ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TLR4 VE IL28B GENLERİ POLİMORFİZMLERİNİN TÜBERKÜLOZ ENFEKSİYONLARININ İNSİDANSI VE GELİŞİMİNE ETKİSİ

Ahmed Kamil Bunıya BUNIYA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI (MOLEKÜLER BİYOLOJİ)

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ahmed Kamil Bunıya BUNIYA tarafından hazırlanan "TLR4 ve IL28B Genleri Polimorfizmlerinin Tüberküloz Enfeksiyonlarının İnsidansı ve Gelişimine Etkisi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT / Türkiye

Eş Danışman : Doç. Dr. Ahmed Abdul Jabbar SULEIMAN / Irak

Jüri üyeleri :

Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN, Çankırı Karatekin Üniversitesi
Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan SHMYO, Veterinerlik Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT, Çankırı Karatekin Üniversitesi
Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan SHMYO, Veterinerlik Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Sencer KARAGÜL, Kocaeli Üniversitesi
Kocaeli Üniversitesi, Kartepe Atçılık MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "TLR4 ve IL28B Genleri Polimorfizmlerinin Tüberküloz Enfeksiyonlarının İnsidansı ve Gelişimine Etkisi" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (12/07/2021).

Ahmed Kamil Bunıya BUNIYA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TLR4 VE IL28B GENLERİ POLİMORFİZMLERİNİN TÜBERKÜLOZ ENFEKSİYONLARININ İNSİDANSI VE GELİŞİMİNE ETKİSİ

Ahmed Kamil Bunıya BUNIYA

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji / Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Doç. Dr. Ahmed Abdul Jabbar SULEIMAN (Eş Danışman)

Mycobacterium tuberculosis bakterisinin neden olduğu tüberküloz, bulaşıcı ve yaygın bir hastalık olup dünyadaki başlıca ölüm nedenlerinden biridir. Bu çalışmada, 100 tüberküloz hastasından balgam örnekleri alınmış olup Ziehl-Neelsen doğrudan muayene yöntemi kullanılarak 88'i TB pozitif, geri kalanı TB negatif bulunmuştur. Tüm örnekler L-J besiyerinde kültüre alınmış ve bakteri kültürü sonuçları %100 TB pozitif bulunmuştur. Balgam numuneleri ayrıca moleküler GeneXpert sistemi kullanılarak da incelenmiştir. Sonuçlar, MTB'nin varlığı veya yokluğu sinyaline ve rifampisin direncinin varlığı veya yokluğuna göre 6 seviyeye ayrılmıştır. Bu çalışmada hastalar 8 yaş grubuna ayrılmıştır. Hastaların yaşları 4 ile 85 yaş arasında değişmektedir. Sonuçlar, en yüksek hasta yüzdesinin %28 ile 25-34 yaş grubunda kaydedildiğini, bunu %21 ile 15-24 yaş grubunun, ardından %19 ile 45-54 yaş grubunun takip ettiğini ve %10 ile 35-44 ve 54-64 yaş gruplarında eşit, %3 ile 5-14 ve %1 ile 0-4 yaş gruplarında en düşük oranlara sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada erkeklerde enfeksiyon oranı %51 iken kadınlarda %49 olarak bulunmuştur. Kültürü pozitif olan 43 hasta ve 30 sağlıklı kontrol TLR4 ve IL28B genlerinin tek nükleotid polimorfizmleri açısından araştırılmıştır. Hepsinin periferik kanından genomik DNA ekstrakte edilmiş ve bu çalışma için özel olarak tasarlanmış spesifik primerler kullanılarak PCR ile hedef DNA amplifiye edilmiştir. TLR4 geninin tek nükleotid polimorfizmleri (rs1927911 ve rs10759930), MTB hastalarında ve sağlıklı kontrollerde üç genotip (rs1927911 için CC, CT ve TT ve rs10759930 için TT, TC ve CC) bulunurken, IL28B geninin tek nükleotid polimorfizmleri (rs12979860 ve rs8099917), MTB hastalarında ve sağlıklı kontrollerde üç genotip (rs12979860 için TT, TC ve CC ve rs8099917 için TT, TG ve GG) ile sunulmaktadır. Bu çalışmada, sonuç, allel T için homozigot olan hastaların pulmoner TB gelişme riskinin anlamlı olarak daha yüksek olduğunu, 12,923 olasılık oranıyla (%95 güven aralığı, 2,1621 ila 32,9812) ve p değeri=0,0221 olan hastaların allel T için heterozigot, 4,4423'lük bir olasılık oranı (%95 güven aralığı, 1,4449 ila 115,5796) p değeri=0,0060 ile pulmoner TB gelişimi için önemli ölçüde daha yüksek bir riske sahip olduğunu ortaya koymuştur. Dolayısıyla TLR4 geninin sonucu C<T rs1927911 geni, çalışma popülasyonunda bir risk faktörü olarak TB ile ilişkilidir. Allel C için heterozigot olan hastalarda pulmoner TB gelişme riski anlamlı olarak daha yüksek olmuştur. TC genotipi (TB vakalarında %41,86) kontrol grubuna (%23,33) göre daha yüksektir. Fark 3,4898 (%95 güven aralığı, 1,1466 ila 10,621)'lik bir olasılık oranıyla önemlidir. p değeri=0,0095, dolayısıyla IL28B geni rs12979860 T<C, bu çalışma popülasyonunda bir risk faktörü olarak MTB ile ilişkilidir.

2021, 82 sayfa

Anahtar Kelimeler: MTB, TB, LTB, SNPs, ARMS, IL28B, TLR4

ABSTRACT

Master's Thesis

IMPACT OF TLR4 AND IL28B GENE POLYMORPHISMS ON THEIR INCIDENCE OF TUBERCULOSIS INFECTION

Ahmed Kamil Bunıya BUNIYA

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology / Biology
Supervisor: Asst. Prof. Müge FIRAT
Assoc.Prof. Ahmed Abdul Jabbar SULEIMAN (Co-Supervisor)

Tuberculosis, which is caused by the bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, is an infectious and common disease and one of the main causes of death in the world. Sputum samples were collected from 100 tuberculosis patients and diagnosed by the Ziehl-Neelsen direct examination method; 88 of them showed positive results, while the remaining results were negative. All samples were cultivated on L-J medium, and the results of the bacterial culture were 100% TB positive. Molecular investigations of sputum samples were also performed using GeneXpert assay. The results were divided into 6 levels according to the signal of presence or absence of MTB and the presence or absence of rifampicin resistance. In this study, the patients were distributed into 8 age groups. The ages ranged from 4 years to more than 85 years. The results revealed the highest percentage of patients was recorded in the age group 25-34 where the percentage was 28%, followed by the age group 15-24 at 21%, then the age group 45-54 at 19%, and the two age groups 35-44 and 54-64 were equal and by 10%, whereas the two categories 5-14 and 0-4 had the lowest rates of 3% and 1%, respectively. In this study, the rate of infection in males was 51% compared to 49% in females. 43 culture-positive patients and 30 healthy controls were investigated for single-nucleotide polymorphisms of TLR4 and IL28B genes. Genomic DNA was extracted from peripheral blood of all them and amplified the target DNA by PCR by using a specific primer specially designed for this study. The two single nucleotide polymorphisms of the TLR4 gene (rs1927911 and rs10759930) were found in MTB patients and healthy controls, with three genotypes (CC, CT, and TT for rs1927911 and TT, TC, and CC for rs10759930). While the two single nucleotide polymorphisms of the IL28B gene (rs12979860 and rs8099917) are presented with three genotypes (TT, TC, and CC for rs12979860 and TT, TG, and GG for rs8099917) in MTB patients and healthy controls. In this study, the result revealed patients who were homozygous for allele T had a significantly higher risk for development of pulmonary TB, with an odds ratio of 12.923 (95% confidence interval, 2.1621 to 32.9812) p value=0.0221 and patients who were heterozygous for allele T had a significantly higher risk for development of pulmonary TB, with an odds ratio of 4.4423 (95% confidence interval, 1.4449 to 115.5796) p value=0.0060. So the result of the TLR4 gene C<T rs1927911 Gene is associated with TB as a risk factor in the study population. Patients who were heterozygous for allele C had a significantly higher risk for development of pulmonary TB. The TC genotype (41,86% in TB cases) is higher than the control group (23.33%). The difference is significant with an odds ratio of 3.4898 (95% confidence interval, 1.1466 to 10.621) p value=0.0277, so the IL28B gene rs12979860 T<C is associated with MTB, a risk factor in this study population.

2021, 82 pages

Key Words: MTB, TB, LTB, SNPs, ARMS, IL28B, TLR4

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Danışmanlarıma teşekkür ederek başlamak istiyorum. Danışmanım ***Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT***, bana her zaman çok güvendi ve her zaman engebeli yollarda kendi projelerimi geliştirmeme ve üstlenmeme izin verdi. Beni doğru yola döndürmek için her zaman oradaydın! Tüm teşvik, destek, fikir ve yazım hatalarını düzelttiğiniz için çok minnettarım.

Yardımcı danışmanım ***Doç. Dr. Ahmed Abdul Jabbar SULEIMAN***'a mükemmel tavsiyeleri ve teşvikleri için teşekkür ederim. Bilime karşı büyük bir hevesiniz var ve her zaman ilginç bakış açıları ve fikirler buluyorsunuz. Yardımcı danışmanım, başından sonuna kadar büyük bir destek oldunuz, her zaman küçük ve büyük görevlerde dinlemek ve yardım etmek için oradaydınız. Çalışmalarımı siz olmadan tamamlayamazdım!

Ulusal Göğüs Merkezindeki ve Ramadi'deki danışmanlık kliniğindeki tüm meslektaşlarıma ve arkadaşlara çok teşekkür ederim.

Büyük aileme; babama, anneme, eşime, çocuklarıma, kardeşlerime destekleri için sonsuz sevgimle…

AHMED KAMIL BUNIYA BUNIYA

Çankırı, Temmuz 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER. ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xi**
1.GİRİŞ **1**
1.1Genel Bilgiler **1**
1.2 Çalışmanın Amaçları **3**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **4**
2.1 Tüberküloz (TB) **4**
2.2 *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) **5**
2.3 Bulgular **6**
2.4 Bulaşma **6**
2.5 Tüberkülozun Epidemiyolojisi **7**
2.6 Tüberkülozun Sınıflandırılması **8**
2.6.1 Pulmoner tüberküloz (PTB) **8**
2.6.2 Ekstrapulmoner tüberküloz (EPTB) **9**
2.7 Tüberküloz Vakaları **10**
2.7.1 Kesin vaka **10**
2.7.2 Ekstrapulmoner TB vakası **10**
2.7.3 Pozitif sürüntü pulmoner TB vakası **10**
2.7.4 Negatif sürüntü pulmoner TB vakas **10**
2.7.5 Yeni vaka **11**
2.7.6 Nüks vakası **11**
2.7.7 Yeniden tedavi vakası **11**
2.8 Tüberkülozun Tespiti **11**
2.8.1 Geçmiş ve ilişkili bulgular **11**
2.8.2 Klinik muayene ve hastalık belirtilerinin bildirimi **11**

2.9 Patogenez 14
2.9.1 1. aşama 14
2.9.2 2. aşama 14
2.9.3 3. aşama 15
2.9.4 4. aşama 15
2.9.5 5. aşama 16
2.10 Tüberküloz Tedavisi 16
2.11.1 Tüberküloza karşı spesifik olmayan bağışıklık tepkisi 17
2.11.2 Tüberküloza karşı spesifik bağışıklık tepkisi 18
2.12 Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP' ler) 19
2.13 Toll Benzeri Reseptörler (TLR' ler) 20
2.13.1 Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) 21
2.13.2 TLR4 geninin polimorfizmi 22
2.14 İnterlökinler (IL'ler) 22
2.14.1 İnterlökinlerin özellikleri 23
2.14.2 İnterlökin-28/İnterlökin-29 (IL-28/IL-29) 24
2.14.3 IL-28A, IL-28B ve IL-29 genleri 24
2.14.4 İnterferonun tüberkülozdaki rolü 25
2.15. Tetra primer amplifikasyon refrakter mutasyon cihazı polimeraz zincir 25
2.16 Doğuştan gelen bağışıklık genlerinin polimorfizmi, hastalığa yatkınlık 26
2.17 Kalıtsal bağışıklık için gen polimorfizmlerini etkileyen faktörler 27
3. MATERYAL VE YÖNTEM 29
3.1 Materyal 29
3.1.1 Cihaz ve ekipmanlar 29
3.1.2 Kimyasallar ve biyolojik materyaller 29
3.1.3 Kitler 30
3.2 Yöntem 32
3.2.1 Balgam örneklerinin dekontaminasyonu 32
3.2.2 Direkt gözlem (Ziehl-Neelsen yöntemi) 33

3.2.3 Kültür yöntemi **34**
3.2.4 Moleküler yöntemler **35**
3.2.4.1 GeneXpert MTB/RIF sistemi **35**
3.2.5 İstatistiksel analiz **40**
4. BULGULAR **41**
4.3 Cinsiyete Göre TB Hasta Dağılımı **43**
4.5 TLR4 Geninin Genetik Polimorfizmi **47**
4.5.1 TLR4 Geni rs1927911 C>T **48**
4.5.2 TLR4 Geni rs10759930 T>C **50**
4.6.2 IL28B Geni rs8099917 T>G **55**
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **60**
5.1. Yaş **60**
5.2 Cinsiyet **61**
5.3 GeneXpert MTB/RIF Testi **62**
5.4 TLR4 Geninin Genetik Polimorfizmi **62**
5.5 IL28B Geninin Genetik Polimorfizmi **64**
5.6 Sonuçlar **65**
KAYNAKLAR **67**
ÖZGEÇMİŞ **82**

SİMGELER DİZİNİ

ARB	Aside Dirençli Basil
ARMS	Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi
bp	Baz çifti
C	Sitozin
°C	Derece Santigrat
CLR	C Tipi Lektin Reseptörleri
CR	Kompleman Reseptörü
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
F	İleri
g	Gram
HIV/AIDS	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü/ Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
IFN	İnterferon
IGRA	İnterferon Gamma Salınımını Ölçen Test
IL	İnterlökin
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
L.J.	Lowenstein Jensen
LTB	Latent Tüberküloz
MDR TB	Çoklu İlaca Dirençli Tüberküloz
MgCl2	Magnezyum Klorür
MHC	Büyük Doku Uygunluk Kompleksi
mM	Milimolar
mL	Mililitre
MTB	*Mycobacterium tuberculosis*
NAAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Testi
NALC-NaOH	N-Asetil-L-Sistein-Sodyum Hidroksit

NLR	NOD Benzeri Reseptörler
NOD	Nükleotid Bağlayıcı Oligomerizasyon Alanı
PAMP	Patojenle İlişkili Moleküler Modeller
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PPD	Saflaştırılmış Protein Türevi
PRR	Örüntü Tanıma Reseptörleri
R	Geri
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
T	Timin
TB	Tüberküloz
TLR	Toll Benzeri Reseptörler
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
U	Ünite
XDR TB	Büyük Ölçüde İlaca Dirençli TB
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.2 TLR4 geninin genomik konumu (O'Driscoll et al. 2017) 22

Şekil 2.2 IL-28A, IL-28B ve IL-29 genleri (Witte *et al.* 2010) 24

Şekil 2.3 Tetra primer ARMS PCR tasarımının genelleştirilmiş diyagramı ve sonuçları. 26

Şekil 3.1 GeneXpert MTB/RIF testi (Shenai et al., 2010). 37

Şekil 4.1 Kırmızı Ziehl-Neelsen boyası ile çubuk şeklinde basiller (100x) 41

Şekil 4.2 L-J besiyerinde düzensiz, kuru ve krem rengi MTB kolonileri 41

Şekil 4.3 Yaş gruplarına göre hasta birey sayılarının yüzdesi 42

Şekil 4.4 TB hastalarının cinsiyete göre yüzdesi 43

Şekil 4.5 GeneXpert ile enfeksiyon düzeyleri farklı hasta sayılarının seviye dağılımı 44

Şekil 4.6 MTB: Tespit edildi Orta / Rif. Direnç: Tespit edilmedi 45

Şekil 4.8 MTB: Tespit edildi Yüksek / Ref. Direnç: Tespit edildi 46

Şekil 4.9 MTB: Tespit edildi Yüksek / Rif. Direnç: Tespit edilmedi 46

Şekil 4.10 MTB: Tespit edildi Düşük / Rif. Direnç: Tespit edildi 47

Şekil 4.11 MTB: Tespit edildi Düşük / Rif. Direnç: Tespit edilmedi 47

Şekil 4.12 Tb hastalarında tlr geni (rs1927911) için jel elektroforezi; ; M:100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; H: TB hastaları (H1-43); C aleli: 250 bp; T aleli: 311 bp ve iki dış primer: 510 bp 49

Şekil 4.13 Kontrol grubunda TLR geni (rs1927911) için jel elektroforezi; M:100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; K: Kontrol grubu bireyleri (K1-K30); C aleli: 250 bp; T aleli: 311 bp ve iki dış primer: 510 bp 50

Şekil 4.14 TB hastalarında TLR geni (rs10759930) için jel elektroforezi M: 100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; H: TB hastaları (H1-H43); T aleli: 160 bp; C alleli: 219 bp ve iki dış primer: 330 bp 51

Şekil 4.15 Kontrol grubunda TLR geni (rs10759930) için jel elektroforezi; M:100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; K: Kontrol grubu bireyleri (K1-K30); T aleli: 160 bp; C alleli: 219 bp ve iki dış primer: 330 bp 52

Şekil 4.16 TB hastalarında IL28B geni (rs12979860) için jel elektroforezi; M: 100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; H: TB hastaları (H1-H43); T aleli: 252 bp; C aleli: 307 bp ve iki dış primer: 516 bp 54

Şekil 4.17 Sağlıklı Bireylerde IL28B geni (rs 12979860) için jel elektroforezi; M:100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; K: Kontrol grubu bireyleri (K1-K30); T aleli: (252 bp); C aleli: 307bp ve iki dış primer: 516 bp 54

Şekil 4.18 TB hastalarında IL28B geni (rs8099917) için jel elektroforezi; M: 100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; H: TB hastaları (H1-H43); G aleli: (215 bp); T aleli: 282 bp ve iki dış primer: 457 bp 56

Şekil 4.19 Sağlıklı Bireylerde IL28B geni (rs8099917) için jel elektroforezi; M:100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; K: Kontrol grubu bireyleri (K1-K30); G aleli: 215 bp; T aleli: 282 bp ve iki dış primer: 457bp 57

Şekil 4.20 SNP sonuçlarının cinsiyete göre yüzdesi 57

Şekil 4.21 Yaş gruplarına göre hasta birey sayılarının yüzdesi 58

Şekil 4.22 GeneXpert ile enfeksiyon düzeyleri farklı hasta sayılarının seviye dağılımı 59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Kullanılan laboratuvar araçları 29

Çizelge 3.2 Kullanılan kimyasal ve biyolojik materyaller 30

Çizelge 3.3 Kullanılan kitler 30

Çizelge 3.4 Tetra primer arms PCR tekniği ile insan TLR4 genindeki rs1927911 ve rs4986790 SNP' lerinin tespiti için kullanılan primerler 31

Çizelge 3.5 Tetra primer arms PCR tekniği ile insan IL28B genindeki rs129798 ve rs8099917 SNP' lerinin espiti için kullanılan primerler 32

Çizelge 3.6 DSÖ tavsiyesine göre ARB sürüntülerinin derecelendirilmesi 34

Çizelge 3.7 Lowenstein-Jensen besiyerinde DSÖ standartlarına göre kültür sonucunun 35

Çizelge 3.8 Kullanılan reaktifler ve miktarları 36

Çizelge 3.9 TLR4 geni ve IL28B genindeki SNP'lerin tespiti için ana karışımın bileşenleri 39

Çizelge 3.10 TLR4 geninde Rs10759930/Rs1927911 tespiti için ısısal döngü cihazı koşulları 39

Çizelge 3.11 IL28B geninde rs12979860/rs8099917 tespiti için ısısal döngü cihazı koşulları 39

Çizelge 4.1 Yaş gruplarına göre dağılım olarak hasta sayısı 42

Çizelge 4.2 Enfeksiyon düzeyleri farklı hasta sayılarının GeneXpert sonuçları 44

Çizelge 4.3 rs1927911 için aleller ve genotip dağılımının sıklığı 48

Çizelge 4.5 rs12979860 için aleller ve genotip dağılımının sıklığı 53

Çizelge 4.6 rs8099917 için aleller ve genotip dağılımının sıklığı 55

Çizelge 4.7 SNP sonuçlarının cinsiyete göre yüzdesi 57

Çizelge 4.8 SNP sonuçlarının yaş gruplarına göre dağılımı 58

Çizelge 4.9 SNP sonuçlarının GeneXpert MTB/RIF testine göre dağılımı 59

1. GİRİŞ

1.1 Genel Bilgiler

Tüberküloz (TB) hastalığının, bulaşıcı bir hastalık olduğu ve etkilenen ilk bireyin 3 bin yıl önce yaşadığı insanların yazmış olduğu en eski kayıtlarda belirtilmektedir. Tüberküloz, dünyada ikinci ölümcül bulaşıcı hastalıktır. Hastalığın etkeni *Mycobacterium tuberculosis* bakterisidir (MTB) (Anonymous 2020). Her ne kadar TB olanların sayısı birkaç yıl içinde biraz azalmış olsada, hastalık dünyanın bazı bölgelerinde kontrolden çıkmış durumdadır (Dheda *et al.* 2018). 2015 ve 2019 yılları arasında kümülatif olarak %9' luk bir düşüşle dünya çapında TB enfeksiyon oranları yılda yaklaşık %2 azalmıştır; fakat bu azalma, 2015 ve 2020 yılları arasında TB'yi Durdurma Stratejisi hedefine ulaşma noktasında hala yetersiz kalmaktadır. Tüberküloz (TB) hala tüm dünyada önemli bir ölüm ve morbidite nedenidir (Ali *et al.* 2015). 2019' da TB, (208.000'i HIV pozitif olan) dünyada toplam 1,4 milyon cana kaybına sebep olmuştur (Anonymous 2020).

TB öncelikle akciğerleri (pulmoner TB) etkiler, ancak beyin veya omurga gibi vücudun diğer alanlarını da kapsayabilir. Tüberküloz enfeksiyonu, hastanın öksürürken veya hapşırırken veya sadece konuşurken ve gülerken ağzından çıkan damlacıkların solunması sonucu hava yoluyla bulaşır (Anonymous 2020).

TB, bağışıklık sisteminin kilit rol oynadığı bulaşıcı bir hastalıktır (Corral-Fernández *et al.* 2017). Bağışıklık sisteminin immun reaksiyon etkinliği ile ilgili olarak hastalık ortadan kaldırılabilir (Vila *et al.* 2012). Makrofajlar, MTB' e (*Mycobacterium tuberculosis*) karşı bağışıklık tepkisinin ilk savunma hattı olarak görev yapar. Makrofajlar, patojeni tanıyarak ve inflamasyonu uyararak adaptif bağışıklık tepkisini ortaya çıkarmak için antijen hücrelerinin öncüsü işleviyle konağın MTB' e karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisine yardımcı olur. Ek olarak, makrofajlar sitokin salınımını başlatmak için MTB yüzeyinde eksprese edilen patojenle ilgili moleküler paternleri (PAMP' ler) tanımlayan toll benzeri reseptörleri (TLR' ler) ifade eder (Bhatt and Salgame 2007). TLR' ler, MTB' e karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde

anahtar reseptörler olarak işlev görür ve adaptif bağışıklık tepkisi için kritik bir tetikleyici rolü üstlenir (Cao *et al.* 2011).

TLR4, proinflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin sentezini ve salınımını indükleyerek inflamatuar yanıtları tetikleyebilir. Çeşitli TLR genleri arasında tek nükleotid polimorfizmleri (SNP' ler) tanımlanmış ve bunların belirli enfeksiyonlara ve diğer inflamatuar hastalıklara duyarlılık/direnç ile ilişkileri rapor edilmiştir (Vijay 2018).

Tip III interferon ailesi dört izoformdan oluşur ve yakın zamanlarda sınıflandırılmış olan IL-29, IL-28A, IL-28B ve IFNλ4'ü içermektedir. Bu sitokinler, TB için önemli inflamasyon düzenleyicileri olabilir, ancak TB ile ilişkileri veya granülomların farklı özelliklere sahip olup olmadığı hakkında çok az şey bilinmektedir (Talukdar and Mattila 2019).

IFN-γ (IL28A, IL28B), TB' ye karşı savunma ile tutarlı olan Th1' e karşı bağışıklık tepkisinin desteklenmesi ile ilişkilendirilmiştir. Kanıtlanmış koruyucu bağıntıların olmaması nedeniyle şu anda bu faktör tartışmalı olsada, IFN' lerin önemli bir rol oynadığı çeşitli profilaktik, tanısal ve immünoterapötik yöntemler şu anda mevcuttur (Chin *et al.* 2017).

İnsan IL28A, IL28B ve IL29; kromozom 19, 19q13.13'ün uzun koluna oturur ve beş (IL29) veya altı (IL28A ve IL28B) ekzon içerir. Sonuç olarak, gen mimarileri IL10 benzeri sitokinleri taklit eder ancak IFN'leri kodlayan intronsuz genlerin aksinedir (Kotenko and Durbin 2017).

SNP saptama yöntemleri, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizminin (RFLP) birçok adımı içermesi, DNA dizilemesinin pahalı araçlara ihtiyaç duyması ve sağlam SNP genotipleme analizinin finansmanın dikkate alınmasına bağlı olmasından dolayı geliştirilmiştir (Kwok ve Chen 2003). Tetra Primer Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ARMS PCR), SNP' leri veya mutasyonları saptamak için hızlı, verimli, uygun maliyetli ve düşük teknolojili bir laboratuvar yöntemi bulmak için optimize edilmiştir (Ye *et al.* 2001). Tetra Primer ARMS PCR, dış

ve iç primerler olmak üzere iki set primer kullanır. Dış primerler, geleneksel PCR' daki primerlerle aynı amaca hizmet eder, yani ilgili DNA dizisini izole etmek ve büyütmek için, iç primerler ise alelik varyasyonu tespit etmek için kullanılır. Tetra primer ARMS PCR, tek bir tüpte ve bir PCR adımında gerçekleştirilir ve ilgili SNP' lerden gelen genotip varyasyonu, ortak agaroz jel elektroforezi kullanılarak doğrudan görselleştirilebilir (Ahlawat *et al.*).

1.2 Çalışmanın Amaçları

1- TB hastalarında TLR4 ve IL28B'de tek nükleotid polimorfizminin (SNP) değerlendirilmesi.

2- Pulmoner tüberküloza duyarlılık konusunda TLR4 gen polimorfizmlerinin etkisinin iki pozisyonda (TLR4 rs 10759930 ve TLR4 rs 1927911) araştırılması.

3- Pulmoner tüberküloza duyarlılık konusunda IL28B gen polimorfizmlerinin etkisinin iki pozisyonda (IL28B rs 8099917 ve IL28B rs 12979860) araştırılması.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Tüberküloz (TB)

TB enfeksiyonu, çoğu durumda akciğerleri istila eden bakteriler (MTB) tarafından tetiklenir (Anonymous 2020). Ancak tedavisi ve önlemesi mümkündür. Pulmoner tüberküloz hastaları öksürdüğünde, hapşırdığında veya tükürdüğünde bakterileri havaya yayar ve hava yoluyla bir kişiden diğerine bulaşma şekillenir. Bu bakterilerden birkaçının solunması, bir insanın kontamine olması için yeterlidir (Mueller *et al.* 2013). Dünya nüfusunun yaklaşık dörtte biri TB ile enfektedir (Rao *et al.* 2018).

Mycobacterium tuberculosis bakterisi ile enfekte olanların yaklaşık %90'ı, latent tüberküloz (gizli TB enfeksiyonu-LTB) olarak adlandırılan semptomsuz şekilde enfekte olur. Enfekte olanların sadece %10'u aktif TB'ye ilerleyebilir, ancak tedavi edilmezse aktif hastalık sebebiyle ölüm oranında %50'lik bir artışa yol açabilmektedir (Skolnik 2016).

Yaş, cinsiyet, sigara, işsizlik, yoksulluk, dışlanma, alkol bağımlılığı ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) gibi risk faktörleri pulmoner tüberkülozdan bağımsız olarak TB enfeksiyonunun bir hastalığa dönüşmesinde rol oynayabilir (Yonge *et al.* 2016). Ayrıca yetersiz beslenme, aşırı alkol kullanımının neden olduğu karaciğer hastalığı, diyabet, son dönem böbrek hastalığı, iç mekan hava kirliliği ve immünosupresif ilaçlar (tümör nekroz faktörü/TNF-α inhibitörleri ile tedavi gibi) bağışıklık sistemini zayıflatarak tüberkülozun ilerlemesine sebep olur (Dutta and Karakusis 2014).

LTB; TB cilt veya kan testleriyle tespit edilir (Manuel Cubillos-Angulo *et al.* 2019). Tedavisi zordur ve hastaya uzun bir süre boyunca birkaç antibiyotik verilmesini gerektirir. Temaslılar incelenip tedavi edilmelidir (Nathavitharana *et al.* 2019). Çoklu ilaca dirençli TB (MDR TB), vakalar arasında büyüyen bir sorundur (Dheda *et al.* 2018). Hastalıkla mücadele, Bacillus Calmette-Guérin (BCG) aşısı ile yapılan bağışıklama programlarına bağlıdır (Chancellor *et al.* 2017)

2.2 *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)

Tüberküloz hastalığının etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) bacillus karakterinde, düz veya kavisli şekilde bir bakteridir. MTB; hareketsiz (hareketli olmayan), spor oluşturmayan ve kapsül içermeyen (kapsülsüz ve toksik olmayan), 3,5-1,5 mikrometre uzunluk ve 0,5-0,2 mikrometre çapında, küçük demetler halinde veya paralel olarak düzenlenmiştir (Todar 2012). Tüberküloz bakterileri zorunlu aeroblardır, bu nedenle kendisi için temel bir barınak olarak solunum sistemini, özellikle her iki akciğerin üst lobunu tercih eder ve organizmanın dışında üremediği için oksijene ihtiyaç duyar (Behr and Waters 2014). Kuruluk gibi zorlu koşullara haftalarca dayanabilir ve düşük konsantrasyonlardaki çoğu dezenfektana karşı dayanıklıdır, ısıya duyarlıdır, yanma ve UV ışığı ile öldürülebilir (Gutierrez and Somoskovi 2014).

MTB, insanlık tarihindeki başarılı patojenlerden biridir ve küresel bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (Korb *et al.* 2016). Aktif pulmoner tüberkülozu olanlar öksürme, hapşırma, konuşma, şarkı söyleme veya tükürme ile bulaşıcı damlacıkları yayar. Her bir hapşırık 40.000 damlacığa kadar dağılabilir (Todar 2012). Bu patojenin yüksek lipid içeriği, birçok benzersiz klinik özelliğinin nedenidir. MTB' in çift dış lipid tabakası vardır (Gutierrez and Somoskovi 2014). Tüberkülozun virülansı, bu bakterilerin toksin üretmemesine rağmen son derece çeşitli ve karmaşıktır. Bununla birlikte, MTB' in virülansına ve şiddetine etki eden çok sayıda fizyolojik ve yapısal özelliklere sahiptir (Velayati and Farnia 2017).

MTB, adaptif bağışıklık tepkisinin başlamasından önce doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından temizlenebilir. TB, inflamatuar Granülom hastalıkları arasında yer alır. T ve B lenfositler, makrofajlar ve hücrelerden gelen fibroblastlar, makrofajları çevreleyen lenfositlerle birlikte bir granülom oluşturmak üzere birleşir (Parker 2017). Granülom oluşumu, MTB' in yayılmasını engeller ve bağışıklık sistemi hücrelerinin tepki vermesi için uygun bir durum sunar. Granülom içindeki bakteriler inaktif hale gelerek gizli tüberküloza yol açabilir (Jee 2020).

2.3 Bulgular

TB vücudun çoğu bölümünü etkileyebilir, ancak büyük oranda akciğerlere saldırır ve bu durum pulmoner TB olarak tanımlanır. TB, akciğerlerin dışında meydana geldiğinde ise ekstrapulmoner TB olarak adlandırılır. Ekstrapulmoner TB, pulmoner TB ile aynı anda olabilir (Ameen *et al.* 2019). Genel belirti ve bulgular ateş, titreme, gece terlemeleri, iştahsızlık, kilo kaybı ve yorgunluktur (Turner *et al.* 2017). Tüberküloz vücudun diğer kısımlarını etkilediğinde, belirtiler ve bulgular ilgili organa bağlı olarak değişir; örneğin omurilikteki tüberküloz sırt ağrısına (Traeger *et al.* 2017), böbreklerde ise kanlı diüreze neden olur (Ramalho *et al.* 2020).

2.4 Bulaşma

Aktif akciğer tüberkülozu olan bireyler öksürdüğünde, hapşırdığında, konuştuğunda, şarkı söylediğinde veya tükürdüğünde 0,5 ila 5,0 mikrometre çapında bulaşıcı damlacıklar şeklinde etrafa saçılır (Todar 2012). Her bir hapşırık 40.000 damlacığa kadar dağılabilir. Bu damlacıklardan herhangi birisi hastalığı bulaştırabilir çünkü TB için enfeksiyöz doz çok düşüktür (enfeksiyona neden olabilecek 10'dan az bakterinin solunması durumu) (Nicas *et al.* 2005). Tüberkülozlu kişilerle uzun süreli, sık veya yakın temasta bulunan kişiler, yaklaşık %22' lik bir oranla çok yüksek risk altındadır (Schluger 2013). Tedavi edilmeyen aktif pulmoner tüberkülozu olan bir kişi yılda 10-15 veya daha fazla kişiye TB bulaştırabilir. Bulaşma aktif tüberkülozlu kişilerden gerçekleşir ve latent enfeksiyonu olan insanlardan enfeksiyonun bulaşacağına inanılmamaktadır (Yates *et al.* 2016). İnsandan insana bulaşma olasılığı, diğer faktörlerin yanı sıra hastalık taşıyıcısından çıkan enfeksiyöz damlacıkların sayısı, ventilasyonun etkinliği, maruz kalma süresi, *Mycobacterium tuberculosis*' in virülansı, cinsiyet, enfekte olmayan kişinin bağışıklık düzeyi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Turner *et al.* 2017). Enfeksiyon zincirinin bir kişiden diğerine yayılması, aktif (belirgin) akciğer TB'si olan kişileri aktif olarak izole ederek ve onları bir anti-TB tedavisine tabi tutarak tersine çevrilebilir. İki haftalık etkili tedaviden sonra dirençli olmayan enfeksiyonlar artık başka duyarlı bireylere bulaşamaz (Dheda *et al.* 2018). Bir

kişi enfekte olursa, enfekte kişinin hastalığı başkalarına geçirecek hale gelmesi için 3-4 haftaya ihtiyacı vardır (Turner *et al.* 2017).

2.5 Tüberkülozun Epidemiyolojisi

TB, 2019 yılında (208.000' i HIV pozitif olan) toplam 1,4 milyon can kaybına sebep olmuştur. Tüberküloz, dünyadaki önde gelen ölüm nedenlerinden birisidir (Anonymous 2020). Küresel olarak önemli bir sağlık sorunu olan TB, her yıl yaklaşık iki milyon insanın ölümüne neden olmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, dünyanın üçte birinin TB hastası olduğunu göstermiştir (Javan *et al.* 2016). 2019 yılında, TB'nin tüm ülkelerde ve farklı yaş gruplarında mevcut olduğu göz önünde bulundurulduğunda, dünya genelinde 5,6 milyonu erkek, 3,2 milyonu kadın ve 1,2 milyonu çocuk olmak üzere toplam 10 milyon kişinin TB ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir ancak TB tedavi edilebilen ve önlenebilen bir hastalıktır. 2019' da dünya çapında 1,2 milyon çocuk tüberküloza yakalanmıştır. Çocuklar ve ergenler arasındaki TB, sıklıkla gözden kaçırılabilmekte, teşhis ve tedavisi zor olabilmektedir (Anonymous 2020).

MDR TB (çoklu ilaca dirençli tüberküloz) halk sağlığı açısından tehdit olmaya devam etmektedir. 2019 yılında, MDR TB' li toplam 206.030 hasta tespit edilmiş ve 2018' de 186.883 olan hasta sayısına oranla %10'luk bir artış olmuştur (Anonymous 2020, Nathavitharana *et al.* 2019).

MTB hastalarının yaklaşık %10'u kronik TB geliştirir (Javan *et al.* 2016). Tüberküloz, doğurganlık çağındaki kadınların dünyadaki en büyük katili ve HIV' li (AIDS) insanlar arasında önde gelen ölüm nedenidir (Abel *et al.* 2018). Ayrıca, HIV enfeksiyonu insidansının yüksek olması ve tüberküloz kontrolünün ihmal edilmesi, TB' nin yeniden canlanmasını ve antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkmasını sağlamıştır (Ali *et al.* 2015, Brodie and Schluger 2009). Yeni TB vaka oranlarının komşu ülkelerde değişiklik göstermesi, sağlık sistemlerindeki farklılıktan kaynaklanıyor gibi görünmektedir (Dheda *et al.* 2018).

MDR TB, küresel çapta TB' ye bağlı ölümlerin yaklaşık %25'ini şekillendirmesi nedeniyle büyük bir tehdit oluşturmaktadır ve yüksek morbidite oranları ile ilişkilidir (Chancellor *et al.* 2017, Hanekom 2016). Aynı zamanda sağlık çalışanları için de bir tehdit olup, sürdürülemez derecede pahalı tedavi gerektirmektedir (Hanekom 2016). Yüksek dirençli tüberkülozun ortaya çıkması ve basillerin ilaçlara karşı direnci endişeleri artırmaktadır (Dheda *et al.* 2018).

Tüberküloz enfeksiyon oranları dünyada her yıl yaklaşık %2 oranında azalmaktadır. 2015 ve 2019 yılları arasında TB kümülatif düşüşü %9 olmuştur fakat bu oran TB' yi Durdurma Stratejisinde hastalık oranlarını 2015 ve 2020 yılları arasında %20 azaltma hedefine ulaşmak için yeterli olmamıştır (Anonymous 2020).

2.6 Tüberkülozun Sınıflandırılması

Akciğer, tüberkülozun en yaygın olduğu bölgedir (pulmoner TB). En yaygın akciğer dışı bölgeler ise lenf düğümleri, plevra ve kemik eklemleridir (Smith 2003).

2.6.1 Pulmoner tüberküloz (PTB)

MTB enfeksiyonu kişide yan etkilere yol açabilir. Hastalık belirtileri olabileceği gibi, hastalığın klinik bulguları olmayabilir ki buna latent TB enfeksiyonu denir (Turner *et al.* 2017).

Aktif pulmoner TB, sıklıkla akciğerlerde oluşur (vakaların yaklaşık %90'ı) (Spinelli *et al.* 2017). Pulmoner TB'de, balgam görülen bireylerde göğüste öksürük ve ağrı bulguları olabilir. Bireylerin yaklaşık %25'i ise asemptomatik kalabilir (Ortega *et al.* 2020). PTB, yüksek bulaşma oranı nedeniyle aktif TB vakalarının %85' ten fazlasını oluşturur (Yates *et al.* 2016).

Aktif tüberkülozun belirti ve bulguları arasında özellikle sabahları üç hafta veya daha uzun süre devam eden inatçı ve şiddetli öksürük, nefes alırken veya öksürürken göğüs ağrısı ve akciğerlerde sıvı toplanması belirtileri, halsizlik, ateş, üşüme, titreme ve kilo

kaybına neden olan iştahsızlık, gece terlemeleri, genel yorgunluk yer alır. Bu hastalığa karşı en savunmasız kişiler, zayıf bağışıklık sistemine sahip olmaları nedeniyle çocuklar ve AIDS hastalarıdır (Halezeroğlu ve Okur 2014).

TB, kronik enfeksiyona dönüşebilir ve üst akciğer loblarında yaygın hasara neden olabilir. Alt akciğer lobları, genellikle belirgin bir neden olmaksızın üst kısımdan daha düşük düzeyde enfektedir (Pragman *et al.* 2018). Bunun nedeni, bu bölgedeki zayıf lenf drenajı veya akciğerin üst loblarındaki daha iyi ve sağlıklı havalandırma olabilir (Pitcher *et al.* 2020).

2.6.2 Ekstrapulmoner tüberküloz (EPTB)

Aktif tüberküloz vakalarının %25'ine varan oranda, akciğer dışındaki organlarında tüberküloz olan bir hastada bakterilerin akciğerden periferik kan damarlarına ve oradan da çeşitli kan sistemlerine infiltre olması sonucu plevrada enfeksiyon şekillenebilir (Golden and Vikram 2005, Jafari *et al.* 2018). Beyni çevreleyen zarlarda ise tüberküloz menenjite sebebiyet verir (Menenjit Tüberküloz) (Golden and Vikram 2005, Pang *et al.* 2016). Lenfatik sistemi enfekte edebilir ve Lenf Nodu Tüberkülozuna neden olur (Golden and Vikram 2005, Fitzgerald *et al.* 2014). Özellikle bakterilerin oksijenin bol olduğu için tercih ettiği bir bölge olan kemik ve omurları da enfekte edebilir. Kemik ve Eklem Tüberkülozu, genitoüriner sistemi enfekte edebilir ve Fallop tüplerinde enfeksiyonlara neden olursa Genitoüriner Tüberküloza neden olabilir (Smith 2003). Ayrıca cildi etkileyebilir ve ciltte tüberküloza neden olabilir, ki bu biraz nadir gelişse de enfekte çocukları ve yetişkinleri etkiler. Miliyer Tüberküloz, vücudun nekrozuna yol açan lenfatik sistemin tüberkülozu ile bu enfeksiyonun gelişmesinden kaynaklanır (Dutta and Karakousis 2014, Hanekom 2016).

2.7 Tüberküloz Vakaları

2.7.1 Kesin vaka

Tüberkülozlu hasta için kültür sonucunun pozitif olduğu durumlarda, ayrıca kültür işleminin periyodik yapılmadığı ülkelerde aside dirençli basil (ARB) yaymada en az iki balgam örneğinin pozitif olması durumu TB kesin vakasıdır (Golden and Vikram 2005, Talbot and Raffa 2014).

2.7.2 Ekstrapulmoner TB vakası

Ekstrapulmoner TB vakası; plevra, lenf düğümleri, karın ve diğer organlar gibi akciğer dışındaki organlarında tüberkülozu olan bir hastanın durumudur (Chai *et al.* 2018). Burada tanı, tek bir pozitif numunenin işlenmesine, histolojik incelemeye veya hastalığın etkili olduğunu ve akciğerle ilgili olmadığını doğrulayan bir klinik tıbbi muayeneye dayanmaktadır (Behr and Waters 2014).

2.7.3 Pozitif sürüntü pulmoner TB vakası

Pozitif sürüntü pulmoner TB vakasında, balgamda en az iki pozitif ARB yayma testi sonucu ve akciğerde tüberkülozun etkili olduğunu kanıtlayan radyografik değişiklikler veya bir pozitif balgam örneği ve pozitif *Mycobacterium tuberculosis* kültürü olmalıdır (Laughon and Nacy 2017).

2.7.4 Negatif sürüntü pulmoner TB vakası

Negatif sürüntü pulmoner TB vakası için tanı kriteri en az üç negatif ARB test sonucu olmasıdır (Golden and Vikram 2005). Göğüs röntgenindeki değişikliklerle akciğer tüberkülozu ile aynıdır ve antibiyotiklere yanıt söz konusudur (Jeanes and O'Grady 2016).

2.7.5 Yeni vaka

Yeni vaka, tüberküloz tedavisi görmemiş veya bir aydan daha kısa süre boyunca antitüberküloz tedavisi görmüş hastanın durumudur. (Pai *et al.* 2016).

2.7.6 Nüks vakası

Nüks vakası, yeni bir semptomun ortaya çıkması ile önceden iyileştiği bildirilen hastanın bakteriyolojik incelemesinin (balgam veya kültür testinin) pozitif çıkması durumudur (Chin *et al.* 2017).

2.7.7 Yeniden tedavi vakası

Yeniden tedavi vakası, daha önce tedavi görmüş ancak tedavinin başarısız olduğu veya nüksettiği hastanın durumudur (Pai *et al.* 2016).

2.8 Tüberkülozun Tespiti

2.8.1 Geçmiş ve ilişkili bulgular

Üç hafta veya daha uzun süre balgam eşliğinde öksürük gibi akciğer hastalığı semptomlarının varlığı, göğüs ağrısı ve geç vakalarda hemoptizi TB'nin bulgularındandır. Sistemik semptomlar ise gece terlemeleri, iştahsızlık, ateş kaynaklı titreme ve çabuk yorulmadır (Pai *et al.* 2016).

2.8.2 Klinik muayene ve hastalık belirtilerinin bildirimi

Beşeri hekim, fiziki muayeneyle şişmiş lenf düğümlerini kontrol eder ve nefes alırken akciğerlerden çıkan sesleri dinler (Caulfield and Wengenack 2016).

2.8.3 Laboratuvar testleri

2.8.3.1 Mikroskopi

TB' nin teşhisi için mevcut en hızlı, en basit ve en ucuz teknik, basillerin doğrudan Ziehl-Neelsen ile izlenmesine dayanan bakteriyoskopidir (Pfyffer 2015). Ziehl-Neelsen boyasında basiller mikroskopta parlak kırmızı çubuklar olarak görünür. Bu yöntem, hücre duvarının penetrasyonunu kolaylaştırmak için ısı fiksasyonu (sıcak boyama) gerektirir (Lienhardt *et al.* 2016).

Mikroskopi, TB semptomları olan bireylerin muayenesinde temel tespit yöntemidir. Ancak zaman alıcı ve zahmetli olması gibi dezavantajları vardır. Dünya Sağlık Örgütü, muayeneyi yapan kişinin ardışık günlerde hastalık şüphesi olan bireyin en az 2 veya 3 ARB yayma preparatının incelenmesinden sorumlu olduğunu ve her iki gündeki bulguların da gerekli olduğunu belirtmektedir (Anonymous 2020). Bu test aynı zamanda auramine-rodamin boyama ve bir floresan mikroskobu ile de yapılabilir ve bakteriler mikroskopta altın renginde görülür (Caulfield and Wengenack 2016).

2.8.3.2 Kültür

MTB için genel olarak Lowenstein-Jensen (LJ) ve Middlebrook kültür ortamları kullanılmaktadır (Jeanes and O'Grady 2016). Kültür yaklaşımı etkili tanı elde edilmesini sağlar ve tanı ARB' ye göre daha duyarlıdır. MTB kültürü, aktif TB ile çalışma ve klinik teşhis için en yüksek duyarlılığa sahip yöntemdir (Anonymous 2020, Laughon and Nacy 2017); fakat sadece kültürde pozitif olan kişilerin, sürüntü mikroskopisinde pozitif tespit edilenlerden daha az bulaşıcı olması, kültürü vakaların sistematik tespiti için öncelikli bir test olmaktan çıkarmaktadır (Pai *et al.* 2016).

Balgam numunesi, kültür işlemine başlamadan önce diğer mikroorganizmaların dekontamine edilmesi amacıyla NaOH çözeltisi ile işlendikten sonra kültürlenir. Tüberküloz bakterileri ise hücre duvarındaki lipid tabakası nedeniyle alkali bileşenlere direnç gösterir (Shetye *et al.* 2020). Kültür, yumurta içeren Lowenstein-Jensen

besiyerinde gerçekleştirilebileceği gibi (Yonge *et al.* 2016), Middlebrook besiyeri gibi diğer agarlı besiyerleri de kullanılabilir (Khara *et al.* 2020). Kültürlerin inkubasyonu 6-8 haftaya kadar uzayabilen uzun bir zaman alır. Bu nedenle, BACTEC sistemi gibi modern sistemler tasarlanmıştır (Caulfield and Wengenack 2016).

2.8.3.3 İmmünolojik tanı

Tüberküloz hastalarının serumunda çeşitli MTB antijenlerine karşı antikorların varlığına dayanan immünolojik testler tüberküloz tanısı için yararlıdır, ayrıca yoksul ve gelişmekte olan ülkeler için uygun olan en kolay, en hızlı ve en uygun maliyetli yaklaşımları sağlar (Tang *et al.* 2018, Khurshid *et al.* 2017).

Hem Interferon Gamma Salınımını Ölçen Test (IGRA) hem de Tüberkülin Deri Testi (Saflaştırılmış Protein Türevi Testi-PPD), immünolojik reaksiyonlara bağlıdır (Manuel Cubillos-Angulo *et al.* 2019, Abel *et al.* 2018). Aktif TB ve latent TB enfeksiyonunu tespit etmek için kullanılmaktadırlar (Sali *et al.* 2018). Kan ve deri testlerinin dolaylı immünolojik testler olduğu bilinmektedir ve HIV/AIDS hastaları gibi bağışıklık etkinliği olmayan kişiler üzerinde hiçbir etkisi olmayabilir (Chai *et al.* 2018). Tüberküloza yakalanma riskinin yüksek olduğu bölgelerde yaşayan kişilerde bağışıklık yetmezliği geliştirme riski de yüksektir (Manuel Cubillos-Angulo *et al.* 2019).

PPD, Mantoux Testi veya Tüberkülin Testi olarak da bilinir (Eribo *et al.* 2020). 0,1 mililitre saflaştırılmış bakteri proteini deri altına enjekte edildiğinde, ortaya çıkan reaksiyonun boyutu ve alanı 48-72 saat sonra ölçülür ve şişme ölçüsü test sonucunu pozitif veya negatif olarak belirler. IGRA ise latent TB enfeksiyonunu teşhisi için yüksek gelirli ülkelerde yaygın olarak tanınmaktadır (Schluger 2013).

2.8.3.4 Moleküler yöntemlerle teşhis

TB' nin moleküler teşhisi; hızlı, spesifik ve ilaç direncini öngördüğü için MTB için nükleik asit amplifikasyon testine (NAAT) dayanır. Klinik örneklerden (kan, balgam, doku, kemik iliği, vb.) elde edilen mikobakterilerden DNA/RNA'nın açığa çıkarılması

ve amplifikasyonu için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılmaktadır (Fitzgerald *et al.* 2014).

Gerçek Zamanlı DNA Amplifikasyonu temelli olan GeneXpert MTB/RIF Testi, tamamen otomatikleştirilmiş en gelişmiş NAAT teknolojilerinden birisidir (Tang *et al.* 2018). Bu yöntem ile, TB' nin ve rifampisine dirençli MTB mutasyonlarının teşhisi yaklaşık 2 saat içinde gerçekleştirilmektedir (Nathavitharana *et al.* 2019). Moleküler teşhis yöntemlerinin, rutin teşhis prosedürlerine dahil edilmesi hem zaman hem de maliyet açısından fayda sağlamaktadır (Herráez *et al.* 2017).

2.9 Patogenez

TB hastalarının yaklaşık %90'ı asemptomatik latent TB ile enfektedir. Latent TB enfeksiyonunun aktif TB hastalığına dönüşme olasılığı yaklaşık %10'dur (Pai *et al.* 2016). Hastalığın ilerlemesi; konağın bağışıklık durumuna, etkene maruziyete ve etkenin bulaşıcı dozuna bağlıdır (Talbot and Raffa 2014, Bhatt and Salgame 2007). Patogenez süreci 5 aşamada incelenmektedir.

2.9.1 1. aşama

TB hastasının öksürmesi veya hapşırması sırasında çıkan basil yüklü damlacıklar duyarlı bireyler tarafından solunur. Damlacıklar kayda değer bir süre havada asılı kalmaktadır. Bir damlacıkta en az üç basil bulunur (Fitzgerald *et al.* 2014). Duyarlı bireyler etkene maruz kaldığında alveolar makrofaj endozomlarında bakteriyel istila başlar ve proliferasyon meydana gelir. Plevranın hemen altında, sınırları belirgin yuvarlakça bir lezyon (Ghon odağı) oluşur. Ghon odağının akciğer enfeksiyonunun birincil bölgesi olduğu düşünülmektedir (Behr and Waters 2014).

2.9.2 2. aşama

Genellikle birincil enfeksiyondan 1-3 hafta sonra akciğerlerde meydana gelen makrofajlar patlamadıkça, MTB makrofajların içinde neredeyse sınırsız olarak çoğalır

(Abel *et al.* 2018). Diğer makrofajlar, periferik kanda artmaya başlar. Bu makrofajlar aynı zamanda MTB'yi fagosite edebilir fakat inaktif oldukları için bakterileri öldüremezler (Parker 2017).

2.9.3 3. aşama

3. aşamada lenfositler infiltre olmaya başlar. Lenfositler; özellikle T hücreleri, Büyük Doku Uyuşum Kompleksi (MHC) molekülleri tarafından işlenen ve sunulan MTB antijenini tanır. Bu, T hücrelerinin aktivasyonu ve İnterlökin 1 (IL-1), gama interferon (IFN) ve tümör nekroz faktörü (TNF) dahil olmak üzere çeşitli sitokinlerin üretimi ile sonuçlanır. IFN salınımı makrofajları aktive eder, bu aktive makrofajlar artık MTB' i yok edebilir. TB enfeksiyonunu kontrol etmek için hücre aracılı bir bağışıklık tepkisi oluşturulmalıdır (Galgani *et al.* 2020). Aktive makrofajlar, litik enzimleri ve reaktif ara maddeleri serbest bırakabilir (Fol *et al.* 2015). Bu noktada da tüberkül oluşumu başlar. Tüberkülün merkezi "kazeasyon nekrozu" olarak tanımlanmaktadır ve yarı katı veya "kazeinsi" bir homojenlik gösterilebilmektedir. *Mycobacterium tuberculosis*, düşük pH ve anoksik koşullar nedeniyle tüberküllerin içinde çoğalamaz, fakat bu tüberküllerde uzun süre kalabilir (Nathavitharana *et al.* 2019).

Antikor aracılı immünite, bakteri hücre duvarındaki yüksek lipid içeriği nedeniyle hücre içi ve hücre dışı TB enfeksiyonlarının kontrolünde etkili olamaz (Korb *et al.* 2016).

2.9.4 4. aşama

Tüberkül boyunca birçok aktive olmuş makrofaj bulunurken, aynı zamanda birçok inaktif veya aktive olduğu halde kullanılmayan makrofaj da vardır (Trivedi *et al.* 2012). MTB içeren bu makrofajların çoğalması sonucu tüberkül genişler (Smith 2003). Bronş büyüyen tüberküller tarafından istila edilebilir ve bunun sonucunda akciğerin diğer kısımları da MTB tarafından enfekte edilebilir. MTB'in hematojen yayılması sonucu ise ekstrapulmoner tüberküloz şekillenebilir (Sharma *et al.* 2012). Yaygın TB olarak bilinen miliyer TB ise MTB'nin lenfo-hematojen yolla yayılımı sonucu şekillenir (Dhamgaye *et al.* 2012).

2.9.5 5. aşama

Açıklanamayan nedenlerle, bazen kazeöz tüberkül merkezleri sıvı bir hal alabilir. Bu sıvılaşma sonucu MTB hücre dışında hızla çoğalmaya başlar. Oluşan büyük antijen yükü sonucunda, bronş duvarları nekrotik hale gelerek yırtılabilir ve bir boşluk oluşur. MTB hava kanallarına dökülerek diğer akciğer bölgelerine doğru ilerler (Gutierrez and Somoskovi 2014).

Nispeten az sayıda MTB enfeksiyonu hastalığa neden olur. Konak, bir aşamada enfeksiyonu düzenlemeye başlayabilir. Primer lezyonlar iyileştiğinde fibröz ve kalsifiye duruma geçer ve bu lezyon Ghon kompleksi olarak bilinir (Dutta and Karakousis 2014). Genellikle, Ghon kompleksi göğüs röntgeninde açıkça görülebilir (Shiratori *et al.* 2017).

2.10 Tüberküloz Tedavisi

Dirençli, çoklu ilaca dirençli (multidrug-resistant/MDR) ve büyük ölçüde ilaca dirençli (extensively drug-resistant/XDR) MTB suşlarının gelişmesiyle birlikte TB; Doğu Avrupa, Asya ve Afrika popülasyonları için özellikle tehlikeli hale gelmiştir. MDR TB, ilk basamak anti TB tedavisinin en güçlü iki üyesi olan rifampisin ve izoniazide direnç olarak sınıflandırılır. XDR TB ise, rifampisin ve izoniazide karşı dirence ek olarak herhangi bir florokinolon direncini yani üç ilaçtan en az birine (amikasin, kanamisin veya kapreomisin) karşı direnci tanımlar (Dheda *et al.* 2018).

MTB'de ilaç direnci, normal hücrelerin üremesi sırasında doğal randomizasyon, kromozomal mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkar. İlaca dirençli bir mutasyonun ortaya çıkma olasılığı, bakteri popülasyonunun ölçeği ile doğrudan ilişkilidir (Parveen *et al.* 2021). TB hastalığını yönetmek için yeni tedaviler oluşturmak gerekmektedir (Javan *et al.* 2016).

İlaca dirençli MTB' in neden olduğu TB, tedavi yükünü artırmaktadır. Sonuç olarak, standart tedavi için kısa süreli 2 aylık izoniazid, pirazinamid, rifampisin ve

etambutolden oluşan dört ilaçlı bir tedavi, ardından rifampisin ve izoniazid ile 4 aylık tedavi yapılmalıdır (Corral-Fernández *et al.* 2017).

İzoniazid, makrofajlara sızma ve bakteri hücre duvarında bulunan mikolik asit üretimini önleme kabiliyetine sahip olduğu için en güçlü anti TB ajanıdır. İlaç rejimi kişiden kişiye değişir. Bağışıklık sistemi zayıf olan hastalar için daha uzun tedaviler gerekebilir (Ali *et al.* 2015).

Bakteriyel faktörler, ilaca dirençli tüberkülozun küresel olarak gelişmesine ve yayılmasına neden olabilir (Khara *et al.* 2020). Bir araştırmaya göre, Güney Afrika' daki ilaca dirençli tüberküloz vakalarının %80' i bir hastadan diğerine yayılmaktadır. Çin' deki MDR TB vakalarının 2003 ile 2012 yılları arasında 121.600 vakayı aştığı bildirilmiştir (Ding *et al.* 2017).

Çoğunlukla, TB tedavisi, bir dizi çoklu antimikrobiyal gerektirmektedir. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) aşısı tüm dünyada kullanılmaktadır (Fitzgerald *et al.* 2014). Bu aşı, temelde bebeklerde ve küçük çocuklarda hayatı tehdit eden tüberkülozu önlemek için yapılırken küresel TB salgınını kontrol etmede başarısız olmuştur. Daha iyi etkinliğe sahip yeni aşılar oluşturmak için çabalar devam etmektedir. Küresel TB salgınını 2035 yılına kadar sona erdirmek için politik ve finansal açıdan yeni kaynakların sağlanması gerekmektedir (Pai *et al.* 2016). Son olarak, özellikle latent ve aktif enfeksiyonlar olmak üzere tüberkülozun etkin ve erken teşhisi, hastalığın önlenmesi için esastır (Al-Quqaili 2018).

2.11 Tüberküloza Karşı Bağışıklık Tepkisi

2.11.1 Tüberküloza karşı spesifik olmayan bağışıklık tepkisi

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin solunum yoluyla akciğer alveollerine ulaşması ile başlar. MTB, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi doğuştan gelen bağışıklık sistemi fagositik hücreleri tarafından tespit edilir. Konak savunmasının ilk hattını temsil eden bu hücreler; Toll benzeri reseptörler (TLR), kompleman reseptörü

1 (CR1), C tipi lektin reseptörleri (CLR), kompleman reseptörü 3 (CR3), mannoz reseptörü, çöpçü reseptörler ve nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD) benzeri reseptörleri (NLR) dahil olmak üzere örüntü tanıma reseptörlerini (PRR) eksprese etmektedir (Gröschel *et al.* 2016). Bu moleküller, patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP) olarak adlandırılan MTB tarafından salınan antijenik motifleri tanırlar (Ortega *et al.* 2020). TLR' ler mikobakteri enfeksiyonunda çok önemli bir rol oynar. Bu reseptörler, *Mycobacterium tuberculosis*' in hücrelere alımını kolaylaştırmak için bakterilerde bulunan spesifik bölgelere bağlanır (Fol *et al.* 2015, Vila *et al.* 2012). Ayrıca fagositik hücrelerden, adaptif bağışıklık savunmasını uyarmak ve bakterilerin çoğalmasını önlemek için çok önemli olan kemokinlerin salınmasına neden olur. Sonuç olarak, TLR' ler, *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonuna karşı doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık savunmaları arasında bir bağ olarak çalışır (Ortega *et al.* 2020, Parker 2017). Tüberküloz, akciğerlerde basillerin fagositozu ile başlar fakat enfeksiyon bölgesine göç eden bağışıklık hücreleri bakterileri azaltmada etkili değildir, aynı zamanda bakteriyel basiller fagozom lizozom füzyonundan kaçarak (Vila *et al.* 2012), fagozomda çoğalır ve makrofaj nekrozuna neden olurlar. Makrofajlarla karşılaştırıldığında, nötrofiller doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde potansiyel bir role sahip olma eğilimindedir. Nötrofiller tarafından salınan katelisidin gibi diğer birçok antimikrobiyal peptit, *Mycobacterium tuberculosis*' e karşı aktif olarak çalışır (Nancy Hilda and Das 2018).

2.11.2 Tüberküloza karşı spesifik bağışıklık tepkisi

Alveolar makrofajlar ve dendritik hücreler bölgesel lenf düğümüne göç ederek T hücrelerini (hem CD4+ hem de CD8+) *Mycobacterium tuberculosis* antijenine karşı uyarır (Korb *et al.* 2016). T hücrelerinin, makrofajların ve diğer konakçı hücrelerinin (dendritik hücreler, fibroblastlar ve endotelyal hücreler) toplanması, enfeksiyon bölgesinde granülom oluşumuna neden olur (Machado *et al.* 2018).

Bir granülom oluşması ile TB basillerinin akciğer dokusunun geri kalanına yayılması engellenir, bakteri proliferasyonu sınırlandırılır ve makrofajlar ile diğer bağışıklık sistemi hücreleri ve bu hücreler tarafından oluşturulan sitokinler arasındaki etkileşimler

için bir mikro ortam sağlanır (Wang *et al.* 2019). CD4+ T hücreleri tarafından geliştirilen IFN-y, MTB antijenlerini içeren enfekte makrofajları tanımlayarak onları yok edebilir (Talbot and Raffa 2014) ve enfeksiyon gelişimini durdurur. Bununla birlikte, bazı dirençli basiller, konağın immun yanıtından kaçabilir ve latent faza geçebilir (Wang *et al.* 2019).

2.12 Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP' ler)

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP); genomdaki belirli bir lokusta meydana gelen, tek bir nükleotidin genetik varyasyonudur. DNA dizisinin incelenmesi, bireyler arasında büyük heterojenliğe işaret eder ve insan genomlarındaki en büyük farklılık, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP' ler) olarak ortaya çıkar (Maass *et al.* 2018). SNP' ler, tüm insan DNA dizisi varyantlarının yaklaşık %90'ını oluşturur ve insanların gelişimi, ilaçlara verdikleri tepki ve hastalıklara karşı duyarlılıklarında farklar oluşmasında önemli bir role sahiptir (Khademi *et al.* 2016).

SNP' ler insan genomu boyunca homojen bir şekilde yer almaz ve gerçekte, genler arasındaki SNP' lerin frekansında, her bir genin çeşitli seçici baskılarını ve ayrıca genom boyunca çeşitli mutasyonları ve rekombinasyon modellerini yansıtan büyük bir çeşitlilik vardır. SNP' ler, son yıllarda bireylerde hastalık hassasiyetinin ve ciddiyetinin belirlenmesinde önemli bir husus olarak ortaya çıkmıştır. Polimorfizmler, gendeki mutasyonlardan farklı olarak DNA dizisinde normal olarak meydana gelen varyantlardır ve popülasyonda en az %1 prevalansa sahiptirler. Polimorfizmlerinin yaklaşık %90'ı, tek baz ikamelerine atfedilebilen SPN' lerdir. Diğerleri ise, ekleme/silme polimorfizmlerini, mini uydu ve mikro uydu polimorfizmlerini içermektedir (Maass *et al.* 2018). Çoğu polimorfizm işlevsel olarak nötr olarak fark edilir. Bazılarının gen ekspresyon kontrolü veya kodlanmış protein işlevi üzerinde belirli etkileri vardır. Böyle polimorfizmler, zayıf penetrasyonlarına rağmen, bireyler arasında hastalıklara duyarlılık ve hastalığın prognozunda farklılıklar oluşturabilir (Jenkins *et al.* 2019).

İnsan genetik çeşitliliği sadece insan polimorfizmi düzeyinde değil, aynı zamanda yakından ilişkili bölgelerde belirlenen spesifik alel karışımlarında (haplotipler) bile azalma eğilimi göstermektedir (Jenkins *et al.* 2019). Karşılıklı varyasyonlar, popülasyondaki olası en büyük heterozigotluktan sorumlu olduğundan, bunların fenotipik özellik heterojenliği üzerindeki olası etkilerini belirlemek gerekli olacaktır. Bu aleller, fenotipler üzerinde farklı etkilere sahiptir ve genellikle vahşi ve mutant formlar olarak adlandırılır. Kodlama bölgelerindeki SNP' ler, amino asit dizisini ve dolayısıyla protein yapısını değiştirerek paralel proteinlerin biyolojik aktivitesini etkileyebilir, bu durumda ciddi sağlık sorunlarına veya ilaç tedavisine tepkide bir kaymaya yol açabilir (Hauser *et al.* 2018).

Uyumlu tek nükleotid polimorfizmi, benzer amino asitler için kodon kodlamasına (sessiz mutasyon) yol açan alel varyasyonları olarak tanımlanabilirken, uyumlu olmayan tek nükleotid polimorfizmi, çeşitli amino asitleri kodlayan alellerin modifikasyonuna neden olur. Uyumlu ve uyumlu olmayan SNP' ler, stabiliteyi etkileyen pre-mRNA promotörlerinin ve konformasyonunun aktivitesini etkiler. Protein-substrat/inhibitör modifikasyonunu, bağlanma kabiliyetini ve hücre altı protein pozisyonunun modifikasyonunu indükler (Dittrich *et al.* 2015).

2.13 Toll Benzeri Reseptörler (TLR' ler)

Toll benzeri reseptörler (TRL' ler), monositlere ihtiyaç duyan çeşitli bağışıklık hücrelerinde (B hücreleri, dendritik hücreler ve ayrıca endotel hücreleri) eksprese edilir. Şu anda memelilerde 12 TLR formu tanımlanmıştır ve bunlar konumlarına göre iki gruba ayrılabilir (Dajon *et al.* 2017). Hücre zarının içinde yer alan TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 ve TLR11 mikroorganizmaların hücre duvarı bileşenlerini tanımlar. TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 dahili olarak endoplazmik retikulum, endozomlar ve lizozomlar gibi bölmelerde bulunarak mikrobiyal veya viral nükleik asitlere bağlanırlar. TLR' lerin ortak özelliklerinden birisi, hücre dışı alanlarında değişen sayıda lösin bakımından zengin tekrarlar bulunmasıdır (ul Ain *et al.* 2020).

2.13.1 Toll benzeri reseptör 4 (TLR4)

İnsanlarda TLR4, örüntü tanıma reseptörleri grubunun bir üyesi olan TLR4 geni tarafından kodlanan bir transmembran proteindir ve aktivasyonu, doğuştan gelen bağışıklık tepkisini tetiklemekten sorumlu olan hücre içi bir sinyalleşme zinciri ve inflamatuar sitokin çıkışı ile sonuçlanır (Korneev *et al.* 2017).

TLR4, insan savunma sisteminde hayati bir rol oynar. Lipopolisakkarit (birçok Gram-negatif bakteride bulunan bir bileşen) ve Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bazı toksinlerin tanımlanmasından sorumludur. Güçlü seçicilik ile patojenlere tepki verir. Ligandları genellikle bazı viral proteinler, polisakkaritler, düşük yoğunluklu lipoprotein, beta-defensin ve ısı şoku proteini gibi bir dizi endojen protein içerir (Zhongqi *et al.* 2019).

TLR4, patojenleri algılar ve anında bir bağışıklık tepkisi başlatır, ardından uyarlanabilir bir bağışıklık tepkisi gelir. Patojenler, moleküler yapıları temelinde, model tanıma reseptörlerinin sınırlı bir repertuarı ile tanımlanır (Shetab Boushehri and Lamprecht 2018). TLR4, bakteriyel bir lipopolisakkarit sensörü olarak tanınırken, her iki eksojen kökenden (ekzojen ligandlar) birçok başka ligand rapor edilmiştir. Patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP), mantarlardan, bakterilerden, bitkilerden, virüslerden ve siyanobakterilerden ayrılan moleküllerdir, en büyükleri TLR4/MD2 kompleksinin başlangıçlarıdır. TLR aktivasyonu, proinflamatuar sitokinlerin, kemokinlerin ve yardımcı uyarıcı molekül ekspresyonunun sentezine katkıda bulunur (O'Driscoll *et al.* 2017).

Birçok patojene karşı ilk savunma hattı olarak TLR' ler esastır. İnsan ve hayvan genetik çalışmaları, TLR' ler ve TB arasındaki ilişkileri göstermektedir. TLR üzerine farelerde yapılan çalışmalar; TLR2, TLR4 ve TLR9' un konağın direncine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Kobayashi *et al.* 2012).

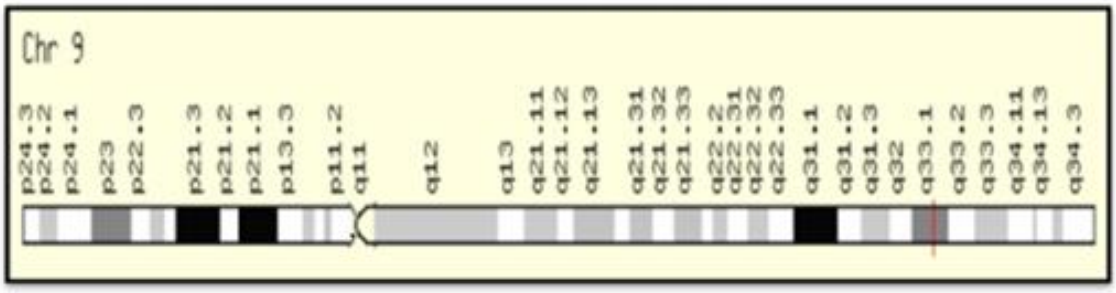
TLR4, akciğer yapısının korunmasında önemli bir rol oynar ve akciğer yapısal stabilitesi için gerekli olan doğuştan gelen bağışıklık sisteminin düşük dereceli

aktivasyonunu uyarır (Zhongqi *et al.* 2019). MTB konağı enfekte ettiğinde; TLR4 bakterinin lipopolisakkaritini tanımlayarak, MyD88 adaptör molekülünü ve diğer sinyal yollarını etkinleştirir ve MTB'e karşı doğuştan gelen konak savunmasını başlatır (Biyikli vd. 2016).

2.13.2 TLR4 geninin polimorfizmi

DNA polimorfizmi, aynı türün bireyleri arasındaki nükleotid dizisindeki bir varyasyondur. Bu varyasyonlar; DNA dizisinde tek baz çifti değişiklikleri, eklemeler, silmeler ve hatta baz çifti ve kopya sayısındaki değişiklikler olabilir. SPN'ler, insanlarda en sık görülen DNA polimorfizmi şeklidir. Bir polimorfik gen varyantı, anormal bir ifade düzeyine veya anormal bir gen tipinin gelişimine katkıda bulunabilir. Bu hastalığa neden olabilir veya hastalıkla ilgili olabilir (Jin *et al.* 2018).

İnsan TLR4 geni, dört ekzondan oluşan 9q31 kromozomu ile eşleşir (Şekil 2.1). İnsan TLR4'ü, 624 hücre dışı alan amino asitten oluşur ve özellikle protein ektodomainlerinde, hafif zararlı fenotipik sonuçlarla birkaç SNP sergiler. TBR4 polimorfizmleri, özellikle reseptörün ligand tanıma bölgesindeki konumları nedeniyle enfeksiyonların duyarlılığı üzerinde bir etkiye sahiptir (Vaure *et al.* 2014).



Şekil 1.2 TLR4 geninin genomik konumu (O'Driscoll et al. 2017)

2.14 İnterlökinler (IL'ler)

İnterlökinler, başlangıçta sadece lökositler tarafından üretildiği düşünülen, ancak daha sonra diğer birkaç hücre tarafından da üretildiği keşfedilen bir tür sitokindir (Schneider *et al.* 2014). İmmun sistem hücrelerinin aktivasyonunda ve farklılaşmasında, ayrıca

olgunlaşmasında, çoğalmasında, adhezyonunda ve göçünde önemli bir rol oynarlar. Hem proinflamatuar hem de antiinflamatuar etkileri vardır. İnterlökinler, inflamatuar ve bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesinde, farklılaşmasında ve aktivasyonunda birincil rolü oynar. İnterlökinler çok sayıda protein içerirler ve hücre yüzeylerindeki reseptörlere bağlanarak hücrelerde ve dokularda çeşitli tepkileri indükleyebilirler. Hem parakrin hem de otokrin rolleri vardır (Kotenko and Durbin 2017).

2.14.1 İnterlökinlerin özellikleri

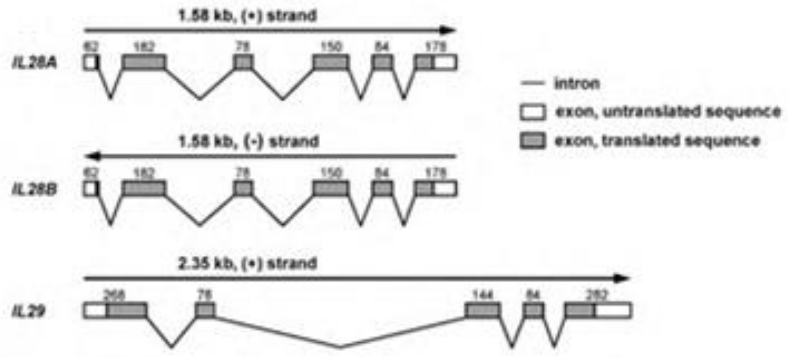
Sitokinler, patojenlere ve diğer antijenlere karşı inflamatuar ve bağışıklık tepkilerini düzenlemek ve yönlendirmek için geliştirilmiş proteinlerdir. İnterlökin sentezi kendi kendini sınırlayan bir işlemdir, mesajcı RNA tarafından kodlanan hemen hemen tüm interlökinler tahmin edilemez ve geçiş sentezini indükler. Bu moleküller bir araya geldikten sonra hızla atılır. Hücresel interlökin reaksiyonları, sitokin reseptör inhibitörlerini kodlayan genlerin işe alınması ve katılımı için yukarı ve aşağı düzenleyici yollara ihtiyaç duyar. İnterlökinler yinelenen işlevselliğe sahiptir. Örneğin, IL-4, IL-5 ve IL-13, B hücreleri için büyüme faktörleridir ve B hücrelerinin farklılaşmasını indükler (Akdis *et al.* 2016). Sitokinler, antikor izotiplerinin B hücrelerine geçişini, Th hücrelerinin Th-1 ve Th-2 alt gruplarına farklılaşmasını ve fagositlerde antiseptik yolların uyarılmasını indükler. İnterlökinler ayrıca interlökinin diğer sentezlerini ve eylemlerini de düzenler. Örneğin, IL-1, IL-2' nin salınmasına katkıda bulunan lenfositlerin aktivasyonunu kolaylaştırır (Kotenko and Durbin 2017). Harici sinyaller veya güçlü afinite reseptörleri, sitokinlere karşı hücresel reaksiyonlar tarafından tetiklenir ve düzenlenir, zira B hücrelerinin patojenik uyarımı, sitokin reseptörlerinin yüksek üretimine yol açar. Sitokinlerin büyük kısmı, sitokini salgılayan aynı hücreye etki eder, örn. IL-2' yi oluşturan T hücreleri, sitokini oluşturan aynı T hücreleri üzerinde veya yakın bir hücre üzerinde hareket eder. Ek olarak, sitokinler kan dolaşımına katılabilir, üretim sahasından uzakta çalışır, örneğin IL-1, merkezi sinir sistemine etki eden ve kararsızlığı indükleyen endojen bir pirojendir (Saraiva *et al.* 2020).

2.14.2 İnterlökin-28/İnterlökin-29 (IL-28/IL-29)

IL-28A, IL-28B ve IL-29 (Tip III interferon olarak da sınıflandırılır), IL-10 interferon sınıfının yeni bir alt ailesidir. Viral enfeksiyon veya bakteriyel elementlerin aktivasyonunu takiben nerdeyse her çekirdekli hücre tipi, özellikle dendritik hücreler tarafından oluşturulurlar ve etkilerini IL-28R1/IL-10R2 reseptör kompleksi aracılığıyla gösterirler. IL-28/IL-29, genlerin yapısı, proteinlerin yapısı ve reseptörlerin kullanımı açısından IL-10 ile ilişkili sitokinlere daha yakın olmakla birlikte, anti-viral tip I interferon benzeri ve sitostatik davranışı sergilerler. Kategori I interferon ile karşılaştırıldığında, IL-28/IL-29' un hedef hücre popülasyonları sınırlıdır ve bunlar esas olarak epitel hücreleri ve hepatositleri içerir. Bu özellikler, IL-28/IL-29' un bakteriyel enfeksiyonlar ve tümörlerde Tip I interferon için olası bir terapötik çözüm olduğunu göstermektedir (Kotenko and Durbin 2017).

2.14.3 IL-28A, IL-28B ve IL-29 genleri

2003 yılında insan IL-28/29'un saptanmasının ardından, genleri (IL-28A, IL-28B, IL-29) da tanımlanmıştır. Kısa bir süre sonra, murine eşdeğerlerinin incelenmesi ile yalnızca IL-28 genlerinin (IL-28A ve IL-28B) fonksiyonel genler olduğu, ancak ilk eksonda bir durdurma kodonunun varlığı ve ekson 2'nin olmaması nedeniyle IL-29' un işlevsel olmadığı göstermiştir (Witte *et al.* 2010). İnsan IL-28A, IL-28B ve IL-29, kromozom 19, 19q13.13'ün uzun koluna oturur ve beş (IL-29) veya altı (IL-28A ve IL-28B) ekzon içerir (Şekil 2.2). Sonuç olarak, gen mimarileri IL-10 benzeri sitokinlerinkileri taklit eder ancak interferonları kodlayan intronsuz genlerin aksinedir (Kotenko and Durbin 2017).



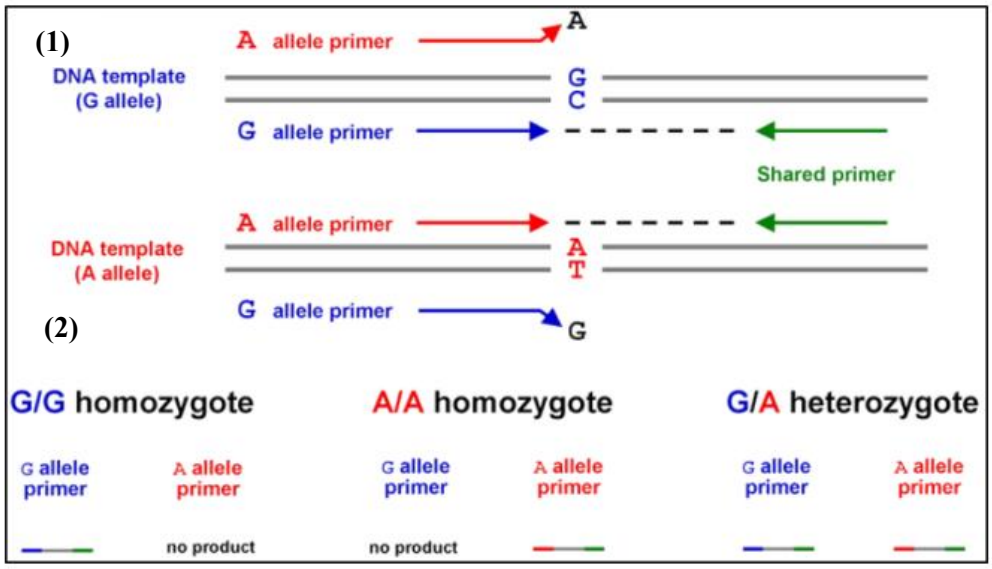
Şekil 2.2 IL-28A, IL-28B ve IL-29 genleri (Witte *et al.* 2010)

2.14.4 İnterferonun tüberkülozdaki rolü

TB' ye yanıt, IFN-y'nin oluştuğu akciğerlere CD4+ ve CD8+ efektör T-hücresi trafiğinin artışı ile optimal olarak tetiklenir. Bu noktada, IFN-y, Tip I IFN'lardan on kat daha fazla şekillenir. MTB, patojenik bir hücre içi mikroorganizma olduğundan, Th1 tipi sitokinler, konakçı savunmasında hücre aracılı bağışıklık tepkilerini inaktive etmede önemli bir role sahiptir (Lazear *et al.* 2019). Bu koşullar altında, IFN-y, T hücrelerinin mobilizasyonu, MHC sınıf II moleküllerinin ekspresyonunun indüklenmesi yoluyla hakim immünomodülatör düzenleyicidir (Korb *et al.* 2016). Antijen sunan hücrelerin çoğalması ve MTB' in çoğalması karşılaştırıldığında, IFN-y hücre çoğalmasını, hücre yapışmasını, apoptozu ve otofajiyi kolaylaştırır. IFN-y, reaktif nitrojen ara maddeleri ve reaktif oksijen ara maddeleri ile solunum patlamasına neden olarak enfekte makrofajlarda mikobakteriyel davranışı iyileştirir (Chin *et al.* 2017). Tip-III IFN' lar ise, MTB enfeksiyonunun düzenlenmesi için gereksizdir ve enfeksiyon kaynağında Th1/Th2 bağışıklık tepkilerinin modülasyonuna yol açabilir. Tip-III IFN' ların, pulmoner TB balgamlı hastalarda, latent olarak enfekte olmuş ve hiç enfekte olmamış sağlıklı bireylere göre yükseldiği kaydedilmiştir (Barathiraja *et al.* 2018).

2.15. Tetra Primer Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Cihazı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tetra primer amplifikasyon refrakter mutasyon cihazı polimeraz zincir reaksiyonu (ARMS PCR) hızlı, etkili ve ekonomik bir laboratuvar sürecinde SNP' leri veya mutasyonları tespit etmek için optimize edilmiştir (Suhda *et al.* 2016). Bu teknikte dış ve iç primer olmak üzere iki set primer kullanılır. Dış primerler konvansiyonel PCR' da olduğu gibi ilgili DNA dizisini izole etmek ve amplifiye etmek için kullanılan primerlerle aynı işleve sahipken, iç primerler alellerdeki varyasyonları saptamak için kullanılmaktadır (Şekil 2.3). Tetra Primer ARMS PCR, tek bir tüpte ve tek bir PCR aşamasında gerçekleştirilir ve ilgili SNP' lerden gelen genotip varyasyonu, ortak elektroforez agaroz jeli kullanılarak doğrudan görselleştirilebilir (Afzal *et al.* 2018).



Şekil 2.3 Tetra primer ARMS PCR tasarımının genelleştirilmiş diyagramı ve sonuçları.

(1) Üst taraf: Ayrı PCR reaksiyonları, yalnızca primerin 3 'ucu, kalıp DNA'nın 5' nükleotidi tamamlayıcı olduğunda, mutant (kırmızı) veya vahşi tip (mavi) primerden uzamaya izin verecek şekilde kurulur. Alele özgü primere ek olarak, her bir ARMS reaksiyonu, her iki reaksiyon için ortak olan ikinci bir primer gerektirir (yeşil).

(2) Alt taraf: Amplifiye DNA'nın varlığı, ayrı vahşi tip ve mutant reaksiyon ürünlerinden elde edilen ürünlerin elektroforezi ile saptanır; mutant (kırmızı) amplifikasyon olmadan vahşi tip (mavi) amplifikasyon, vahşi tip homozigotluğu gösterir; vahşi tip (mavi) amplifikasyon olmadan mutant (kırmızı) amplifikasyon mutant homozigotluğu gösterir ve her iki reaksiyondaki amplifikasyon ürünleri heterozigotluğu gösterir (Kitching and Seth 2005).

2.16 Doğuştan Gelen Bağışıklık Genlerinin Polimorfizmi, Hastalığa Yatkınlık ve Hastalığın İlerlemesi

Bağışıklığı yeterli bir insanda, orijinal bir TB enfeksiyonunun etkileri karakteristik olarak belirtisizdir. Bu nedenle, ilk enfeksiyonun zamanını belirlemek önemlidir. Birincil enfeksiyondan sonra (iki ila on iki haftalık yansımalı iyileşme), TB inaktif kalabilir ya da nadiren klinik hastalığın indüklenmesi ile aktif hale gelebilir. Buna karşın adaptif immün genler hastalığın büyük bir bölümünü sergiler (Lindenau *et al.* 2014). Bazı deneyler, ilk enfeksiyonla olmasada, kalıtsal bağışıklık genlerinin klinik TB

enfeksiyonu ile etkileşimlerini doğrulamıştır. Ek olarak, kalıtsal bağışıklık genlerinin ilk enfeksiyondan klinik enfeksiyona kadar olan gelişimi nasıl etkilediği sorusuna cevap verecek bir kanıt yoktur (Fol *et al.* 2015). Bir ilişki ve etkileşim analizinde interlökin 10 ve tümör nekroz faktörü-alfa reseptörünün, interferon-gama reseptörü 1 ile karşılaştırıldığında, aktif TB hastalığının gelişiminde faktör olduğu belirtilmiştir. Yine, bazı kalıtsal bağışıklık genlerindeki polimorfizmlerin, TB enfeksiyonunun aktif klinik hastalığa ilerlemesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Fol *et al.* 2015).

2.17 Kalıtsal Bağışıklık İçin Gen Polimorfizmlerini Etkileyen Faktörler

Yaklaşık bir asır önce basiller tespit edilmesine rağmen, dünyanın çoğu bölgesinde hala sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Buna parallel olarak konakçı TB direnci hakkında da pek çok açık endişe vardır. Pek çok çalışma, MTB-konak etkileşiminin sonucuna konakçı genetik faktörlerinin karar verdiğini ortaya koymaktadır. C-tipi lektinler, TLR, sitokinler/kemokinler ve bunların reseptörlerini (TNF-α, IFN-y, IL-10, IL-12, vb.), D vitamini reseptörünü, MHC moleküllerini ve proton-bağlı iki değerlikli metal iyon taşıyıcılarını kodlayan genler için iyi kanıtlar mevcuttur. Bu genlerdeki polimorfizm, belirli ailelerde TB geliştirme veya önleme duyarlılığı üzerinde çeşitli etkilere sahiptir (Fol *et al.* 2015).

Daha önce yapılmış olan bir çalışmanın sonuçları, IL-17A rs3819024 AA genotipi, A veya G allelleri ile bunların TB enfeksiyonuna yatkınlıktaki rolleri veya Iraklı Arap popülasyonunda IL-17A'nın gelişimi üzerindeki etkileri nedeniyle TB riski arasında önemli bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur (Ameen *et al.* 2019).

Başka bir çalışma, TLR1 geninde, MTB' e karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisini işlevsel olarak değiştiren ve Hindistan' da TB duyarlılığı ile ilişkili olan tek bir nükleotid polimorfizmini tanımlamaktadır. Sonuçlar, bunun Hint popülasyonunda TB savunması ile ilişkili olduğunu ve *in vitro* olarak MTB lizatına karşı gelişmiş bağışıklık tepkisi sergilediğini göstermektedir (Dittrich *et al.* 2015).

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve pulmoner TB' nin, doğuştan gelen bağışıklıkla ilgili genetik faktörler de dahil olmak üzere çeşitli ortak risk faktörlerini paylaştığı ve TLR4 geninin genetik varyantlarının KOAH ve pulmoner TB' a duyarlılıkta etkisi olduğu, ayrıca altta yatan fonksiyonel SNP' lerin moleküler mekanizmasının aydınlatır (Zhongqi *et al.* 2019).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Cihaz ve ekipmanlar

Çizelge 3.1' de, mevcut çalışmada kullanılan laboratuvar araçları sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Kullanılan laboratuvar araçları

Cihaz	**Menşei**
Terazi	Memmert/Almanya
Santrifüj	Sigma, Harz/ Almanya
Toplama tüpleri	Eppendorf/ Almanya
Jel elektroforez ünitesi	Apelex/Fransa
İnkübatör	Memmert/ Almanya
Mikrosantrifüj	Eppendorf/ Almanya
Mikropipetler	Sigma, Harz/ Almanya
Mikrodalga fırın	Gosonic/Türkiye
Nanodrop	ACT Gene/Avustralya
PCR tüpleri	Eppendorf/ Almanya
Fotoğraf makinesi	Minolta/Japonya
Güç kaynağı	Consort/ABD
Döndürme santrifüjü	Sigma, Harz/ Almanya
Isı döngüleme cihazı	BIO-RAD/ABD
UV aydınlatıcı	Major science/Tayvan
Vorteks	Memmert/ Almanya
Su banyosu	Memmert/ Almanya

3.1.2 Kimyasallar ve biyolojik materyaller

Bu çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik materyaller Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2 Kullanılan kimyasal ve biyolojik materyaller

Kimyasallar	**Menşei**
Agaroz	Promega/ ABD
DNA merdiveni 100 bp	Promega/ ABD
DNA merdiveni 50 bp	Promega/ ABD
Etanol %70	Thermofisher/ ABD
Etidyum bromür	Promega/ ABD
Yüksek çözünürlüklü agaroz	Invitrogen/ ABD
Trisasetat EDTA tamponu	Promega/ ABD

3.1.3 Kitler

Bu çalışmada kullanılan kitler Çizelge 3.3'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.3 Kullanılan kitler

Kitler	**Firma/ Menşei**
DNA ekstraksiyon kiti	Geneaid/Kore
Asit Hızlı Bakteri Boya Kiti	B.D.H. Chemical/İngiltere

3.1.4 Balgam örnekleri

Irak'ın batısındaki Ramadi kentindeki Göğüs Hastalıkları Konsültasyonu Kliniğine başvuranlardan, tüberküloz enfeksiyonunu doğrulamak için rutin muayeneleri (mikroskobik inceleme, bakteri kültürü ve moleküler inceleme) yapıldıktan sonra TB pozitif 100 adet hasta seçildi ve bu hastalardan balgam örnekleri alındı. Hastalar rastgele olarak örneklendi, 51 erkek ve 49 kadın hasta farklı yaş gruplarına ayrıldı. Moleküler biyolojik testler amacıyla TB teşhis edilen 100 hastadan 43 adeti rastgele olarak seçildi. Hastalardan sabah erken 5 mL olacak şekilde balgam örneklerinin toplanması amacıyla steril, plastik, berrak, kırılmaz, sıkı kapaklı ve geniş ağızlıklı infüzyon şişeleri kullanıldı.

3.1.5 Kan örnekleri

Her bir TB hastasından ve kontrol grubundan EDTA' lı tüplere 5 mL kan örneği alındı. DNA ekstraksiyonu için buzdolabında 4 ˚C' de saklandı.

3.1.6 İnsan TLR4 ve IL28B genlerindeki SNP' lerin tespiti için kullanılan primerler

İnsan TLR4 genindeki rs1927911 ve rs10759930 SNP'leri ile insan IL28B genindeki rs8099917 ve rs12979860 SNP' lerinin varlığını saptamak için tetra primer arms PCR tekniğinde kullanılan spesifik primerler, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi Gen Bankasındaki-NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/, 2020) dizilere göre ve ücretsiz çevrimiçi primer tasarım aracı PRIMER 1 (http://primer1.soton.ac.uk/primer1, 2020) ile bu çalışma için tasarlanmıştır. Macrogen/Kore' den satın alınan primerlerin bilgileri Çizelge 3.7 ve 3.8' de sunulmuştur.

Çizelge 3.4 Tetra primer arms PCR tekniği ile insan TLR4 genindeki rs1927911 ve rs4986790 SNP' lerinin tespiti için kullanılan primerler

SNP' ler	Boyut (bp)	Primer	Nükleotid Dizisi (5`-3`)
Rs 1927911	C aleli: 250	İç F	CCAGATTTTGACAACTGCATTCTTGTC
	T aleli : 311	İç R	CTCAAGGGTCAATGAGCCACGA
	İki dış primerin boyutu :510	Dış F	GATACAGAGAAGATGAGCATGGCCC
		Dış R	CAAGGAATTTTGTTGGAGGAAATGA
Rs 10759930	T aleli:160	İç F	GAGAATACCCTTTATGCCTTGGT
		İç R	ATAGTACAGAAAATGGTGCTTTTCAG
	C aleli:219	Dış F	GATGGCACTATGTAGGCTGATTACC
	İki dış primerin boyutu :330	Dış R	GAGTACTCAATGTTTCCCAACTTTT

Çizelge 3.5 Tetra primer arms PCR tekniği ile insan IL28B genindeki rs12979860 ve rs8099917 SNP' lerinin tespiti için kullanılan primerler

SNP' ler	Boyut (bp)	Primer	Nükleotid Dizisi (5`-3`)
Rs 12979860	T alelei 252	İç F	CAGGGAGCTCCCCGAAGGAGT
	C aleli : 307	İç R	AGTGCAATTCAACCCTGGTGCG
	İki dış primerin boyutu: 516	Dış F	ACGAGAGGGCGTTAGAGCGGG
		Dış R	GTTCCCATACACCCGTTCCTGTCCC
Rs 8099917	G aleli:215	İç F	TTGTTTTCCTTTCTGTGAGCAGTG
		İç R	GCATGGTTCCAATTTGGGTAAA
	T aleli:282	Dış F	CCTATAACTTCACCATCCTCCTCTCA
	İki dış primerin boyutu: 451	Dış R	CAATCGCTTTATAAAGGCTTCTGG

3.2 Yöntem

3.2.1 Balgam örneklerinin dekontaminasyonu

Balgam örneklerinin diğer bakteriler, doku ve kimyasallardan dekontaminasyonu N-asetil-L-sistein-sodyum hidroksit (NALC-NaOH) yöntemine göre yapılmıştır. Mikobakteriler için en az düzeyde toksik olması ve en yüksek pozitif verimi sağladığı için dekontaminasyon adımı için bu yöntem tercih edilmektedir. NALC, solüsyonda aktiviteyi hızla kaybettiği için dijestan kullanımdan önce taze olarak hazırlandı. Eşit hacimde %4 NaOH ve %2,9 sodyum sitrat karıştırılarak taze dijestan çözeltisi hazırlandı. Daha sonra 100 mL NaOH-Na sitrat çözeltisi başına 0,5 g NALC tozu ilave edildi. Balgam numuneleri içeren 50 mL'lik falkon santrifüj tüpüne eşit hacimde NALC-NaOH çözeltisi ilave edildi. Dijestan ilave edildikten sonra tüpün kapağı sıkıca kapatıldı ve tüp ara sıra çalkalanarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. pH 6,8' lik

steril fosfat tampon çözeltisi ilave edilerek yaklaşık 50 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 50 mL falkon santrifüj tüpü 3 000 x g' de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, dezenfektan (%3 glutaraldehit) içeren bir kaba atıldı ve pelet 1 mL fosfat tampon çözeltisi ile yeniden süspanse edildi (Bradner *et al.* 2013). Daha sonra bu yeniden süspanse edilmiş pelet; preparat hazırlama, sıvı ve katı kültür ortamına ekim ve moleküler analizler için kullanıldı.

3.2.2 Direkt gözlem (Ziehl-Neelsen yöntemi)

Ziehl-Neelsen; aside dirençli basilleri (ARB), özellikle de Mikobakterileri ayırt etmek için kullanılan bakteriyolojik bir boyama yöntemidir. Mycobacterium gibi aside dirençli organizmaların hücre duvarlarında çok fazla lipid bulunur. Bu bakteriler, Gram boyama gibi başka yöntemlerle boyanmaya karşı dirençlidir (Anonymous 2011).

Ziehl-Neelsen boyama için; bütün işlemler Biyogüvenlik-2 seviyesinde laboratuvarda ve biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi. Bu amaçla:
1.Numune lam üzerine damlatıldı.
2.Lam 10 dakika kurutuldu, 60 °C' de ve 10 dakika ısıyla tespit edildi.
3.Lamın üzerine karbol fuksin damlatıldı, kaynamasına izin verilmeden buhar görünene kadar alev tutuldu.
4. Sıcak lam 3-5 dakika oturmaya bırakıldı ve musluk suyu ile durulandı.
5. %3 hidroklorik asit veya %25 sülfürik asit ile 2 dakika muamele edildi ve 1 dakika süreyle musluk suyu ile durulandı.
6. Lam, metilen mavisi ile 1 dakika muamele edildi.
7. Lam musluk suyu ile durulandı.
8. Preparat kurutulduktan sonra mikroskopta immersiyon objektifi ile 100x büyütmede incelendi.

Bu yöntem ile aside dirençli bakteriler koyu parlak kirmizi renkte, zemini oluşturan hücreler ve diger bakteriler ise mavi renkte boyanmaktadır. Sonuç raporlarının hesaplanması DSÖ standartlarına göre yapılmıştır (WHO, 2011). Yarı nicel raporlama yöntemi Çizelge 3.4' te gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 DSÖ tavsiyesine göre ARB sürüntülerinin derecelendirilmesi

Kayıt	Bulgular
Olumsuz	En az 100 alanda aside dirençli Basil yok
Yetersiz	1-9 Basil/100 alan
Pozitif (1+)	10-99 Basil/100 alan
Pozitif (2+)	50 alanda 1-10 Basil/alan
Pozitif (3+)	En az 20 alanda 10'dan fazla Basil/alan

3.2.3 Kültür yöntemi

Mycobacterium tuberculosis' in geleneksel kültür tekniği ile izolasyonu, bu organizmanın klinik örneklerde saptanması için altın standart olarak kabul edilir. Bu çalışmada, katı kültür ortamı olarak Lowenstein-Jensen besiyeri kullanıldı. Kültür işlemleri Biyogüvenlik-2 seviyesinde laboratuvarda ve biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi.

Yumurta bazlı Lowenstein-Jensen besiyerinin hazırlanması amacıyla; öncelikle bir haftadan eski olmayan yumurtalar sabun çözeltisi kullanılarak el fırçasıyla temizlendi, 15 dakika sabun çözeltisine batırıldı ve ardından akan musluk suyunda iyice durulandı. Temizlenen yumurtalar %70 etanolde 15 dakika bekletildi. Yumurtalar daha sonra steril cam boncuklar içeren steril bir şişeye kırıldı. Yumurtalar homojenize edildi ve dört kat steril gazlı bez ile steril ve dereceli bir silindire süzüldü. Homojenize yumurta çözeltisi hazırlandıktan sonra tuz çözeltisi ve %2 malakit yeşili çözeltisi hazırlanarak otoklavlandı. Yumurta bazlı L-J modifiye besiyeri; steril tuz çözeltisi, %2 malahit yeşili ve homojenize yumurtanın 1000 mL'de karıştırılmasıyla hazırlandı. Yaklaşık 6,7 mL besiyeri McCortney şişesine dağıtıldı. Tüpler eğimli hale getirildi ve 90 °C' de 50 dakika süreyle pıhtılaştırıldı. Tüpler, ortamın sterilliğini kontrol etmek için 35-37 °C' de 48 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra hazırlanan L-J tüpleri, buharlaşmayı önlemek için (hemen kullanılmadığında) kapakları yeterince yakın tutularak soğutuldu.

Hazırlanan balgam örneğinden 100 µL' lik bir kısım, yumurta bazlı L-J besiyeri içeren tüpe aktarıldı ve bakteriyolojik bir öze kullanılarak besiyerinin tüm yüzeyine eşit olarak yayıldı. İnokule edilmiş besiyeri tüpleri, sıvı inokulumlar oluşana kadar yarım saat oda sıcaklığında tutuldu.

İnoküle edilen tüpler eğik pozisyonda 37 °C' de inkübe edildi. İnokulumların kuruması için inkübasyonun ilk 48 saatinde tüplerin kapakları gevşek tutuldu. 48 saat sonra, 5-7 gün içinde ortamın dehidrasyonunu önlemek için tüplerin kapakları sıkıldı, hızla büyüyen mikobakterilerin erken saptanmasına izin vermek ve kontamine kültürlerin derhal çıkarılmasını sağlamak için tüpler incelendi. Tüm kültürler, haftalık büyüme incelemesi ile 8 hafta süreyle inkübe edildi. Bir balgam örneğinde *M. tuberculosis* varlığı veya yokluğu, L-J besiyeri üzerinde koloni morfolojisi gözlemlendi ve başlangıç olarak belirlendi. Tek bir katı kültür ortamında büyümenin skorlanması için DSÖ skorlama kılavuzu (Anonymous 2014) izlendi (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.7 Lowenstein-Jensen besiyerinde DSÖ standartlarına göre kültür sonucunun değerlendirilmesi (Anonymous 2014)

Okuma	**Rapor**
Büyüme yok	Negatif
1-9 koloni	Pozitif, koloni sayısı
20-100 koloni	Pozitif (+1)
100-200 koloni	Pozitif (+2)
200-500 neredeyse birleşik büyüme	Pozitif (+3)
>500 koloni birleşik büyüme	Pozitif (+4)

3.2.4 Moleküler yöntemler

3.2.4.1 GeneXpert MTB/RIF sistemi

Gerçek zamanlı PCR ve ters transkriptaz PCR kullanan GeneXpert Sistemi, numune işlemeyi, nükleik asit amplifikasyonunu ve numunelerdeki hedef dizilerin tanımlanmasını uygular ve otomatikleştirir (Anonymous 2014). Sistemde, kişisel bilgisayarda, barkodda ve önceden yüklenmiş yazılımda, toplanan numuneler üzerinde

testler yapmak ve sonuçları görüntülemek için bir cihaz kullanılır.

Sistem, PCR reaktiflerini tutan ve PCR sürecini barındıran tek kullanımlık GeneXpert kartuşlarının kullanılmasını gerektirir. Kartuşlar bağımsız olduğundan, numuneler arasında çapraz kontaminasyon ortadan kalkar.

GeneXpert MTB/RIF testindeki primerler, 81 baz çifti "çekirdek" bölgesini içeren rpoB geninin bir kısmını yükseltir. Stileler, korunmuş vahşi tip dizi ve RIF'in direnci ile ilişkili çekirdek bölgedeki mutasyonlar arasında ayrım yapabilir (Anonymous 2014).

Çizelge 3.8 Kullanılan reaktifler ve miktarları

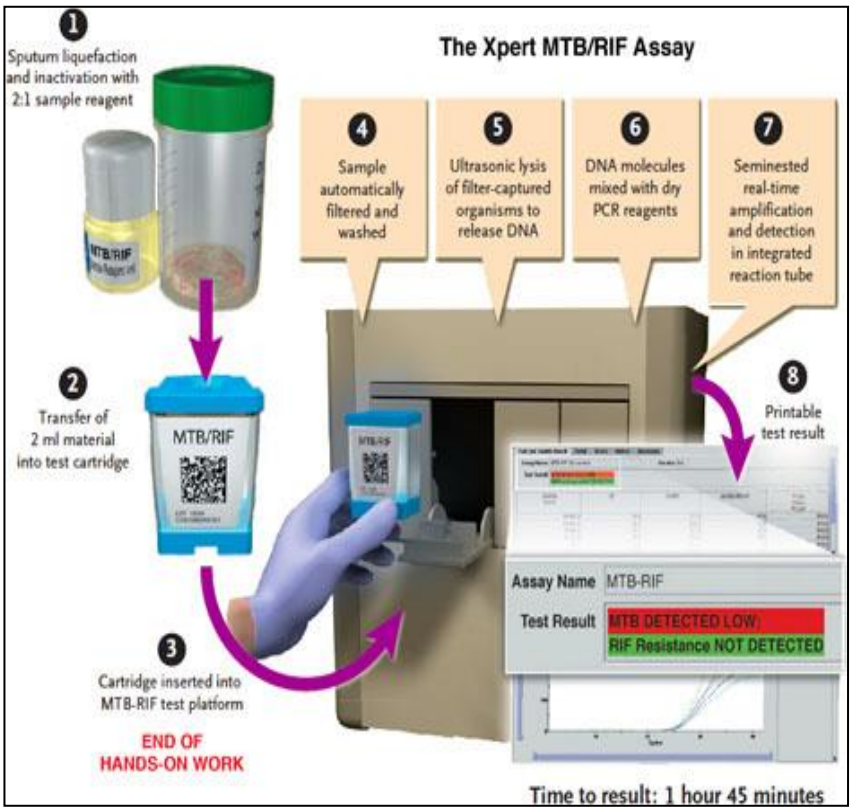
Reaktifler	Miktarları
Tris Tamponu, EDTA	4 mL / (kartuş) başına
Numune reaktifi (sodyum hidroksit ve izopropanol)	10 x 8 mL (şişe)

Xpert MTB/RIF testi için aşağıdaki protokol uygulandı:

1. Eşit balgam hacimleri birleştirildi, çalkalandı ve oda sıcaklığında %4 sodyum hidroksit ile 15 dakika inkübe edildi. Her 5 dakikada bir karışım mekanik bir çalkalayıcı ile çalkalandı.
2. Numune steril bir tüp içinde yüksek hızda (> 13.000 rpm) bir soğutma santrifüjünde 15 dakika santrifüjlendi.
3. Üst faz atıldı ve tortu, karışım pembe rengini kaybetmeden önce, litre (L) başına %37 hidroklorik aist içeren 20 mL fenol kırmızısı solüsyonu damla damla ilave edilerek hemen nötralize edildi.
4. Numune numarası kartuşun üzerine yazıldı.
5. Steril bir pipet kullanılarak Xpert MTB/RIF tüpüne yarım mL resüspansiyon eklendi.
6. Bir buçuk mL Xpert MTB/RIF Numune reaktifi, 0,5 mL yeniden süspanse edilmiş tortu örneğine uygulandı ve 10-20 kez kuvvetlice çalkalandı.
7. Numune oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
8. Kartuşa 2 mL balgam yerleştirildi ve ardından kapatıldı.
9. Yanıp sönen yeşil ışıklı aletin kilidi açıldı ve kartuş yüklendi.

10. GeneXpert DX cihazı etkinleştirildi, kapısı kapatıldı, test başlatıldı ve yeşil ışığın yanıp sönmesi sona erdi.

11. İki saat sonra GeneXpert DX cihazının kapısı açıldı ve veriler okundu.



Şekil 3.1 GeneXpert MTB/RIF testi (Boehme et al., 2010)

3.2.4.2 Kandan DNA ekstraksiyonu

Kan örneklerinden genomik DNA'nın saflaştırılması Geneaid gSYNCTM DNA ekstraksiyon kiti protokolüne göre yapılmıştır. Bu protokole göre:

1. 200 µL' ye kadar kan 1,5 mL' lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak kan örneği hazırlandı.
2. 20 µL proteinaz K, pipetleme ile karıştırılarak ilave edildi ve 60 °C' de 5 dakika inkübe edildi.
3. Numuneye 200 µL GB tamponundan eklendi ve hücre lizizi için 10 saniye vorteksle karıştırıldı.

4. Örnek lizatının temizlendiğinden emin olmak için 60 °C' de 5 dakika inkübe edildi (inkübasyon sırasında tüpler her 2 dakikada bir ters çevrildi).
5. Parçalama esnasında gerekli elüsyon tamponu (örnek başına 200 µL) 70 °C' de önceden ısıtıldı.
6. Numune lizatına, 200 µL mutlak etanol uygulandı.
7.GD kolonu 2 mL' lik toplama tüpüne yerleştirildi, karışım GD kolonuna taşındı ve karışım 2 dakika 14.000 rpm' de santrifüjlendi (2 mL'lik toplama tüpündeki kolon çıkarılarak 2 mL' lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi).
8. Yıkama için, GD kolonuna 400 µL W1 tamponu uygulandı, 14.000 rpm' de 30 saniye santrifüjlendi, kolondan atıldı ve GD kolonu 2 mL' lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
9.GD kolonuna 600 µL yıkama tamponu yüklendi, 14.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi, kolon boşaltıldı ve kuruması için 3 dakika boyunca 14 000 rpm'de santrifüjlendi.
10. Kurutulmuş GD kolonu, temiz 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
11.Kolon matrisinin merkezine 100 µL önceden ısıtılmış elüsyon tamponu eklendi, elüsyonun tamamen emilmesini sağlamak için 3 dakika beklemeye bırakıldı.

3.2.4.3 Tetra primer arms PCR kullanılarak insan TLR4 ve IL28B genlerindeki SNP' lerin tespiti

Tetra primer arms PCR tekniği ile insan TLR4 ve IL28B genlerindeki SNP' lerin tespiti için spesifik primerler kullanıldı. PCR reaksiyonları, steril koşullar altında PCR tüplerinde gerçekleştirildi. Reaksiyon gereksinimlerinin optimum konsantrasyonlarını (MgCl2 1,5 mM, Taq polimeraz 1 U, her biri 200 µM dNTPler) içeren reaksiyon ana karışımı kullanıldı ve hacmi steril PCR suyu ile 25 µl'ye tamamlandı. Tüm amplifikasyon deneylerinde, kalıp DNA dışında PCR reaksiyon karışımının tüm bileşenlerini içeren bir negatif kontrol kullanıldı. Reaksiyon karışımı Çizelge 3.9' da sunulmuştur. Reaksiyonun nihai hacminin 25 µL olduğundan emin olmak ve duvardan damlaları toplamak için karışım 3 saniye santrifüjlendi. Daha sonra, Çizelge 3.10 ve 3.11' de gösterilen ısısal döngü cihazı koşullarında amplifikasyon gerçekleştirildi. Amplifikasyon reaksiyonunun ürününe, %2 konsantrasyonda hazırlanmış olan agaroz

jelde 2 saat boyunca 50 volt ile elektroforez uygulandı. Amplifiye parçanın boyutunu belirlemek için agaroz jelin ilk kuyucuğuna 100bp DNA merdiveni eklenerek oluşan ürünlerin boyutları kontrol edildi.

Çizelge 3.9 TLR4 geni ve IL28B genindeki SNP'lerin tespiti için ana karışımın bileşenleri

Malzeme	**Hacim (µL)**
Ana karışım	5
İç F primer	1,5
İç R primer	1,5
Dış F primer	1
Dış P primer	1
Steril PCR suyu	12
Kalıp DNA	3
Toplam hacim	25

Çizelge 3.10 TLR4 geninde Rs10759930/Rs1927911 tespiti için ısısal döngü cihazı koşulları

Adımlar	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (dk)**	**Döngü sayısı**
İlk denatürasyon	95	3	1
Denatürasyon	95	0:30	35
Bağlanma	60	0:30	
Uzama	72	1	
Nihai uzama	72	5	1
Son	12	∞	

Çizelge 3.11 IL28B geninde rs12979860/rs8099917 tespiti için ısısal döngü cihazı koşulları

Adımlar	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (dk)**	**Döngü sayısı**
İlk denatürasyon	95	3	1
Denatürasyon	95	0:30	35
Bağlanma	58	0:30	
Uzama	72	1	
Nihai uzama	72	5	1
Son	12	∞	

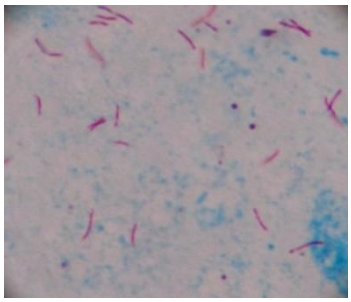
3.2.5 İstatistiksel analiz

Alel frekansları, doğrudan gen sayma yöntemiyle hesaplanırken, iki alel için Hardy-Weinberg (H-W) hesaplayıcısı kullanılarak H-W dengesinden önemli bir sapma olup olmadığı araştırıldı. Gözlenen ve beklenen frekansların yüzdesini önemli ölçüde karşılaştırmak için Ki-kare testi kullanıldı. Grup varyansının anlamlı olup olmadığını test etmek için istatistiksel analiz yapıldı. İstatistiksel anlamlılık * p-değeri≤ 0,05 veya ** $p \leq 0,01$ olarak tanımlandı.

4. BULGULAR

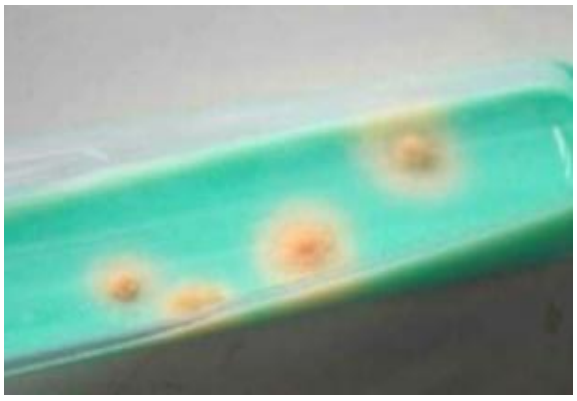
4.1. Direkt Gözlem (Ziehl-Neelsen Yöntemi) ve Kültür Yöntemi Sonuçları

Tüberküloz (pulmoner TB) ile enfekte 100 kişiden toplanan balgam numuneleri doğrudan inceleme yöntemiyle (Ziehl-Neelsen) incelendi. Bakteriler, 100x büyütme gücüne sahip bir ışık mikroskobu altında şekil ve renkleriyle tanımlanmış olup, mavi zemin üzerine kırmızı veya pembe renkli, ince, düz veya hafif kavisli basiller şeklinde izlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Kırmızı Ziehl-Neelsen boyası ile çubuk şeklinde basiller (100x)

Çalışmada, Ziehl-Neelsen yöntemi ile yapılan direkt mikroskopide örneklerin %12' sinin MTB negatif, %88' inin ise MTB pozitif olduğu bulunmuştur. Ayrıca tüm numuneler Lowenstein-Jensen besiyerine ekilmiş ve bakteri kültürü sonuçlarında koloninin rengi, şekli ve dokusuna göre MTB yönünden %100 oranında pozitiflik teşhis edilmiştir (Şekil 4.2). Tüberküloz bakterilerinin saptanmasında katı bakteri kültürü sonuçlarının, direkt mikroskopiye göre daha duyarlı olduğu ortaya konmuştur.



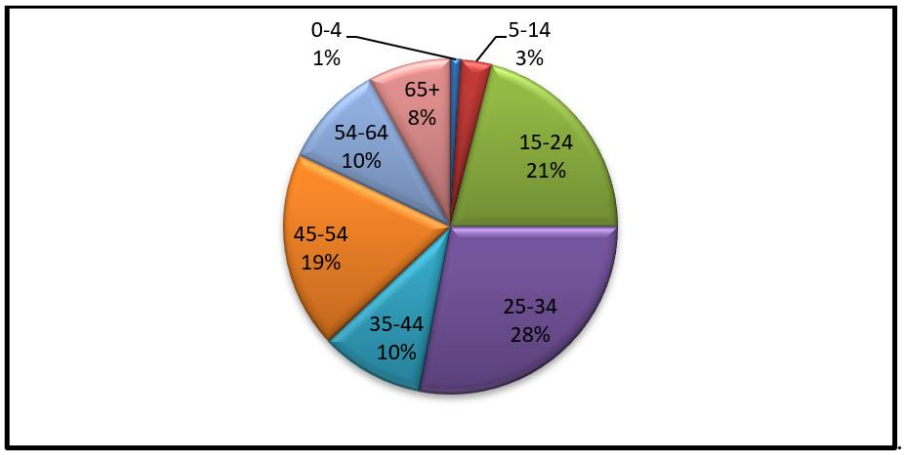
Şekil 4.2 L-J besiyerinde düzensiz, kuru ve krem rengi MTB kolonileri

4.2 Yaşa Göre TB Hasta Sayısı Dağılımı

Bu çalışmada Çizelge 4.1' de görüldüğü üzere yaşları 4 ile 65 yaş üstü arasında bulunan hastalar sekiz ayrı yaş grubuna ayrılmıştır. Şekil 4.3' te gösterildiği gibi sonuçlar, en yüksek hasta birey sayısı yüzdesinin 25-34 yaş grubunda kaydedildiğini ve %28 olduğu, bunu %21 ile 15-24 yaş grubunun, ardından %19 ile 45-54 yaş grubunun takip ettiğini ve 35-44 ve 54-64 yaş gruplarında %10 oranıyla sayıların eşit olduğunu, 5-14 ve 0-4 yaş gruplarının ise sırasıyla 3 ve 1 olarak en düşük oranlar olarak kaydedildiğini ortaya koymuştur.

Çizelge 4.1 Yaş gruplarına göre dağılım olarak hasta sayısı

Yaş Grubu	Hasta Birey Sayısı
0-4	1
5-14	3
15-24	21
25-34	28
35-44	10
45-54	19
54-64	10
65+	8
Toplam	**100**

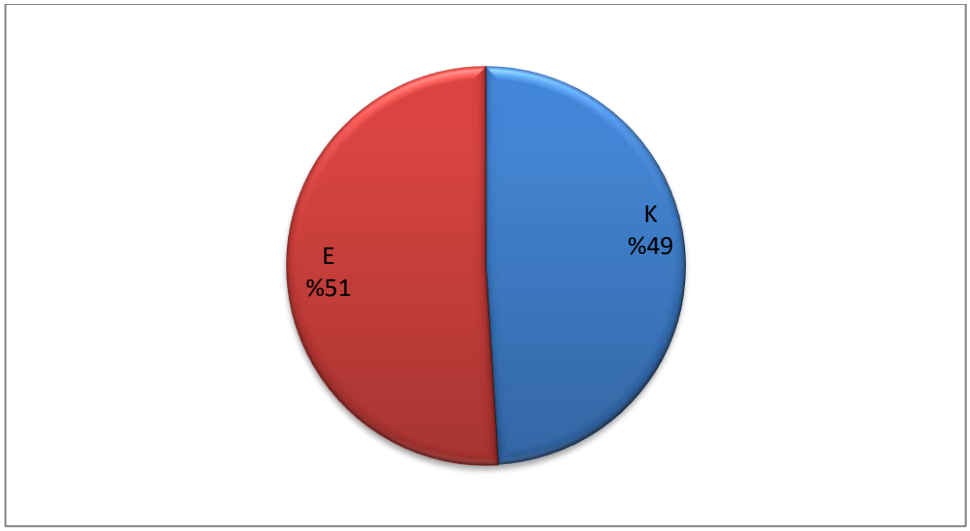


Şekil 4.3 Yaş gruplarına göre hasta birey sayılarının yüzdesi

4.3 Cinsiyete Göre TB Hasta Dağılımı

Şekil 4.4' te gösterildiği gibi, mevcut çalışmanın bulgularına göre erkeklerde enfeksiyon oranı %51 iken kadınlarda %49 olduğu için, her iki cinsiyette de TB insidansında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur ve bu durum cinsiyete göre hastalık ile enfeksiyon paterninde bir değişikliğin olmadığını gösteren önemli bir bulgudur.

Bu çalışmadaki cinsiyete göre TB hasta dağılımı sonucu, Khdban (Khdban 2018) tarafından bildirilmiş olan erkeklerde enfeksiyon oranı %51 iken kadınlarda %49 oranları ile uyumludur.



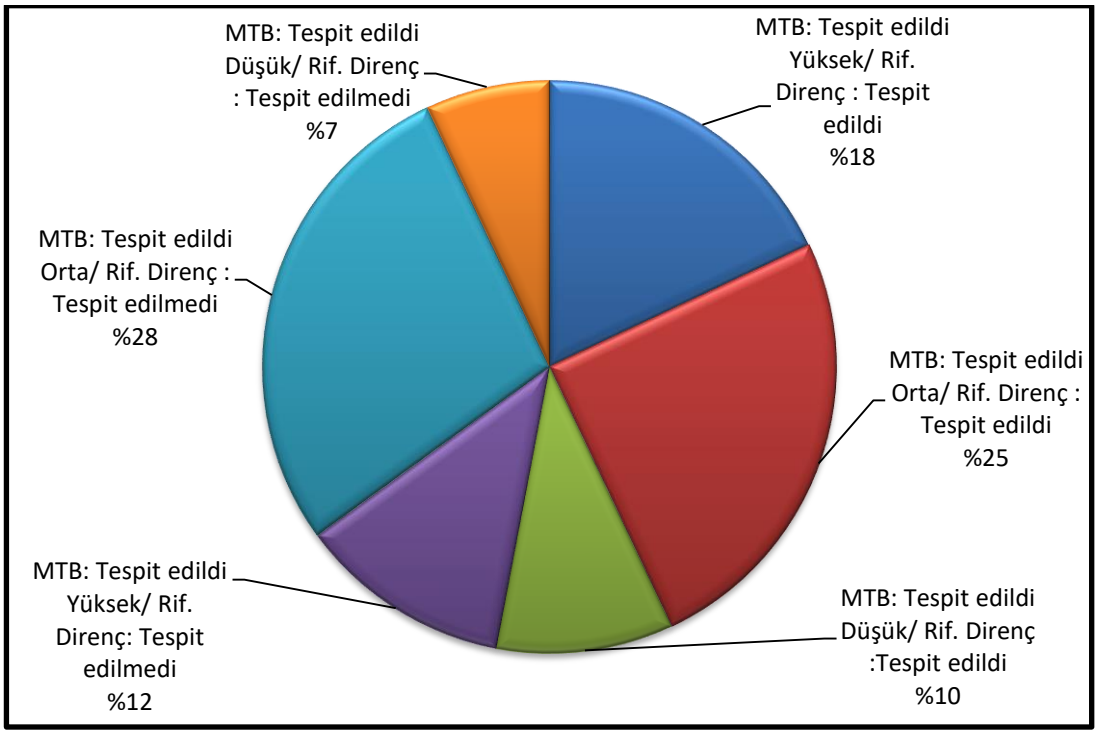
Şekil 4.4 TB hastalarının cinsiyete göre yüzdesi

4.4 GeneXpert MTB/RIF Testi Sonuçları

GeneXpert MTB/RIF, MTB' in varlığının veya yokluğunun, rifampisin direncinin varlığının veya yokluğunun ve basil konsantrasyonunun Ct aralığının (yüksek <16, orta: 16-22, düşük: 22-28, çok düşük: >28) sinyalini gösteren bir testtir (Omote *et al.* 2020). Çıkan sonuçlar, Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5' te gösterildiği gibi 6 seviyede incelenmektedir.

Çizelge 4.2 Enfeksiyon düzeyleri farklı hasta sayılarının GeneXpert sonuçları

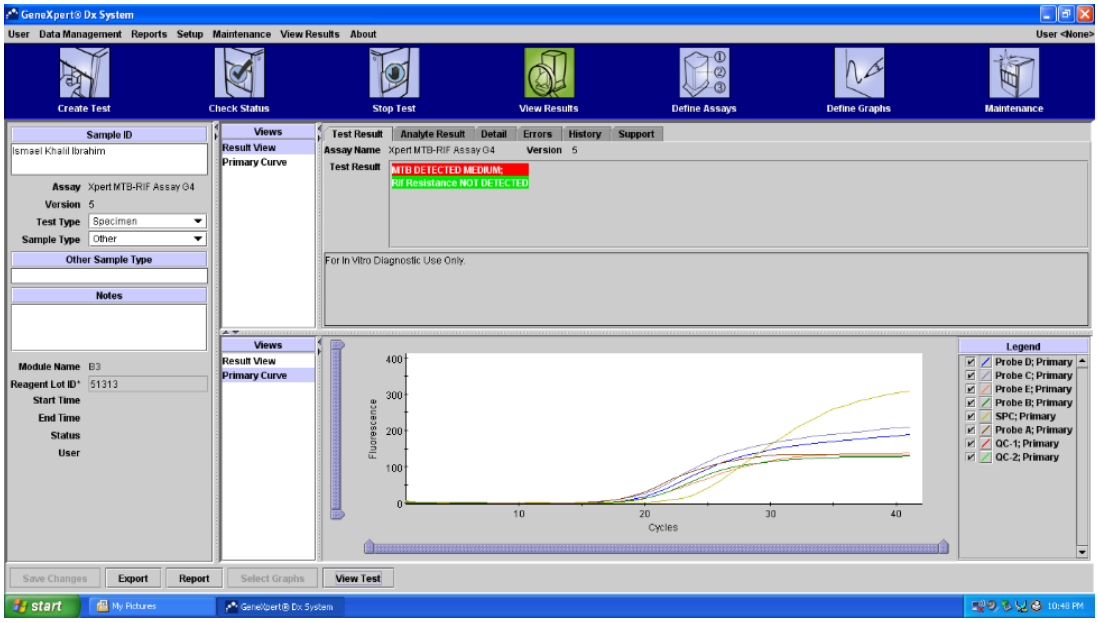
Gene Xpert sonucu	Hasta sayısı
MTB: Tespit edildi Yüksek / Rifampisin Direnç : Tespit edildi	18
MTB: Tespit edildi Orta / Rifampisin Direnç : Tespit edildi	25
MTB: Tespit edildi Düşük / Rifampisin Direnç : Tespit edildi	10
MTB: Tespit edildi Yüksek / Rifampisin Direnç: Tespit edilmedi	12
MTB: Tespit edildi Orta / Rifampisin Direnç : Tespit edilmedi	28
MTB: Tespit edildi Düşük / Rifampisin Direnç : Tespit edilmedi	7
Toplam	100



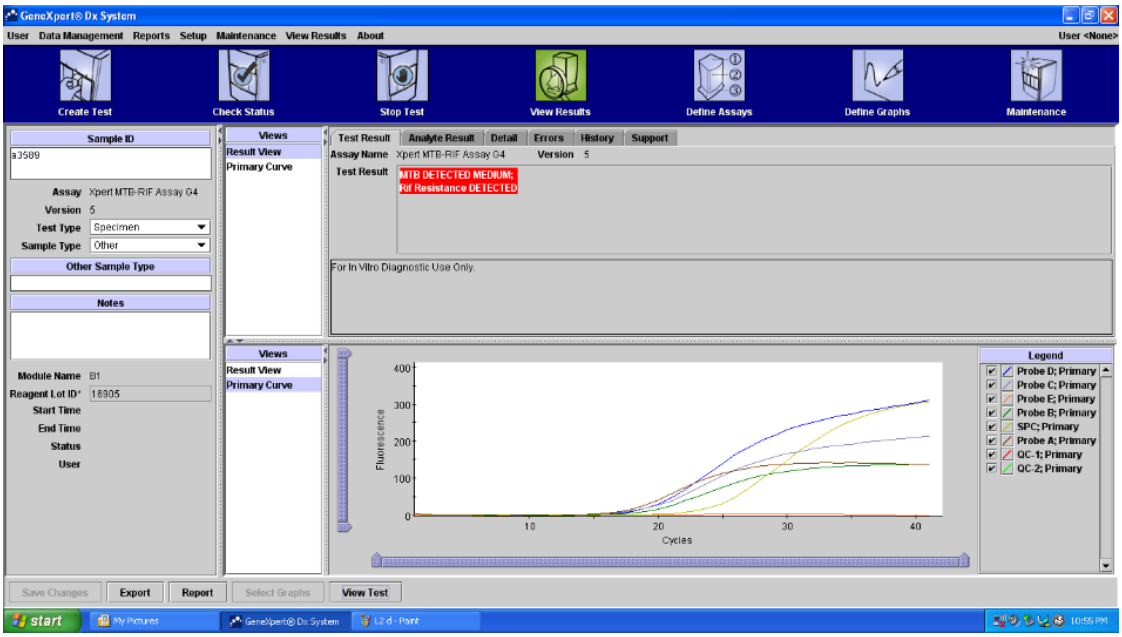
Şekil 4.5 GeneXpert ile enfeksiyon düzeyleri farklı hasta sayılarının seviye dağılımı

Çalışma, Şekil 4.6'da gösterildiği gibi rifampisine duyarlı ve orta düzeyde MTB içeriğine sahip hasta numunelerinin en yüksek yüzdesinin %28, ardından Şekil 4.7' de gösterildiği gibi rifampisine duyarlı olmayan (dirençli) ve orta düzeyde MTB içeriğine sahip numunelerin %25 oranında olduğunu bildirmiştir. Şekil 4.8' de %18 orana sahip rifampisine duyarlı olmayan (dirençli) ve MTB içeriği yüksek olan numuneler ve Şekil 4.9' da %12 orana sahip rifampisine duyarlı ve MTB içeriği yüksek olan numuneler gösterilmiştir. Şekil 4.10' da %10 orana sahip rifampisine duyarlı olmayan (dirençli) ve

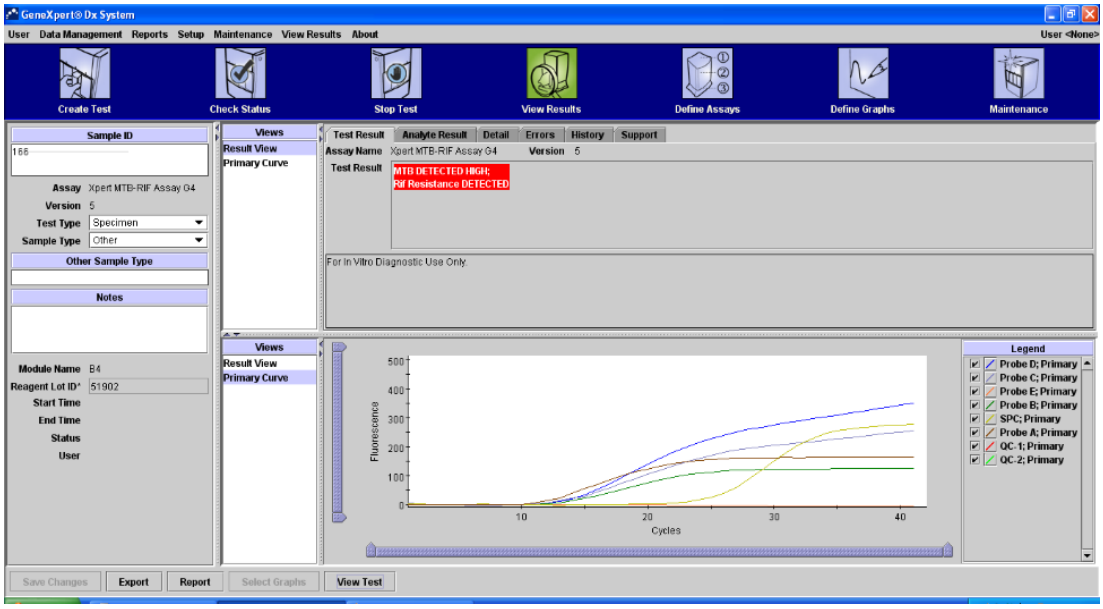
düşük MTB içeriğine sahip numuneler ve Şekil 4.11' de %7 orana sahip rifampisine duyarlı ve düşük MTB içeriğine sahip numuneler gösterilmiştir.



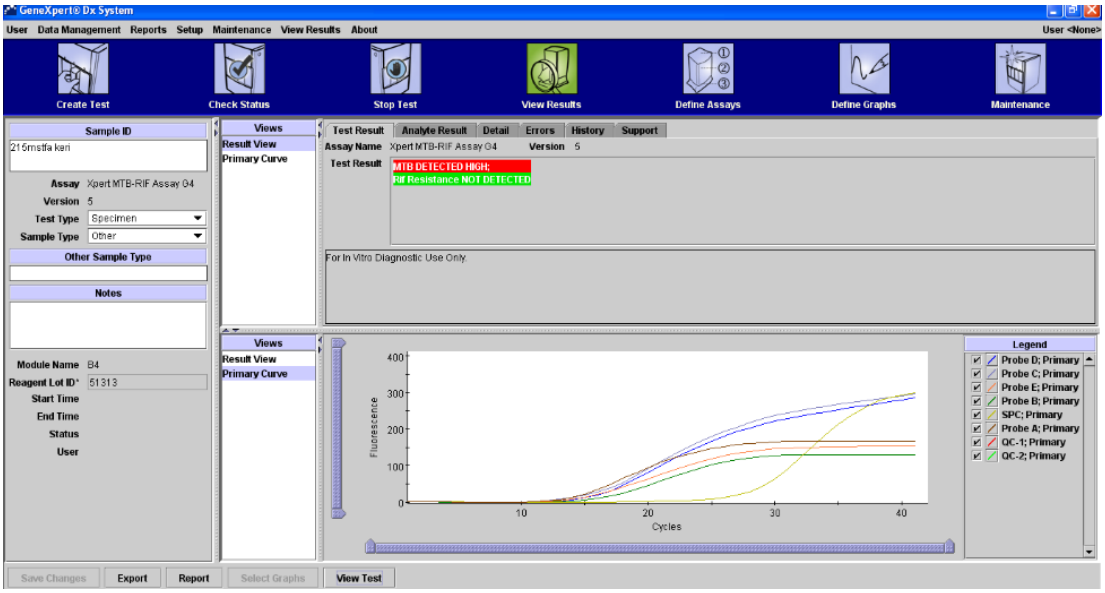
Şekil 4.6 MTB: Tespit edildi Orta / Rif. Direnç: Tespit edilmedi



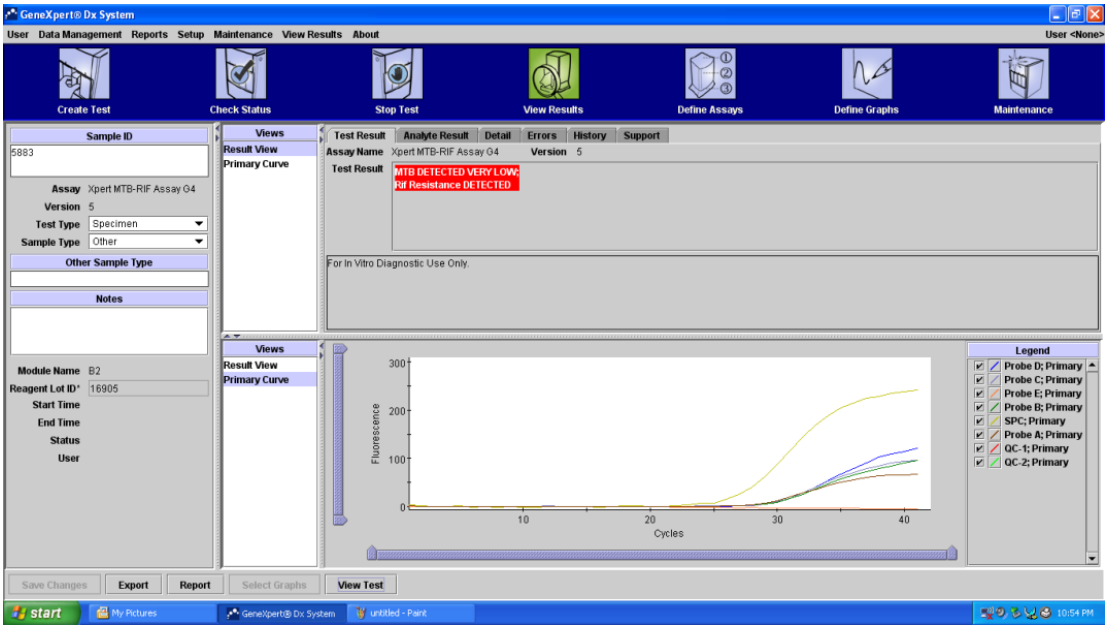
Şekil 4.7 MTB: Tespit edildi Orta / Rif. Direnç : Tespit edildi



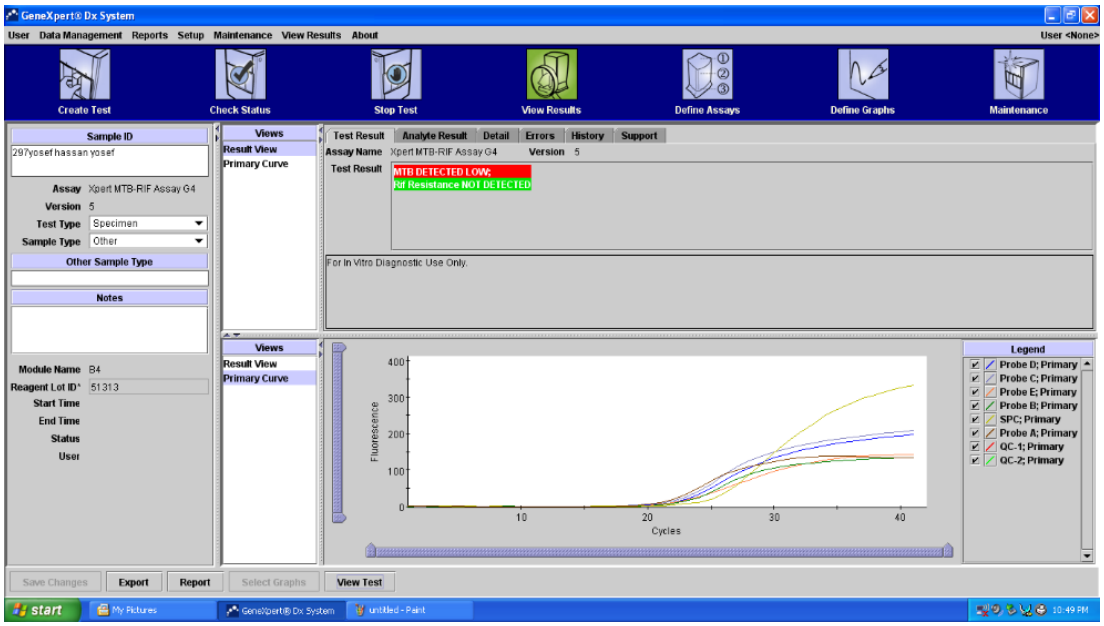
Şekil 4.8 MTB: Tespit edildi Yüksek / Ref. Direnç: Tespit edildi



Şekil 4.9 MTB: Tespit edildi Yüksek / Rif. Direnç: Tespit edilmedi



Şekil 4.10 MTB: Tespit edildi Düşük / Rif. Direnç: Tespit edildi



Şekil 4.11 MTB: Tespit edildi Düşük / Rif. Direnç: Tespit edilmedi

4.5 TLR4 Geninin Genetik Polimorfizmi

Bu çalışmada, TLR4 geninde rs1927911 ve rs10759930 tek nükleotid polimorfizmlerinin araştırılması amacıyla TB kültürü pozitif olan 100 hastadan 43

tanesi ve kontrol grubundan 30 sağlıklı kişi incelendi. Hepsinin periferik kanından genomik DNA ekstrakte edildi ve bu çalışma için özel olarak tasarlanmış spesifik primerler kullanılarak PCR ile hedef DNA amplifiye edildi. TLR4 geninin rs1927911 ve rs10759930 tek nükleotid polimorfizmleri TB hastalarında ve sağlıklı kontrollerde üç genotipte; rs1927911 için CC, CT ve TT ve rs10759930 için TT, TC ve CC bulundu.

4.5.1 TLR4 Geni rs1927911 C>T

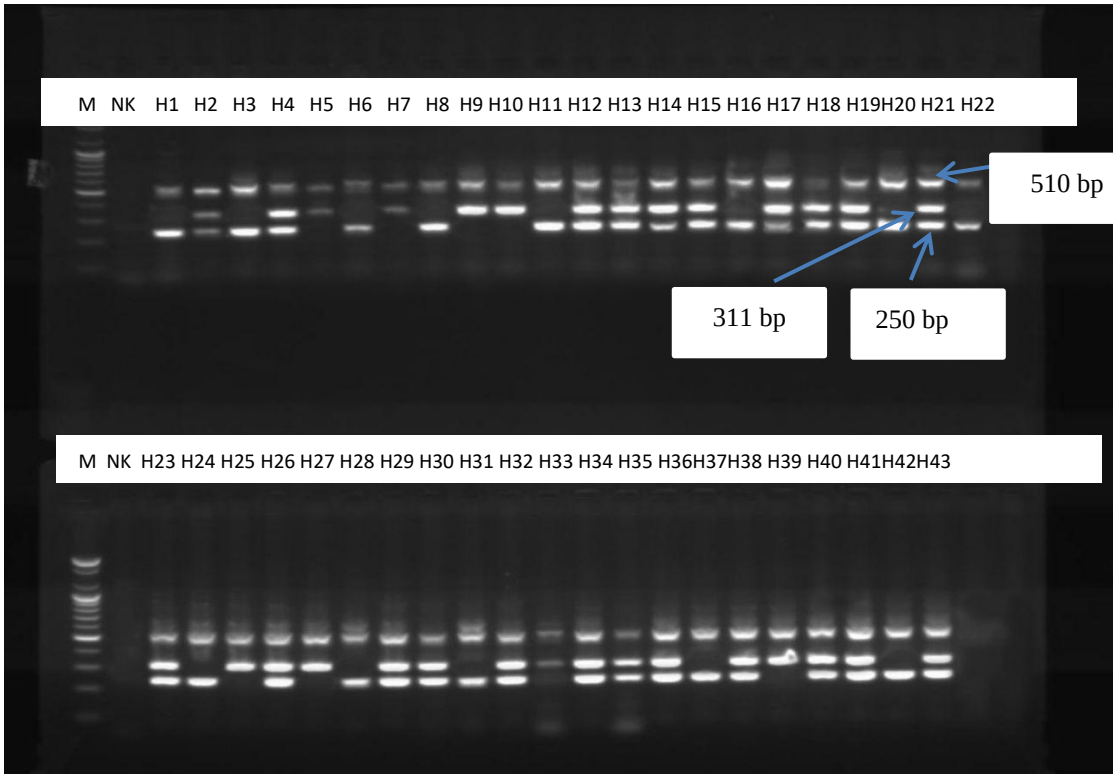
Araştırılan iki grup için rs1927911'in genotip dağılım sıklığı ve alelleri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.12 ile Şekil 4.13' te sunulmuştur. MTB hastaları arasında rs1927911' in CC, CT ve TT genotip frekansları sırasıyla %30, %51 ve %19 iken, sağlıklı kontrol grubunun genotipleri için %60 CC, %32,5 CT ve %7,5 TT olduğu belirlenmiştir. C ve T alelleri, hastalar ve kontroller arasında önemli bir frekans farkı sergilemiştir (OR=%3,959 güven aralığı: 1,774-8,583; p<0,0006).

Çizelge 4.3 rs1927911 için aleller ve genotip dağılımının sıklığı

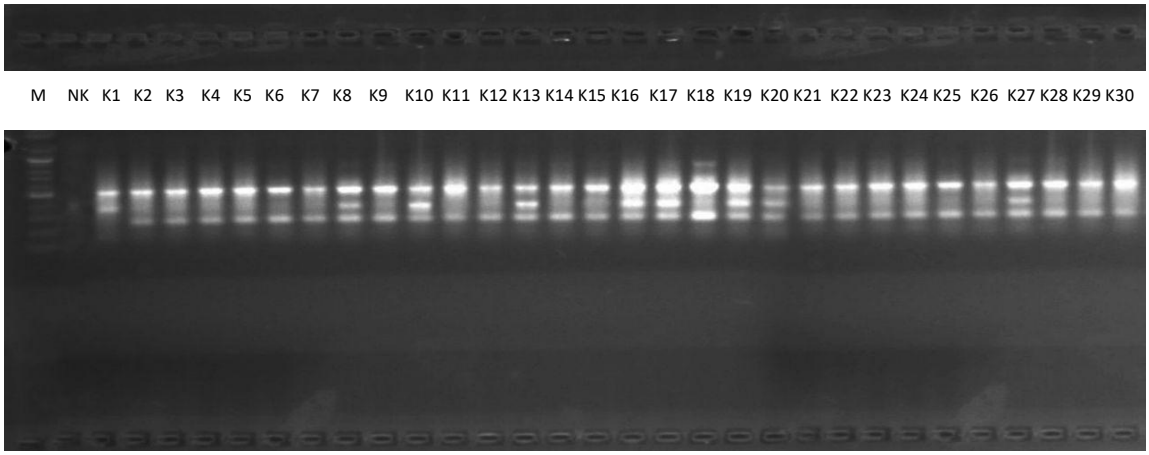
	rs1927911 Genotip Frekansı (%)					
Genotip	**Kontrol n=30**	**Hasta n=43**	**p-değeri**		**Olasılık Oranı**	**%95 Cl**
CC	21 (%60)	13 (%30)	0,0208		0,2786	0.0977 ila 0.7941
CT	8 (%32,5)	22 (%51)	0,0060 **		4,4423	1,4449 ila 115,5796
TT	1 (%7,5)	8 (%19)	0,0221*		12,923	2,1621 ila 32,9812
Ki-kare	0,04801 NS	0,05976 NS				
P Değeri	0,9763	0,9706				
	alel frekansı A%)					
Alel	**Kontrol n=60**	**Vakalar n=86**	**p-değeri**		**Olasılık Oranı**	**%95 Cl**
C	0,83 (50)	0,55 (48)	0,0006 **		3,958	1,744 ila 8,583
T	0,17 (10)	0,45 (38)				

NS=Anlamlı değil, * p değeri ≤ 0,05 olduğunda anlamlı, ** p değeri ≤ 0,01 olduğunda anlamlı.

Kontrol grubundaki TLR4 C<T genotip dağılımı, önemli bir sapma olmaksızın Hardy-Weinberg dengesindedir (p-değeri=0,9763). CC genotipi, kontrol grubunda %60 iken TB vakalarında %30 bulunmuş daha az yaygın olduğu görülmüştür. TT genotipi TB vakalarında %19 ve kontrol grubunda %7,5 bulunarak p-değeri=0,0221 ile anlamlı fark olduğu görülmüştür. TB'lu vakalarda CT sıklığı %51 iken, kontrol grubunda %32,5 bulunarak p-değeri=0,0060 ile fark olduğu görülmüştür. Allel frekansı TLR4 C<T, 3,95'lik bir olasılık oranıyla (%95 güven aralığı, 1,744 ila 8,583) TB vakaları ve kontrol arasında önemli ölçüde farklıdır p-değeri=0,0060. T alleli için homozigot olan hastalarda 12,923'lük bir olasılık oranı (%95 güven aralığı, 2,1621 ila 32,9812) ile pulmoner TB gelişimi açısından anlamlı derecede daha yüksek bir risk söz konusudur p-değeri=0,0221 ve allel T için heterozigot olan hastalarda 4,4423' lük bir olasılık oranı ile pulmoner TB gelişimi için önemli ölçüde daha yüksek risk vardır (%95 güven aralığı, 1,4449 ila 115,5796) p-değeri=0,0060. Dolayısıyla, C<T rs 1927911 geninin sonucu, çalışma popülasyonunda bir risk faktörü olarak bir TB ile ilişkilidir.



Şekil 4.12 TB hastalarında TLR geni (rs1927911) için jel elektroforezi; M:100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; H: TB hastaları (H1-43); C aleli: 250 bp; T aleli: 311 bp ve iki dış primer: 510 bp



Şekil 4.13 Kontrol grubunda TLR geni (rs1927911) için jel elektroforezi; M:100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; K: Kontrol grubu bireyleri (K1-K30); C aleli: 250 bp; T aleli: 311 bp ve iki dış primer: 510 bp

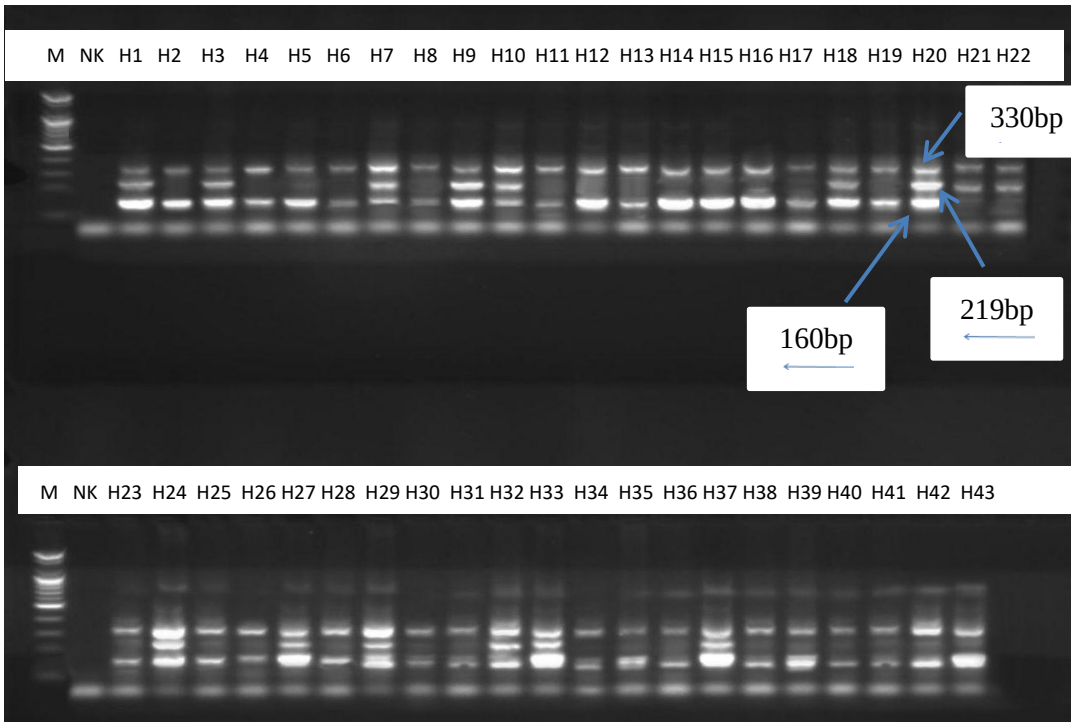
4.5.2 TLR4 Geni rs10759930 T>C

İncelenen iki grup için rs10759930' un genotip dağılım sıklığı ve alelleri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.14 ve Şekil 4.15' te sunulmuştur. TB hastaları arasında rs10759930'un TT, TC ve CC genotip frekansları sırasıyla %65,12, %30,23 ve %4,651, sağlıklı kontrol grubunda ise TT, TC ve CC genotipleri için sırasıyla %73,3, için %26,7 ve %0 bulunmuştur. C ve T aleli, hastalar ve kontroller arasında anlamlı olmayan bir farklı frekans sergilemiştir (OR=%1,601 güven aralığı: 0,6481-3,898; p< 0,3755). Kontrol grubundaki TLR4 T<C genotip dağılımı, önemli bir sapma olmadığı için Hardy-Weinberg dengesindedir (p-değeri=0,7010). TT genotipinin, TB vakalarında %65,12 olup kontrol grubunda tespit edilmiş olan %73,3 ile karşılaştırıldığında daha az yaygın olduğu belirlenmiştir. CC genotipi kontrol grubunda %0 ile, %4,651 tespit edilen TB vakaları ile karşılaştırıldığında daha az yaygın bulunmuştur, ancak bu fark 3,9474' lük bir olasılık oranı (%95 güven aralığı, 0,1803 ila 86,4330) p-değeri=0,3832 ile anlamlı olmadığı belirlenmiştir. TB vakalarında TC genotipi %30,23 ve kontrol grubunda %26,7 olarak tespit edilmiş ve 1,2768' lik bir olasılık oranı (%95 güven aralığı, 0,4500 ila 3,226) p-değeri=0,6461 ile anlamlı bulunmamıştır. TLR4 T<C allel frekansı da 1,601' lik bir olasılık oranı (%95 güven aralığı, 0,6481 ila 3,898) p-değeri=0,3755 ile TB vakaları ve kontrol arasında önemli ölçüde fark olmadığı belirlenmiştir, dolayısıyla TLR4 T<C rs10759930 geni çalışma popülasyonumuzda bir risk faktörü olarak TB ile ilişkili değildir.

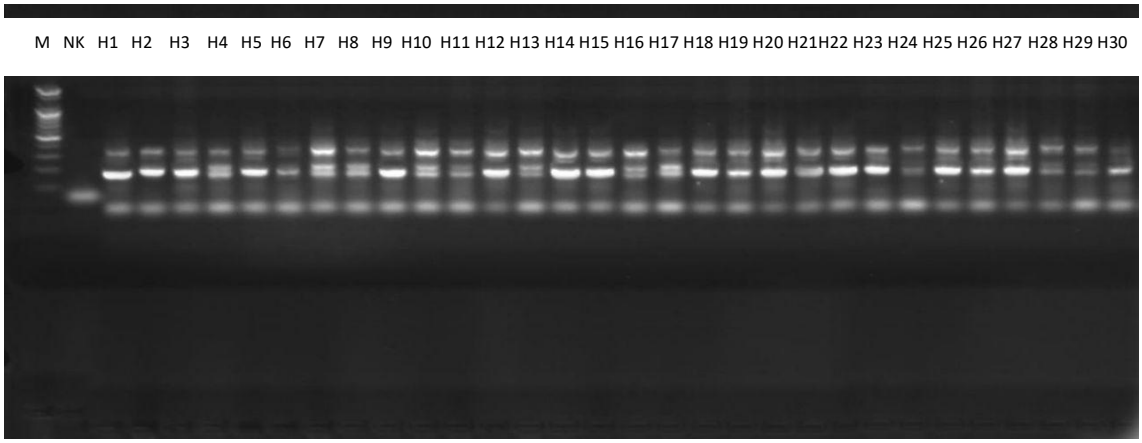
Çizelge 4.4 rs10759930 için aleller ve genotip dağılımının sıklığı

	rs10759930 Genotip Frekansı (%)				
Genotip	**Kontrol n=30**	**Vakalar n=43**	**p-değeri**	**Olasılık Oranı**	**%95 Cl**
TT	22 (%73,3)	28 (%65,12)	0,4582	0,6788	0,2438 ila 1,8895
TC	8 (%26,7)	13 (%30,23)	0,6461 NS	1,2768	0,4500 ila 3,6226
CC	0 (%0)	2 (%4,651)	0,3832 NS	3,9474	0,1803 ila 86,4330
Ki-kare	0,7100 NS	0,09455 NS			
***p* Değeri**	0,7012	0,9538			
Alel frekansı (%)					
Alel	**Kontrol n=60**	**Vakalar n=86**	**p-değeri**	**Olasılık Oranı**	**%95 Cl**
T	0,86 (52)	0,8 (69)	0,3755 NS	1,601	0,6481 ila 3,898
C	0,14 (8)	0,2 (17)			

NS=Anlamlı değil, * p değeri ≤ 0,05 olduğunda anlamlı, ** p değeri ≤ 0,01 olduğunda anlamlı.



Şekil 4.14 TB hastalarında TLR geni (rs10759930) için jel elektroforezi; M: 100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; H: TB hastaları (H1-H43); T aleli: 160 bp; C alleli: 219 bp ve iki dış primer: 330 bp



Şekil 4.15 Kontrol grubunda TLR geni (rs10759930) için jel elektroforezi; M:100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; K: Kontrol grubu bireyleri (K1-K30); T aleli: 160 bp; C alleli: 219 bp ve iki dış primer: 330 bp

4.6 IL28B Geninin Genetik Polimorfizmi

TB hastalarında ve sağlıklı kontrol grubunda, üç genotip (rs12979860 için TT, TC ve CC ve rs8099917 için TT, TG ve GG) ile sunulan, daha önce belirlenmiş farklı referans sekanslarda (rs12979860 ve rs 8099917 için) IL28B geninin iki adet tek nükleotid polimorfizmi belirlendi ve Şekil 4.16, 4.17, 4.18 ve 4.19' da PCR sonrası agaroz jel elektroforezi sonuçları sunuldu.

4.6.1 IL28B Geni rs12979860 T>C

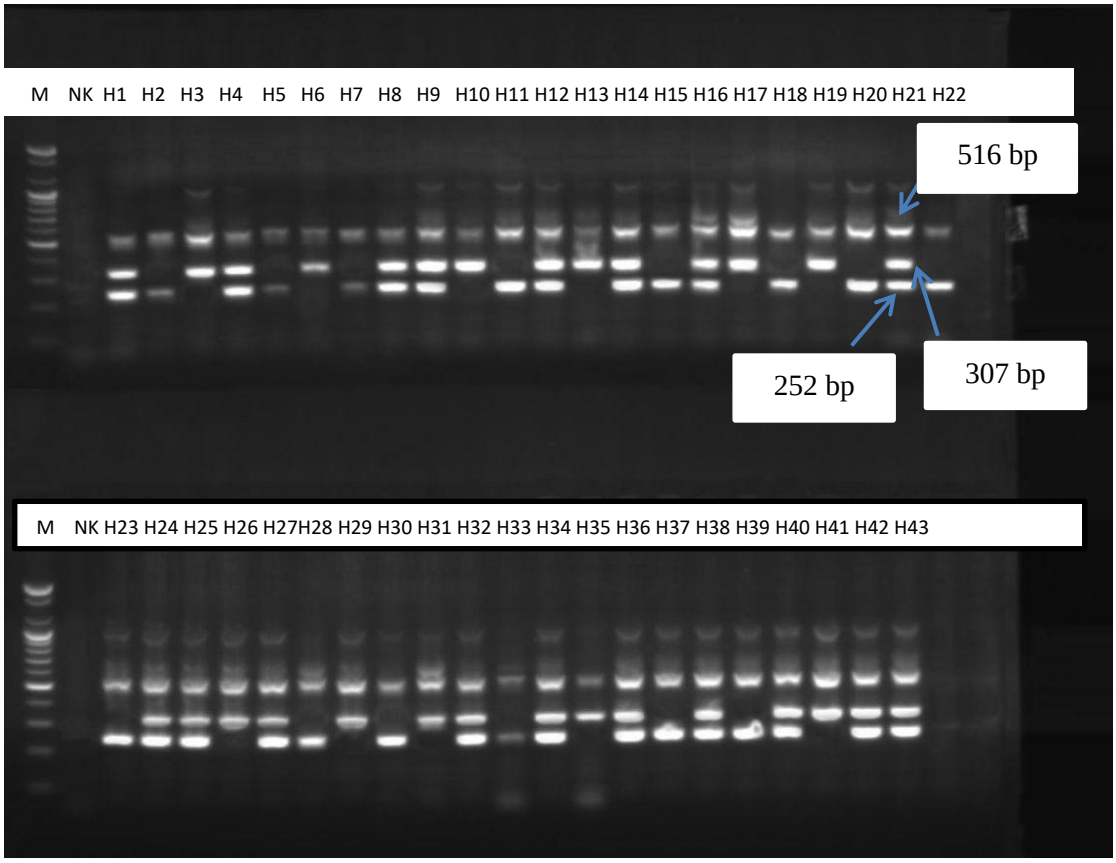
rs12979860' ın genotip dağılımı ve alellerinin sıklığı incelenen iki grup için sonuçlar; Çizelge 4.5 ve Şekil 4.16 ile 4.17' de sunulmuştur. TB hastaları arasında rs12979860' ın TT, CT ve CC genotip sıklıkları sırasıyla %32,56, %41,86 ve %25,58, sağlıklı kontrol grubunun genotipleri TT için %63,33, CC için %13,33 ve CT genotipleri için %23,33 bulunmuştur. C ve T aleli, hastalar ve kontroller arasında önemli bir farklı frekans sergilemiştir (OR=%2,609; güven aralığı: 1,290-5,483; p<0,0095). Kontrol grubundaki IL28B T<C genotip dağılımı, önemli bir sapma olmadığı için Hardy-Weinberg dengesindedir (p-değeri=0,1176). TT genotipi karşılaştırıldığında, TB vakalarında %32,56 oranı ile, %63,33 oranına sahip kontrol grubuna göre daha az yaygın olduğu tespit edilmiştir. CC genotipi ise kontrol grubunda %13,33 oranı ile, %25,58 oranına

sahip TB vakalarından daha az yaygın bulunmuştur, ancak bu farkın p-değeri=0,0534'te 3,7321' lik bir olasılık oranı (%95 güven aralığı, 0,9807 ila 14,2034) ile anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Alel C için heterozigot olan hastalarda pulmoner TB gelişme riski anlamlı olarak daha yüksek iken, TC genotipi TB vakalarında %41,86 oranı ile, kontrol grubu için tespit edilen %23,33 oranından daha fazla bulunmuştur. Farkın, 3,4898'lik bir olasılık oranı ile anlamlı olduğu görülmüştür (%95 güven aralığı, 1,1466 ila 10,621) p-değeri=0,0277. IL28B T<C geninin alel frekansı, TB vakaları ve kontrol arasında 2,609'luk bir olasılık oranı (%95 güven aralığı, 1,290 ila 5,483) ile önemli ölçüde farklı bulunmuştur (p-değeri=0,0095), bu nedenle IL28B geni rs12979860 T<C' nin TB ile ilişkili ve bu çalışma popülasyonunda bir risk faktörü olduğu tespit edilmiştir.

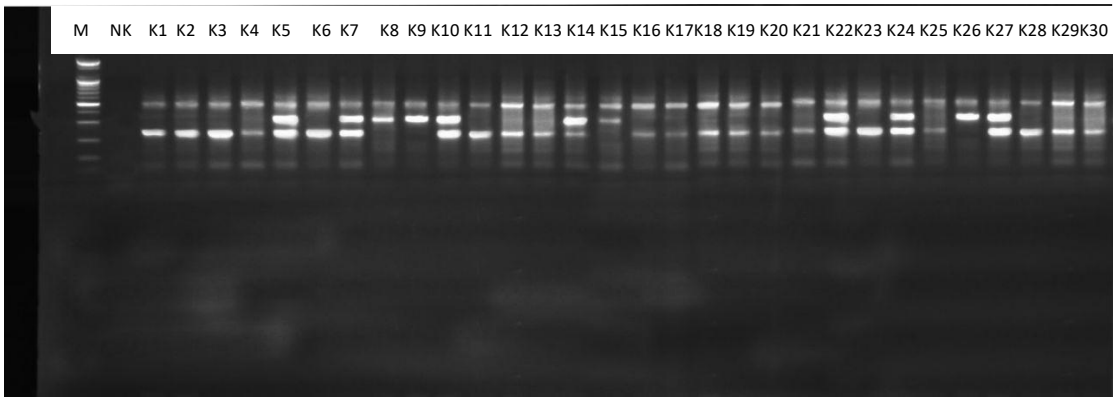
Çizelge 4.5 rs12979860 için aleller ve genotip dağılımının sıklığı

	rs12979860 Genotip Frekansı (%)					
Genotip	**Kontrol n=30**	**Hasta n=43**	**p-değeri**		**Olasılık Oranı**	**%95 Cl**
TT	19 (%63,33)	14 (%32,56)	0,0207		0,2795	0,1050 ila 0,7439
TC	7 (%23,33)	18 (%41,86)	0,0277 *		3,4898	1,1466 ila 10,6213
CC	4 (%13,33)	11 (%25,58)	0,0534		3,7321	0,9807 ila 14,2034
Ki-kare	4,281 NS	1,083 NS				
P değeri	0,1176	0,5819				
	Alel frekansı (%)					
Alel	**Kontrol n=60**	**Vakalar n=86**	**p-değeri**		**Olasılık Oranı**	**%95 Cl**
T	0,75 (45)	0,53 (46)	0,0095 **		2,609	1,290 ila 5,483
C	0,25 (15)	0,47 (40)				

NS=Anlamlı değil, *p ≤ 0.05 değerinde anlamlı, **p ≤ 0.01 değerinde anlamlı.



Şekil 4.16 TB hastalarında IL28B geni (rs12979860) için jel elektroforezi; M: 100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; H: TB hastaları (H1-H43); T aleli: 252 bp; C aleli: 307 bp ve iki dış primer: 516 bp



Şekil 4.17 Sağlıklı Bireylerde IL28B geni (rs 12979860) için jel elektroforezi; M:100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; K: Kontrol grubu bireyleri (K1-K30); T aleli: (252 bp); C aleli: 307bp ve iki dış primer: 516 bp

4.6.2 IL28B Geni rs8099917 T>G

İncelenen iki grup için rs8099917' nin genotip dağılım sıklığı ve alelleri Çizelge 4.6 ve Şekil 4.18 ile 4.19' da sunulmuştur. TB hastaları arasında rs8099917' nin TT, TG ve GG genotip frekansları sırasıyla %69,77, %30,23 ve %0 iken, sağlıklı kontrol grubunun genotipleri TT için %60, TG için %32,5 ve GG için %7,5 bulunmuştur. G ve T aleli, hastalar ve kontrol grupları arasında anlamlı olmayan bir farklı frekans sergilemiştir (OR=%0,8904; güven aralığı: 0,3820-2,245; p<0,8207).

Çizelge 4.6 rs8099917 için aleller ve genotip dağılımının sıklığı

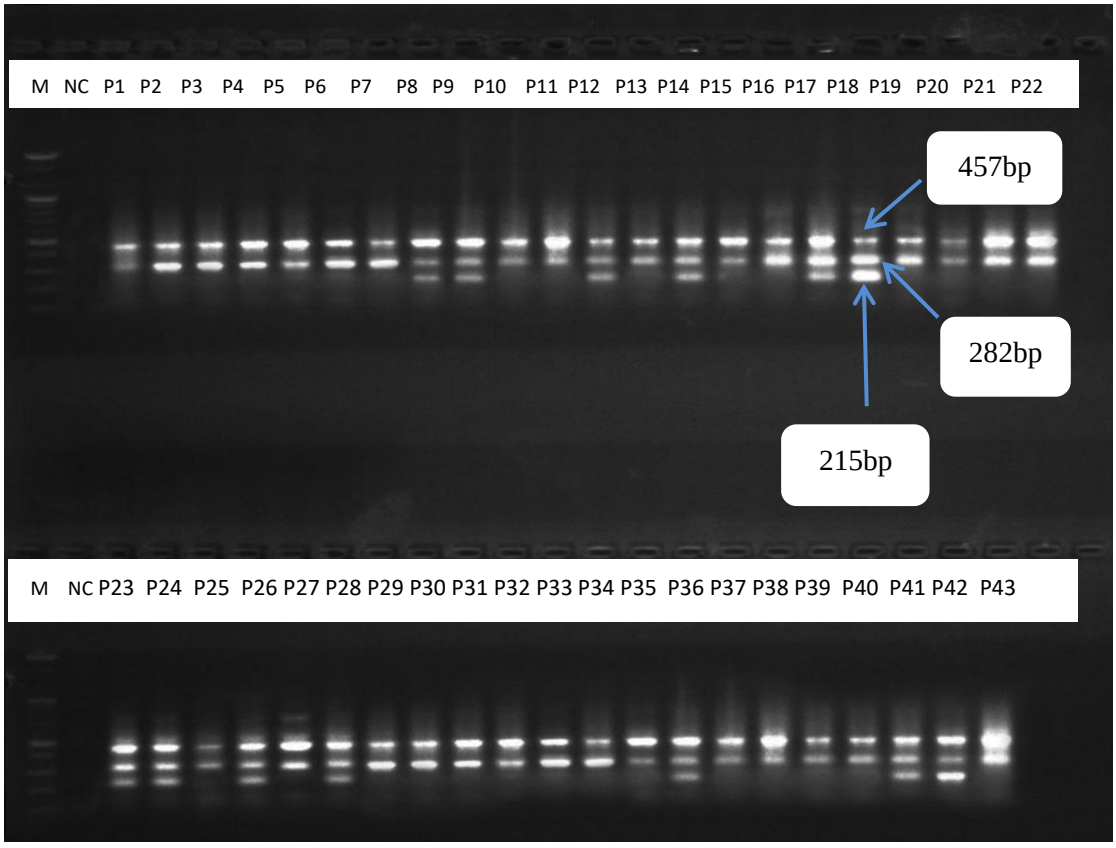
	rs8099917 Genotip Frekansı (%)				
Genotip	**Kontrol n=30**	**Vakalar n=43**	**p-değeri**	**Olasılık Oranı**	**%95 Cl**
TT	21 (%60)	30 (%69,77)	0,9830	0,9890	0,3579 ila 2,7332
TG	8 (%32,5)	13 (%30,23)	0,8086 NS	1,1375	0,4011 ila 3,2261
GG	1 (%7,5)	0 (%0)	0,3821 NS	0,2350	0,0091 ila 6,0474
Ki-kare	0,04801 NS	1,364 NS			
***p* Değeri**	0,9763	0,5057			
Alel frekansı (%)					
Alel	**Kontrol n=60**	**Vakalar n=86**	**p-değeri**	**Olasılık Oranı**	**%95 Cl**
T	0,83 (50)	0,85 (73)	0,8207 NS	0,8904	0,3820 ila 2,245
G	0,17 (10)	0,15 (13)			

NS=Anlamlı değil, * p değeri ≤ 0,05'te anlamlı, ** p değeri ≤ 0,01'de anlamlı.

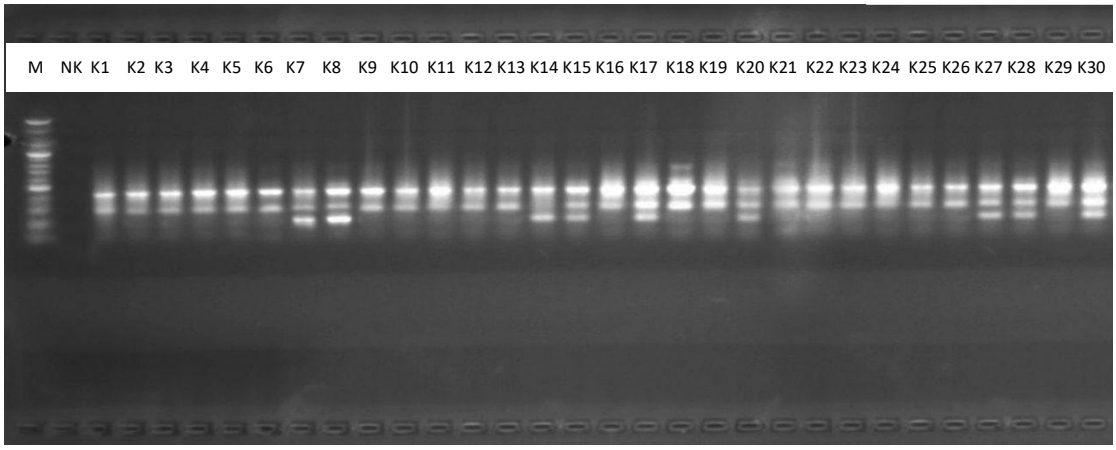
Kontrol grubundaki IL28B T<G genotip dağılımı, önemli bir sapma olmadığı için Hardy-Weinberg dengesindedir (p-değeri=0,9763). TT genotipi, TB vakalarında %69,7 oranı ile, %60 orana sahip kontrol grubuna kıyasla daha yaygın bulunmuştur. GG genotipi TB vakalarında %0 oranı ile, %7,5 oranına sahip kontrol grubuna kıyasla daha

az yaygın bulunmuştur, ancak bu farkın 0,350’ lik bir olasılık oranı (%95 güven aralığı, 0,0091 ila 6,0474) p-değeri=0,3821 ile anlamlı olmadığı görülmüştür. TG genotipinin kontrol grubunda %32,5 oranı ile, %30,23 oranına sahip TB vakalarından daha sık görüldüğü, aynı zamanda 1,1375'lik bir olasılık oranı (%95 güven aralığı, 0,4011 ila 3,226) p-değeri=0,8086 ile anlamlı farklılıklar olmadığı tespit edilmiştir.

IL28B T<G geninin alel frekansı, 0,8904’ lük bir olasılık oranı (%95 güven aralığı, 0,3820 ila 2,245) ile TB vakaları ve kontrol grubu arasında önemli ölçüde farklılık göstermemiştir (p-değeri=0,8207), bu nedenle IL28B geni rs8099917 T<G değildir, TB ile ilişkili değildir ve bu çalışma popülasyonunda bir risk faktörü değildir.



Şekil 4.18 TB hastalarında IL28B geni (rs8099917) için jel elektroforezi; M: 100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; H: TB hastaları (H1-H43); G aleli: (215 bp); T aleli: 282 bp ve iki dış primer: 457 bp



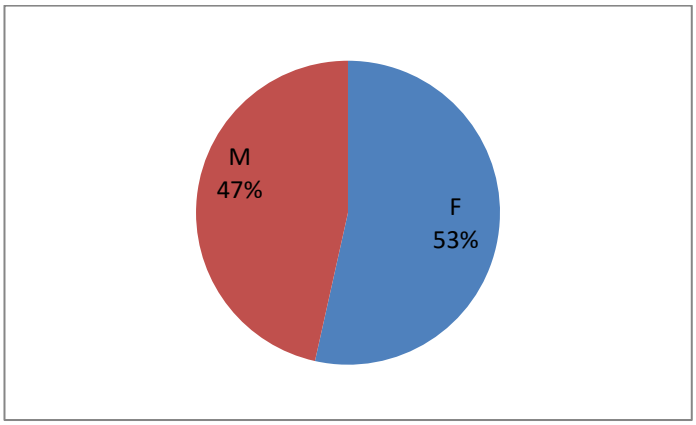
Şekil 4.19 Sağlıklı Bireylerde IL28B geni (rs8099917) için jel elektroforezi**;** M:100 bp DNA merdiveni; NK: Negatif Kontrol; K: Kontrol grubu bireyleri (K1-K30); G aleli: 215 bp; T aleli: 282 bp ve iki dış primer: 457bp

4.7 SNP Sonuçlarının Cinsiyete Göre Dağılımı

Sonuçlar cinsiyete göre 23 kadına (%53), 20 erkek (%47) olarak Çizelge 4.7 ve Şekil 4.20' de görüldüğü gibi dağılmıştır.

Çizelge 4.7 SNP sonuçlarının cinsiyete göre yüzdesi

Cinsiyet	Hasta sayısı
K	23
E	20
Toplam	**43**



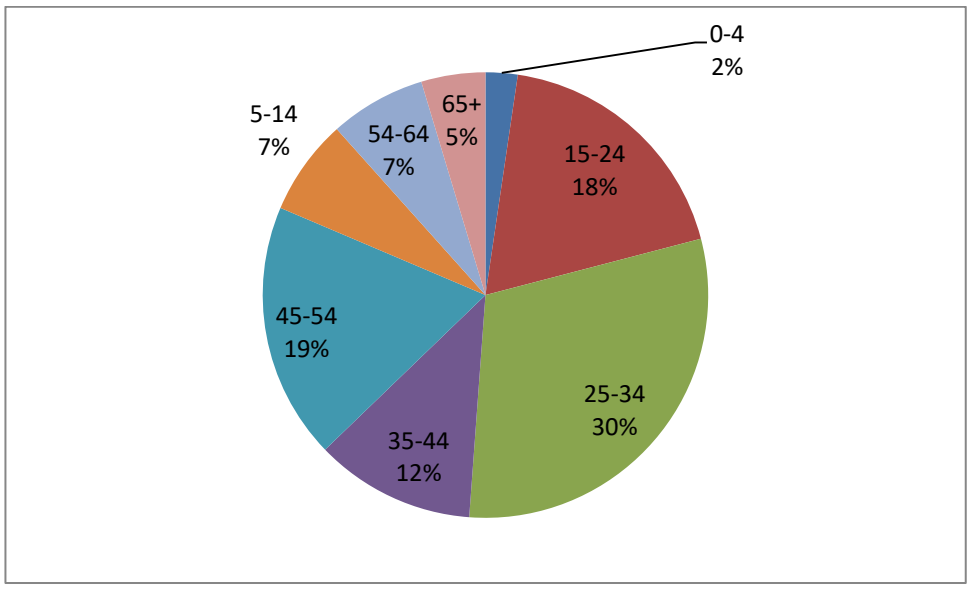
Şekil 4.20 SNP sonuçlarının cinsiyete göre yüzdesi

4.8 SNP Sonuçlarının Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

SNP' lerin çalışıldığı hasta grubunun yaşlara göre dağılımı Çizelge 4.8 ve Şekil 4.21' de gösterilmiştir. Birinci yaş grubunda 1 (%2), ikinci yaş grubunda 8 (%18), üçüncü yaş grubunda 13 (%30), dördüncü yaş grubunda 5 (%12) ve beşinci yaş grubunda 8 (%19), altıncı yaş grubunda 3 (%7) ve yedinci yaş grubunda 3 (%7), sekizinci yaş grubunda ise 2 (%5) hasta tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8 SNP sonuçlarının yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grubu	Hasta Birey Sayısı
0-4	1
15-24	8
25-34	13
35-44	5
45-54	8
5-14	3
54-64	3
65+	2
Toplam	**43**



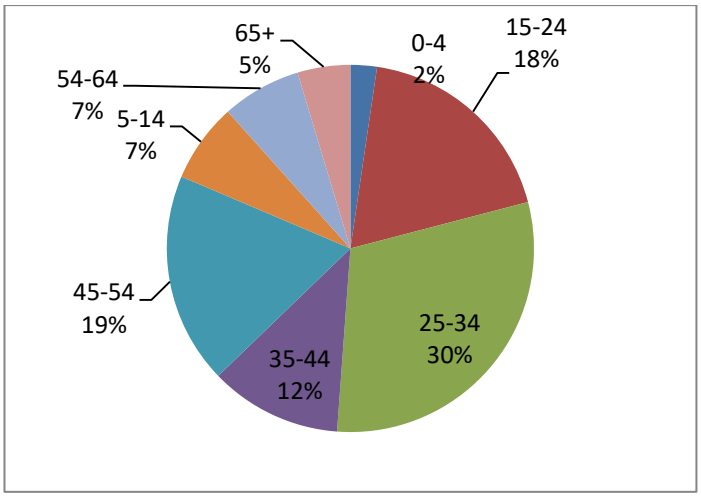
Şekil 4.21 Yaş gruplarına göre hasta birey sayılarının yüzdesi

4.9 SNP Sonuçlarının GeneXpert MTB/RIF Testine Göre Dağılımı

SNP'lerin çalışıldığı hasta grubunun GeneXpert MTB/RIF testine göre sonuçlarının dağılımı Çizelge 4.9 ve Şekil 4.22' de gösterilmiştir. Rifampisin duyarlı olmayan orta düzeyde MTB içeriğine sahip örneklerin sayısının 14 ile en yüksek yüzdeyi oluşturduğu (%32), ardından rifampisine duyarlı orta düzeyde MTB içeriğine sahip örneklerin 11 (%26) ve rifampisine duyarlı yüksek oranda MTB içeriğine sahip örneklerin 7 (%16) olduğu belirlendi. Rifampisine duyarlı olmayan yüksek MTB içeriğine sahip örnekler 5 (%12), rifampisine duyarlı düşük MTB içeriği 4 (%9) ve rifampisine duyarlı olmayan düşük MTB içeriğine sahip numuneler için sayı 2 (%5) bulundu.

Çizelge 4.9 SNP sonuçlarının GeneXpert MTB/RIF testine göre dağılımı

Gene Xpert sonucu	Hasta sayısı
MTB: Tespit edildi Yüksek / Rifampisin Direnç : Tespit edildi	7
MTB: Tespit edildi Orta / Rifampisin Direnç : Tespit edildi	11
MTB: Tespit edildi Düşük / Rifampisin Direnç : Tespit edildi	4
MTB: Tespit edildi Yüksek / Rifampisin Direnç: Tespit edilmedi	5
MTB: Tespit edildi Orta / Rifampisin Direnç : Tespit edilmedi	14
MTB: Tespit edildi Düşük / Rifampisin Direnç : Tespit edilmedi	2
Toplam	**43**



Şekil 4.22 GeneXpert ile enfeksiyon düzeyleri farklı hasta sayılarının seviye dağılımı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, 100 TB hastasından alınmış balgam örneklerinden yapılan direkt mikroskopide örneklerin 12'si negatif, 88'i pozitif bulunmuştur. Pozitif ve negatif örnekler Lowenstein-Jensen besiyerine ekilmiş ve bakteri kültürü sonuçları bütün örnekler için pozitif çıkmıştır. Teşhis için koloninin rengi, formu ve dokusu incelenmiştir.

Direkt mikroskobik incelemenin duyarlılığı %22 ile %76 arasında değişmektedir ve bakterileri teşhis etmek için en az 5.000 ila 10.000 basil/mL gerekliyken, bakteri kültürü testi için 10 basil/mL yeterlidir ve bu da bakteri kültürü testini daha hassas kılmaktadır. Buna rağmen direkt mikroskobik inceleme, özellikle bakteri kültürü sonuçlarının alınmasının uzun sürebilmesi nedeniyle hızı, hazırlanma kolaylığı, düşük maliyeti ve işlem kolaylığı nedeniyle tüberküloz bakterilerinin saptanmasında önemli bir yöntemdir (Minion *et al.* 2011).

5.1. Yaş

Bir risk faktörü olarak yaş, pulmoner TB ile bağımsız olarak ilişkilidir ve TB enfeksiyonunun hastalığa ilerlemesinde rol oynayabilir (Yonge *et al.* 2016). Yaş, PTB insidansı ve prevalansı açısından geleneksel olarak bilinen bir değişkendir. TB'nin mortalite, morbidite ve hastalık çeşitliliği, farklı yaş grupları arasında büyük ölçüde farklılık göstermektedir (Kolappan *et al.* 2007).

Bu çalışmada hastalar yaşları 4 ile 85 yaş üstü arası olmak üzere 8 yaş grubuna ayrıldı. Hastaların dağılımı yaş gruplarına göre olup, Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3' te görüldüğü gibi akciğer tüberkülozlu hasta sayısı bakımından genç grup ilk sırada yer almıştır. 25-34 yaş grubu en yüksek oranı %28 ile kaydederken, bu oran çocuklar arasında %1-3 ile en düşük olmuştur.

Bu çalışmanın bulguları, TB'nin genç yaş grubunda önemli ölçüde daha yaygın olduğunu kaydeden (Khademi *et al.* 2016) ile hemfikir olmuştur; bunun nedeni Irak'ın

sahip olduğu büyük genç nüfusu olabilir. TB'li yaşlıların sayısının genç yaştakilerin sayısından fazla olduğunu ifade eden Zhang ve arkadaşları (Zhang *et al.* 2014) ile Süleymaniye, Irak' ta daha büyük yaş grupları daha fazla etkilendiğini, vakaların %40'ını 55 yaş ve üzeri insanlar olduğunu ve sadece %3'ünün 14 yaşından küçük çocuklar olduğunu işaret eden Karakadhy ve arkadaşları (Karadakhy *et al.* 2016) ile fikir ayrılığı yaşanmıştır. Ayrıca Suudi Arabistan'da (Al-Orainey *et al.* 2013) TB insidansının yaşla birlikte arttığını ve 45 yaşından büyükler için en yüksek olduğunu ifade etmiştir.

0-4 ile 5-14 yaş gruplarındaki hasta sayısındaki azalma BCG aşısına bağlıyken, mevcut çalışmada enfeksiyon oranının 15-24 ve 25-34 yaş gruplarında yüksek olarak kaydedilmesinin sebebi, gençlerin diğer yaş gruplarına göre iş nedeniyle insanların arasına karışma ve sosyal temas kurma olasılığının daha yüksek olduğu gerçeğinin yanı sıra sigara ve diğer risk faktörleri de dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir (Roy *et al.* 2014).

5.2 Cinsiyet

Bu çalışmadaki hasta popülasyonunda Şekil 4.4' te görüldüğü üzere erkeklerde TB enfeksiyon oranı %51 ve kadınlarda %49 bulunmuştur. Sonuçları erkek=%51 ve kadın= %49 olarak bulan Khdban (Khdban 2018) ile uyumlu olduğu, fakat bazılarında erkeklerin kadınlara oranının çok yüksek olduğunu veya kadınların oranının daha yüksek olduğunu belirten önceki birçok çalışma ile örtüşmemektedir (Anonymous 2017). DSÖ (Anonymous 2017), Irak'ta erkeklerin kadınlardan daha fazla etkilendiğini bildirmektedir. Benzer şekilde Arjantin ve Çin'deki diğer birçok çalışmada, erkeklerin kadınlardan daha yüksek TB oranına sahip olduğunu göstermiştir (Rolandelli *et al.* 2017, Wu *et al.* 2020).

Basra'da (Issa and Salman 2017) yakın zamanda görülen pulmoner tüberküloz enfeksiyonunun kadınlarda erkeklerden daha sık olduğunu ortaya koymuştur ve Pakistan'da (Khan *et al.* 2014) yakın zamanda teşhis edilen vakalarda erkeklerin oranının %43 ve kadınlarının %58' inin olduğunun bulunması bu çalışma sonucuyla

benzerlik göstermemektedir. Mevcut çalışmadaki erkekler ve kadınlar arasındaki fark, erkekler arasında topluluk temasının daha yüksek olması ve komorbidite, tütün içimi veya alkol tüketimi gibi TB gelişimi açısından yüksek risk faktörleri ile açıklanabilir (Khan *et al.* 2014).

5.3 GeneXpert MTB/RIF Testi

Sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5' te gösterildiği gibi 6 seviyeye ayrılmıştır. Çalışma, sırasıyla en yüksek yüzdeyi orta MTB içeriği, rifampisine duyarlı olmayan ve orta düzeyde MTB içeriği, rifampisine duyarlı grupları sırasıyla %28 ve %25 olarak bildirirken, en düşük değerler rifampisine duyarlı olan ve MTB içeriği düşük olan ve rifampisine duyarlı olmayan düşük MTB içeriğine sahip örnekler için sırasıyla %9 ve %7 olarak bildirmiştir.

MTB/RIF, simir mikroskopisinden daha yüksek bir duyarlılığa ve güçlü pulmoner tüberkülozu riski olan hastalarda kullanılması gereken bronş yıkama örneklerinde PTB'nin hızlı doğrulanması için karşılaştırılabilir bir doğruluğa sahiptir (Barnard *et al.* 2015). Düşük prevalanslı bir bölgede, tüberküloz hastalarının bulaşma riskinin daha hızlı ve daha kesin yönetimi için simir mikroskopisi yerine GeneXpert MTB/RIF tabanlı bir teknik kullanılmıştır (Opota *et al.* 2016).

5.4 TLR4 Geninin Genetik Polimorfizmi

Sitokinler, hastalığın ilerlemesinde destekleyici bir rol oynar. Bireyler, sitokin atılımına dayalı olarak yüksek veya düşük inflamatuar yanıtı verenler olarak kategorize edilir. Olağandışı TLR sinyali, insan bağışıklık yetmezliği ile bağlantılıdır ve bu, TLR4' ün insan enfeksiyon savunmasında önemli bir işlevi olduğunu düşündürmektedir (Wang *et al.* 2019).

Bu çalışmada TLR4 rs1927911 ve rs10759930 genlerinin iki tek nükleotid polimorfizmlerinin, TB hastalarında ve sağlıklı kontrol gruplarında rs1927911 için CC,

CT ve TT ve rs10759930 için TT, TC ve CC olmak üzere üç genotipte olduğu tespit edilmiştir.

İncelenen iki grup için TLR4 rs1927911 geninin genotip dağılım sıklığı ve alelleri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.12 ve 4.13' te sunulmuştur ve Bulgular bölümünde anlatıldığı üzere, C ve T alelleri, hastalar ve kontrol grubundakiler arasında önemli bir farklı frekans sergilemiştir. T aleli için homozigot olan hastalarda pulmoner TB gelişimi açısından anlamlı derecede daha yüksek bir risk ve alel T için heterozigot olan hastalarda pulmoner TB gelişimi için önemli ölçüde daha yüksek risk olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla TLR4 rs1927911geni için C<T sonucunun, çalışma popülasyonunda bir risk faktörü olarak TB ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

İncelenen iki grup için TLR4 rs10759930 geninin genotip dağılım sıklığı ve alelleri Çizelge 4.4' te sunulmuştur ve Bulgular bölümünde anlatıldığı üzere, C ve T aleli hastalar ve kontrol grubundakiler arasında anlamlı olmayan bir farklı frekans sergilemiştir. Genotipler ve alel sıklığında hastalar ve kontroller arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

TLR' lerin polimorfizmleri ve rolleri, TB dahil olmak üzere çeşitli bulaşıcı hastalıklarla etkileşimler kurmak açısından incelenmiştir. Endonezya ve Vietnam popülasyonlarının meta-analizi, resesif modelde rs352139' un TB ile büyük ölçüde ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu sonuç TLR9 polimorfizminin Asya toplumunda *M. tuberculosis* duyarlılığında kritik bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Kobayashi *et al.* 2012).

TLR2, TLR4, TNFA, IFNG ve IL1B insanlarda tüberküloza karşı koruyucu bağışıklığın bazı anahtar genetik bileşenleridir. Ayrıca; TLR2 rs5743708, TLR4 rs4986791, TNFA rs361525, IFNG rs2430561, IL1B rs1143627 ve diğerleri gibi bağışıklıkla ilgili tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP' ler) hepsinin TB duyarlılığını etkilediği öne sürülmüştür (Manuel Cubillos-Angulo *et al.* 2019).

Meksika' nın Veracruz eyaletinde TB prevalansının oldukça yüksek olduğu bir popülasyonda TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 ve TLR10 genlerindeki polimorfizmlerin TB

duyarlılığı ile ilişkisini araştıran bir çalışmada ortaya konan sonuçlar, güçlü bir bağlantı dengesizliği içinde olan iki yaygın TLR4 SNP'nin (rs4986790, rs4986791) nispeten yüksek bir TB prevalansında aktif TB gelişimi üzerinde önleyici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Ortega *et al.* 2020).

Asya alt grubunda TLR4 rs4986791' in T alelinin de TB riskini arttırdığı (Schurz *et al.* 2015) ve TLR4 Thr399Ile ve TLR9-1486T/C polimorfizmlerinin sinerjik etkilerinin PTB riskini artırabileceği belirtilmiştir (Jahantigh *et al.* 2013).

Çin Tibet popülasyonunda TLR4 SNP, rs12377632 nin (OR=1,30, %95 CI=1,09-1,55, p-değeri=0,004), artan PTB riski ile ilişkili olduğu (Xue *et al.* 2017) ve Sudan'da yapılan bir araştırmada yaygın TLR4 polimorfizmlerinin popülasyondaki TB duyarlılığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Zaki *et al.* 2012).

Bakteriyel enfeksiyonlar ve septik şok sonucu gelişen immun savunmadaki zayıflama, TLR4 genlerindeki polimorfizmlerle ilişkilendirilmiştir. TLR4 polimorfizmleri Asp299Gly ve Thr399Ile Afrika, Asya ve Avrupa popülasyonlarında farklı aralıklara sahiptir. Genetik ve fonksiyonel çalışmalara göre, eş anlamlı olmayan polimorfizm Asp299Gly, sıtmaya karşı bir savunma alel olarak ortaya çıkmıştır. TLR4 genindeki SNP'ler, belirli ekosistemlerdeki adaptif bağışıklığın ve bulaşıcı streslerin genetik ortamı, bağışıklık sistemi kalıplarını ve işlevlerini nasıl şekillendirdiğini göstermektedir (Pandey *et al.* 2018).

5.5 IL28B Geninin Genetik Polimorfizmi

Bu çalışmada, TB hastalarında ve sağlıklı kontrol grubunda daha önce belirlenmiş farklı referans dizilerde (rs12979860 ve rs 8099917) üç genotiple (rs12979860 için TT, TC ve CC ve rs8099917 için TT, TG ve GG) sunulan IL28B geninin iki tek nükleotid polimorfizmi tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5' te, genotip dağılımının sıklığı ve rs12979860 alellerinin çalışıldığı iki grup için elde edilen sonuçlar sunulmuştur ve Bulgular bölümünde anlatıldığı üzere C ve T

alelleri, hastalar ve kontrol grubundakiler arasında önemli bir farklı frekans sergilemiştir. Allel C için heterozigot olan hastalarda pulmoner TB gelişme riski anlamlı olarak daha yüksek ve TC genotipi kontrol grubundan daha yüksek ve önemli bulunmuştur. IL28B T < C geninin allel frekansı, TB vakaları ve kontrol grubu arasında önemli ölçüde farklı bulunmuş, bu nedenle IL28B geni rs 12979860 T < C Şekil 16.4 ve 17.4' de gösterildiği üzere bu çalışma popülasyonunda bir risk faktörü olarak TB ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Araştırılan iki grup için rs8099917' nin genotip dağılım sıklığı ve alelleri Çizelge 6.4' te sunulmuştur. Çizelge 6.4 ve Şekil 4.18 ve 4.19' da gösterildiği ve Bulgular bölümünde anlatıldığı üzere, IL28B geni rs 8099917 T<G' nin bu çalışma popülasyonunda TB ile ilişkili bir risk faktörü olmadığı bulunmuştur.

Kronik hepatit C, antiviral sitokin interferon lambda kodlayan IL28B lokusundaki SNP'ler ile ilişkilendirilmiştir. rs8099917 minör alelinin, kronik Hepatit C virüsü enfeksiyonunun ilerlemesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Rauch *et al.* 2010). Lange ve Zeuzem (Lange and Zeuem 2011), IL28B SNP rs8099917' nin daha yüksek kronik Hepatit C enfeksiyonu ihtimali ile olası bir ilişkisini öne sürmekte, ancak araştırılan SNP'lerin sürekli virolojik yanıt üzerinde varsayılan bir etkisini göstermemektedir. IL28B geninin yakınındaki genetik varyasyonların, Hepatit C' nin spontan ve tedaviye bağlı klirensi üzerindeki güçlü etkisi, Hepatit C virüs enfeksiyonunda IFN-k sinyalinin önemli bir rolüne de işaret etmektedir.

Diğer yandan, Zhao ve arkadaşları (Zhao *et al.* 2020), IL28B polimorfizmleri ile Asyalılar ve Çinlilerde genel olarak Hepatit B virüsü enfeksiyonunun sonucu arasında bir ilişki olmadığını bulmuştur. Bu SNP'lerin, Hepatit B virüsü enfeksiyonunun gelişimi ile ilgili olmayabileceğini belirtmişlerdir.

5.6 Sonuçlar

TLR4 gen polimorfizmlerinin araştırılması ile genotipleri ve alelleri aracılığıyla, hastalıkla ilişkili riski artırarak veya azaltarak (koruyucu etkiler) bireyleri tüberküloza

yatkın hale getirebilecek önemli bir immünogenetik arka planı temsil ettiği belirlenmiştir.

IL28B gen polimorfizmlerinin araştırılması ile, genotipleri ve alelleri aracılığıyla hastalığa bağlı riski artırarak veya azaltarak (koruyucu etkiler) bireyleri tüberküloza yatkın hale getirebilecek önemli bir immünogenetik arka planı temsil ettiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

Abel, L., Fellay, J., Haas, D.W., Schurr, E., Srikrishna, G., Urbanowski, M., Chaturvedi, N., Srinivasan, S., Johnson, D.H., Bishai, W.R. 2018. Genetics of human susceptibility to active and latent tuberculosis: present knowledge and future perspectives. The Lancet Infectious Diseases, 18(3), e64–e75.

Afzal, M., Rahim, A., Naveed, A. K., Ahmed, S., Kiyani, M.M. 2018. Development of cost-effective tetra-primer amplification refractory mutation system (T-ARMS) PCR for the detection of miR-146a gene rs2910164 C/G polymorphism in breast cancer. Biochemistry & Molecular Biology Journal, 04(01), 1.

Ahlawat, S., Sharma, R., Maitra, A., Roy, M., Tantia, M.S. 2014. Designing, optimization and validation of tetra-primer ARMS PCR protocol for genotyping mutations in caprine Fec genes. Meta gene, 2, 439–449.

Akdis, M., Aab, A., Altunbulakli, C., Azkur, K., Costa, R.A., Crameri, R., Duan, S.,Eiwegger, T., Eljaszewicz, A., Ferstl, R., Frei, R., Garbani, M., Globinska, A., Hess, L., Huitema, C., Kubo, T., Komlosi, Z., Konieczna, P., Kovacs, N., Akdis, C.A. 2016. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β, and TNF-α: Receptors, functions, and roles in diseases. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 138(4), 984–1010.

Ali, R.M., Al-Thwani, A.N., Cirillo, D.M., Borroni, E., Mankhi, A. A. 2015. Molecular characterization of multi drug-resistant tuberculosis isolated from Baghdad, Iraq. International Journal of Mycobacteriology, 4, 54–55.

Al-Orainey, I., Alhedaithy, M.A., Alanazi, A.R., Barry, M.A., Almajid, F.M. 2013.Tuberculosis incidence trends in Saudi Arabia over 20 years: 1991-2010. Annals of Thoracic Medicine, 8(3), 148–152.

Al-Quqaili, M.T.S. 2018. Molecular detection of insertion sequence 6110 of Mycobacterium tuberculosis in patients with pulmonary tuberculosis and

tuberculous pleuritis in Anbar governorate, West of Iraq. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 8(3).

Ameen, N.Y., Utba, N.M., Abed, M.Q. 2019. Interleukin-17A rs3819024 gene polymorphism in iraqi arab pulmonary tuberculosis patients. Research Journal of Biotechnology, 14(Special Issue I), 83–88.

Anonymous. 2011. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis policy statement. WHO, March, 1–12.

Anonymous. 2014. Global TB programme World Health Organization.Web sitesi: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/137094/9789241564809_eng.pdf?sequence=1. Erişim tarihi: 01.02.2021.

Anonymous. 2017. WHO EMRO, tuberculosis programmes, Iraq. Web sitesi:http://www.emro.who.int/irq/programmes/tuberculosis.html.Erişim tarihi: 15.12.2021.

Anonymous. 2020. WHO global tuberculosis report 2020. Web sitesi: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-ng.pdf. Erişim tarihi: 15.12.2021.

Barathiraja, S., Gangadhara, P.A.V., Umapathi, V., Dechamma, H.J., Reddy, G.R. 2018. Expression and purification of biologically active bovine Interferon λ3 (IL28B) in Pichia pastoris. Protein Expression and Purification, 145, 14–18.

Behr, M.A., Waters, W.R. 2014. Is tuberculosis a lymphatic disease with a pulmonary portal?. The Lancet Infectious Diseases, 14(3), 250–255.

Bhatt, K., Salgame, P. 2007. Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. Journal of Clinical Immunology, 27(4), 347–362.

Biyikli, O.O., Baysak, A., Ece, G., Oz, A.T., Ozhan, M.H., Berdeli, A. 2016. Role of toll-like receptors in tuberculosis infection. Jundishapur Journal of Microbiology, 9(10), 20224.

Boehme, C. C., Shenai, S., Ph, D., Krapp, F., Allen, J., Tech, B., Tahirli, R., Blakemore, R., Rustomjee, R., Ph, D., Milovic, A., Jones, M., Ph, D., Brien, S. M. O., Ph, D., Persing, D. H., Ph, D., Ruesch-gerdes, S., Gotuzzo, E., … Perkins, M. D. (2010). Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. The New England Journal of Medicine. 1005–1015.

Bradner, L., Robbe-Austerman, S., Beitz, D. C., Stabel, J.R. 2013. Optimization of hexadecylpyridinium chloride decontamination for culture of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from milk. Journal of Clinical Microbiology, 51(5), 1575–1577.

Brodie, D., Schluger, N.W. 2009. Chapter 20-Nucleic acid amplification for detection of Mycobacterium tuberculosis, In: Tuberculosis, A Comprehensive Clinical Reference. Schaaf, H.S and Zumla, A. (eds.), Saunders Elsevier, pp. 197-204, Oxford.

Cao, B., White,J. M., Williams, S.J. 2011. Synthesis of glycoconjugate fragments of mycobacterial phosphatidylinositol mannosides and lipomannan. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 7, 369–377.

Caulfield, A.J., Wengenack, N.L. 2016. Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases, 4, 33–43.

Chai, Q., Zhang, Y., Liu, C.H. 2018. Mycobacterium tuberculosis: An adaptable pathogen associated with multiple human diseases. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8(MAY), 1–15.

Chancellor, A., White, A., Tocheva, A.S., Fenn, J.R., Dennis, M., Tezera, L., Singhania, A., Elliott, T., Tebruegge, M., Elkington, P., Gadola, S., Sharpe, S., Mansour, S. 2017. Quantitative and qualitative iNKT repertoire associations with disease susceptibility and outcome in macaque tuberculosis infection. Tuberculosis, 105, 86–95.

Chin, K.L., Anis, F.Z., Sarmiento, M.E., Norazmi, M.N., Acosta, A. 2017. Role of interferons in the development of diagnostics, vaccines, and therapy for

tuberculosis. Journal of Immunology Research, Volume 2017, Article ID 5212910.

Corral-Fernández, N.E., Cortes-García, J.D., Bruno, R.S., Romano-Moreno, S., Medellín-Garibay, S.E., Magaña-Aquino, M., Salazar-González, R.A., González-Amaro, R., Portales-Pérez, D.P. 2017. Analysis of transcription factors, microRNAs and cytokines involved in T lymphocyte differentiation in patients with tuberculosis after directly observed treatment short-course. Tuberculosis, 105, 1–8.

Dajon, M., Iribarren, K., Cremer, I. 2017. Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. Immunobiology, 222(1), 89–100.

Dhamgaye, T.M., Mishra, G., Deokar, K. 2012. Miliary tuberculosis with bilateral pneumothorax - a case report. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2(6), 492–494.

Dheda, K., Cox, H., Esmail, A., Wasserman, S., Chang, K.C., Lange, C. 2018. Recent controversies about MDR and XDR-TB: Global implementation of the WHO shorter MDR-TB regimen and bedaquiline for all with MDR-TB?. Respirology, 23(1), 36–45.

Ding, P., Li, X., Jia, Z., Lu, Z. 2017. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) disease burden in China: A systematic review and spatio-temporal analysis. BMC Infectious Diseases, 17(1), 1–29.

Dittrich, N., Berrocal-Almanza, L.C., Thada, S., Goyal, S., Slevogt, H., Sumanlatha, G., Hussain, A., Sur, S., Burkert, S., Oh, D.Y., Valluri, V., Schumann, R.R., Conrad, M.L. 2015. Toll-like receptor 1 variations influence susceptibility and immune response to Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis, 95(3), 328–335.

Dutta, N.K., Karakousis, P.C. 2014. Latent tuberculosis ınfection: myths, models, and molecular mechanisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 78(3), 343–371.

Eribo, O.A., Leqheka, M.S., Malherbe, S.T., McAnda, S., Stanley, K., van der Spuy, G. D., Walzl, G., Chegou, N.N. 2020. Host urine immunological biomarkers as potential candidates for the diagnosis of tuberculosis. International Journal of Infectious Diseases, 99, 473–481.

Fitzgerald, D.W., Sterling, T.R., Haas, D.W. 2014. Mycobacterium tuberculosis, In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Bennett, J., Dolin, R., Blaser, M. (eds). Elsevier Inc., Eighth Edi, Vol. 2, New York.

Fol, M., Druszczynska, M., Wlodarczyk, M., Ograczyk, E., Rudnicka, W. 2015. Immune response gene polymorphisms in tuberculosis. Acta Biochimica Polonica, 62(4), 633–640.

Galgani, M., Bruzzaniti, S., Matarese, G. 2020. Immunometabolism and autoimmunity. Current Opinion in Immunology, 67, 10–17. Golden, M.P., Vikram, H.R. 2005. Extrapulmonary tuberculosis: An overview. American Family Physician, 72(9), 1761–1768.

Gröschel, M.I., Sayes, F., Simeone, R., Majlessi, L., Brosch, R. 2016. ESX secretion ,systems: Mycobacterial evolution to counter host immunity. Nature Reviews Microbiology, 14(11), 677–691.

Gutierrez, C., Somoskovi, A. 2014. Human pathogenic mycobacteria, In: Reference Module in Biomedical Sciences (Third Edit). Elsevier Inc. Halezeroğlu, S., Okur, E. 2014. Thoracic surgery for haemoptysis in the context of tuberculosis: What is the best management approach? Journal of Thoracic Disease, 6(3), 182–185.

Hanekom, W.A. 2016. Chapter 18 - Tuberculosis vaccines A2, In: The Vaccine Book (Second Edit). Bloom, B.R. and Paul-Henri Lambert (eds), Elsevier Inc.

Hauser, A.S., Chavali, S., Masuho, I., Jahn, L. J., Martemyanov, K.A., Gloriam, D.E.,Babu, M.M. 2018. Pharmacogenomics of GPCR drug targets. Cell, 172(1–2), 41-54.e19.

Herráez, Ó., Asencio-Egea, M.Á., Huertas-Vaquero, M., Carranza-González, R., Castellanos-Monedero, J., Franco-Huerta, M., Barberá-Farré, J.R., Tenías-Burillo, J.M. 2017. Cost-effectiveness study of the microbiological diagnosis of tuberculosis using geneXpert MTB/RIF®. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 35(7), 403-410.

Issa, A.H., Salman, M.S. 2017. Polymorphism of Interferon gamma promoter and receptor among tuberculosis patients in Basra Province, South of Iraq. Donnish Journal of Medicine and Medical Sciences, 4(1), 1–7.

Jafari, C., Olaru, I.D., Daduna, F., Ernst, M., Heyckendorf, J., Lange, C., Kalsdorf, B. 2018. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by combined molecular and immunological methods. European Respiratory Journal, 51(5).

Jahantigh, D., Salimi, S., Alavi-Naini, R., Emamdadi, A., Owaysee-Osquee, H., arajian-Mashhadi, F. 2013. Association between TLR4 and TLR9 gene polymorphisms with development of pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeastern Iran. The Scientific World Journal, Volume 2013, Article ID 534053.

Javan, M.R., Jalali, N.A.A., Shahraki, S., Safa, A., Aali, H., Kiani, Z. 2016. Cross-talk between the ımmune system and tuberculosis pathogenesis; a review with emphasis on the ımmune based treatment. International Journal of Basic Science in Medicine, 1(2), 40–47.

Jeanes, C., O'Grady, J. 2016. Diagnosing tuberculosis in the 21st century-dawn of a genomics revolution?. International Journal of Mycobacteriology, 5(4), 384–391.

Jee, B. 2020. Understanding the early host immune response against Mycobacterium tuberculosis. Central European Journal of Immunology, 45(1), 99–103.

Jenkins, M.A., Win, A.K., Dowty, J.G., MacInnis, R.J., Makalic, E., Schmidt, D.F., Dite, G.S., Kapuscinski, M., Clendenning, M., Rosty, C., Winship, I. M., Emery, J.D., Saya, S., Macrae, F.A., Ahnen, D.J., Duggan, D., Figueiredo, J.C., Lindor, N.M., Haile, R.W., Hopper, J.L. 2019. Ability of known

susceptibility SNPs to predict colorectal cancer risk for persons with and without a family history. Familial Cancer, 18(4), 389–397.

Jin, Y., Wang, J., Bachtiar, M., Chong, S.S., Lee, C. 2018. Architecture of polymorphisms in the human genome reveals functionally important and positively selected variants in immune response and drug transporter genes. Human genomics, 12(1), 43.

Khdban, M.M. 2018. Isolation and identification of *M. tuberculosis* and detection of polymorphism in multidrug resistance gene. Master thesis, College of Science Diyala University.

Khademi, F., Derakhshan, M., Sadeghi, R. 2016. The role of Toll-like receptor gene polymorphisms in tuberculosis susceptibility : a systematic review and meta-analysis. Review in Clinical Medicine, 3(4), 133–140.

Khan, A.H., Aslam, M.A., Hussain, I., Naz, A.G., Rana, I. A., Ahmad, M.M., Ali, M., Ahmad, S. 2014. Role of Toll-like receptor 2 (-196 to -174) polymorphism in susceptibility to pulmonary tuberculosis in Pakistani population. International Journal of Immunogenetics, 41(2), 105–111.

Khara, J.S., Mojsoska, B., Mukherjee, D., Langford, P.R., Robertson, B.D., Jenssen, H., Ee, P., Newton, S.M. 2020. Ultra-short antimicrobial peptoids show propensity for membrane activity against multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis. Frontiers in microbiology, 11, 417.

Khurshid, S., Afzal, M., Khalid, R., Akhtar, M.W., Qazi, M.H. 2017. Potential of multi-component antigens for tuberculosis diagnosis. Biologicals, 48, 109–113.

Kitching R., Seth A. 2005. Amplification refractory mutation system and molecular diagnostics. In: Medical Biomethods Handbook. Walker, J.M. and Rapley, R. (eds), Springer Protocols Handbooks, Humana Press, pp. 155-165, New Jersey.

Kobayashi, K., Yuliwulandari, R., Yanai, H., Naka, I., Lien, L.T., Hang, N.T.L., Hijikata, M., Keicho, N., Tokunaga, K. 2012. Association of TLR

polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females. Tissue Antigens, 79(3), 190–197.

Kolappan, C., Gopi, P.G., Subramani, R., Narayanan, P.R. 2007. Selected biological and behavioural risk factors associated with pulmonary tuberculosis. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 11(9), 999–1003.

Korb, V.C., Chuturgoon, A.A., Moodley, D. 2016. Mycobacterium tuberculosis: manipulator of protective immunity. International Journal of Molecular Sciences, 17(3).

Korneev, K.V., Atretkhany, K.S.N., Drutskaya, M.S., Grivennikov, S.I., Kuprash, D. V., Nedospasov, S.A. 2017. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. Cytokine, 89, 127–135.

Kotenko, S.V., Durbin, J.E. 2017. Contribution of type III interferons to antiviral immunity. Journal of Biological Chemistry, 292 (18), 7295–7303.

Kwok, P.Y., Chen, X. 2003. Detection of single nucleotide polymorphisms. Current Issues in Molecular Biology, 5(2), 43–60.

Lange, C.M., Zeuzem, S. 2011. IL28B single nucleotide polymorphisms in the treatment of hepatitis C. In Journal of Hepatology, 55(3), 692–701.

Laughon, B.E., Nacy, C.A. 2017. Tuberculosis-drugs in the 2016 development pipeline. In Nature Reviews Disease Primers, 3(1), 1–1).

Lazear, H.M., Schoggins, J.W., Diamond, M.S. 2019. Shared and distinct functions of type I and type III interferons. Immunity, 50(4), 907–923.

Lienhardt, C., Kraigsley, A.M., Sizemore, C.F. 2016. Driving the way to tuberculosis elimination: the essential role of fundamental research. Clinical Infectious Diseases, 63(3), 370–375.

Lindenau, J.D., Guimarães, L.S.P., Friedrich, D.C., Hurtado, A.M., Hill, K.R., Salzano, F.M., Hutz, M.H. 2014. Cytokine gene polymorphisms are associated with

susceptibility to tuberculosis in an Amerindian population. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 18(8), 952–957.

Maass, P.G., Barutcu, A.R., Shechner, D.M., Weiner, C.L., Melé, M., Rinn, J.L. 2018. Spatiotemporal allele organization by allele-specific CRISPR live-cell imaging (SNP-CLING). Nature Structural and Molecular Biology, 25(2), 176–184.

Machado, D., Girardini, M., Viveiros, M., Pieroni, M. 2018. Challenging the drug-likeness dogma for new drug discovery in Tuberculosis. In Frontiers in Microbiology, Vol. 9, Issue JUL. Frontiers Media S.A.

Manuel Cubillos-Angulo, J., Arriaga, M.B., Silva, E.C., A Müller, B. L., P Ramalho, D. M., Fukutani, K.F., C Miranda, P.F., Moreira, A.S., Ruffino-Netto, A., Lapa-Silva, J.R., Sterling, T.R., Kritski, A.L., Oliveira, M.M., Andrade, B B., Gonçalo-Moniz, I., Oswaldo-Cruz, F. 2019. Clinical infectious diseases polymorphisms in TLR4 and TNFA and risk of Mycobacterium tuberculosis infection and development of active disease in contacts of tuberculosis cases in Brazil: a prospective cohort study. Clinical Infectious Diseases, 69(6):1027-1035.

Minion, J., Pai, M., Ramsay, A., Menzies, D., Greenaway, C. 2011. Comparison of LED and conventional fluorescence microscopy for detection of acid fast bacilli in a low-incidence setting. PLoS ONE, 6(7), e22495.

Nancy Hilda, J., Das, S. 2018. Neutrophil CD64, TLR2 and TLR4 expression increases but phagocytic potential decreases during tuberculosis. Tuberculosis, 111, 135-142.

Nathavitharana, R.R., Lederer, P., Tierney, D.B., Nardell, E. 2019. Treatment as prevention and other interventions to reduce transmission of multidrug-resistant tuberculosis. The international journal of tuberculosis and lung disease. The Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease, 23(4), 396–404.

NCBI, 2020. Web sitesi. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ Erişim Tarihi: 10.07.2020.

Nicas, M., Nazaroff, W.W., Hubbard, A. 2005. Toward understanding the risk of secondary airborne ınfection: emission of respirable pathogens. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 2(3), 143–154.

O'Driscoll, D.N., De Santi, C., McKiernan, P.J., McEneaney, V., Molloy, E.J., Greene, C.M. 2017. Expression of X-linked Toll-like receptor 4 signaling genes in female vs. male neonates. Pediatric Research, 81(5), 831–837.

Omote, V., Ukwamedua, H.A., Oshilonya, H.U., Bini, N., Ugwuoke, H.C., Usiobeigbe, S.O., Omoviye, E.O., Nkama, I.V., Ogbodo, E.C. 2020. Frequency and distribution of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates using Gene Xpert MTB/RIF in Delta State, South-South Nigeria. Discoveries Reports, 3, e11.

Opota, O., Senn, L., Prod'hom, G., Mazza-Stalder, J., Tissot, F., Greub, G., Jaton, K. 2016. Added value of molecular assay Xpert MTB/RIF compared to sputum smear microscopy to assess the risk of tuberculosis transmission in a low-prevalence country. Clinical Microbiology and Infection, 22(7), 613–619.

Ortega, E., Hernández-Bazán, S., Sánchez-Hernández, B., Licona-Limón, I., Fuentes-Dominguez, J. 2020. Single Nucleotide Polymorphisms in TLR4 Affect Susceptibility to Tuberculosis in Mexican Population from the State of Veracruz. Journal of Immunology Research, 2020.

Pai, M., Behr, M.A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C.C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., Raviglione, M. 2016. Tuberculosis, Nat Rev Dis Primers, 2, 16076

Pandey, N., Chauhan, A., Jain, N. 2018. TLR4 polymorphisms and expression in solid cancers. Molecular Diagnosis and Therapy, 22(6), 683–702.

Pang, C., Wu, Y., Wan, C., Shen, K., Hu, Y., Yang, T., Shen, Y., Wen, F. 2016. Accuracy of the bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot assay for

the diagnosis of pulmonary tuberculosis a meta-analysis. Medicine, 95(12), 1–9.

Parker, G.A. 2017. Cells of the immune system. Molecular and Integrative Toxicology, 95–201.

Parveen, U., Sultana, S., Heba, S.F., Rafi, R., Begum, A., Fatima, N. 2021. Pretomanid:A novel therapeutic paradigm for treatment of drug resistant tuberculosis. Indian Journal of Tuberculosis. 68(1), 106–113.

Pfyffer, G.E. 2015. Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection and staining procedures. Manual of Clinical Microbiology, 536–569.

Pitcher, M.J., Bowness, R., Dobson, S., Eftimie, R., Gillespie, S.H. 2020. Modelling the effects of environmental heterogeneity within the lung on the tuberculosis life-cycle. Journal of Theoretical Biology, 506, 110381.

Pragman, A.A., Lyu, T., Baller, J.A., Gould, T.J., Kelly, R.F., Reilly, C.S., Isaacson, R.E., Wendt, C.H. 2018. The lung tissue microbiota of mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease. Microbiome, 6(1), 7.

PRIMER 1, 2020. Web sitesi. http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html Erişim Tarihi: 10.07.2020.

Ramalho, R., Rao, M., Zhang, C., Agrati, C., Ippolito, G., Wang, F. S., Zumla, A., Maeurer, M. 2020. Immunometabolism: new insights and lessons from antigen-directed cellular immune responses. Seminars in Immunopathology, 42(3), 279–313.

Rao, V.G., Muniyandi, M., Bhat, J., Yadav, R., Sharma, R. 2018. Research ontuberculosis in tribal areas in India: A systematic review. Indian Journal of Tuberculosis, 65(1), 8–14.

Rolandelli, A., Del Pino, R.E.H., Pellegrini, J.M., Tateosian, N.L., Amiano, N.O., De La Barrera, S., Casco, N., Gutiérrez, M., Palmero, D.J., García, V.E. 2017. The IL-17A rs2275913 single nucleotide polymorphism is associated with

protection to tuberculosis but related to higher disease severity in Argentina. Scientific Reports, 7.

Roy, A., Eisenhut, M., Harris, R.J., Rodrigues, L.C., Sridhar, S., Habermann, S., Snell, L., Mangtani, P., Adetifa, I., Lalvani, A., Abubakar, I. 2014. Effect of BCG vaccination against Mycobacterium tuberculosis infection in children: Systematic review and meta-analysis. BMJ (Online), 349.

Sali, M., Buonsenso, D., D'Alfonso, P., De Maio, F., Ceccarelli, M., Battah, B., Palucci, I., Chiacchio, T., Goletti, D., Sanguinetti, M., Valentini, P., Delogu, G. 2018. Combined use of Quantiferon and HBHA-based IGRA supports tuberculosis diagnosis and therapy management in children. Journal of Infection, 77(6), 526– 533.

Saraiva, M., Vieira, P., Vieira, P., Vieira, P., O'Garra, A., O'Garra, A. 2020. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. Journal of Experimental Medicine, 217(1), 1–19.

Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., Rice, C.M. 2014. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. Annual Review of Immunology, 32(1), 513–545.

Schluger, N.W. 2013. Advances in the diagnosis of latent tuberculosis infection. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 34(1), 60–66.

Schurz, H., Daya, M., Möller, M., Hoal, E. G., Salie, M. 2015. TLR1, 2, 4, 6 and 9 variants associated with tuberculosis susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLOS ONE, 10(10), e0139711.

Sharma, S.K., Mohan, A., Sharma, A. 2012. Challenges in the diagnosis & treatment of miliary tuberculosis. Indian Journal of Medical Research, 135(5), 703–730.

Shetab Boushehri, M.A., Lamprecht, A. 2018. TLR4-Based Immunotherapeutics in cancer: a review of the achievements and shortcomings. Molecular Pharmaceutics, 15(11), 4777–4800.

Shetye, G.S., Franzblau, S.G., Cho, S. 2020. New tuberculosis drug targets, their inhibitors, and potential therapeutic impact. Translational Research, 220, 68–97.

Shiratori, B., Zhao, J., Okumura, M., Chagan-Yasutan, H., Yanai, H., Mizuno, K., Yoshiyama, T., Idei, T., Ashino, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Hattori, T. 2017. Immunological roles of elevated plasma levels of matricellular proteins in japanese patients with pulmonary tuberculosis. International Journal of Molecular Sciences, 18(1), 1–15.

Skolnik, R. 2016. Global Health 101 (3rd ed.), In: Faculty Bookshelf. 6. Richard Skolnik, R. (eds). Jones & Bartlet Learning, Burlington, MA.Smith I. 2003. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clinical Microbiology Reviews, 16(3), 463–496.

Spinelli, S. V., Fernández, R. del V., Zoff, L., Bongiovanni, B., Díaz, A., D'Attilio, L., Santucci, N., Bay, M.L., Bottasso, O.A., Alvarez, T., Marchesini, M.M., Bogue, C. 2017. miR-30c is specifically repressed in patients with active pulmonary tuberculosis. Tuberculosis, 105, 73–79.

Suhda, S., Paramita, D.K., Fachiroh, J. 2016. Tetra primer ARMS PCR optimization to detect single nucleotide polymorphisms of the CYP2E1 gene. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17(7), 3065–3069.

Talbot, E.A., Raffa, B.J. 2014. Mycobacterium tuberculosis, In: Molecular Medical Microbiology Second Edition (Vol. 3). Schwartzman, W.T.S.L.P. (eds), Academic Press, pp. 1637-1653, Boston.

Talukdar, P., Mattila, J.T. 2019. Type III interferons are expressed in tuberculosis granulomas and may influence signaling in epithelioid macrophages. The Journal of Immunology, 202(1 Supplement),62.2.

Tang, Y., Yin, L., Tang, S., Zhang, H., Lan, J. 2018. Application of molecular,microbiological, and immunological tests for the diagnosis of bone and joint tuberculosis. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 32(2), 1–7.

Todar, K. 2012. The good, the bad, and the deadly. Web Review of Todar's Online Textbook of Bacteriology, SCIENCE Magazine, 304.

Traeger, A., Buchbinder, R., Harris, I., Maher, C. 2017. Diagnosis and management of low-back pain in primary care. CMAJ, 189(45), E1386–E1395.

Trivedi, A., Singh, N., Bhat, S.A., Gupta, P., Kumar, A. 2012. Redox biology of tuberculosis pathogenesis. Adv Microb Physiol, 60, 263-324.

Turner, R.D., Chiu, C., Churchyard, G.J., Esmail, H., Lewinsohn, D.M., Gandhi, N.R., Fennelly, K.P. 2017. Tuberculosis infectiousness and host susceptibility. The Journal of Infectious Diseases, 636(6), 216.

ul Ain, Q., Batool, M., Choi, S. 2020. TLR4-targeting therapeutics: Structural basis and computer-aided drug discovery approaches. Molecules, 25(3), 627.

Vaure, C., Liu, Y. 2014. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. In Frontiers in Immunology, 5, 316.

Velayati, A.A., Farnia, P. 2017. Diversity in cell shape of Mycobacterium tuberculosis. Atlas of Myobacterium Tuberculosis, 71–99.

Vijay, K. 2018. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: past, present,and future. International Immunopharmacology, 59(March), 391–412.

Vila, Y., Cavalcanti, N., Accioly Brelaz, M.C., Kelle De Andrade, J., Neves, L., andido Ferraz, J., Rêgo, V., Pereira, A. 2012. Role of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-10 in the development of pulmonary tuberculosis. Pulmonary medicine, 745483.

Wang, A., Luan, H.H., Medzhitov, R. 2019. An evolutionary perspective on immunometabolism. Science, 363(6423).

Witte, K., Witte, E., Sabat, R., Wolk, K. 2010. IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. Cytokine and Growth Factor Reviews, 21(4), 237–251.

Wu, S., Liu, X., Chen, L., Wang, Y., Zhang, M., Wang, M., He, J. Q. 2020. Polymorphisms of TLR2, TLR4 and TOLLIP and tuberculosis in two independent studies. Bioscience Reports, 40(8), 20193141.

Yates, T.A., Khan, P.Y., Knight, G.M., Taylor, J.G., McHugh, T.D., Lipman, M., White, R.G., Cohen, T., Cobelens, F.G., Wood, R., Moore, D.A.J., Abubakar, I. 2016. The transmission of Mycobacterium tuberculosis in high burden settings. In The Lancet Infectious Diseases, 16(2), 227–238.

Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R., Day, I.N. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Research, 29(17), E88–e88.

Yonge, S., Otieno, M., Sharma, R., Omedo, R. 2016. Risk factors in transmission of tuberculosis infection in Mombasa, Kenya: an epidemiological descriptive study. International Journal of Tropical Disease & Health, 13(4), 1-10.

Zaki, H.Y., Leung, K.H., Yiu, W.C., Gasmelseed, N., Elwali, N.E M., Yip, S.P. 2012. Common polymorphisms in TLR4 gene associated with. International Journal, 16(January), 934–940.

Zhang, J., Zheng, L., Zhu, D., An, H., Yang, Y., Liang, Y., Zhao, W., Ding, W., Wu, X. 2014. Polymorphisms in the interleukin 18 receptor 1 gene and tuberculosis susceptibility among Chinese. PLoS ONE, 9(10), e110734.

Zhongqi, Mao, X., Liu, Q., Song, H., He, B., Shi, P., Zhang, Q., Li, X., Wang, J. 2019. Functional variations of the TLR4 gene in association with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary tuberculosis. BMC Pulmonary Medicine, 19(1), 1–8.