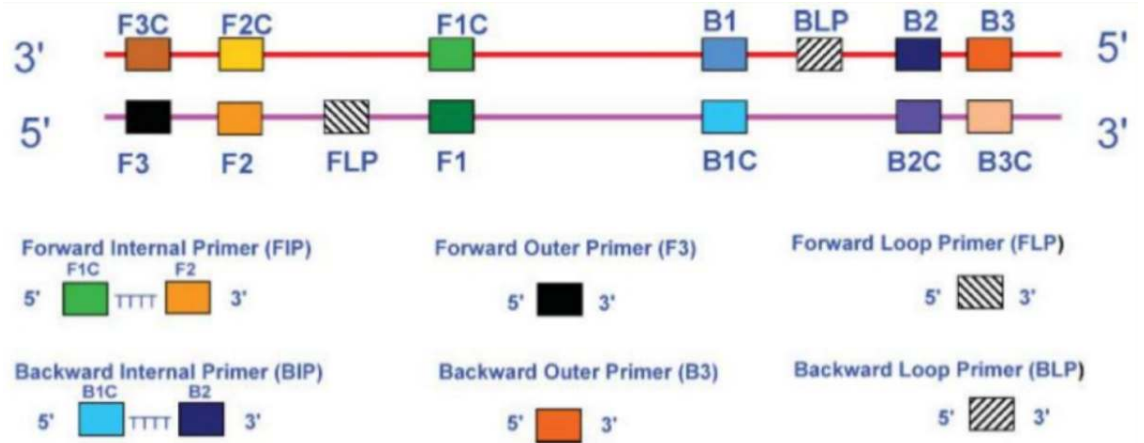
1- Forward Inner Primer (FIP): FIP, 3'ün sonunda bir F2 bölgesinden ve 5'in sonunda F1c bölgesinden oluşur. F2 bölgesi, şablon dizinin F2c Bağlayıcı tamamlayıcıdır. Prototip dizisinin F1c bölgesi F1c Benzer benzer (Parida *et al.* 2008).

2- Forward Outer Primer (FOP): FOP (F3 Primer olarak da bilinir) şablon dizinin F3c birlikte tamamlayıcı olan bir F3 alanından oluşur. Bu primerin uzunluğu daha kısadır ve sorgu olarak FIP'den daha düşüktür (Parida *et al.* 2008).

3- Backward Inner Primer (BIP): BIP, 3'ün sonunda bir B2 bölgesi ve 5'in sonunda bir B1c bölgesinden oluşur. B2 bölgesi, şablon dizisinin B2c bölgesini tamamlayıcıdır. B1c bölgesi, prototip dizi bölgesi B1c'ye benzer (Parida *et al.* 2008).

4- Backward Outer Primer (BOP): BOP (B3 Primer olarak da bilinir), şablon dizinin B3c birlikte tamamlayıcı olan bir B3 alanından oluşur (Parida *et al.* 2008).

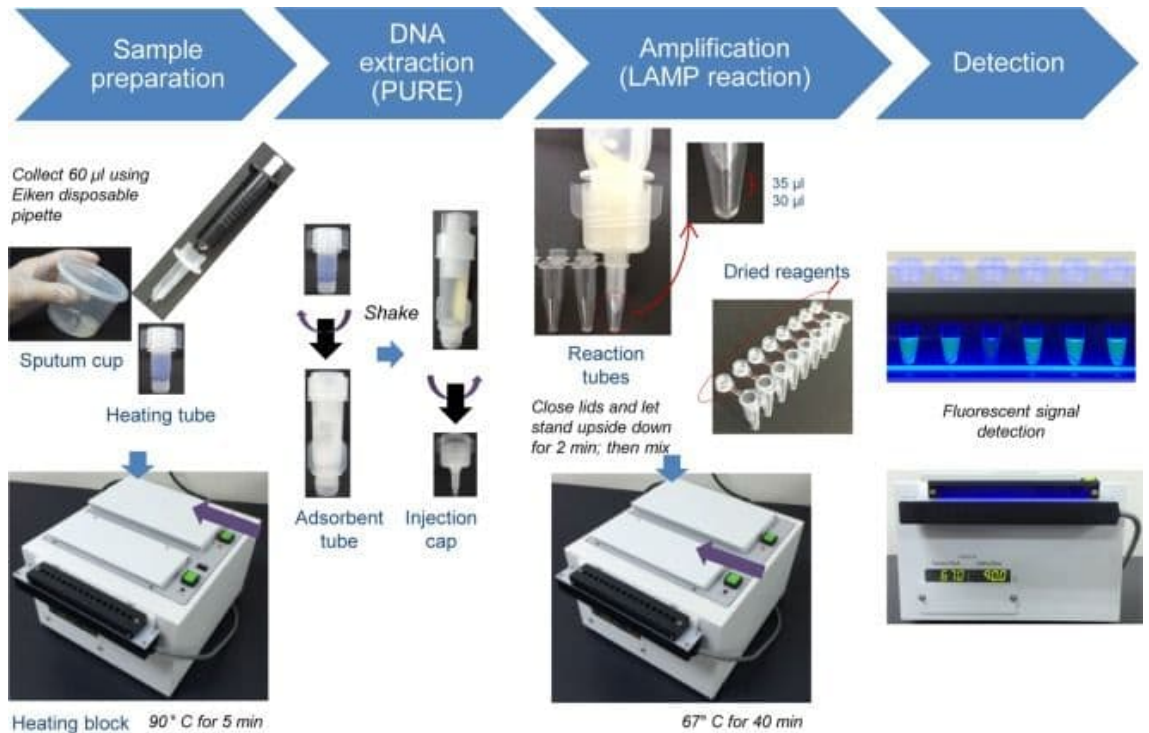
İki döngü primeri, ileri döngü primer (FLP) ve geri döngü primer (BLP), iç primerlere erişilmeyen ek bölgelere bağlanarak amplifikasyon reaksiyonunu hızlandırır (Parida *et al.* 2008).



Şekil 2.8. TB-LAMP primerleri ile hedef genin amplifikasyonu (Parida *et al.* 2008).

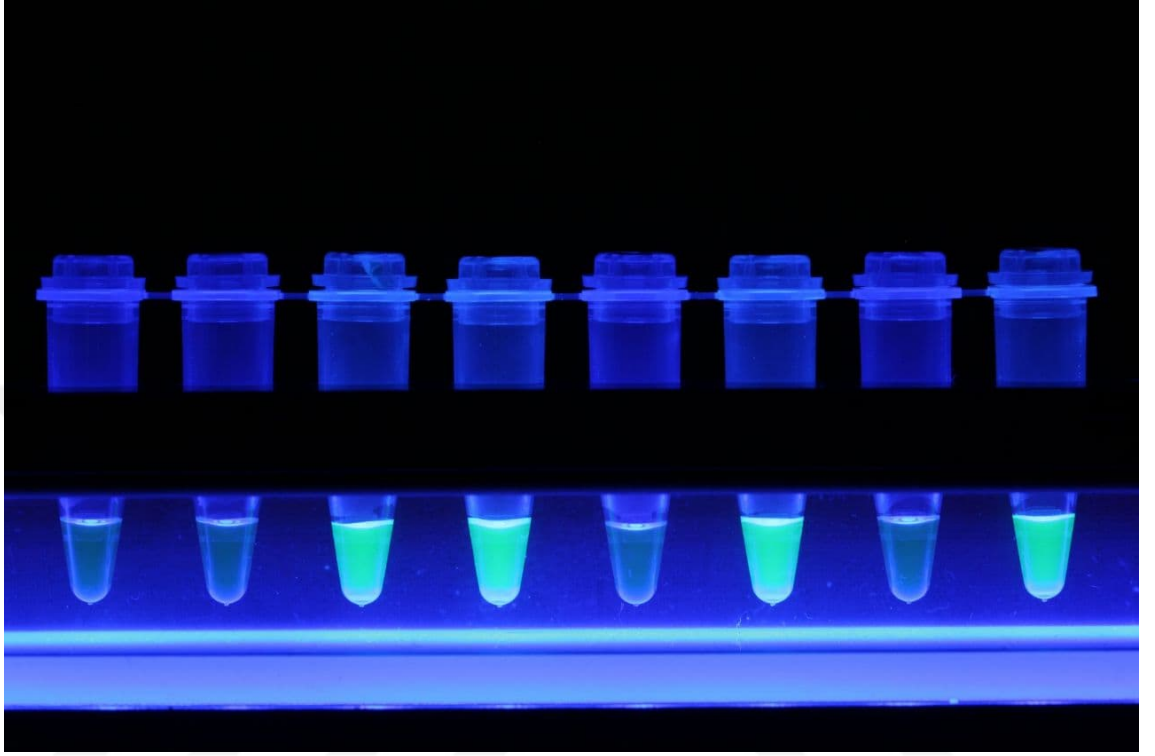
TB-LAMP prosedürü

TB-LAMP'nın prosedürü talimatlara uygun adımları içerecek şekilde yapıldı (Şekil 2.9). Kısaca, 60 µl balgam ısıtma tüpüne aktarıldı, çalkalayarak iyice karıştırıldı. Ardından tüp HumaLoop T veya HumaHeat ısıtma ünitesinde 90°C'de 5 dk inkübe edildi. Loopamp TM PURE DNA ekstraksiyonu işlemi uygulandı. DNA reaksiyon tüpüne alındı. Döngü aracılı izotermal amplifikasyon işlemi uygulandı. Reaksiyon tüpünü HumaLoop T reaksiyon ünitesi veya HumaTurb A'da 45 dakika 67°C'de inkübe edildi (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. TB-LAMP prosedürü

Sonucun değerlendirilmesinde, tüpleri tespit ünitesine yerleştirildi ve UV ışığını açıldı. UV altında pozitif örneklerde açık yeşil floresanı gösterdi ve negatif olanlarda ise floresan yansıma olmadı (şekil 2.10).



şekil 2.10. TB-LAMP testi için pozitif ve negatif sonuçların değerlendirilmesi.

3. BULGULAR

Akciğer veya akciğer dışı TB şüphesi olduğundan şüphelenilen hastalardan 141 örnek, Bağdat'taki Ulusal Solunum Hastalıkları Uzman Merkezi ve Tıp Şehri Hastanelerinden alındı. Sonuçlarımız Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

Tüberküloz enfekte olmuş veya olduğundan şüphelenilen bireylerden elde edilen bilgiler yaş, cinsiyet, ikamet yeri ve varsa komorbiditelerin varlığıdır, tüm örnekler hazırlandıktan sonra doğrudan ışık mikroskobu ve Genexpert MTB / RIF ve TB- ile incelenir.

Daha önce de açıkladığımız gibi test sonuçlarını Genexpert MTB / RIF'den 2 saat sonra ve 1 saat sonra TB-LAMP ile test sonucunu alıyoruz. Sonuçlar aşağıdaki gibidir. Genexpert MTB / RIF %63.83 duyarlılık, %50.00 özgüllük; Pozitif değerler sırasıyla %58.36 - %68.96 ve %42.73 ve %57.27 negatif olarak bulundu. TB-LAMP %55,32 duyarlılık %50,00, pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla %49.61, %60.89, %43.70 ve %56.30 iken, optik mikroskopinin duyarlılığı %41.13 ve özgüllük %50.00 olarak tespit edildi. Pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla %35.26, %47.27 ve %44.88, %55.12 arasında değişir ve bu değerler hastalık prevalansının kapsamına bağlıdır.

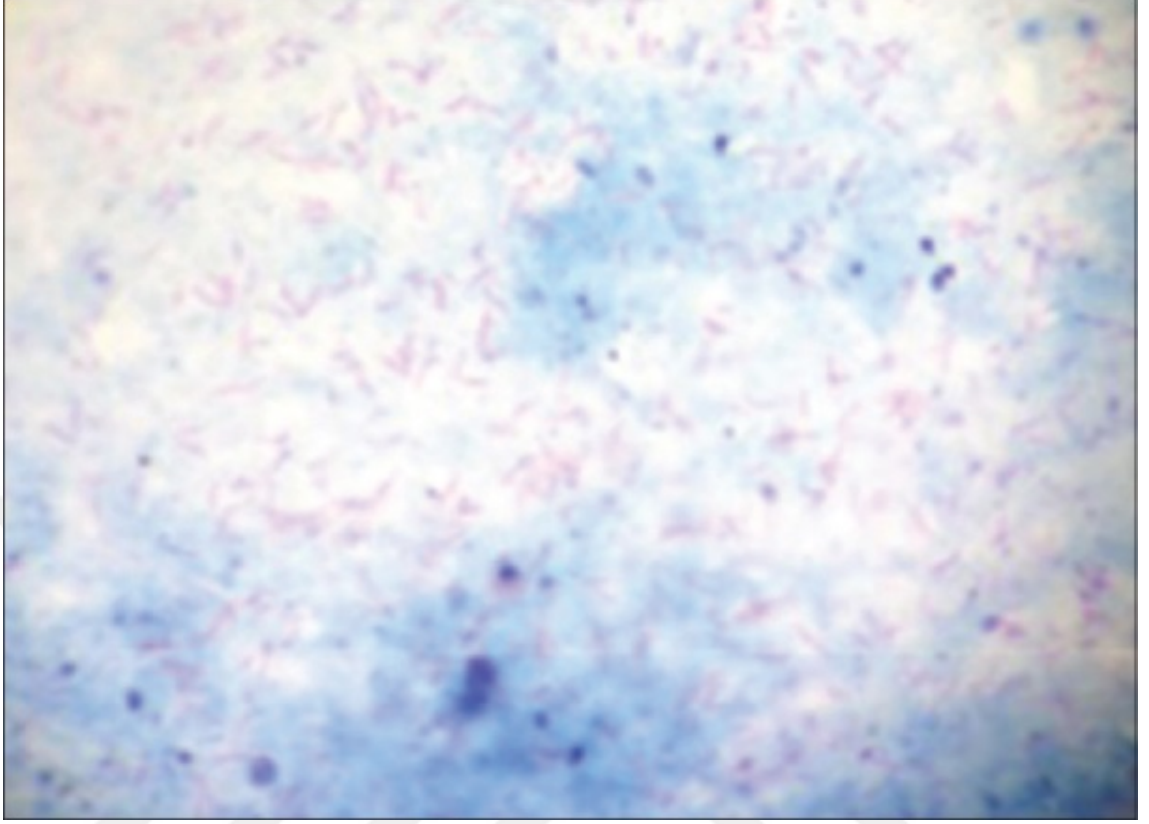
Genexpert MTB/RIF				Döngü aracılı izotermal amplifikasyon TB-LAMB			z.n
Numune türü	Toplam No.	Algıla	Algılanmadı	Toplam No.	+Ve	- Ve	
1 Pulmoner TB	107	76	31	107	70	37	54
a Balgam	92	63	29	92	57	35	47
b Bronşiyal Yıkama	10	8	2	10	8	2	5
c Bronşiyal alveolar lavaj (BAL)	2	2	0	2	2	0	1
d Mide yıkama	3	3	0	3	3	0	1
2 Ekstra pulmoner TB	34	14	20	34	8	26	4
a Plevral sıvı	16	8	8	16	6	10	3
b Asit sıvısı	4	0	4	4	0	4	
c Deri sürüntüsü	4	4	0	4	0	4	
d Beyin omurilik sıvısı (BOS)	2	0	2	2	0	2	
e Lenf düğümünden sürüntü	4	2	2	4	2	2	1
f irin	2	0	2	2	0	2	
g sinüsten sürüntü	2	0	2	2	0	2	

Çizelge 3.1 Genexpert MTB/RIF,TB-LAMP ve mikroskopik incelenen örneklerinin sayısı, türleri ve sonuçları

3.1. Mikroskopik inceleme sonuçları

Ziehl-Neelsen boyası için aşamaları takip edip örnekleri ışık mikroskobu ile inceledikten (Şekil 3.1) sonra, pozitif sonuçların toplamı 58 (54 akciğer + 4 ekstrapulmoner) oldu ve örneklerin istatistiksel analizi Çizelge 3.2'da gösterildiği gibi

yapıldı.



Şekil 3.1. *Mycobacterium tuberculosis* basilin mikroskop altında görünümü (x100).

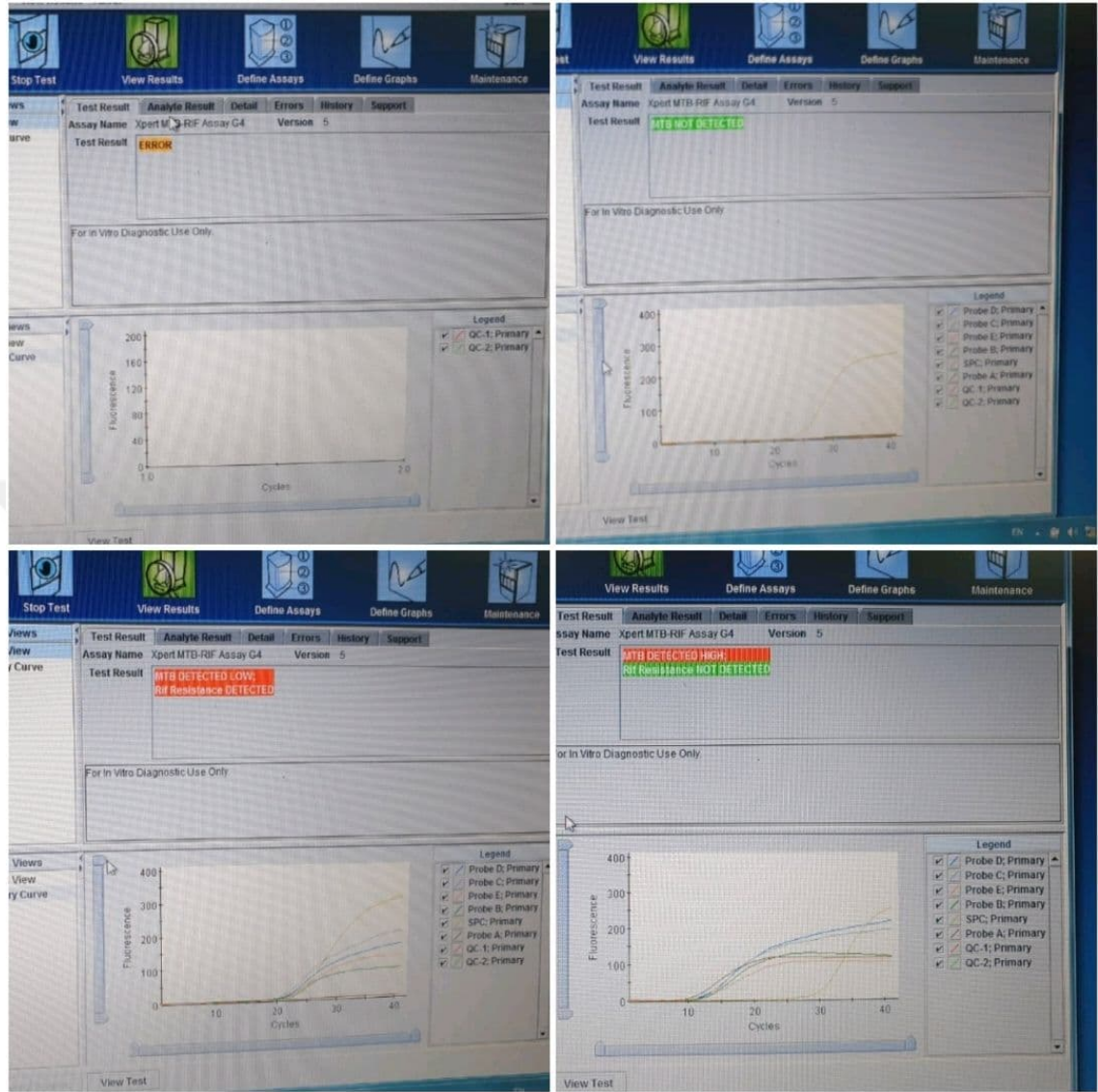
Parametre	Değer	%95 CI
Duyarlılık	%41.13	32.92 - 49.37
Özgüllük	%50.00	42.15 - 57.85
+ olasılık oranı	0,82	0.64 - 1.06
-Olasılık oranı	1,18	0.96 - 1.45
Hastalık yaygınlığı	45,93	40.25-51.68
Öngörülen pozitif değeri	41.13	35.25-47.27
Tahmini negatif değer	%50.00	44.88-55.12
Doğruluk	45,93	40.25-51.68

Çizelge 3.2 Örneklerin mikroskopik inceleme sonuçlarının istatistiksel analizi.

3.2. Genexpert MTB/RIF test sonuçları

Genexpert MTB / RIF testi ile *M. tuberculosis* 'in moleküler tanısı yapıldı. Örneklerden 76 akciğer ve 14 akciğer dışı olmak üzere toplam 90 örnek pozitif bulundu. Sonuçlar, Genexpert MTB/RIF sistemi tarafından izole edilen TB mikroplarının sayısına göre bilgisayar ekranında belirdi (Şekil 3.2) ve bunlar (çok az, az, orta veya yüksek, çok yüksek) idi. Sadece iki vakada rifampisine dirençli tanı konuldu.

İleri tetkik ve değerlendirilme için uzman hekime sevk edildi.



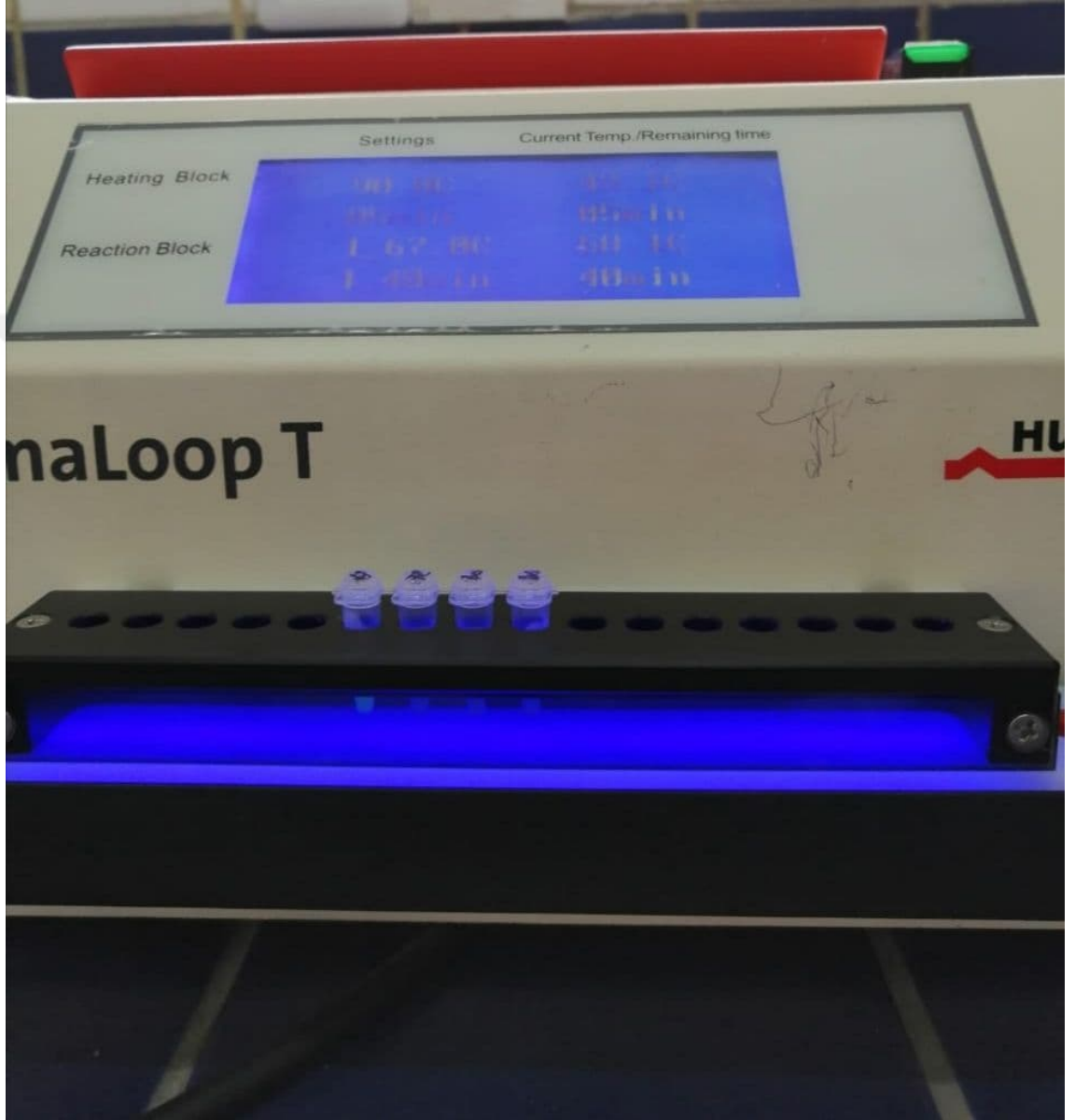
Şekil 3.2. GeneXpert MTB/RIF testi sonuçlarının örnekleri.

Parametre	Değer	%95 CI
Duyarlılık	%63,83	55.32- 71.75
Özgüllük	%50.00	39.93- 60.07
+ olasılık oranı	1,28	1.01 -1.16
-Olasılık oranı	0,72	0.54 - 0.97
Hastalık yaygınlığı	%58,02	51.55- 64.30
Öngörülen pozitif değer	%63.83	58.36- 68.96
Tahmini negatif değer	%50.00	42.73-57.27
Doğruluk	58,02	51.55-64.30

Çizelge 3.3 Genexpert MTB/RIF örneklerinin sonuçlarının istatistiksel analizi

3.3. TB-LAMP testi sonuçları

Mycobacterium tuberculosis'in moleküler tanısı yapıldı ve 78 (70 akciğer+8 akciğer dışı) örnek pozitif bulundu. Çalışmanın sonuçları, TB-LAMP cihazının floresan tespit ünitesinde UV ışığı altında değerlendirildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. TB-LAMP testi sonuçlarının örnekleri.

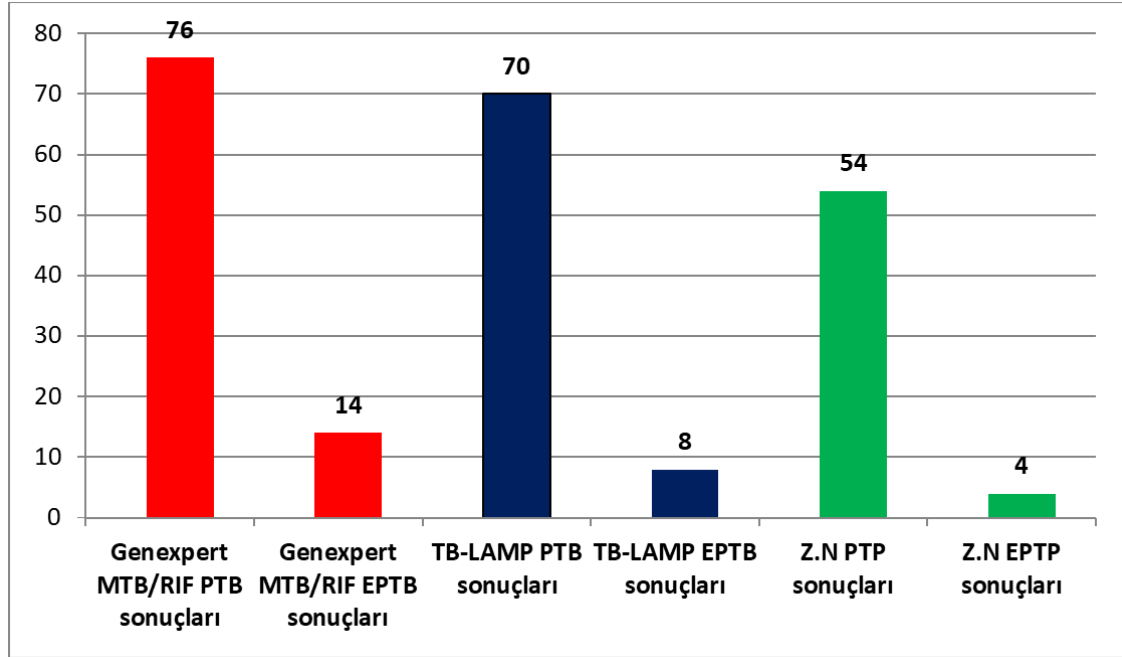
Genexpert MTB/RIF ile test edilen akciğer numunelerinin, balgam 63, bronşiyal lavaj 8, bronşiyal alveolar lavaj 2, gastrik lavaj 3 olmak üzere Genexpert MTB/RIF ile toplam 76 pozitif tanı konuldu. Akciğer dışı örneklerden de plevral sıvı 8, cilt eküvyonu 4, lenf nodu eküvyonu 2 olmak üzere toplam 14 örnekte pozitif tanı konuldu.

Diğer taraftan TB-LAMP ile test edilen örneklerden; balgam 57, bronşiyal lavaj 8,

Parametre	Değer	%95 CI
Duyarlılık	%55,32	46.72- 63.69
Özgüllük	%50.00	40.97-59.03
+ olasılık oranı	1,11	0.88-1.39
-Olasılık oranı	0,89	0.69-1.15
Hastalık yaygınlığı	%52,81	46.63-58.92
Öngörülen pozitif değeri	%55.32	49.61-60.89%
Tahmini negatif değeri	%50.00	43.70-56.30
Doğruluk	52,81	46.63-64.30

Çizelge 3.4 TB-LAMP örneklerinin sonuçlarının istatistiksel analizi.

alveolar bronkoalveolar lavaj 2, gastrik lavaj 3 olmak üzere toplam 70 akciğer örneğinde pozitif tanı konuldu. Akciğer dışı örnekler, TB-LAMP ile 8 pozitif tanı (plevral sıvı 6, lenf düğümü 2) konuldu. Mikroskopik incelemesi yapılan örneklerin de 54 akciğer (balgam 47, bronşiyal lavaj 5, alveolar bronkoalveolar lavaj BAL 1, gastrik lavaj 1) örneği pozitif değerlendirilmiştir. Akciğer dışı örneklerde 4'ü (plevral sıvı 3, lenf düğümü 1) pozitif değerlendirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Pulmoner (PTB) ve ekstrapulmoner (EPTB) örneklerde pozitif sonuç sayısı.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye’de 2015 yılında akciğer ve akciğer dışı tüberküloz ile ilgili yapılan bir çalışmada. 227 (%61) erkek, 145 (%39) kadın hastanın ve 204 (%54,8) akciğer tüberkülozu 168 (% 45,2) hastada da akciğer dışı tüberküloz tanısı konulmuştur (Guler *et al.* 2015). Diğer taraftan, Suudi Arabistan kaynaklı çalışmada Al-Otaibi ve Al-Hazmi (2010) tarafından akciğer tüberkülozu ve akciğer dışı tüberküloz oranının sırasıyla % 42,5 ve % 57,5 olduğunu rapor edilmiştir. Madagaskar’da yapılan moleküler bir araştırmada, tüberkülozun teşhisi için hem Genexoert MTB/RIF hem de TB-LAMP’ın oldukça hassas olduğunu bildirilmiştir (Rakotosamimanana 2019). Gambiya’da sunulan çalışma raporunda hem GeneXpert hem de TB-LAMP’ın tanısal faydasını göstermektedir. TB-LAMP daha az altyapı gerektirirken, ilaca dirençli kalıpları tespit edemez ve bu nedenle periferik sağlık kliniklerinde yeni TB vakaları için bir tarama testi olarak en uygun olanıdır. Hem TB-LAMP hem de GeneXpert, yaşa veya enfeksiyon türüne bakılmaksızın yüksek hassasiyet ve özgüllük gösterdiği bildirilmiştir. (Bojang 2016). GeneXpert MTB/RIF testiyle TB-LAMP testi karşılaştırıldığında ile hemen hemen tüm yayma pozitif TB vakalarını ve smear negatif TB vakalarını tespit edebileceği değerlendirilmiştir (Thu *et al.* 2018).

Aside dirençli boyama tekniği ve yayma preparat negatif ya da kültür pozitif örneklerde LAMP ve Xpert MTB/RIF analizi ile karşılaştırıldığında, tespit oranında %47,7 (21/44) ve %54,6 (24/44). Bu LAMP’nin hızlı TB teşhisi için hassas bir teşhis testi sağlama potansiyeline sahip olduğunu bildirilmiştir (Phetsuksiri 2020). Kuzey Hindistan yapılan bir çalışma, akciğer TB semptomları ile başvuran toplam 530 hasta hastadan balgam örneğiyle TB-LAMP testi (Loopamp TM MTBC Saptama kiti) yapılmıştır. Akciğer TB semptomları ile başvuran 453 hastadan elde edilen pozitif kültür örneklerde TB-LAMP testinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %100 (%95 CI 94,7-100) ve %99,2 (%95 CI 97.8-99.8) olduğu ifade edilmiştir (Yadav *et al.* 2017).

Bizim çalışmamızda da Bağdat Ulusal Solunum Hastalıkları Merkezi’nde, 6-65 yaş grubundaki akciğer veya akciğer dışı tüberküloz şüphesi olan bireylerde tüm akciğer ve akciğer dışı örnekleri (107 akciğer ve 34 akciğer dışı) değerlendirildi. 141 örnek incelendi. Pozitif örnekler 90 (70 erkek %78,77 ve 20 kadın %22,2). Örneklerin mikroskopik incelemesi yapılırken 58 (54 pulmoner ve 4 ekstrapulmoner) örnek TB pozitif olarak tespit edildi. Bizim çalışmamızda da kullanılan Genexoert MTB/RIF testi

%78.95 (90/114) oranında pozitif bulunmuştur. Bu test ile örneklerin %66.66 oranında akciğer TB ve %12.28 oranında da akciğer dışı TB tanısı konulmuştur. TB-LAMP testinde de örneklerin %68.42 oranında TB pozitif tanısı konulmuştur. Bizim çalışmanın sonuçlarında önceki çalışmaları doğrular niteliktedir.

Sonuç olarak TB enfeksiyonu prevalansının yüksek Sadr, Al-Shula, Al-Hussainiya ve Al-Baladiyat gibi Bağdat şehrinin popüler bölgelerinde erkekler kadınlardan daha fazla etkilenmiştir. Tüberküloz prevalansı 25-35 yaş grubunda diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Genexoert MTB/RIF testi TB-LAMP ve mikroskopik incelemeye karşılaştırıldığında dah yüksek oranında TB pozitif tanısı konulmuştur.

Bu çalışmanın sonuçlarında şu önerilerde bulunabiliriz; (a) Genexpert MTB/RIF ve TB-LAMP testlerinin doğrudan akciğer ve akciğer dışı klinik örneklerden mikobakteriyel enfeksiyonların rutin laboratuvar tanısında kullanılması, (b) Genexpert MTB/RIF ve TB-LAMP testleri, ekstrapulmoner TB numuneleri, özellikle Genexpert MTB/RIF için gerçekleştirilebilir. (c) Bu cihazlar ile M. tuberculosis'in hızlı ve doğru teşhis konulmasına olanak sağlayarak özellikle sağlık durumu kritik olan hastalarda ve kültür sonucunun sekiz hafta gibi uzun sürdüğünden hastalarda biran önce tedaviye başlanarak tıbbi desteğin sunulması oldukça önemlidir. Bu amaçla her bir vilayet TB taraması amacıyla bir veya iki Genexpert MTB/RIF ve TB-LAMP cihazı ile laboratuvar alt yapısı desteklenmelidir. Diğer bir taraftanda TB yükünü azaltmak için, büyük ölçekli ilaca dirençli vakalarında tarafından tespiti dahil olmak üzere moleküler tanının iyileştirilmesi ve özellikle HIV pozitif hastalarda aktif TB'nin hızlı ve doğru teşhisine ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Abdalla CM, de Oliveira ZN, Sotto MN, Leite KR, Canavez FC, de Carvalho CM. (2009). Polymerase chain reaction compared to other laboratory findings and to clinical evaluation in the diagnosis of cutaneous tuberculosis and atypical mycobacteria skin infection. *Int J Dermatol.* 48(1):27-35.
- Abel, L., Fellay, J., Haas, D. W., Schurr, E., Srikrishna, G., Urbanowski, M., et al. (2018). Genetics of human susceptibility to active and latent tuberculosis: present knowledge and future perspectives. *Lancet Infect. Dis.* 18 (3), e64–e75.
- Adékambi, T., and Drancourt, M. (2004). Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2095–2105.
- Adwoa, A.P. (2015). Genotypic and epidemiological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Ghana. PhD Thesis, University of Basel, Faculty of Science, 1-211.
- Ahmad S. (2011). Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol.* 2011:814943.
- Al- Otaibi, F., El Hazmi, M.M. (2010). Extra-pulmonary tuberculosis in Saudi Arabia. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 53(2): 227 31.
- Ali, A. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* and molecular epidemiology: An overview. *J. Microbiol. Res.* 4 (6A): 25-31.
- American Thoracic Society. (2000). Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am. J. Respir. Dis. Crit. Care. Med.* 161: 1376-95.
- Aryan E, Markvandi M, Farajzadeh A, Huygen K, Bifani P, Mousavi S-L, et al. A novel and more sensitive loop mediated isothermal amplification assay target IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiol Res.* 2010; 165:211-22.

- Babady, N.E., Wengenack, N. L. (2012). Clinical Laboratory Diagnostics for *Mycobacterium tuberculosis*. In: Understanding Tuberculosis- Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis. Pere-Joan, C. Intech. .3-35.
- Barnard, A.; Wolfe, A. and Busby, S. (2004). Review Article. Regulation at complex bacterial promoters: How bacteria use different promoter organizations to produce different regulatory outcomes. Curr. Opin. Microbiol. 7(2): 102-8.
- Barnard, M.; Gey van Pittius, N. C.; van Helden, P. D.; Bosman, M.; Coetzee, G. and Warren, R. M. (2012b). The diagnostic performance of the GenoTypeMTBDRplus version 2 line probe assay is equivalent to that of the XpertMTB/RIF assay. J. Clin. Microbiol. 50(11): 3712-16.
- Behr M A, Edelstein P H, Ramakrishnan L. Revisiting the timetable of tuberculosis BMJ 2018; 362 :k2738 doi:10.1136/bmj.k2738
- Behr MA. (2002). BCG--different strains, different vaccines? Lancet Infect Dis. (2):86-92. doi: 10.1016/s1473-3099(02)00182-2. PMID: 11901655.
- Bhanu NV, Singh UB, Chakraborty M, Suresh N, Rana T, Takkar D, Seth P. (2005). Improved diagnostic value of PCR in the diagnosis of female genital tuberculosis leading to infertility. J Med. Microbiol. 54: 927-931.
- Bifani, P.; Moghazeh, S.; Shopsis, B.; Driscoll, J.; Ravikovitch, A., Kreiswirth, B. N. (2000). Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra variants: Distinguishing the mycobacterial laboratory strain. J. Clin. Microbiol. 38(9): 3200-3204.
- Boehme CC, Nabeta P, Hilleman D. (2010). Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med. 363:1005-15.
- Bojang AL, Mendy FS, Tientcheu LD, Otu J, Antonio M, Kampmann B, Agbla S, Sutherland JS.(2016). Comparison of TB-LAMP, GeneXpert MTB/RIF and

- culture for diagnosis of pulmonary tuberculosis in The Gambia. *J Infect.* 72(3):332-7.
- Bravo FG, Gotuzzo E. (2007). Cutaneous tuberculosis. *Clin Dermatol.* 25(2):173-80.
- Breen RA, Leonard O, Perrin FM, Smith CJ, Bhagani S, Cropley I, Lipman MC. (2008). How good are systemic symptoms and blood inflammatory markers at detecting individuals with tuberculosis? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008 12(1):44-9.
- Brosch, R. and Vincent, V. (2007). Cutting-edge science and the future of tuberculosis control. *Bulletin of the World Health Organization*, 85(5), 410–412.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D., & Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3684–3689.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, et al. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 6: 6:23.
- Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. (2002). Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology (Reading)*. 148(Pt 10):2967-2973.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies". *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (1): 278–88.
- Caulfield AJ, Wengenack NJ. (2016). Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis.* 4: 33-43.

- CDC. (2019). Center for Disease Control and Prevention. Tuberculosis. Available at: // <http://www.cdc.gov/tb/>
- CDC. (2020). Center for Disease Control and Prevention. Tuberculosis. Available at: // <http://www.cdc.gov/tb/>.
- Chacon-Salinas R, Serafin-Lopez J, Ramose-Payan R, Mendez-Aragon P, Hernandez-Pando R, van Soolingen D, et al. (2005). Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected *in vitro* with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. Clin Exp Immunol. 140: 443-449.
- Chakravorty S, Sen MK, Tyagi JS.(2005). Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by smear, culture, and PCR using universal sample processing technology. J.Clin Microbiol. 43(9):4357-4362.
- Chandler, M. and Mahillon, J. (2002). Insertion sequences revisited. In: Mobile DNA II. Craig, N. L.; Craigie, R.; Gellert, M. and Lambowitz, A. M. Eds. Am. Soci. Microbiol. Washington.UAS.
- Cohen RA, Muzaffar S, Schwartz D, Bashir S, Luke S, Mcgartland LP, Kaul K. (1998). Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assays on sputum collected within 24 hours of hospital admission. Am J Respir Crit Care Med. 157:156-161.
- Cole ST. (2002). Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology. 148:2919-2928.
- Cole, S. T. (2005). Tuberculosis and the tubercle bacillus. Washington, DC: ASM Press. Xii, 584.
- Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J. Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 393(6685): 537- 544.

- Cortez M.V. Oliveira C.M. Monte R.L. Araújo J.R. Braga B.B. Reis D.Z. Ferreira L.C. Moraes M.O. Talhari S. (2011). HIV-associated tuberculous lymphadenitis: the importance of polymerase chain reaction (PCR) as a complementary tool for the diagnosis of tuberculosis-a study of 104 patients. *An Bras Dermatol.* 86: 925–931.
- Dallmann-Sauer, M., Correa-Macedo, W., Schurr, E. (2018). Human genetics of mycobacterial disease. *Mamm. Genome* 29 (7-8), 523–538.
- Darman SE , Schumacher SG, Alland D, Nabeta P, Armstrong DT, King B, Hall SL, Chakravorty S , Cirillo DM , Tukvadze N, Bablishvili N, Stevens W, Scott L, Rodrigues C , Kazi L., Joloba K.(2018). Xpert MTB/RIF ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: A prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis.* 18(1):76-84.
- Della, L.P. (2004). Mycobacteriology and mycobacterial susceptibility tests. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Second edition. Henry, D.Isenberg Editor in Chief, ASM Press. Washington.USA
- Dheda, K.; Schwander, S. K.; Zhu, B.; Van, Z. S.; Richard, N. and Zhang, Y. (2010). The immunology of tuberculosis from bench to bedside. *Respirology.* 15(3): 433-450.
- Dormans J, Burger M, Anguiler D, Hernandez-Pando R, Kremer K, Roholl P, et al. (2004). Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in BAL B/c mouse model. *Clin Exp Immunol.* 137:460-468.
- Dye, C., Williams, B. G. (2010). The population dynamics and control of tuberculosis. *Science.* 328(5980): 856-861.
- Fedrizzi, T., Meehan, C. J., Grottola, A., Giacobazzi, E., Fregni, S. G., Tagliazucchi, S., et al. (2017). Genomic characterization of Nontuberculous *Mycobacteria*. *Sci. Rep.* 7:45258. doi: 10.1038/srep45258.

- Fleischmann, R. Alland, D.Eisen, J. Carpenter, L. White, O.; Peterson, J. et al. (2002). Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J. Bacteriology. 184(19): 5479-5490.
- Forbes B.A., Hicks K.E (1193). Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 31:1688-1694.
- Fox, G. J., Orlova, M., Schurr, E. (2016). Tuberculosis in newborns: the lessons of the “Lubeck disaster” (1929-1933). PLoS Pathog. 12 (1), e1005271.
- Franz J.K, David R. (1973). Twin studies on genetic variations in resistance to tuberculosis. Journal of Heredity. 34(9): 269–276.
- Gao, B., Gupta, R.S. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 76, 66–112.
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, et al. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Nat Acad Sci USA. 100:7877-7882.
- Glynn JR, Whitley J, Bifany PJ, Kremer K, van Soolingen D. (2002). Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. Emerg Infect Dis. 8:843-849.
- Golden, M.P. Vikram, H.R. (2005). Extrapulmonary tuberculosis: An overview. Am. Fam. Physician. 72(9): 1761-1768.
- Goodfellow, M., Magee, G. M. (1998). Taxonomy of Mycobacteria,” in Mycobacteria, eds P. A. Gangadharam and P.A. Jenkins (New York, NY: Chapman and Hall), 1–71.
- Guillemin I, Cambau E, Jarlier V. (1995). Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus *Mycobacterium*: phylogenetic

- analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(9):2145-9.
- Guillet-Caruba C, Martinez V. (2014). Doucet-Populaire F. Les nouveaux outils de diagnostic microbiologique de la tuberculose maladie. *Rev Med Interne.* 35:794–800.
- Guler SA, Bozkus F, Inci MF, Kokoglu OF, Ucmak H, Ozden S, Yuksel M. (2015). Evaluation of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in immunocompetent adults: a retrospective case series analysis. *Med Princ Pract.*24(1):75-9.
- Gutacker, M.M. Smoot, J.C. Migliaccio, C.A. Ricklefs, S.M.; Hua, S. Cousins, D.V. et al. (2002). Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics.* 162(4): 1533-1543.
- Hall, L. Roberts, G.D. (2006). Non-molecular identification of nontuberculous mycobacteria in the clinical microbiology laboratory: What's the real deal? *Clin. Microbiol. News.* 28(10): 73-80.
- Hamasur B, Bruchfeld J, van Helden P, Källenius G, Svenson S.A. (2015). Sensitive urinary lipoarabinomannan test for tuberculosis. *PLoS One.* 23;10(4):e0123457.
- Hanekom, M. van der Spuy, G.D. Gey van Pittius, N.C., McEvoy, C.R.E. et al. (2008). Discordance between *Mycobacterial* Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing and IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Genotyping for Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains in a Setting of High Incidence of Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 46(10): 3338–45.
- Hartmans S., de Bont J.A.M., Stackebrandt E. (2006). The Genus *Mycobacterium*--Nonmedical. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH.,

- Stackebrandt E. (eds) The Prokaryotes. Springer, New York, NY.
https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_33.
- Health Protection Agency. (2009). Tuberculosis in the UK. Annual report on tuberculosis surveillance in the UK. London. pp.1-72.
- Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, Kop J, Owens MR, et al. (2010). Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. J Clin Microbiol. 48(1):229-37.
- ICMR Bulletin Jan-March (2017), Vol.48,1-3.
- Jagielski, T.; Ingen, J .V.; Rastogi, N; Dziadek, J.; Mazur, P. K. and Bielecki, J. (2014). Review Article: Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. Bio. Med. Res. Int. 2014: 645802.
- Kang, D. D.; Lin, Y.; Moreno, J. R.; Randall, T.D. and Khader, S. A. (2011). Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. PLoS ONE 6(1); e16161.
- Kapur V, Li LL, Iordanescu S, Hamrick MR, Wanger A, Kreiswirth BN, Musser JM. (1994). Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. J Clin Microbiol. 32(4):1095-8.
- Kasai, H., Ezaki, T., Harayama, S. (2000). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences. J.Clin.Microbiol.38, 301–308.
- Kaufmann, S.H. Parida, S.K. 2008. Tuberculosis in Africa: learning from pathogenesis for biomarker identification. Cell Host Microbe, 4, 219-28.
- Kaufmann, S.H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? Nat. Rev. Immunol. 1(1): 20-30.

- Kawabata, Y. (1998). Pathogenesis of tuberculosis. *Nihon rinsho. Japanese J. Clin. Med.* 56(12): 3041-3046.
- Kim, H., Kim, S. H., Shim, T. S., Kim, M. N., Bai, G. H., Park, Y. G., et al. (2005). Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heatshock protein 65 gene (hsp65). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1649–1656.
- Kim, S. H., and Shin, J. H. (2017). Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, hsp65, and rpoB. *J. Clin. Lab. Anal.* 32:e22184.
- Knechel NA. (2009). Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Crit Care Nurse.* 29(2):34-43.
- Kolk AH, Schuitema AR, Kuijper S, van Leeuwen J, Hermans PW, van Embden JD, Hartskeerl RA. (1992). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using polymerase chain reaction and a non-radioactive detection system. *J Clin Microbiol.* 30(10):2567-2575.
- Kuan-Ting L., Wei-Juin S., Reury-Perng P. (2007). Clinical utility of polymerase chain reaction for diagnosis of smear-negative pleural tuberculosis. *J Chin Med Assoc.* 70(4):148-51.
- Kulkarni S.P. Jaleel M.A. Kadival G.V. (2005) Evaluation of an in-house developed PCR for the diagnosis of tuberculous meningitis in Indian children. *J Med Microbiol* 54: 369–373.
- Kumar, V. Abbas, A.K. Fausto, N., Mitchell, R.N. (2007). *Robbins Basic Pathology* (8th ed). Philadelphia: Saunders Elsevier.USA. pp. 516-522.
- Lawn SD, Nicol MP.(2011). Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiol.* 6(9):1067-82.

- Lawn SD, Zumla AI.(2011). Tuberculosis. Lancet. 378(9785): 57-72.
- Light RW. (2010). Update on tuberculous pleural effusion. Respiriology. 15(3):451-8.
- Liu, C.H. Li, L. Chen, Z. Wang, Q. Hu, Y.L. Zhu, B. Woo, P.C. (2011). Characteristics and treatment outcomes of patients with MDR and XDR tuberculosis in a TB referral hospital in Beijing: A 13-year experience. PLoS ONE. 6(4): e19399.
- Magee, G.M., Ward, A.C. (2012). Genus I. Mycobacterium Lehmann and Neumann 1896, 363AL, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 5, Actinobacteria, eds M. Goodfellow, P. Kampfer, H. J. Busse, M. E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, and W. Whitman (New York, NY: Springer), 312–375.
- Manca C, Reed MB, Freeman S, Mathema B, Kreiswirth B, Bary III. CE, et al. (2004). Differential monocyte activation underlies strain specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. Infect Immun. 72:5511-5514.
- Mankhi, A. A. (2009). Manual of Laboratory guide line in the national reference laboratory in Iraq (2 nd Edition). Ministry of Health. Chest and respiratory Diseases center in collaboration with WHO. Baghdad. Iraq.
- Marais, B. J., Hesselning, A. C., Schaaf, H. S., Gie, R. P., van Helden, P. D., Warren, R. M. (2009). Mycobacterium tuberculosis transmission is not related to household genotype in a setting of high endemicity. J. Clin. Microbiol. 47 (5), 1338–1343.
- Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. (2006). Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. Clin Microbiol Rev. 19(4):658-685. doi:10.1128/CMR.00061-05.
- McEvoy CRE, Falmer AA, van Pittius NCG, Victor TC, van Helden PD, Warren RM. (2007). The role of IS6110 in the evolution of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis. 87:393-404.

- Mignard, S., Flandrois, J.P. (2008). A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1432–1441. doi: 10.1099/ij.s.0.65658-0
- Mishra A S, Chauhan DS, Katoch VM, Srivatsa K, Thakral SS, Bhardwaj SS, Sreenivas V., Prasad HK. (2005). Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: Correlation with conventional techniques. *J Clin Microbiol.* 43(11):5670-5678.
- Mizuno, K. Chikamatsu, K. Aono, A. Azuma, Y. Yamada, H.i Mitarai, S. (2009). Clinical evaluation of acid-fast smear examination with light emitting diode fluorescent microscopy. *Kekkaku.* 84(9): 627-629.
- Mohapatra PR, Janmeja AK. (2009). Tuberculous lymphadenitis. *J Assoc Physicians India.* 7:585-90. PMID: 20209720.
- Mostowy S, Behr MA (200). The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinics in Chest Medicine.* 26:207-216.
- Musher, D. M. (2003). Medical Progress: How Contagious Are Common Respiratory Tract Infections? *New Engl. J. Med.* 348(13): 1256-1266.
- Naveen G, Peerapur BV. (2012). Comparison of the Lowenstein-Jensen Medium, the Middlebrook 7H10 Medium and MB/BacT for the Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) from Clinical Specimens. *J Clin Diagn Res.* 6(10):1704-9.
- Negi SS, Anand R, Pasha ST, Gupta S, Blasir SF, Khare S. (2017) Diagnostic potential of IS6110, 38kDa, 65kDa and 85B sequence based polymerase chain reaction in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Indian J Med Microbiol.* 25: 43 49.

- Nema, V. (2012). Tuberculosis diagnostics: Challenges and opportunities. *Lung India*. 29(3): 259-266.
- Neonakis IK, Spandidos DA, Petinaki E. (2011). Use of loop-mediated isothermal amplification of DNA for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 8:937-42.
- NICE. National Institute for Clinical Excellence. (2011). Tuberculosis: Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. Available at: [http://guidance.nice.org.uk/ Clinical Guideline 117](http://guidance.nice.org.uk/Clinical%20Guideline%20117).
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 15;28(12): e63
- NTP. National Tuberculosis Program. (2017). UN Migration Agency Global Fund support Iraqi Ministry of Health in Combatting TB. 4(4): pp83.
- Nunes-Alves C, Booty MG, Carpenter SM, Jayaraman P, Rothchild AC, Behar SM. (2014). In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nat Rev Microbiol*. 12(4):289-299.
- Orlova, M., Schurr, E. (2017). Human genomics of *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Curr. Genet. Med. Rep*. 5 (3), 125–131. doi: 10.1007/s40142-017-0124-7
- Pai M, Kalantri S and Dheda K. (2006). New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn*. 6:423-432.
- Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol*. 2008 18(6):407-21.

- Park H, Kim C, Park KH and Chang CL. (2001). Development and evaluation of triplex PCR for direct detection of mycobacteria in respiratory specimens. *J Appl Microbiol.* 161-167.
- Parte, A.C. (2014). LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 42, D613–D616.
- Pepper T, Joseph P, Mwenya C, McKee GS, Haushalter A, Carter A, Warkentin J, Haas DW, Sterling TR. (2008). Normal chest radiography in pulmonary tuberculosis: implications for obtaining respiratory specimen cultures. *Int J Tuberc Lung Dis.* 12(4):397-403. PMID: 18371265.
- Perez-Velez CM, Marais BJ. (2012). Tuberculosis in children. *N Engl J Med.* 26; 367(4):348-61.
- Perkins MD, Roscigno G, Zumla A. (2006). Progress towards improved tuberculosis diagnostics for developing countries. *Lancet.* 18;367(9514):942-3.
- Pfyffer, G. E. (2015). *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. pages 536– 569 In: J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, K. Carroll, G. Funke, M. L. Landry, S. S. Richter, D. Warnock, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition. ASM Press, Washington, DC. Chapter 30.
- Phetsuksiri B, Klayut W, Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Bunchoo S, Toonkomdang S, Wongchai T, Nakajima C, Suzuki Y. (2020). The performance of an in-house loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples in comparison with Xpert MTB/RIF, microscopy and culture. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 5; 62:e36.
- Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, Bocart D, Joly V, Yeni P., Hance AJ. (1991). Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *J Clin Microbiol.* 29(4):712-717.

- Promod K. Mehta, AR., Netrapal S., Gopal K.K. (2021). Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 66(1): 20–36.
- Puffer R. R. (1944). Familial susceptibility to tuberculosis: its importance as a public health problem. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press, 106. 10.4159/harvard.9780674428720.
- Rageade F, Picot N, Blanc-Michaud A, Chatellier S, Mirande C, Fortin E, van Belkum A.(2014). 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*. 33(6):867-70.
- Rakotosamimanana, N., Lapierre, S.G., Raharimanga, V. et al. (2019). Performance and impact of GeneXpert MTB/RIF® and Loopamp MTBC Detection Kit® assays on tuberculosis case detection in Madagascar. *BMC Infect Dis* 19, 542 <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4198-6>
- Ravn, P., Munk, M., Andersen, A., Lundgren, B., Lundgren, J., Nielsen, L., Kok-Jensen, A., Andersen, P. Weldingh, K. 2005. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12, 491-496.
- Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, et al. (2004). A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*. 431:84-87.
- Richeldi, L. (2006). An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am. J. Respir. Crit Care Med*. 174(7):736-742.
- Richter, E.; Weizenegger, M.; Fahr, A. M. and Rusch-Gerdes, S. (2004). Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the *Mycobacterium*

- tuberculosis complex in cultures obtained from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 42(9): 4303-4306.
- Richter, E.; Weizenegger, M.; Rusch-Gerdes, S. and Niemann, S. (2003). Evaluation of GenoType MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates J. Clin. Microbiol. 41(6): 2672–2675.
- Robert N.M, Richard H. (2015). Immune Cell Regulatory Pathways Unexplored as Host-Directed Therapeutic Targets for *Mycobacterium tuberculosis*: An Opportunity to Apply Precision Medicine Innovations to Infectious Diseases, Clinical Infectious Diseases, 61(3): S200–S216.
- Roth, A., Fischer, M., Hamid, M. E., Michalke, S., Ludwig, W., and Mauch, H. (1998). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J. Clin. Microbiol. 36, 139–147.
- Rothschild BM, Martin LD, Lev G, Bercovier H, Bar-Gal GK, Greenblatt C, Donoghue H, Spigelman M, Brittain D, et al. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. Clin Infect Dis. 33:305-311.
- Rusch-Gerdes, S.; Domehl, C.; Nardi, G.; Gismondo, M. R.; Welscher, H. M. and Pfyffer, G. E. (1999). Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. J. Clin. Microbiol. 37(1): 45- 48.
- Ryan KJ and Ray CG. Sherris Medical Microbiology-An Introduction to Infectious Diseases. 4 th Edition. 2004. 1-997.
- Sakula A. (1983). Robert koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. Can Vet J. 24(4):127-131.

- Santos N, Geraldes M, Afonso A, Almeida V, Correia-Neves M. (2010). Diagnosis of tuberculosis in the wild boar (*Sus scroafa*): a comparison of methods applicable to hunter harvested animals. *PloS One*. 5(9): e12663.
- Seth V. Kabra SK. (2008). *Essentials of Tuberculosis in Children*. 3rd Edition. Indian Pediatrics. 45:163.
- Sharma K. Sharma A. Singh M. Ray P. Dandora R. Sharma S.K. Modi M. Prabhakar S. Sharma M. (2010a). Evaluation of polymerase chain reaction using protein b primers for rapid diagnosis of tuberculous meningitis. *Neurol India*. 58: 727–731.
- Sharma SK, Mohan A. (2004). Extrapulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res*. 120(4): 316-53.
- Sharma, S.K. and Mohan, A. (2006). Multidrug-resistant tuberculosis: A menace that threatens to destabilize tuberculosis control. *Chest*. 130(1): 261-72.
- Siddiqi, S.H., Libonati, J.P., Middlebrook, G. (1981). Evaluation of rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*. 13(5): 908-12.
- Simmons, J. D., Stein, C. M., Seshadri, C., Campo, M., Alter, G., Fortune, S., et al. (2018). Immunological mechanisms of human resistance to persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nat. Rev. Immunol*. 18 (9), 575–589. doi: 10.1038/s41577-018-0025-3.
- Singal A, Sonthalia S. (2010). Cutaneous tuberculosis in children: the Indian perspective. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 76(5):494-503.
- Smith I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis*. Pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*. 16(3):463-496.
- Somoskovi A, Dormandy J, Rivenburg J, Pedrosa M, McBride M, Salfinger M. (2008). Direct comparison of the genotype MTBC and genomic deletion assays in terms

of ability to distinguish between members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates and in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 46(5):1854-7.

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connel ND, Kreisworth BN, Whittam TS, et al. (1997;). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci,USA.* 94:9869-9874.

Takahashi T. Tamura M. Asami Y. et al. (2008). Novel wide-range quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA: clinical application for diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol.* 46: 1698–1707.

Thu Hang Pham, Peter J, Mello FCQ, Parraga T, Lan NTN, Nabeta P, Valli E, Caceres T, Dheda K, Dorman SE, Hillemann D, Gray CM, Perkins MD. (2018). Performance of the TB-LAMP diagnostic assay in reference laboratories: Results from a multicentre study. *Int J Infect Dis.* 68:44-49.

Thwaites, G., Caws, M., Chau, T. T., D'Sa, A., Lan, N. T., Huyen, M. N., Gagneux, S., Anh, P. T., Tho, D. Q., Torok, E., Nhu, N. T., Duyen, N. T., Duy, P. M., Richenberg, J., Simmons, C., Hien, T. T., & Farrar, J. (2008). Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), 1363–1368.

Tiruvilumala, P. and Reichman, L. B. (2002). Tuberculosis. *Annu. Rev. Publ. Heal.* 23(1): 403-26.

Tissot, F.; Zanetti, G.; Francioli, P.; Zellweger, J. P. and Zysset, F. (2005). Influence of bacilli Calmette-Guerin vaccination on size of tuberculin skin test reaction: To what size? *Clin. Infect. Dis.* 40 (2): 211-217.

- Todar, K. 2005. Tuberculosis. Todar's online textbook of bacteriology [Online]. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. Available: <http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>.
- Tortoli, E. (2012). Phylogeny of the genus *Mycobacterium*: many doubts, few certainties. *Infect. Genet. Evol.* 12, 827–831.
- Tortoli, E., Fedrizzi, T., Pecorari, M., Giacobazzi, E., De Sanctis, V., Bertorelli, R., et al. (2015). The new phylogenesis of the genus *Mycobacterium*. *Int. J. Mycobacteriol.* 4, 77.
- Ulukanligil M, Aslan G, Tasçi S.A. (2000). comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid fast bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95(6):855-8.
- Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF, Orme I, Agerton T, Hoy D, Jones JS, Westmoreland H, Onorato IM. (1998). An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med.* 5; 338(10):633-9.
- van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, van Soolingen D. (2012). Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis.* 18(4):653-5.
- Verma A, Rattan A and Tyagi JS. (1994). Development of a 23S rRNA based PCR assay for the detection of mycobacteria. *Indian J Biochem Biophys.* 31:288-294.
- WHO (2016). Global Tuberculosis report. Geneva. Available at: <https://reliefweb.int/report/world/global-tuberculosis-report-2016>
- WHO (2019). Global Tuberculosis report. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-report-2019>
- WHO (2020). Global Tuberculosis report. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2020>

- WHO (2008). Molecular Line Probe Assays for Rapid Screening of patients at risk of Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB). Policy statement. Geneva, Switzerland.
- WHO (2014). Antimicrobial resistance: Global report on surveillance 2014. Available at: www.who.int/drugresistance.
- WHO Eastern Mediterranean Regional Office (EMRO). (2015) Tuberculosis/ programmes/ Iraq. Eastern Mediterranean Health Journal (EMHJ). <http://www.emro.who.int>
- Woese CR, Fox GE. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(11):5088-90.
- Yadav R, Sharma N, Khaneja R, et al. (2017). Evaluation of the TB-LAMP assay for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis in Northern India. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 21(10):1150-1153.
- Zhang M, Gong J, Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF. (1999). Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in macrophages. *J Infect Dis*. 179:1213-1217.
- Zumbo A, Palucci I, Cascioferro A, Sali M, Ventura M, D'Alfonso P, Iantomasi R, Di Sante G, Ria F, Sanguinetti M, Fadda G, Manganeli R, Delogu G. (2013). Functional anatomy of the protein domains involved in Immunological properties of PE_PGRS33 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathogens Dis* 69: 232-239.

EKLER

EK-1

Republic of Iraq
Ministry of
health/Environment
Public health Directorate
فه رماتكه ى ته ندرومتى كشتى

جمهورية العراق
وزارة الصحة/ البيئة
دائرة الصحة العامة
شعبة التدريب والبحوث
العدد/د.ص.ع/ ١١/ ٤/
التاريخ: ١٢/ ٩/ ٢٠٢٠ م

١٦٨٦

الى/ المركز الوطني التخصصي للأمراض الصدرية والتنفسية
م / تسهيل مهمة

تحية طيبة ..

اشارة الى كتاب دائرة صحة ميسان / قسم الامور الادارية والمالية والقانونية / شعبة الموارد البشرية / وحدة
شؤون الموظفين ذي العدد ١١٢٢٠ في ٢٠٢٠/٩/٣ المتضمن تسهيل مهمة طالب الماجستير / (يحيى كاظم جابر)
لاكمال متطلبات بحثه الموسوم .

(Agenetic Study of mycobacterium tuberculosis isolated from iraq)
(دراسة جينية لبكتريا السل المتفطرة المعزولة من العراق)

للتفضل بالاطلاع واتخاذ ما يلزم و تسهيل مهمة اجراء البحث على ان لا تتحمل دائرتنا
التبعات المالية ... مع الاحترام .

الدكتور
رياض عبد الامير الحلفي
المدير العام
٢٠٢٠/٩/١٢
أسعد مهدي أسعد
معاون المدير العام

نسخة منه الى:

- دائرة صحة ميسان / قسم الامور الادارية والمالية والقانونية / شعبة الموارد البشرية // كتابكم اعلاه للتفضل بالاطلاع وتزويدنا بالبحث بعد اتمامه .. مع الاحترام .
- المركز الوطني التخصصي للأمراض الصدرية والتنفسية / للتفضل بالاطلاع .. مع الاحترام.
- مكتب المدير العام / للتفضل بالاطلاع / مع الاحترام.
- شعبة التدريب والبحوث / مع الاولويات.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : YEHA BENELAM
Uyruğu :
Doğum Yeri ve Tarihi :
Telefon :
E-Posta :

EĞİTİM DURUMU

Lise : Erkek Amara Lisesi 1995
Lisans : Al-Mustansiriyah Üniversitesi, Fen Fakültesi / Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi

İŞ DENEYİMİ

- 1- 2004-2005 Maysan Valiliği Halk Sağlığı Merkezinde (Merkez Laboratuvar) Bakteriyoloji
- 2- Maysan Valiliğindeki Irak Sağlık Bakanlığı Endokrinoloji ve Diyabet İhtisas Merkezinde 2005 yılından bugüne Bakteriyoloji