



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TÜRKİYE’DE İNSAN VE HAYVAN ORJİN Lİ
***BACILLUS ANTHRACIS* İZOLATLARININ MULTIPLE-**
LOCUS VARIABLE-NUMBER TANDEM REPEAT
ANALYSIS (MLVA-31) İLE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

Süleyman YALÇIN

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

ANKARA
2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE’DE İNSAN VE HAYVAN ORJİNİLİ
***BACILLUS ANTHRACIS* İZOLATLARININ MULTIPLE-**
LOCUS VARIABLE-NUMBER TANDEM REPEAT
ANALYSIS (MLVA-31) İLE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

Süleyman YALÇIN

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU
Prof. Dr. Selçuk KILIÇ

ANKARA
2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Türkiye’de İnsan ve Hayvan Orijinli *Bacillus anthracis* İzolatlarının Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) ile Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Süleyman YALÇIN

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalında

Süleyman YALÇIN tarafından hazırlanan

“Türkiye’de İnsan ve Hayvan Orijinli *Bacillus anthracis* İzolatlarının Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) ile Moleküler Karakterizasyonu” adlı

tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY

ÇOKLUĞU ile kabul/reddedilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul Ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler Ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Bacillus anthracis</i> ’in Genel Özellikleri	4
1.1.1. Tarihçesi	4
1.1.2. Klasifikasyonu	6
1.1.3. Etiyolojik Özellikleri	7
1.1.3. Epidemiyolojisi	10
1.1.4. Patogenezi	11
1.1.5. Klinik Formları	13
1.2. <i>B. anthracis</i> ’in Teşhis Yöntemleri	16
1.2.1. Konvansiyonel Teşhis	16
1.2.2. Moleküler Tanı	17
1.2.3. Serolojik Tanı	19
1.2.4. Yeni Nesil Tanı Yöntemleri	20
1.2.4.1. Filmarray	20
1.2.4.2. MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry)	21
1.2.4.3. Biyoprob ve Biyosensörler	22
1.2.4.3.1. Faj Tabanlı Tanımlama Sistemleri	22
1.2.4.3.2. Aptamerler ve Protein-DNA Tabanlı Algılama Sistemleri	23
1.3. <i>B. anthracis</i> ’in Tiplendirme Yöntemleri	24
1.3.1. SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Analizi	24
1.3.2. SNR (Single Nucleotide Repeat / Tek Nükleotid Tekrarı) Analizi	25
1.3.3. Çok Lokuslu Değişken-Sayı Tekrar Analizi (Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis / MLVA)	25
1.3.4. Tüm Genom Dizileme	26

2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Gereç	28
2.1.1. Mikroorganizmalar	28
2.1.2. Besiyerleri	31
2.1.3. Konvansiyonel Tanı Materyalleri	32
2.1.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Reaktifleri ve Primerleri	33
2.1.5. MLVA Yönteminde Kullanılan Reaktifler ve Primerler	33
2.2. Yöntem	35
2.2.1. Konvansiyonel Tanı Yöntemleri	35
2.2.1.1. Suşların Canlandırması ve Selektif Besiyerinde Üretilmesi	36
2.2.1.2. Penisilin Duyarlılık Testi	36
2.2.1.3. Gama (γ) Fajı Duyarlılık Testi	37
2.2.2. Suşlardan DNA Ekstraksiyonu	37
2.2.3. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)	37
2.2.4. MLVA-31 Çalışması	38
3. BULGULAR	44
3.1. Konvansiyonel Tanı Yöntemleri ile Suşların Doğrulanması	44
3.2. Gerçek Zamanlı PCR (qPCR) Bulguları	47
3.3. MLVA Bulguları	51
4. TARTIŞMA	82
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	87
ÖZET	88
SUMMARY	89
KAYNAKLAR	90
EKLER	97
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÖNSÖZ

Şarbon (Anthrax), *Bacillus anthracis*'in etken olduğu esas olarak ot yiyen (koyun, keçi, sığır gibi) hayvanların hastalığı olup, insanlara genel olarak direkt temas, nadiren enfekte etlerin yenmesi veya sporların solunması ile bulaşabilen zoonoz bir hastalıktır. Ülkemizde hayvancılık yaygın olarak yapılmaktadır ve bunun sonucu olarak şarbon vakaları da hayvanlarda ve insanlarda farklı yıllarda ve farklı bölgelerde görülmektedir. Şarbon hastalığı ile daha etkili mücadele edilebilmesi ve insanlara bulaşmasının önlenmesi için hastalığın epidemiyolojisinin etkili bir şekilde ortaya konması gerekmektedir. Ülkemizde şarbon hastalığının epidemiyolojisine yönelik çalışmalar sınırlı olduğu görülmektedir. Son yıllarda moleküler yöntemlerdeki hızlı gelişmelerle paralel olarak moleküler epidemiyoloji çalışmaları da hız kazanıp gelişme göstermektedir. Ülkemizde insan ve hayvan ve insanlardan izole edilen suşların moleküler genotiplendirilmesine yönelik 31 lokus ile yapılan MLVA (Çok bölgeli farkı sayılarda sıralı tekrarların analizi) çalışması bulunmamaktadır. Bu çalışmada; 2010-2021 yılları arasında ülkemizin çeşitli şehirlerinde meydana gelen şarbon vakalarından insan ve hayvan kaynaklı *Bacillus anthracis* suşlarının MLVA-31 yöntemi ile moleküler epidemiyolojik analizi yapılmış ve zaman ve mekâna bağlı genotip dağılımı saptanmıştır.

“Türkiye’de İnsan ve Hayvan Orijinli *Bacillus anthracis* İzolatlarının Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA-31) ile Moleküler Karakterizasyonu” konulu tez çalışmamın seçiminde, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında, Doktora eğitimim boyunca fikirlerini, emeğini ve desteğini her zaman üstümde hissettiren çok değerli danışmanım ve hocam sayın Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU ve eş danışmanım Prof. Dr. Selçuk KILIÇ’ a,

Çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan mesleki deneyimlerini ve çok değerli bilgilerini benimle paylaşan iş arkadaşım aynı zamanda manevi ablam Dr. Biyolog Fatma BAYRAKDAR’a,

Doktora eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Gülay KORUKLUOĞLU ve Dr. Mahmut AVCI' ya,

Doktora tezimde kullandığım suşların temininde yardımcı olan T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Bakteriyojik Teşhis Laboratuvarı'ndan Vet. Hekim Selahattin ŞEN, Vet. Hekim Enes Gazi ATICI ve Vet. Hekim Zeynep ŞIK'a; T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarı'ndan Doç. Dr. Serap SÜZÜK YILDIZ, Uzm. Dr. Meral TURAN ve Bil. Uzm. Bio. Bülent ACAR'a,

Hayatım boyunca maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen beni yetiştirip bu günlere gelmemi sağlayan çok değerli babam Metin YALÇIN, annem Nebahat YALÇIN, ablalarım Arzu YALÇIN AYNACIOĞLU ve Emel YALÇIN, eniştem Volkan AYNACIOĞLU ve hayatımın neşe kaynağı yeğenlerim Ece Naz AYNACIOĞLU ve Ecrin Ezo AYNACIOĞLU'na,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMP	Adenozin monofosfat
ATP	Adenin trifosfat
Bp	Base pair
°C	Santigrat derece
Ca	Kalsiyum
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
canSNP	Kanonik tek nükleotid polimorfizmi
CAP	Kapsül
CFU	Koloni oluşturan birim
Cl	Klor
CMG2	Kapiler morfogenez geni 2
CO ₂	Karbondioksit
Ct	Cycle threshold
DNA	Deoksiribonükleik asit
EF	Ödem Faktörü
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
g	Gram
GİS	Gastrointestinal Sistem
İv	İntravenöz
kDa	Kilodalton
LF	Letal Faktör
MAPK	Mitojenle Aktive olmuş Protein Kinaz
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MLVA	Çok bölgeli farkı sayılarda sıralı tekrarların analizi

M.Ö.	Milattan önce
M.S.	Milattan sonra
NaHCO ₃	Sodyum karbonat
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
ÖF	Ödem Faktörü
PA	Protektif Antijen
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGA	Poli-y-d-glutamik asit
PG	Peptidoglikan
pH	Power of hidrojen
qPCR	Kantitatif (Gerçek Zamanlı) Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RSKK	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
SCWP	İkincil hücre duvarı polisakkariti
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SNR	Tek Nükleotid Tekrarı
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
VNTR	Farklı sayılarda sıralı tekrarlar
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
γ	Gama
β	Beta
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>B. cereus</i> grubunun beş ana filogenetik kolu	7
Şekil 1.2. <i>B. anthracis</i> 'in hücre duvarı. A) Elektron mikroskobu görüntüsü B) Hücre zarfının şematik yapısı	8
Şekil 1.3. <i>B. anthracis</i> 'in beş saatlik sporülasyondan (soldaki resim) ve olgun bir spordan (sağdaki resim) sonra ince kesitli transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü	9
Şekil 1.4. Şarbonun ortaya çıkışlarına karşı küresel şarbon şeması (nokta), ülke bazında şarbon salgınları	11
Şekil 1.5. <i>B. anthracis</i> virulansının moleküler mekanizması	12
Şekil 1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Süreci	18
Şekil 1.7. Biofire cihazı	21
Şekil 1.8. MALDI-TOF Cihazı	22
Şekil 2.1. BSL3 laboratuvarı, konvansiyonel çalışmalar	36
Şekil 3.1. Ba/A/65 suşunun koloni morfolojisi	44
Şekil 3.2. Ba/H/05 suşunun koloni morfolojisi	45
Şekil 3.3. Ba/A/28 suşunun penisilin duyarlılık testi	46
Şekil 3.4. Ba/A/06 suşunun Gama Fajı lizisi testi	47
Şekil 3.5. Ba/H/22 ve Ba/A/64 multiplex PCR elektroforez görüntüsü	51
Şekil 3.6. Kapiler elektroforez cihazında map marker pikleri	52
Şekil 3.7. Kapiler elektroforez cihazında Ba/A/48 D miksinin pikleri	52
Şekil 3.8. Bionumerix 7.5 (Applied-Maths, Belçika) programı ile elde edilen 114 örneğin MLVA-31 UPGMA filogramı	72
Şekil 3.9. Bionumerix 7.5 (Applied-Maths, Belçika) programı ile elde edilen 114 örneğin MLVA-25 UPGMA filogramı	75
Şekil 3.10. Yetmiş adet genotipin Türkiye haritasında izole edildikleri yerler	81

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) Stratejik Planlama Grubuna göre, insanlarda hastalıkları indükleyebilen potansiyel biyoterörizm ajanlarının (bakteri, virüs, protozoan ve toksinler) sınıflandırılması	2
Çizelge 1.2. Şarbon tanısı ve amaçları için mevcut test yöntemleri	17
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların kodları, orijinleri, şehir ve tarihleri	28
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve karışım miktarları	32
Çizelge 2.3. qPCR çalışmasında kullanılan primerler, hedef bölgeleri, pozisyonları ve baz dizileri	33
Çizelge 2.4. MLVA çalışmasında kullanılan primerler ve DNA dizileri	34
Çizelge 2.5. Ticari kit ve primerler ile yapılan Real- time PCR karışımları	38
Çizelge 2.6. qPCR döngüleri	38
Çizelge 2.7. Multiplex PCR mix grupları, analiz kanalları ve hedeflenen bölgeler	39
Çizelge 2.8. Ticari kit ve primer mix ile yapılan multiplex PCR karışımları	40
Çizelge 2.9. Multiplex PCR döngüleri	40
Çizelge 2.10. MLVA fragman uzunlukları ve code rehberi	41
Çizelge 3.1. <i>B. anthracis</i> suşlarının qPCR testi sonucu elde edilen Ct değerleri	47
Çizelge 3.2. Suşların A ve B mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları	53
Çizelge 3.3. Suşların C, D ve E mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları	62
Çizelge 3.4. Bionumerix 7.5 (Applied-Maths, Belçika) programı ile belirlenen grup, genotip ve genotiplerde bulunan suş sayısı	73

1. GİRİŞ

Kişiler, gruplar veya hükümetler tarafından ideolojik, politik veya finansal kazanç sağlamak amacıyla hastalık yaratıcı mikroorganizma veya ürünlerinin (biyolojik silahların) hayvanlarda, bitkilerde ve insanlarda hastalık oluşturmak ve/veya ölüme neden olmak amacıyla açık veya gizli şekilde yayılmasına biyoterörizm denir (Kılıç, 2006). Savaşlarda ve/veya ayaklanmalarda halkı paniğe sürüklemek, kaos yaratmak için kullanılan, mortalite ve/veya morbiditeye neden olabilen biyolojik kökenli kitle imha silahlarına ise biyolojik savaş ajanları denilmektedir. Biyolojik savaş ajanları tarih boyunca savaşlarda düşmana karşı yaygın olarak kullanılmış ve bu nedenle, bu ajanların güvenli ve korunmalı yerlerde saklanması ve erişiminin kısıtlı olması son derece önemlidir (Erkekoğlu ve Gümüşel, 2018).

“Tek Sağlık” yaklaşımı, biyoterörizm tehditlerine karşı etkin hazırlık ve müdahale sağlamaktadır. Aynı zamanda çevrede, hayvanlarda ve insanlarda, zoonotik hastalıkların yönetimi için etkili bir yaklaşımdır. Dünyadaki bakteriyel zoonozların yönetimine ilişkin örnekler hem endemik hem de endemik olmayan bölgelerde salgınları başarılı bir şekilde önlemek ve kontrol etmek için bilgi paylaşımı, uluslararası sürveyans ve uygun müdahale yöntemleri tek sağlık yaklaşımlarının gerekli olduğunu göstermektedir (Cross ve ark., 2019).

Mikroorganizmaların konakçıya bulaşmasının zahmetsiz olmasına, seri üretilme yeteneklerine, ilişkili morbidite ve mortalite oranlarına bağlı olarak bu biyolojik ajanlar CDC (Hastalık Kontrol Merkezi) tarafından üç kategoride (A, B ve C) sınıflandırılır (Oliveira ve ark., 2020).

Çizelge 1.1. Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) Stratejik Planlama Grubuna göre, insanlarda hastalıkları indükleyebilen potansiyel biyoterörizm ajanlarının (bakteri, virüs, protozoan ve toksinler) sınıflandırılması.

Kategori	Tanım	Ajan ve Hastalık
A	•yüksek öncelikli temsilciler •yayılması veya iletilmesi kolay (kişiden kişiye) • yüksek ölüm oranları • büyük halk sağlığı etkisi potansiyeli • kamuoyunda paniğe ve sosyal bozulmaya neden olmak • halk sağlığına hazırlık için özel eylem	•<i>Bacillus anthracis</i> (şarbon) •<i>Clostridium botulinum</i> (botulizm, toksin) •<i>Francisella tularensis</i> (tularemi) •<i>Yersinia pestis</i> (veba) •Variola major (çiçek hastalığı) •Filovirüsler (Ebola, Marburg) •Arenavirüsler (Lassa, Machupo) •Bunyavirüsler (Kongo-Kırım, Rift Vadisi) •Flavivirüsler (Dang humması)
B	• ikinci en yüksek öncelikli temsilciler • orta derecede kolay yayılabilir • orta morbidite oranları ve düşük mortalite oranları • CDC'nin teşhis kapasitesinde ve gelişmiş hastalık gözetiminde özel geliştirmeler	•<i>Brucella spp.</i> (bruselloz) • <i>Clostridium perfringens</i> (kangren ve gıda zehirlenmesi, Epsilon toksini) • <i>Salmonella spp.</i> (salmonelloz) •<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (Hemorajik kolit) • <i>Shigella dysenteriae</i> (dizanteri) • <i>Burkholderia mallei</i> (ruam) •<i>Burkholderia pseudomallei</i> (melioidoz) • Chlamydia psittaci (psittakoz) • <i>Coxiella burnetii</i> (Q ateşi) • <i>Vibrio kolera</i> (kolera) •<i>Cryptosporidium parvum</i> (kriptosporidiyoz) • <i>Staphylococcus aureus</i> (gıda zehirlenmesi, Staphylococcal enterotoxin B) • <i>Rickettsia prowazekii</i> (tifüs ateşi) • Alfavirüsler (ensefalit) • Calicivirüsler (gastroenterit)
C	• üçüncü en yüksek öncelikli temsilciler • kitlesel yayılma için tasarlanabilecek ortaya çıkan patojenleri içerir • müsaitlik • üretilmesi ve yayılması kolay • yüksek morbidite ve mortalite oranları • büyük halk sağlığı etkisi potansiyeli	• Çoklu ilaca dirençli Mycobacterium tuberculosis (tüberküloz) • Nipah virüsü (ensefalit) • Hantavirüs (renal sendromlu hemorajik ateş-HFRS, kardiyopulmoner sendrom-HCPS) • Chikungunya virüsü (artrit ve döküntü) • SARS ile ilişkili koronavirüs (solunum sendromu) • Yüksek derecede patojenik suşlar İnfluenza Virüsü (solunum sendromu) • Sarı humma (miyalji)

A kategorisinde yer alan şarbon, OIE (World Organisation for Animal Health, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü) listesinde yer alan bir hastalıktır ve Karasal Hayvan Sağlığı Kodu'nda belirtildiği gibi OIE'ye bildirimi yapılmalıdır. Aynı zamanda T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı 2011/27823 sayılı İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları ve Bildirimine ilişkin Yönetmelik'e göre ülkemizde de ihbarı zorunlu hale getirilmiştir.

Şarbon bir otçul hayvan hastalığıdır ve bu hastalığın ajanı Gram pozitif, aerobik, spor oluşturan kapsüllü ve çubuk şekilli bir bakteri olan *Bacillus anthracis*'tir. *B. anthracis* sporları basınca, ısıya, iyonlaştırıcı radyasyona ve ultraviyole ışınlarına, dezenfektanlara ve kimyasal maddelere karşı oldukça dirençlidir. Bu sebeple *B. anthracis* sporları, biyolojik silah ve/veya biyoterörizm kullanımı için biyolojik savaş ajanları içerisinde dikkat çekici bir seçimdir (Doğanay ve Demiraslan, 2015). Hayvanlarda görülen şarbon vakaları yaz ve sonbahar mevsimlerinde daha sık görülme eğilimindedir. Başta evcil koyun, keçi, sığır olmak üzere yaban geyiği ve antilop gibi otlayan memelilerde görülür. İnsanlar, temas yoluyla (enfekte hayvanlar ve kontamine olmuş hayvan ürünleri) veya doğrudan *B. anthracis*'e maruz kalarak ikincil olarak enfekte olurlar. Şarbon hayvanlardan elde edilir; doğrudan insandan insana bulaştığına dair bir rapor bulunmamaktadır (Simonsen ve Chatterjee, 2021). Toprak, *B. anthracis* için ana rezervuardır. Dünya çapında görülen bu enfeksiyon, bazı bölgelerde hem hayvanlarda hem de insanlarda hala endemik veya hiperendemiktir (Doğanay ve Demiraslan, 2015).

B. anthracis'in tanımlanmasında konvansiyonel yöntemlerin (seçici besiyerinde büyüme, hemoliz eksikliği, hareketlilik eksikliği, kapsül boyama, gama faj lizisi, 'inci dizisi' reaksiyonu ve penisiline duyarlılık) yanı sıra gelişen teknoloji ile birlikte moleküler yöntemler (PCR ve Gerçek Zamanlı PCR, İzotermal DNA Amplifikasyon Yöntemleri), Antijene Dayalı Tanımlama Yöntemleri, Biyosensörler (Nükleik Asit Probları ve Genosensörler, Antikor Probları ve İmmünosensörler, Aptamerler ve Peptid-Nükleik Asit Kimera Probları) ve MALDI-TOF MS gibi cihazlar rol oynamaktadır (Zasada, 2020).

B. anthracis, *B. cereus* grubunda bulunan evrimsel olarak genç bir patojendir. Dünyanın dört bir yanından toplanan izolatlar ile yapılan çok sayıda çalışma bu türde moleküler varyasyon olmadığını ve son derece yüksek bir genetik homoloji varlığını göstermektedir. Genetik materyalin yatay transferinin olmaması, bakteri genomu içindeki büyük genom yeniden düzenlemelerinin azlığı ve genetik varyasyonların yavaş bir birikim hızına sahip olması bakterinin yüksek oranda klonal doğasına katkıda bulunur. Bu çeşitlilik eksikliğinden dolayı, yalnızca çoklu lokus değişken

sayılı tandem tekrar analizi (MLVA), tek nükleotid tekrarı (SNR), genom çapında tek nükleotid polimorfizmi (SNP) analizleri gibi yüksek ayırım gücüne sahip modern moleküler karakterizasyon teknikleri ve hatta tüm genom dizilimi (WGS) bu yüksek oranda klonal türlerdeki suşları ayırt etmede etkilidir (Derzelle ve Thierry, 2013).

Bu çalışmada ülkemizde farklı yıllarda ve farklı şehirlerde meydana gelen şarbon vakalarından elde edilen insan ve hayvan orijinli *B. anthracis* suşlarının 31 adet gen bölgesi incelenerek çoklu lokus değişken sayılı tandem tekrar analizi (MLVA31) yapılarak moleküler karakterizasyonu sağlanmıştır.

Bu çalışma, ülkemizde yeni bir yöntem ile şarbon haritasının çıkarılması, şarbon enfeksiyonlarının insanlara bulaşma yollarının ve bulaşma için risk faktörlerinin belirlenmesi, insan ve hayvanlar arasındaki hâkim olan suş genotiplerin tanımlanması ve ülkemizdeki suşların filocoğrafik ilişkisinin anlaşılabilmesi için tıp ve veteriner hekimliği alanlarında çalışan araştırmacıların ortaklaşa yürütecekleri moleküler epidemiyoloji çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

1.1. *Bacillus anthracis*'in Genel Özellikleri

1.1.1. Tarihçesi

Şarbon, insanlık tarihi ile uzun bir ilişkiye sahiptir ve M.Ö. 1190-1491 yıllarında Avrupa'da ve M.Ö. 3000 yıllarında Çin'de bilinmektedir. Şarbon, Romalıların, Hinduların ve Yunanlıların erken literatüründe tanımlanmıştır. Şarbon adı, kömür karası, deri lezyonlarının kutanöz şarbon formunda oluşması nedeniyle, kömür anlamına gelen Yunanca "anthrakis" kelimesinden türetilmiştir (Goel, 2015).

Şarbon tarihi antik çağa kadar uzanır ve literatürde bu hastalığın izi Yaratılış kitabından İncil'e kadar takip edilebilmektedir. Yaratılış kitabında (M.Ö. 1491), "... ve tüm Mısır toprakları üzerinde ince toz haline gelecek ve üreyecek. Çıbanlar Mısır'ın her yerinde insanlarda ve hayvanlarda ülserlere neden olacak" şeklinde

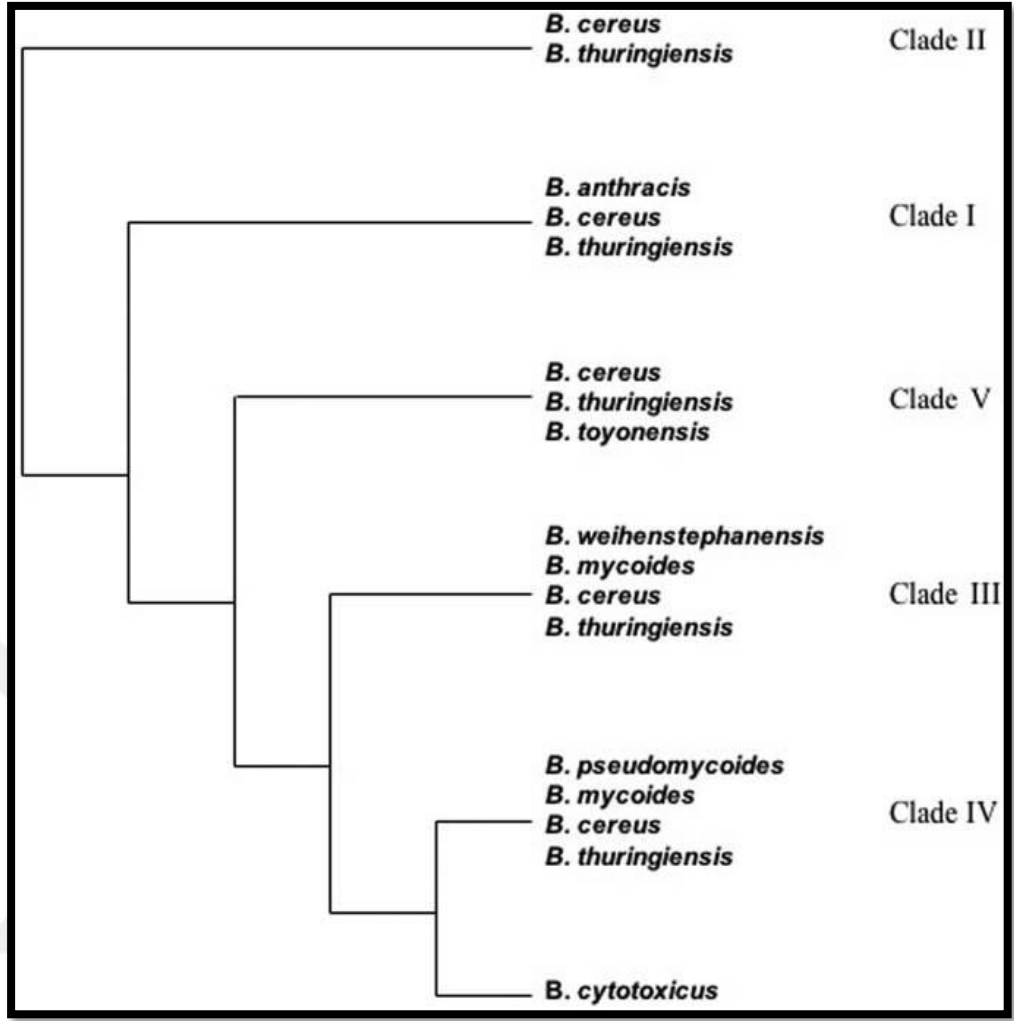
yazılar bulunmaktadır ve eski Mısır salgını olan Mısır'ın beşinci vebası (fifth plague); sığır, koyun, keçi, deve, at ve eşek de dahil olmak üzere hayvanların ölümüne sebep olan hastalık şarbondur. Şair Virgilio, Las Georgicas'ın III. kantosunda, doğu Alpleri etkileyen bir salgından bahseder ve hayvanlardaki semptomları şöyle anlatır: "Gözleri iltihaplanır ve nefeslerini göğüslerinin derinliklerinden çekerler, bazen bir inilti ile şiddetlenirler ve uzun süreli hıçkırıklarla böğürlerin derinliklerini genişletirler; siyahımsı bir kan burun deliklerinden ve dilden kaçar, tıkanmış çenelerine baskı yapar" (Espinosa ve ark., 2018).

17. yüzyılda Avrupa'da insan ve hayvan ölümleriyle seyreden pandemiler bildirilmiştir. Barthalemy, 1823 yılında hastalığın bulaşıcılık özelliğini göstermiştir. Delofond, 1838 yılında organizmanın mikroskopik özelliklerini, Pollender ise 1849 yılında enfekte hayvanda organizmayı ilk defa tanımlamıştır. Koch, 1876 yılında bakteri hastalık ilişkisini kurarak Koch postulatını ortaya koymuştur. Greenfield, 1880 yılında attenüe hayvan spor aşısını geliştirmiş ve Pasteur de 1881 yılında attenüe spor aşısını elde ederek, koyunlarda sahada ilk aşı uygulamasını yapmıştır. 1929 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalı ilk hocalarından Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün yaptığı başarılı çalışmalar neticesinde "Türk Üniversal Antrax Aşısını" bulmuştur. Ülkemizde bu aşı 20 yıl kadar kullanılmıştır (Osmanağaoğlu, 2010). İngiliz Veteriner Mikrobiyolog Sterne 1939 yılında avirulan canlı spor aşısını geliştirmiştir. Bu aşı hayvanlarda hala kullanılan aşıdır (Doğanay ve Altıntaş, 2009).

1979-1980 yılları arasında, dünyanın şimdiye kadar kaydedilen en büyük şarbon salgını, Zimbabwe'de iç savaş sırasında meydana gelmiştir. İki yıllık bir süre içerisinde, 182'si ölüm olmak üzere 9400'den fazla kutanöz şarbon vakası rapor edilmiştir. Şarbon'un 1. ve 2. Dünya Savaşı sırasında biyolojik silah olarak kullanılmak üzere geliştirildiği düşünülmektedir. 2001 yılında, içerisinde *B. anthracis* organizmasını bulunduran zarflar, posta yoluyla Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 22 farklı devlet adamına gönderilmiştir ve bu olay bir biyoterörizm eylemi olarak kabul edilmektedir (Goel, 2015).

1.1.2. Klasifikasyonu

B. anthracis, Firmicutes filumuna, Bacillaceae familyasına, *Bacillus* cinsine ve *Bacillus cereus* grubuna aittir (Pilo ve Frey, 2018). Burada en iyi bilinen türler; *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. sphaericus* ve *B. thuringiensis* 'tir. Bunların rRNA dizilerine bakılarak üç tür grupları belirlenmiştir; “*B. subtilis* grup”, “*B. cereus* grup” ve “*B. circulans* grup”. (Doğanay ve Altıntaş, 2009). *Bacillus cereus* grubunu oluşturan mikroorganizmalar, Firmicutes filumuna ait Gram pozitif düşük % GC oranına sahip bakterileridir. *B. cereus* grubunda yer alan *B. cereus*, *B. anthracis* ve *B. thuringiensis* tek bir türün patovarlarıdır (Schulz ve ark., 2019).

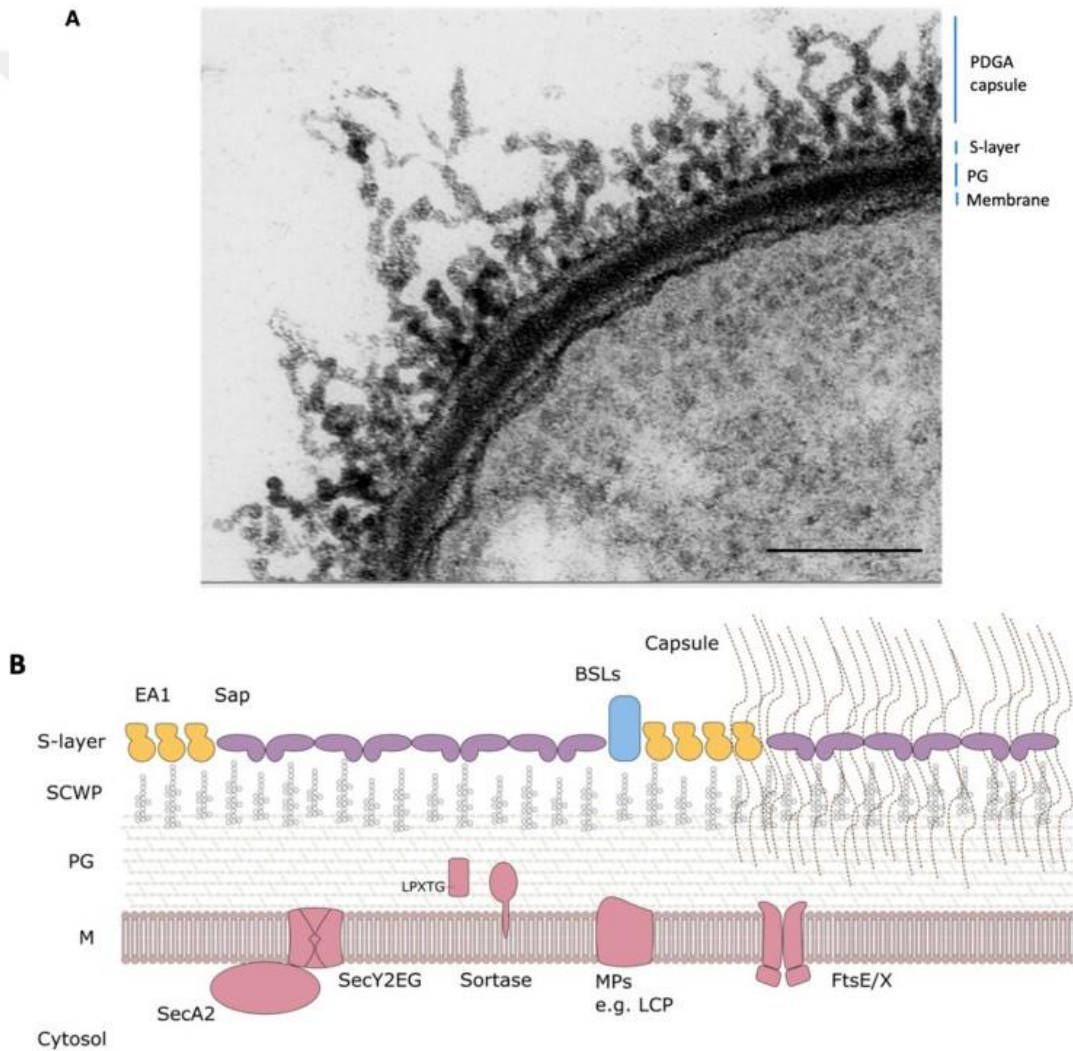


Şekil 1.1. *B. cereus* grubunun beş ana filogenetik kolu (Schulz ve ark., 2019).

1.1.3. Etiyolojik Özellikleri

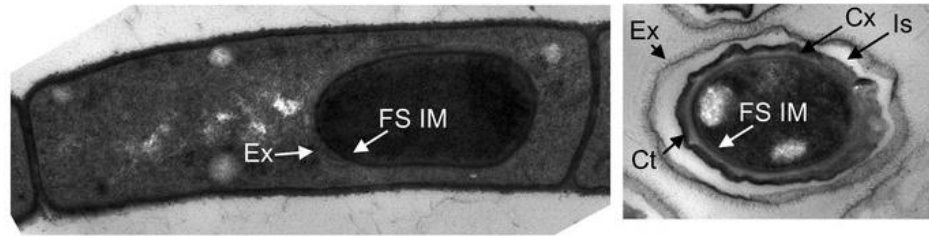
Bacillus anthracis, hareketsiz, non-hemolitik, aerobik, Gram pozitif ve endospor oluşturan bir çubuk şeklinde bir bakteridir (Salgado ve ark., 2020). Bakteri, 1-1,5x3-5 µm boyutlarında olup aerobik ortamda rutin besiyerlerinde kolayca üreyebilmektedir (WHO, 2008). *B. anthracis*, koyun kanlı agarda 2-5 mm çapında, hemoliz oluşturmeyen (yoğun üremeye bağlı olarak hafif bir hemoliz görünümü oluşabilirse de bu gerçek bir β-hemoliz değildir), beyaz-gri renkli, düz veya hafif konveks, düzensiz kenarlı, R-tipinde koloniler oluşturmaktadır ve bu görünümü “medusa başı” olarak adlandırılmaktadır (Kılıç, 2006).

B. anthracis, hücre duvarı karmaşık bir mimariye ve dinamik bileşime sahiptir. Sitoplazmik membrandan itibaren kalın bir peptidoglikan (PG) tabakası, ikincil hücre duvarı polisakkariti (SCWP), iki farklı proteinli parakristal diziden oluşan S-katmanları ve son olarak zayıf immünojenik ve antifagositik özellikte poli- γ -d-glutamik asit (PDGA) yapısında kapsül bulunur (Chateau ve ark., 2020). *B. anthracis* hücre zarf organizasyonunun elektron mikroskobu görüntüsü ve zarfının şematik yapısı Şekil 1.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. *B. anthracis*'in hücre duvarı. A) Elektron mikroskobu görüntüsü B) Hücre zarfının şematik yapısı (Chateau ve ark., 2020).

Bakteri; oval veya yuvarlak santral veya subterminal yerleşimli, bakteri hücresinde şişlik oluşturmeyan sporlar oluşturur ve atmosferik düzeyde CO₂'e maruz kalmadıkça sporlar oluşmamaktadır (Kılıç, 2006). Spor boyutu ve morfolojisi aynı türün suşları arasında değişkenlik gösterebilir, ancak çoğu suş, ekzosporyum olarak adlandırılan bir dış tabaka ile çevrili yaklaşık 1 µm çapında sporlar üretir. Sporların minimal özellikleri, farklı büyüme ve sporlanma koşullarında değişebilir (Schulz ve ark., 2019). *B. anthracis* hücresinin spor formu Şekil 1.3.'te gösterilmiştir.



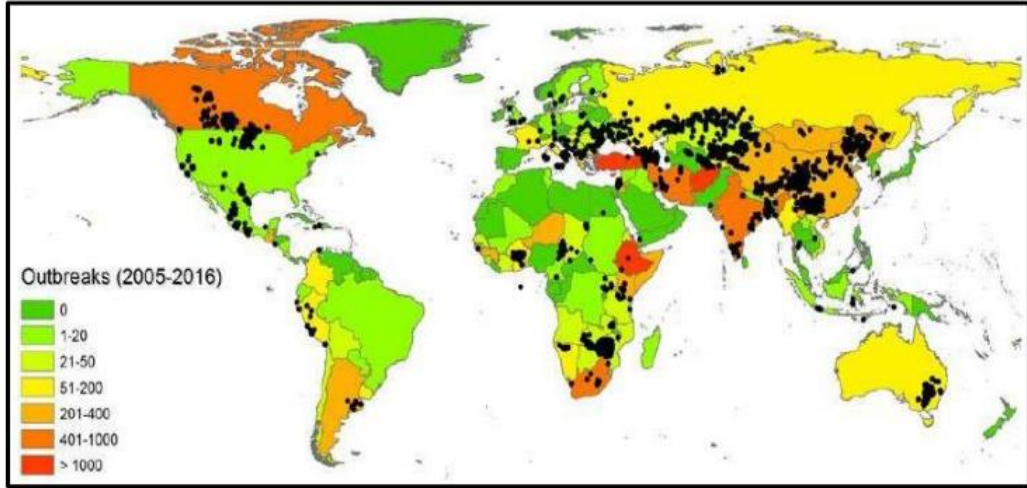
Şekil 1.3. *B. anthracis*'in beş saatlik sporülasyondan (soldaki resim) ve olgun bir spordan (sağdaki resim) sonra ince kesitli transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü (Schulz ve ark., 2019). Not: Soldaki resimde, FS IM: Ön spor iç zarı, Ex: yeni oluşan ekzosporyum. Sağdaki resimde FS IM: ön spor iç zarı, Ex: olgun ekzosporyum, Ct: kaplama, ara boşluk, Is: ara boşluk ve korteks Cx: korteks.

Otçul hayvanlar merada otlarken çevreyi kirleten *B. anthracis* sporlarını oral yolla alırlar. Sporlar konakçı içinde filizlenir ve vejetatif formları tüm doku ve organlarını istila eder ve çoğalır. Sonunda konakçı ölür, vejetatif basiller çürüten karkaslarda sporlanır, böylece hareketsiz sporlar tekrar çevreyi kirletebilir ve böylece *B. anthracis* yaşam döngüsünü tamamlar (Missiakas ve Schneewind, 2017).

1.1.3. Epidemiyolojisi

Şarbon dünyada görülme sıklığı giderek azalan enfeksiyon hastalıklarından birisidir. Toprak, *B. anthracis* için ana rezervuardır. Hastalık en sık vahşi ve evcil memelileri etkilemektedir. *B. anthracis*'in sebep olduğu şarbon hastalığı dünya çapında görülmektedir ve bu enfeksiyon özellikle Orta Doğu, Batı Afrika, Orta Asya, Hindistan ve Güney Amerika olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde hem hayvanlarda hem de insanlarda hala endemik veya hiperendemik özellik göstermektedir (Doğanay ve Demiraslan, 2015). Dünya çapında yıllık vaka tahminleri 20.000 ila 100.000 arasında değişmektedir ve ayrıca Orta Asya, Haiti, Afrika, Güney Amerika ve Orta Doğu'da halk sağlığı için büyük bir tehdit olarak kabul edilmektedir (Janik ve ark., 2020). Şarbon, enfekte hayvanlarla, özellikle çiftçiler, kasaplar ve çobanlar gibi meslek gruplarının doğrudan teması veya et, saç, yün ve hatta kemikler dahil olmak üzere hayvansal ürünlere temas ile de insanlara bulaşabilmektedir (Eshraghi ve ark., 2020).

Deneyisel yollarla hastalık oluşturmak mümkün olmakla birlikte kanatlılar (devekuşu hariç; deneyisel yollarla hastalık oluşturmak mümkündür) ve soğukkanlı hayvanlar (yılan, kertenkele vb.) şarbon hastalığına dirençlidir. Hastalığa daha çok sığır, manda, koyun, keçi, deve ve geyiklerde rastlanmaktadır. Son yıllarda, Batı ve Orta Afrika'da şempanze ve gorillerde ani ölümle sonuçlanan şarbon olguları bildirilmiştir. Bulaşma solunum, sindirim ve deri yoluyla olabilmektedir. Ölen hayvanlardan sızan kan, sıvı ya da hastaların dışkıları ile kirlenen otlaklarda otlayan diğer hayvanlar *B. anthracis* sporlarını sindirim kanalı ile alarak hastalanmaktadırlar. Bazen kontamine yemler de hastalık kaynağı olmaktadır. Şarbon genellikle bir mera hastalığı olarak şekillenir; ancak, bol yağış alan mevsimlerde sel suları ile etken çok uzak mesafelere taşınabilmekte ve sporlar belli bir bölgede yoğunlaşabilmektedir (Doğanay ve Altıntaş, 2009). Şekil 1.4.'te Ocak 2005-Ağustos 2016 Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyon raporu'dan sayısallaştırılan veriler ile hazırlanmış ülke bazında şarbon salgınları gösterilmiştir (Carlson ve ark., 2018).

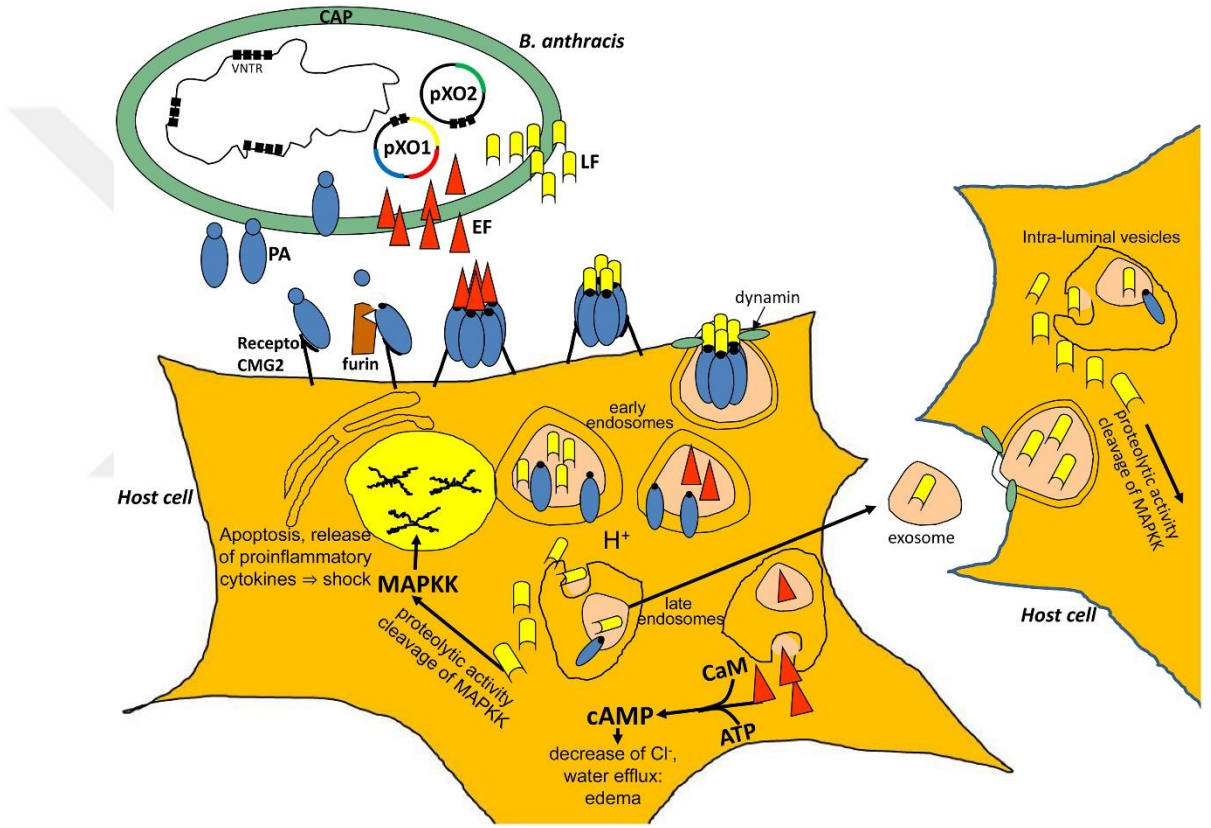


Şekil 1.4. Şarbonun ortaya çıkışlarına karşı küresel şarbon şeması (nokta), ülke bazında şarbon salgınları.

1.1.4. Patogenezi

B. anthracis, kapsül ihtiva eden, penisiline ve gama (γ) fajına duyarlı bir bakteridir. Basilin kapsülü bakterinin fagosite edilmesini önler ve vejetatif hale geçen basiller girdiği dokuda çoğalarak ekzotoksin üretmeye başlarlar. Basilin patojenitesi büyük ölçüde protein yapısındaki ekzotoksinine bağlıdır (WHO, 2008). *B. anthracis*'in virülansı, pXO1 ve pXO2 adı verilen spesifik PCR yöntemiyle saptanabilen iki virülans plazmidi tarafından belirlenir. pXO1 plazmidi: öldürücü faktör (LF) ve ödem faktörü (EF) olmak üzere iki ikili toksini kodlar. Hem öldürücü faktör (LF) hem de ödem faktörü (EF) için ortak olan koruyucu antijen (PA) olarak adlandırılan bir yapışma alt birimidir. pXO2 plazmidi ise, bir poli- γ -d-glutamik asit kapsülünün üretiminden sorumludur ve bunun için bir operon (capBCDAE) taşır (Pilo ve Frey, 2018). PA, konak hücre üzerindeki CMG2 ve TEM8 reseptörlere bağlanır ve ardından furin tarafından bölünerek LF veya EF'nin multimerizasyonuna ve bağlanmasına izin verir. PA:EF ve PA:LF kompleksleri daha sonra dinamin-klatrin bağımlı bir şekilde endositoz ile hücre içine alınır. Endozomların asit ortamında PA:EF ve PA:LF kompleksleri çözülür ve geç endozomlara geçerler. EF tarafından aşırı cAMP üretimi sağlanır ve böylece Cl^- iyonlarının azalması ve su çıkışının oluşmasına bağlı ödem meydana gelir. LF tarafından MAPKK' nın

(mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz) proteolitik bölünmesi ile pro-inflamatuar sitokinlerin ardından şok oluşur ve apoptoz yoluyla toksik alt birimleri serbest bırakılır. Toksinlerin bir kısmı, eksozomlar olarak aktarılabilen ve enfekte olmayan hücrelere dahil edilebilen intralüminal veziküllerde kalır; burada toksinler, uzun süre saklanabilir, salınabilir ve enfeksiyon gerçekleşikten çok sonra bile aktivitelerini sürdürebilirler (Pilo ve Frey, 2011).



Şekil 1.5. *B. anthracis* virulansının moleküler mekanizması.

Kısaltmalar: CAP: kapsül, PA: koruyucu antijen, EF: ödem faktörü, LF: öldürücü faktör, VNTR: değişken sayı tandem tekrarı, MAPKK: mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz, CaM: kalmodulin, cAMP: siklik adenosin 3' 5' mono fosfat, CMG2: kapiler morfogenez geni 2 (Pilo ve Frey, 2011).

1.1.5. Klinik Formları

Şarbon hastalığının perakut, akut, subakut ve nadiren kronik formları görülmektedir. Geviş getiren hayvanlar genellikle hasta olduklarına dair hiçbir belirti göstermeksizin ölü bulunmaktadır. Bu akut formda, hayvan ölmeden kısa bir süre önce yüksek ateş, kas titremeleri ve zor nefes alma gibi semptomlar görülebilmektedir. Subakut forma ise ilerleyici ateş, iştahsızlık, halsizlik, depresyon ve ölüm eşlik edebilir (OIE, 2018).

Şarbon, 1930’larda canlı atenüe veteriner aşılarının geliştirilmesine kadar çiftlik hayvanlarında başlıca ölüm nedenlerinden birisi olmuştur. Etkili veteriner aşılarının geliştirilmesiyle bile, şarbon dünyanın birçok bölgesinde enzootik kalmaktadır (Savransky, 2020).

Hayvanlar, sporları yutarak veya muhtemelen enfekte bir hayvandan beslenen sinekler tarafından ısırılarak enfekte olurlar ve 24 saat içerisinde ölüm meydana gelir. Çevresel kontaminasyonu önlemek için, şarbon şüpheli hayvanların karkaslarının ölüm sonrası incelemeleri önerilmez. En sık görülen lezyonlar, genişlemiş bir dalak ve genellikle çamur kıvamına sahip yetersiz pıhtılaşmış kan ile görülen genel septisemi lezyonlarıdır. Ölüm anında burun, ağız, vajina ve/veya anüs gibi doğal açıklıklardan kanama bulunabilir (OIE, 2018).

İnsanlara dört ana yolla bulaşabilir: inhalasyon, kutanöz, gastrointestinal ve intravenöz/enjeksiyon (Savransky, 2020). Hastalığın 4 formu, organizmanın konakçıya giriş şekline bağlı olarak ortaya çıkar (Odalar ve ark., 2021).

İnhalasyon şarbonunda, bakteriyel endosporların solunmasıyla oluşan vakaların neredeyse tamamı, semptomların başlamasının ardından birkaç gün içinde ölümle sonuçlanmaktadır (Balkan ve Çelebi, 2018). *B. anthracis* bir kez solunduğunda makrofajlar tarafından fagosite edilir ve sporlar trakeobronşiyal lenf düğümlerinde çoğalır (Odalar ve ark., 2021). Semptomlar 2-5 gün içerisinde kırınglık, yorgunluk ve

hafif ateş şeklinde başlar. Sonrasında ateşin yükselmesi, nefes darlığı, göğüs ağrısı, taşikardi ve senkop gelişir. Hastalarda, şuur bulanıklığı, solunum yetersizliği ve kanlı balgam gelişebilmektedir. Balgamda şarbon basili izole edilebilir. Radyolojik incelemede pnömoni ve bronkopnömoni bulguları görülebilmektedir (Keten ve ark, 2016).

Kutanöz şarbon (deri şarbonu), şarbon enfeksiyonlarının %95'inden fazlasını oluşturmaktadır. *B. anthracis* sporlarının deri üzerinde basit bir travmayı takiben girmesiyle, giriş yerinde 1-7 günlük kuluçka süresinin ardından küçük kaşıntılı bir papül oluşmaktadır. Lezyonlar daha çok açıkta olan baş, boyun, kol ve bacaklarda görülmektedir (Öğütü, 2012). Lezyonlar, ekzotoksin salınımına bağlı olarak ödemli hale gelir ve hastada buna bağlı bölgesel lenfadenit gelişmektedir. Yaklaşık bir hafta sonra lezyonlar yırtılır ve bir eskar gelişir. Lezyonlar görünüm olarak etkileyici olsada, hassas değildir ve ağrısız olarak tanımlanmaktadır (Odalar ve ark., 2021). Hastalığın şiddetine göre belirtiler de değişmektedir. Hastalarda yüksek ateş, lenfanjit ve bölgesel lenfadenit görülebilir. Kutanöz şarbonun histopatolojik özellikleri arasında damar konjestyonu, jelatinöz ödem ve nekroz bulunmaktadır (Kadanalı ve Özel, 2019).

Gastrointestinal (GİS) şarbon, *B. anthracis* sporları ile kontamine olmuş yiyecek ve içeceklerin vücuda alınmasıyla ortaya çıkmaktadır. Sindirimi takiben 2-7 gün sonrasında bulantı, kusma, karın ağrısı ve ateş görülmektedir. Ayrıca hematemez, şiddetli diyare, masif assit, hemorajik mezenterik lenfadenit ve sepsise eşlik edebilmektedir (Kıncı ve ark., 2020). Sporlar gastrointestinal epitele yapışır ve burada endoskopik muayenede görülebilen yüzeysel ülserasyonlar oluşturmaktadır (Odalar ve ark., 2021). İlk temas ile *B. anthracis* sporları üst gastrointestinal yol (boğaz ve ösefagus), mide ve bağırsaklara etki edebilir (Ateş Özcan, 2019). Oral kaviteden sekuma kadar gastrointestinal kanalın herhangi bir yerinde, mukozada şarbon lezyonları gelişir. En sık görülen formları orofaringeal şarbon ve barsak şarbonudur. Orofaringeal şarbonunda, lezyonlar oral kavitede, dil, tonsiller, yanak mukozası, farinks arka duvarına yerleşmektedir. Semptomlar arasında yutma güçlüğü, boğaz ağrısı, boyunda ağrılı lenfadenit, yüksek ateş ve toksemi

görülmektedir. Bağırsak şarbonunda bakteri sporları terminal ileum ve çekumda daha sık, mide, duodenum ve proksimal ileuma nadiren yerleşmektedir. Hastalarda karın ağrısı, bulantı, kusma, hematemez ve kanlı ishal görülmektedir (Kadanalı ve Özel, 2019).

Enjeksiyon şarbonu, kontamine olmuş eroin gibi maddelerin intravenöz, subkutan veya intramüsküler enjeksiyonu ile bulaşır. Deri altı enjeksiyonunun (eroin, vb.) sporlar için bir alan sağladığı sonucuna varılmıştır. Geniş yumuşak doku ödemi ve nekroz şeklinde kendini gösteren hastalığın bu formu birkaç hastada rapor edilmiştir. Enfeksiyon çok sık septik şok ve menenjit ile komplike hale gelir (Zasada, 2018).

Şarbon hastalığını etkili bir şekilde tedavi etmek için, hızlı tanıma ve terapötikler esastır. Şüpheli bir *B. anthracis* vakasında antibiyotik uygulamasına hemen başlanmalı ve 60 gün boyunca devam edilmelidir. Klinik semptomlar henüz görülmemişse, doksisisiklin veya penisilin G, sırasıyla günde iki kez 100 mg (BID) veya 12 saatte bir 1.200.000 ünite olarak ağızdan veya damardan (iv) uygulanmalıdır. Eğer klinik semptomlar ortaya çıkarsa, 400 mg siprofloksasin BID' nin oral veya iv formülasyonu önerilmektedir (Head ve ark., 2016).

Hayvanlarda hastalığın tespit edilmesi durumunda enfekte hayvanlar öldürülür ve imha edilir. Hasta ve hastalıktan şüpheli hayvanların kesilmesi ve etlerinin tüketilmesi yasak olup, 23.11.2011 tarihinde resmî gazetede yayınlanan Şarbon Hastalığına Karşı Korunma ve Mücadele Yönetmeliği kapsamında hastalığın teşhisinden, mücadelesinden ve gözetim programlarından sorumlu olan Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü ve Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yetki verilen veteriner hekim tarafından yürütülmektedir. Ölen ve imha edilen hayvanlar en az iki metrelik çukurlara gömülerek üzerine sönmemiş kireç dökülmektedir (Ateş Özcan, 2019).

1.2. *B. anthracis*'in Teşhis Yöntemleri

1.2.1. Konvansiyonel Teşhis

B. anthracis'in tanımlanmasında konvansiyonel mikrobiyolojik teşhis yöntemleri yıllardır altın standart olarak kabul edilmiştir (Ireng ve Gala 2012). *B. anthracis*'in teşhisinde kullanılan geleneksel yöntemler arasında seçici besiyerinde büyüme, hareketlilik eksikliği, hemoliz eksikliği, kapsül boyama, penisilin ve gama fajı duyarlılığı, inci dizisi reaksiyonu gösterilebilmektedir. Bu yöntemler *B. anthracis* için yanıltıcı olabilir. Bunun nedeni hemoliz ve mortalite eksikliği, gama fajı ve penisiline duyarlılık gibi birçok fenotipik özelliğin *B. cereus* suşları tarafından da sergilenebilmesidir. Ayrıca, hemoliz gösteren, penisiline ve gama fajına dirençli *B. anthracis* suşları da izole edilmiştir (Zasada, 2020). *B. anthracis* seçici besiyeri olarak polymyxin-B, lysozyme, EDTA, thallous asetat içeren agar (PLET agar) üzerinde üremektedir, ancak bu üreme 1-2 günlük bir inkübasyon süresi gerektirmektedir ayrıca daha fazla doğrulayıcı testler yapılması gerekmektedir (Goel, 2015).

Kapsül ihtiva eden *B. anthracis* hücrelerinin varlığı, polikrom metilen mavisi veya Hindistan mürekkebi boyaları kullanılarak M'Fadyean boyama ile doğrulanabilmektedir. Boyamadan sonra, *B. anthracis* hücreleri, pembe kapsüller ise mavi-siyah, basiller olarak mikroskop altında görülebilmektedir. Bununla birlikte, *B. anthracis* kapsülü, çürüme sırasında metilen mavisine olan afinitesini kaybeder ve bu nedenle, karkaslardan alınan numuneler incelendiğinde kapsül M'Fadyean boyamasında görünmeyebilir (Turnbull, 2008).

Yıllarca *B. anthracis*'i lize edebilen birçok faj denemeleri yapılmış fakat istenilen sonuç alınamamıştır. Son olarak Brown ve Cherry (1955), *B. anthracis*'i parçalama yeteneğine sahip olan ancak *B. cereus*'un direnç gösterdiği gama (γ) fajını izole etmeyi başarmışlardır. Gama fajı *B. anthracis* tanımlaması için hala kullanılmaktadır (Turnbull, 2008). Bu testin özgüllüğü, %96 olarak tahmin

edilmektedir ve az sayıda Bacillus olmayan çevresel suşların γ fajına duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır (Kolton ve ark., 2017).

Jensen ve Kleemeyer (1953) tarafından ‘İnci dizisi’ reaksiyonu tanımlanmıştır. Bu yöntemle göre ml başına 0,05-0,5 birim penisilin içeren Triptose Agar gibi katı bir besiyerinde, 37 °C’de 3-6 saat boyunca büyüyen *B. anthracis*’in büyük, küresel inci gibi dizili hücreler oluşturmaktadır.

Çizelge 1.2. Şarbon tanısı ve amaçları için mevcut test yöntemleri (OIE, 2018).

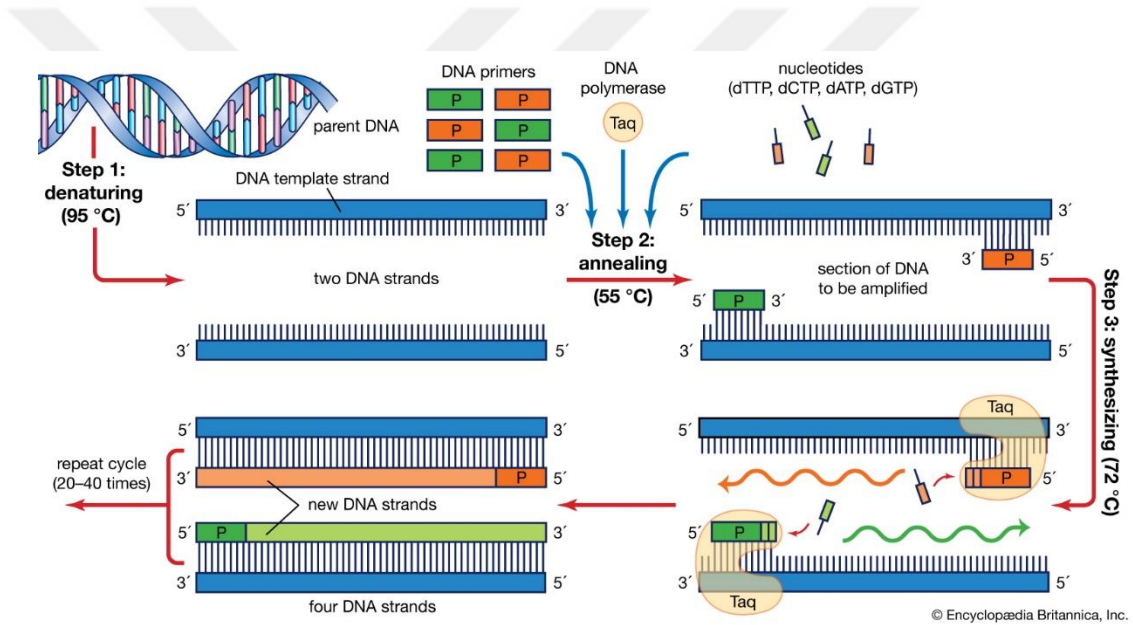
Metot	Amaç					
	İnfeksiyon görülmeyen populasyon	Hareket öncesi infeksiyon görülmeyen bireysel hayvan	Yok etme politikalarına katkıda bulunmak	Klinik vakaların doğrulanması	İnfeksiyon-gözetim sistemine hakim olmak	Aşılama sonrası bireysel hayvanlarda veya popülasyon-larda bağışıklık durumu
Ajan Kimliği						
Kapsülün İspatı	-	-	-	++	-	-
Motilite eksikliğinin gösterilmesi	-	-	-	++	-	-
Gama Fajı Lizisi	-	-	-	++	-	-
Penisilin Duyarlılığı	-	-	-	++	-	-
Real Time PCR	-	-	-	+	+++ /++	-

Not: +++: Gösterilen amaç için doğrulanan önerilen yöntem, ++: Uygun yöntem ancak daha fazla doğrulama gerektirebilir, +: bazı durumlarda kullanılabilir, ancak maliyet, güvenilirlik veya diğer faktörler uygulamayı ciddi şekilde sınırlar, -: bu amaç için uygun değildir.

1.2.2. Moleküler Tanı

Kary B. Mullis (1983) tarafından polimeraz zincir reaksiyonu (PZR/Polymerase Chain Reaction: PCR) kullanılarak DNA amplifikasyon yönteminin keşfedilmesi, mikroorganizmaların tanımlanması için yeni olanaklar sağlamıştır ve bu durum *B. anthracis*’in tanımlanmasına da yansımıştır. Moleküler

tanı yöntemlerinin, mikroorganizmaların kültüre alınmasına gerek olmaması ve inaktive edilmiş örnekleri test etme imkânı olması gibi bazı avantajları vardır, bu da moleküler tanı yöntemlerini konvansiyonel tanı yöntemlerine göre daha güvenli hale getirmektedir (Zasada, 2020). Moleküler tanı yöntemlerinin en önemli ilkesi, uygun genetik belirteçlerin seçilmesidir. *B. anthracis*'in tanımlaması için kullanılan genetik belirteçler, virülans plazmidleri olan pXO1 ve pXO2 üzerinde bulunmaktadır (Makino ve ark., 1993). Klinik ve çevresel örneklerde plazmid kaynaklı kapsül ve/veya toksin virülans genlerini real-time PCR (qPCR) yöntemi ile saptamak amacıyla çok farklı ticari sistemler geliştirilmiştir (Kılıç, 2006). Genel olarak PCR döngüsü Şekil 1.6.'da verilmiştir.



Şekil 1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Süreci (Britannica, 2021).

İzotermal koşullardaki DNA amplifikasyonu moleküler tanıda çok umut verici bir araç olarak görülmektedir. Bu uygulamalar arasında döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), *B. anthracis*'in tanımlanmasında uygulanan bir yöntemdir. *B. anthracis* tanımlaması uygulanan LAMP yönteminde pag (pXO1), capB (pXO2), Ba813 (kromozomal), pagA (pXO1), capB (pXO2) ve sap(kromozomal) gibi birçok belirteç gen bölgeleri kullanılmaktadır (Kurosaki ve ark., 2009 ve Qiao ve ark., 2007). LAMP uygulamasında, her gen bölgesi için altı primer gereklidir ve

amplifikasyon, 60–65 °C’de yaklaşık bir saat boyunca DNA polimeraz tarafından gerçekleştirilmektedir (Zasada ve ark., 2018).

1.2.3. Serolojik Tanı

B. anthracis’in saptanması için alternatif bir yaklaşım, immünoassay yoluyla antijen saptamasıdır. *B. anthracis*’in S-tabaka bileşeni, toksininin ve kapsülün bir bileşeni olan PA, sporlarının önemli bir bileşeni olan glikoprotein BclA ve ayrıca BclA’nın oligosakarit epitopları, hücre dışı antijen 1EA1 gibi çeşitli antijenler serolojik tanıda yardımcı olmaktadır. Test için uygun bir hedef antijenin seçimi serolojik tanıda etkili olmaktadır (Kuehn ve ark., 2009; Mechaly ve ark., 2018 ve Sastry ve ark., 2003).

Serolojik tanıda bir antikor immün yanıtının saptanması için kullanılan en yaygın yöntem, enzime bağlı immünosorbent testidir (ELISA). Test, PA, kapsüller antijen ve LF gibi çeşitli antijenlere karşı antikorların saptanması için geliştirilmiştir (Semenova ve ark., 2017). Mabry ve ark. (2006), özellikle serumda PA ve LF’yi saptamak için bir ELISA testi geliştirmiştir. Yapılan çalışmada ELISA, intranazal olarak enfekte edilmiş kobaylarda enfeksiyonun geç evresinde ve inhalasyon şarbonu ile enfekte olmuş tavşanın ölümden sonra PA’nın saptanmasına olanak sağlamıştır. Enfeksiyonun erken evresinde PA veya LF’nin saptanamadığını, dolaşıma salınan şarbon toksininin yeterli doygunluğa ulaşana kadar sürekli olarak mevcut doku reseptörlerine bağlanmasıyla açıklamışlardır. Ancak, daha hassas yöntemler kullanılarak yapılan ileri çalışmalar bunun doğru olmadığını göstermektedir (Tournier ve Rougeaux, 2006).

Yanal akış tahlilleri (Lateral Flow Assay / LFA), birinci basamak tanı için ticari olarak mevcut olan ikinci test grubudur. Bu testlerin yapılması kolay olmakla birlikte herhangi bir ekipman gerektirmemektedir. Yöntemde, yakalama etiketli antikor, hedef antijenine bağlanır ve kromatografi şeridi boyunca akar. Ardından, antikor-antijen kompleksleri, sırasıyla bir test çizgisi ve bir kontrol çizgisi oluşturan

şerit üzerinde iki bölgede immobilize edilmiş ikincil antikorlar tarafından yakalanmaktadır ve bu işlem 15 dakika kadar sürmektedir (Wang ve ark., 2015).

B. anthracis teşhisinde kullanılan diğer immünolojik testler arasında, floresein etiketli antikorlar ve FRET (Förster rezonans enerji transferi), Luminex testi ile birleştirilmiş akış sitometrisi testleri, manyetik partikül florojenik immün testi (MPFIA) örnek olarak gösterilebilmektedir (Zasada, 2020).

1.2.4. Yeni Nesil Tanı Yöntemleri

1.2.4.1. Filmarray

İdeal klinik tanı sistemi, özel laboratuvar ve kalifiye teknisyenlerin gereksinimlerini en aza indirirken hızlı, hassas, spesifik ve tekrarlanabilir sonuçlar vermelidir. Yaklaşık bir saat içerisinde tek örneklemden birden fazla organizmanın tespitini ve tanımlanmasını tamamen otomatikleştiren entegre bir teşhis platformu olan "FilmArray" sistemi tanımlanmaktadır. İşlenmemiş bir biyolojik / klinik numune, nükleik asit izolasyonuna, saflaştırmasına, revers transkripsiyona, nested ve multipleks polimeraz zincir reaksiyonuna ve ampikon eriyik eğrisi analizine (melt curve analysis) tabi tutulur. Filmarray sistemi ile Multiplex ve Nested PCR yapılarak *B. anthracis* tanısı konabilir. Bu sistemde Biofire cihazı ve biotreat panel kiti kullanılmaktadır. Örnek hiçbir işleme tabi tutulmadan cihaza yüklenir. Cihaz içerisinde çevresel veya klinik numunenin DNA izolasyonu, PCR'ı yapılır ve tür bazında sonuç verilir (Poritz ve ark., 2011).



Şekil 1.7. Biofire cihazı.

1.2.4.2. MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry)

Kütle spektrometresi yakın zamanda bakteriyel tanımlama için güçlü bir teknik haline gelmiştir. Bakterilerin kütle spektrometrisi yaklaşımları genellikle MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) ile bir organizmaya özgü onların parmak izini oluşturan proteinlerin tanımlanması üzerine dayanır (Kalb ve ark., 2015). Bu yöntemde mikroorganizmalara ait biyomoleküllerin (protein, peptid, şeker) ve büyük organik moleküllerin (polimer, dendrimer, makromolekül) iyonize edildikten sonra elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilerek protein profilleri çıkarılmaktadır. Bu profil spektralarına ait grafiksel görüntülerin sistemin veri tabanındaki referans organizmaya uyumuna göre mikroorganizmalar cins ve tür bazında tanımlanabilmektedir (Yılmaz ve ark., 2014). *B. anthracis* gibi bazı bakterilerde, bu organizmaların yarattığı sağlık tehdidi organizmanın kendisi değildir, organizmalar tarafından üretilen protein toksinleridir. Güçlü biyolojik toksinlerin saptanması, yüksek analitik hassasiyet gerektirir ve *B. anthracis*'in öldürücü toksinlerinin (letal

faktör) enzimatik aktivitesini belirlemek için MALDI-TOF MS tabanlı yöntemler geliştirilmiştir (Kalb ve ark., 2015).



Şekil 1.8. MALDI-TOF MS Cihazı

1.2.4.3. Biyoprob ve Biyosensörler

1.2.4.3.1. Faj Tabanlı Tanımlama Sistemleri

Antikor-antijen bağlanmasına benzer şekilde, bir fajın bakteri hücreleri ile etkileşimi güçlü ve spesifiktir (Kim ve ark., 2015). *B. anthracis*'te, özellikle bakteriyolizisi indüklemek için faj-W β ve γ -fajı bildirilmiştir (Buck ve ark., 1963 ve Watanabe ve ark., 1975). Bu bakteriyofajlar, tanısal sistemler için alternatif bir biyoprob olarak kullanılabilir. Örneğin, Schofield ve ark. (2009) *B. anthracis*'i tespit edebilen bakteriyel *luxA* ve *luxB* raportör genlerini W β faj genomuna entegre ederek biyolüminesan bir bakteriyofaj geliştirmişlerdir. Faj ve numune, biyolüminesansı analiz etmek için basitçe karıştırılmıştır. Vejetatif hücrelerin infeksiyonundan 16

dakika sonra biyolüminesan bir sinyal belirginleşmiş; 60 dakika içinde 10^3 CFU/ml'lik bir tespit limiti elde edilmiştir. Benzer şekilde, Fujinami ve ark. (2007), *B. anthracis*'i diğer *Bacillus* aile üyelerinden ayırmak için γ -faj kullanmışlardır. Ek olarak, Schuch ve ark. (2009) toprak, otobur dışkısı, çürüyen organik madde ve topraktaki omurgasız bağırsakları da dahil olmak üzere bir dizi çevresel maddeyi incelemiş ve *B. anthracis*'e özgü birçok fajı tanımlamıştır.

1.2.4.3.2. Aptamerler ve Protein-DNA Tabanlı Algılama Sistemleri

Aptamerler, eşsiz üç boyutlu yapıları nedeniyle küçük organik bileşikler, biyotoksinler ve tüm organizmalar dahil olmak üzere çeşitli hedeflere yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanan tek iplikli RNA veya DNA oligonükleotidleridir (Hamula ve ark., 2011; Lauridsen ve Veedu, 2012 ve Proske ve ark., 2005). İlk aptamer tabanlı metodoloji Tuerk ve Gold (1990) (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) tarafından rapor edildiğinden beri, aptamerler hedef validasyon, teşhis ve terapötikler de dahil olmak üzere çeşitli uygulamalarda geniş şekilde tanımlanmış ve analiz edilmiştir. SELEX tarafından elde edilen çeşitlilik derecesi, çok yüksek afiniteli oligonükleotid sekanslarının üretimini kolaylaştırır. Bruno ve ark. (1999), aptamerleri geliştirmek için SELEX kullanmış ve yaklaşık 10^6 *B. anthracis* sporu saptamış bir aptamer-manyetik boncuk elektrokemilüminesan sandviç deneyi önermiştir. Enfeksiyonun erken evrelerinde şarbon toksini saptanmasının önemi göz önüne alındığında, hem Cella ve ark. (2010) hem de Joungmak ve ark. (2015), şarbon PA'ya karşı özgül ve duyarlı tek iplikli DNA aptamerlerinin taranmasını ve tanımlanmasını bildirmiştir. Başlangıçta Cella ve ark. (2010) SELEX ile tanımlanan seçici aptamer ile konjuge edilmiş fonksiyonel tek duvarlı karbon nanotüpler kullanarak şarbon PA'yı saptamak için bir aptasensör geliştirmiştir.

1.3. *B. anthracis*'in Tiplendirme Yöntemleri

Tiplendirme çalışmaları, dizi tabanlı genetik veriler ışığında bir popülasyonda popülasyon yapısının yeniden belirlenmesi, mikroorganizmalar arasındaki genetik ilişkileri daha doğru bir şekilde tahmin etmek, doğru soy ağacını bulmak ve şifreli akrabalığı belirlemek için soy ağacının yeniden yapılandırması gibi amaçlarla kullanılabilmektedir (Samuels ve ark., 2020).

B. anthracis'in sebep olduğu olgular arasındaki epidemiyolojik ilişkinin belirlenmesinde moleküler tiplendirme yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu genotiplendirme yöntemleri kullanılarak farklı hastalar ile çevre ve/veya hayvan izolatları arasındaki epidemiyolojik ilişki doğrulanabilmekte aynı zamanda bir ülkede görülen majör genotipik klonlar belirlenerek, ülkedeki kökenlerin orijini hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (Durmaz, 2011). *B. anthracis*'in olası bulaşma kaynaklarını araştırmak ve suşlar arasındaki genetik ilişkiyi belirlemek için üç moleküler tiplendirme metodu, kanonik tek nükleotid polimorfizmleri (canSNP), tek nükleotid tekrar (SNR) analizi ve çok lokuslu değişken-sayı tekrar analizi (MLVA) kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2017).

1.3.1. SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Analizi

B. anthracis izolatlarını önceden tanımlanmış üç ana soy (A, B ve C) ve 12 farklı alt soy veya alt grupları mevcuttur. PCR analizine, her biri için oligonükleotidler ve probler ile 13 TaqMan-Minor Groove Binding (MGB) allelik ayırım analizleri kullanılarak kanonik tek nükleotid polimorfizmi (CanSNP) tanımlaması yapılmaktadır. 13 CanSNP primerlerinin elde ettiği sonuçlar, tanınmış 12 alt-soy ya da alt-grup ile karşılaştırılmıştır (Rume ve ark., 2016). *B. anthracis* SNP ağacındaki temel filogenetik kavşaklarda yer alan 13 seçilmiş SNP'yi kullanarak, kanonik single nükleotid polimorfizmleri (canSNP'ler) olarak adlandırılan yaklaşım şu anda en uygun ilk soy genotipleme analizleridir (Zhang ve ark., 2018). Şu anda *B. anthracis* için kullanılan klasik SNP tipleme siteleri, Keim ve

ark. (2004) tarafından, 42 ülke ve bölgeden 1033 *B. anthracis* izolatının genomik analizinin ardından tasarlanan canSNP genotipleridir (Wang ve ark., 2020).

1.3.2. SNR (Single Nucleotide Repeat / Tek Nükleotid Tekrarı) Analizi

Tiplendirme çalışmaları içerisinde tek nükleotid tekrar dizilerini analiz ederek ince ölçekli çözüm sağlamada daha fazla ilerleme sağlanmıştır. Tek nükleotid tekrarı (SNR) analizi, tekrar uzunluğunun sadece tek bir nükleotid olduğu özel bir variable number tandem repeat (VNTR) kategorisidir ve bu dizilerin evrimi oldukça hızlıdır. SNR analizi, salgın vakalarında çok yakından ilişkili olan izolatları birbirinden ayırt etmek için kullanılmaktadır (Derzelle ve Thierry, 2013). SNR analizi salgınla veya epidemiyile ilişkili mikroorganizmaların ayrıntılı analizleri için kullanılmakta ve bu yöntemle MLVA'nın ortak olarak bulduğu epidemik izolatlar alt tiplere ayrılabilir. SNR yöntemi biyoterörizm ilişkili salgınların (anthrax/şarbon) analizinde ve kaynağın saptanmasında oldukça yararlı bilgiler sağlayabilmektedir (Durmaz, 2011). Mullins ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, SNR yöntemini kullanarak *B. anthracis*'in dört alt genotip belirlemişlerdir. Hahn ve ark. (2014), Kanada'da *B. anthracis* izolatlarının tek nükleotid tekrar analizinde Pirosekans ve Sangersekans karşılaştırılması yapmışlardır.

1.3.3. Çok Lokuslu Değişken-Sayı Tekrar Analizi (Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis / MLVA)

Bakteriyel genomlar, aynı dizi tekrarlarının art arda sıralandığı bölgeleri içermektedir. Bu bölgelerdeki tekrarların sayısı bakteri izolatları arasında sıklıkla değiştiğinden, her biri değişken sayılı ardışık tekrarı (Variable Number Tandem Repeat / VNTR) olarak adlandırılmaktadır (Sawa ve ark., 2020). Çok lokuslu değişken sayılı ardışık tekrar analizinde (MLVA) kullanılan sıralı tekrarlar, satellitler arasında sınıflandırılmaktadır ve 6-100 baz çifti uzunluktakilere minisatellit, 1-8 baz çifti uzunluktakilere ise mikrosatellitler adı verilmektedir (Durmaz, 2011). MLVA,

VNTR'lerin PCR ile tespit edilmesine dayanan bir genotiplendirme yöntemidir. PCR aracılığıyla amplifiye edilen, lokusların tekrar sayısı, jel elektroforezi veya yüksek çözünürlüklü kapiler elektroforez ile lokusların boyutu ölçülerek belirlenmektedir. Daha sonra, MLVAbank genel veritabanını kullanılarak karşılaştırma esasına göre genotiplendirme yapılmaktadır (Sawa ve ark., 2020).

B. anthracis suşlarının moleküler tiplendirmesinde çok lokuslu değişken sayılı ardışık tekrarların analizi yaygın şekilde kullanılmaktadır. Analizi yapılan lokusların içerisindeki sıralı tekrarların sayısı suşlar arasında değişiklik gösterebilmektedir ve buna bağlı olarak amplifiye edilen lokusun büyüklüğü değişmektedir. Sıralı tekrarların sayı farklılığı genellikle epidemiyolojik olarak ilişkisiz olan suşlarda gözlenmekte, aynı soydan gelen salgınla ilişkili olan suşlarda ise sıralı tekrarların uzunlukları aynı kalmaktadır. Dolayısıyla epidemik olarak ilişkisiz kaynaklardan gelen izolatların lokusları, sıralı tekrar sayısı ve büyüklük bakımından farklılık göstermektedir (Durmaz, 2011).

2000 yılındaki ilk MLVA sisteminde 8 lokusta (MLVA-8) sıralı tekrarların analizi hedeflenmiştir. Keim ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada, 426 *B. anthracis* suşunun MLVA-8 tiplendirmesi sonucunda 89 farklı genotip tanımlanmıştır. Manzulli ve ark. (2018) İtalya'da, 1984'ten 2017'ye kadar olan şarbon salgınları sırasında izole edilen *B. anthracis* suşlarının *in-vitro* antimikrobiyal duyarlılıklarının değerlendirilmesi çalışmalarında 15 lokuslu MLVA (MLVA-15) yönteminden yararlanmışlardır. Daha yüksek ayırım gücü arayışında, MLVA sistemini yeni şemalara yükseltmek için farklı araştırmalarla ek VNTR grupları (MLVA-15, MLVA-25 veya MLVA-31) eklenmiştir (Derzelle ve Thierry, 2013).

1.3.4. Tüm Genom Dizileme

Tüm genom dizilimi (WGS/Whole Genome Sequence), *B. anthracis*'in alt tiplerinin saptanması için kullanılmakla birlikte patojenin bulaşmasını incelemek, şarbon salgınlarını araştırmak ve rutin sürveyansı gerçekleştirmek için düzenli olarak

kullanılmaktadır. Core-genome multilocus sekans tipleme (cgMLST) ise, yüksek çözünürlüklü suş karakterizasyonu sağlamak için tüm genom sekans verilerini kullanan bir bakteri genotiplendirme yöntemidir (Abdel-Glil ve ark., 2021).

Tüm genom dizileme çalışmaları dünya genelinde şarbon ulusal referans laboratuvarları tarafından kullanılacak WGS verilerini ve epidemiyolojik yorumlama ölçütlerini içeren analitik bir iş planlamasının oluşturulmasına katkıda bulunabilmektedir. Gelişen teknoloji ile paralel olarak tüm genom dizileme verilerinin kullanılmasıyla, hastalığın olası bir yayılımı için risk altındaki bölgelerin haritasını çıkarmak mümkün olacaktır (Chiaverini ve ark., 2020). Ayrıca *B. anthracis*'in genomunda meydana gelebilecek mutasyonların sıklığını belirlemek, penisilin direnciyle ilişkili mutasyonları belirlemek ve penisilin direncini tahmin etmede tüm genom dizileme (WGS) verilerinden yararlanılmaktadır (Gargis ve ark., 2018).

Bu çalışmada insan ve hayvan kaynaklı *B. anthracis* suşlarının MLVA-31 yöntemi ile moleküler epidemiyolojik analizinin yapılması amaçlanmıştır. Bu çalışma ile ülkemizde görülen *B. anthracis* genotiplerinin belirlenmesi, ülkemizde insan ve hayvan kaynaklı suşlar arasındaki epidemiyolojik ilişkinin saptanması ve hayvanlar ile insanlar arasındaki genotip geçişlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Mikroorganizmalar

Tez çalışmasında kullanılmak üzere T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarı'ndan 28 adet insandan izole edilen *Bacillus anthracis* suşu ve Max sterne aşısı suşu alındı. Aynı daire başkanlığına bağlı Refik Saydam Kültür Koleksiyonu'ndan 3 adet suş alındı. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarından 82 adet hayvan orijinli *B. anthracis* suşu alındı. Çalışmada yararlanılan tüm *B. anthracis* suşlarının, suş kodları, izole edildikleri orijin, gönderen şehir ve tarih (yıl) Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların kodları, orijinleri, şehir ve tarihleri.

NO	SUŞ KODU	ORİJİN	ŞEHİR	TARİH
1	Ba/A/01	Hayvan (Keçi)	Ankara (Bala)	2010
2	Ba/H/01	İnsan	Van	2011
3	Ba/A/02	Hayvan	Yozgat (Sarıkaya)	2011
4	Ba/A/03	Hayvan	Ankara (Nallıhan)	2011
5	Ba/A/04	Hayvan (Sığır)	Bolu (Gerede)	2011
6	Ba/A/05	Hayvan	Ankara (Polatlı)	2011
7	Ba/A/06	Hayvan	Ankara (Bala)	2011
8	Ba/A/07	Hayvan (Keçi)	Çorum (Sungurlu)	2011
9	Ba/A/08	Hayvan	Ankara (Şereflikoçhisar)	2011
10	Ba/A/09	Hayvan	Yozgat (Sarıkaya)	2011
11	Ba/A/10	Hayvan	Ankara (Nallıhan)	2011
12	Ba/A/11	Hayvan	Nevşehir	2011
13	Ba/A/12	Hayvan (Sığır)	Bolu (Gerede)	2011
14	Ba/A/13	Hayvan	Ankara (Nallıhan)	2011
15	Ba/A/14	Hayvan	Ankara (Bala)	2011

Çizelge 2.1. Devam. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların kodları, orijinleri, şehir ve tarihleri.

16	Ba/H/02	İnsan	Kırşehir	2012
17	Ba/H/03	İnsan	Van	2012
18	Ba/H/04	İnsan	Van	2012
19	Ba/H/05	İnsan	Van	2012
20	Ba/H/06	İnsan	Van	2012
21	Ba/H/07	İnsan	Bursa	2012
22	Ba/A/15	Hayvan (Sığır)	Samsun	2012
23	Ba/A/16	Hayvan (Koyun)	Eskişehir (Sivrihisar)	2012
24	Ba/A/17	Hayvan	Ankara (Haymana)	2012
25	Ba/A/18	Hayvan	Eskişehir (Sivrihisar)	2012
26	Ba/A/19	Hayvan	Ankara (Yakup Abdal köyü)	2012
27	Ba/A/20	Hayvan	Bursa	2012
28	Ba/A/21	Hayvan (Sığır)	Kastamonu	2012
29	Ba/H/08	İnsan	Bilinmiyor	2013
30	Ba/H/09	İnsan	Samsun	2014
31	Ba/H/10	İnsan	Bilecik	2014
32	Ba/H/11	İnsan	Ankara (Polatlı)	2014
33	Ba/A/22	Hayvan	Çorum (Sungurlu)	2014
34	Ba/H/12	İnsan	Giresun	2015
35	Ba/H/13	İnsan	İzmir	2016
36	Ba/H/14	İnsan	Bursa	2016
37	Ba/H/15	İnsan	Ağrı	2016
38	Ba/H/16	İnsan	Bilinmiyor	2016
39	Ba/A/23	Hayvan (Keçi)	Çorum (Sungurlu)	2016
40	Ba/A/24	Hayvan (Keçi)	Ankara (Bala)	2016
41	Ba/A/25	Hayvan	Kayseri (İncesu)	2016
42	Ba/A/26	Hayvan (Sığır)	Nevşehir (Hacıbektaş)	2016
43	Ba/A/27	Hayvan (sığır)	Kırşehir	2017
44	Ba/A/28	Hayvan (Koyun)	Yozgat (Şefahtli)	2017
45	Ba/A/29	Hayvan (sığır)	Ordu	2017
46	Ba/A/30	Hayvan (sığır)	Ordu	2017
47	Ba/A/31	Hayvan (sığır)	Yozgat (Şefahtli)	2017
48	Ba/A/32	Hayvan	Ankara (Haymana)	2017
49	Ba/A/33	Hayvan (sığır)	Ordu	2017
50	Ba/A/34	Hayvan (Koyun)	Ankara (Polatlı)	2017
51	Ba/A/35	Hayvan (Koyun)	Ankara (Polatlı)	2017
52	Ba/H/17	İnsan	Tranzon	2018
53	Ba/H/18	İnsan	Trabzon	2018
54	Ba/H/19	İnsan	Diyarbakır	2018
55	Ba/H/20	İnsan	Trabzon	2018

Çizelge 2.1. Devam. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların kodları, orijinleri, şehir ve tarihleri.

56	Ba/H/21	İnsan	İstanbul	2018
57	Ba/A/36	Hayvan (Sığır)	Tunceli (Pertek)	2018
58	Ba/A/37	Hayvan (Koyun)	Mardin (Mazıdağı)	2018
59	Ba/A/38	Hayvan (Koyun)	Bitlis (Hizan)	2018
60	Ba/A/39	Hayvan (Sığır)	Bingöl	2018
61	Ba/A/40	Hayvan (Sığır)	Ankara (Haymana)	2018
62	Ba/A/41	Hayvan (Sığır)	İstanbul (Pendik)	2018
63	Ba/A/42	Hayvan (Sığır)	Kayseri (Pınarbaşı)	2018
64	Ba/A/43	Hayvan (Sığır)	Kayseri (Pınarbaşı)	2018
65	Ba/A/44	Hayvan (Sığır)	Kayseri (Pınarbaşı)	2018
66	Ba/A/45	Hayvan (Sığır)	Elazığ	2018
67	Ba/A/46	Hayvan (Sığır)	Elazığ	2018
68	Ba/A/47	Hayvan (Sığır)	Samsun	2018
69	Ba/A/48	Hayvan (Sığır)	Karabük (Eflani)	2018
70	Ba/A/49	Hayvan (Sığır)	Elazığ	2018
71	Ba/A/50	Hayvan (Sığır)	Samsun	2018
72	Ba/A/51	Hayvan (Sığır)	Konya (Beyşehir)	2018
73	Ba/A/52	Hayvan (Sığır)	Samsun (Terme)	2018
74	Ba/A/53	Hayvan (Sığır)	Sivas	2018
75	Ba/A/54	Hayvan (Sığır)	Samsun (İlkadım)	2018
76	Ba/A/55	Hayvan (Sığır)	Sivas	2018
77	Ba/A/56	Hayvan (Keçi)	Mersin (Gülнар)	2018
78	Ba/A/57	Hayvan (Sığır)	Konya	2018
79	Ba/A/58	Hayvan (Sığır)	Samsun	2018
80	Ba/A/59	Hayvan (Sığır)	Ankara (Gölbaşı)	2018
81	Ba/A/60	Hayvan (Sığır)	Ankara (Gölbaşı)	2018
82	Ba/A/61	Hayvan (Sığır)	Ankara (Beypazarı)	2018
83	Ba/A/62	Hayvan (Sığır)	Sivas (Yıldızeli)	2018
84	Ba/A/63	Hayvan (Sığır)	Van	2018
85	Ba/A/64	Hayvan (Düve)	Çerkeş (Yeniköy)	2018
86	Ba/A/65	Hayvan (Sığır)	Ankara (Gölbaşı)	2018
87	Ba/H/22	İnsan	Bilinmiyor	2019
88	Ba/A/66	Hayvan (Sığır)	Samsun (Alaçam)	2019
89	Ba/A/67	Hayvan (Sığır)	Samsun (Alaçam)	2019
90	Ba/A/68	Hayvan (Koyun)	Eskişehir (Sivrihisar)	2019
91	Ba/A/69	Hayvan (Sığır)	Karabük (Eflani)	2019
92	Ba/A/70	Hayvan (Sığır)	Yozgat (Sorgun)	2019
93	Ba/A/71	Hayvan (Sığır)	Yozgat (Sarıkaya)	2019
94	Ba/A/72	Hayvan (Keçi)	Ankara (Beypazarı)	2019
95	Ba/H/23	İnsan	Edirne	2020

Çizelge 2.1. Devam. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların kodları, orijinleri, şehir ve tarihleri.

96	Ba/A/73	Hayvan (Sığır)	İzmir (Bornova)	2020
97	Ba/A/74	Hayvan (Kuzu)	Çankırı	2020
98	Ba/A/75	Hayvan (Sığır)	Konya	2020
99	Ba/A/76	Hayvan (Koyun)	Yozgat (Sarıkaya)	2020
100	Ba/A/77	Hayvan (Sığır)	Çorum (Alaca)	2020
101	Ba/A/78	Hayvan (Sığır)	Ardahan (Çıldır)	2020
102	Ba/H/24	İnsan	Elazığ	2021
103	Ba/H/25	İnsan	Erzurum	2021
104	Ba/H/26	İnsan	Amasya	2021
105	Ba/H/27	İnsan	İstanbul	2021
106	Ba/H/28	İnsan	Mersin	2021
107	Ba/A/79	Hayvan (Koyun)	Eskişehir Sivrihisar	2021
108	Ba/A/80	Hayvan (Sığır)	Çankırı	2021
109	Ba/A/81	Hayvan (Sığır)	Samsun	2021
110	Ba/A/82	Hayvan	Iğdır	
111	Max Sterne			
112	RSKK1120			
113	RSKK9703			
114	RSKK14003			

2.1.2. Besiyerleri

Çalışmada kullanılan suşları canlandırmak, çoğaltmak ve konvansiyonel tanı yöntemlerini çalışmak için farklı besiyerleri belirtilen oranlarda kullanıldı.

%5'lik Koyun Kanlı Agar (CONDA Blood Agar Base, Spain)

Ticari olarak üretilip satın alınan kanlı agar'ın 40 g'ı 1000 ml distile suda çözülerek 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril hale getirildi. Sıcaklığı 45-50°C'ye düşene kadar soğuması beklendi. 50 ml steril, defibrine edilmiş koyun kanı ilave edilerek homojen hale getirildi. Tüm besiyeri 20 ml petrilere dağıtıldı. Besiyerleri ve karışım oranları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Nutrient Broth (OXOID, England)

Ticari olarak üretilip satın alınan nutrient broth' un 13 g'ı 1000 ml distile suda çözülerek 121°C'de 15 dakika otoklavda steril hale getirildi. 5-10'ar ml şeklinde steril tüplere dağıtıldı. Besiyerleri ve karışım oranları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Gliserollü Buyyon

Ticari olarak üretilip satın alınan Tryptic soy broth w/o dextrose'dan (Condalab, Spain) 2,75 g tartıldı. 16 ml gliserol (Merck, USA) ve 84 ml distile su ile karıştırılarak pH 7,3'e ayarlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril hale getirildi. Besiyerleri ve karışım oranları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve karışım miktarları.

Besiyerleri	Karışım miktarları
%5'lik Koyun Kanlı Agar (CONDA Blood Agar Base, Spain)	40 g/1000 ml + 10 ml Koyun kanı
Nutrient broth (OXOID, England)	13 g/1000 ml
Gliserollü Buyyon	2,75 g Tryptic soy broth w/o dextrose (Condalab, Spain) 16 ml gliserol (Merck, USA) 84 ml dH ₂ O

2.1.3. Konvansiyonel Tanı Materyalleri

Çalışmada kullanılan suşların tanımlaması ve doğrulaması için penisilin direnci testinde 10 ünite penisilin diskleri (Himedia, India), Gama (Y) fajı duyarlılık testinde Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarından alınan faj solüsyonu kullanıldı.

2.1.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Reaktifleri ve Primerleri

Çalışmada PXO1 ve PXO2 plazmid DNA'sı ile purA ve ptsI genomik DNA'sını hedefleyen 4 primer çifti ve bu primer bölgelerine spesifik 4 adet primer prob kullanıldı. Primerlerin hedef bölgeleri DNA dizisi üzerindeki pozisyonları ve DNA dizileri Çizelge 2.3.'te verilmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda HS Prime Taq Premix (2X) (GeNet Bio, South Korea) master mixi kullanıldı.

Çizelge 2.3. qPCR çalışmasında kullanılan primerler, hedef bölgeleri, pozisyonları ve baz dizileri (İreng ve ark., 2010).

Primer ismi	Hedef	Pozisyon	Dizileme(5'→3')
Lef-1-FOR	<i>pXO1</i>	150116–150092	CATCGGTCTGGAAATAAAGGATGTA
Lef-2-REV	<i>pXO1</i>	150037–150062	GCACTACTTTTCGCATCAATCCTTATA
pXO1-LEF-PRO	<i>pXO1</i>	150067–150083	FAM-CTTTTTCGGATTGCTTA-NFQ-MGB
CapA-1-FOR	<i>pXO2</i>	54939–54917	TGACGATGGTTGGTGACATTATG
CapA-2-REV	<i>pXO2</i>	54871–54898	AATCTGTACCGTAACGATTAACAATCTC
pXO2-CAPa-PRO	<i>pXO2</i>	54900–54915	VIC-TTTACGTGACGTCCCA-NFQ-MGB
PUR-ANT-FOR	<i>purA</i>	5208833–5208806	CAACACTTAAAATTTGTGTTGCTTACAA
PUR-ANT-REV	<i>purA</i>	5208746–5208773	TCACATTTTCGCTAAAATGTTTAAGTTTG
PUR-ANT-PRO	<i>purA</i>	5208802–5208788	FAM-CGATGGGAAAGTTAT-NFQ-MGB
PTS-BAC-FOR	<i>ptsI</i>	3902805–3902827	GCTTGACGGAAYTCATCAAGAGT
PTS-BAC-REV	<i>ptsI</i>	3902925–3902900	TATGYCTTGAWGARCAAGATGTGTTC
PTS-BAC-PRO	<i>ptsI</i>	3902894–3902880	VIC-ACAACCTTCGTGCATT-NFQ-MGB

2.1.5. MLVA Yönteminde Kullanılan Reaktifler ve Primerler

Çalışmanın Multiplex PCR aşamasında HS Prime Taq Premix (2X) (GeNet Bio, South Korea) master mixi kullanıldı. Çalışmada 31 gen lokusuna spesifik 31 primer çifti kullanıldı. Forward primerler fragman analizi için işaretlidir ve farklı

kanallarda analiz edilmeyi sağlamaktadır. Kullanılan primerler ve DNA dizileri Çizelge 2.4.'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. MLVA çalışmasında kullanılan primerler ve DNA dizileri

Primer	Dizileme (5'→3')
vrrA-F	5'-(cy5.5)CACAACTACCACCGATGGCACA-3'
vrrA-R	5'-GCGCGTTTCGTTGATTCATAC-3'
vrrB1-F	5'-(cy5)ATAGGTGGTTTTCCGCAAGTTATTC-3'
vrrB1-R	5'-GATGAGTTTGATAAAGAATAGCCTGTG-3'
vrrB2-F	5'-(WellRed dye D2)CACAGGCTATTCTTTATCAAATCATC-3'
vrrB2-R	5'-CCCAAGGTGAAGATTGTTGTTGA-3'
vrrC1-F	5'(cy5)GAAGCAAGAAAGTGATGTAGTGGAC-3'
vrrC1-R	5'-CATTTCTCAAGTGCTACAGGTTTC-3'cy5
vrrC2-F	5'(cy5)CCAGAAGAAGTGGAACCTGTAGCAC-3'
vrrC2-R	5'-GTCTTTCCATTAATCGCGCTCTATC-3'
CG3-F	5'-(cy5.5)TGTCGTTTTACTTCTCTCCAATAC-3'
CG3-R	5'-AGTCATTGTTCTGTATAAAGGGCAT-3'
pXO1-aat-F	5'-(cy5)CAATTTATTAACGATCAGATTAAGTTCA-3'
pXO1-aat-R	5'-TCTAGAATTAGTTGCTTCATAATGGC-3'
pXO2-at-F	5'-(cy5.5)TCATCCTCTTTTAAGTCTTGGGT-3'
pXO2-at-R	5'-GTGTGATGAACCTCCGACACA-3'
bams01-F	5'-(cy5)GTTGAGCATGAGAGGTACCTTGTCCTTTT-3'
bams01-R	5'-AGTTCAAGCGCCAGAAGGTTATGAGTTATC-3'
bams03-F	5'-(cy5.5)GCAGCAACAGAAAACCTCTCTCCAATAACA-3'
bams03-R	5'-TCCTCCCTGAGAACTGCTATCACCTTTAAC-3'
bams05-F	5'-(WellRed dyeD2)GCAGGAAGAACAAAAGAACTAGAAGAGCA-3'
bams05-R	5'-ATTATTAGCAGGGGCTCTCCTGCATTACC-3'
bams13-F	5'-(cy5.5)AATTGAGAAATTGCTGTACCAAACCT-3'
bams13-R	5'-CTAGTGCATTTGACCCTAATCTTGT-3'
bams15-F	5'-(WellRed dyeD2)GTATTTCCCCCAGATACAGTAATCC-3'
bams15-R	5'-GTGTACATGTTGATTCATGCTGTTT-3'
bams21-F	5'-(cy5.5)TGTAGTGCCAGATTGTGCTTCTGTA-3'
bams21-R	5'-CAAATTTTGAGATGGGAGTTTACT-3'
bams22-F	5'(cy5)ATCAAAAATTCTTGGCAGACTGA-3'
bams22-R	5'-ACCGTTAATTCACGTTTAGCAGA-3'
bams23-F	5'-(WellRed dyeD2)CGGTCTGTCTCTATTATTCAGTGGT-3'
bams23-R	5'-CCTGTTGCTCCTAGTGATTCTTAC-3'
bams24-F	5'-(cy5)CTTCTACTTCCGTACTTGAAATTGG-3'
bams24-R	5'-CGTCACGTACCATTTAATGTTGTTA-3'
bams25-F	5'-(cy5.5)CCGAATACGTAAGAAATAAATCCAC-3'
bams25-R	5'-TGAAAGATCTTGAAAAACAAGCATT-3'
bams28-F	5'-(cy5)CTCTGTTGTAACAAAATTTCCGTCT-3'
bams28-R	5'-TATTAAACCAGGCGTTACTTACAGC-3'
bams30-F	5'-(cy5.5)AGCTAATCACCTACAACACCTGGTA-3'
bams30-R	CAGAAAATATTGGACCTACCTTCC-3'
bams31-F	5'-(WellRed dyeD2)GCTGTATTTATCGAGCTTCAAATCT-3'
bams31-R	5'-GGAGTACTGTTTGTGTAATGTTGTTT-3'
bams34-F	5'-(WellRed dyeD2)CAGCAAAATCAATCGAATCAAA-3'
bams34-R	5'-TGTGCTAAATCATCTTGCTTGG-3'
bams44-F	5'-(cy5.5)GCCGAATTAATTGCTCCTCAAAT-3'
bams44-R	5'-GCACTTGAATATTGGCGGTAT-3'
bams51-F	5'-(cy5)ATTTCTGAAGCAGTTGTGTT-3'
bams51-R	5'-TGCATCTAACAATGCAGAACAA-3'
bams53-F	5'-(WellRed dyeD2)GAGGTGTGTTAGGTGGGCTTAC-3'
bams53-R	5'-CATATTTTACCTTAATTTTGAAG-3'
vntr12-F	5'-(cy5)CGTACGAAGTAGAAGTCATTAA-3'
vntr12-R	5'-GCATATAATTGCACCTCATCTAG-3'

Çizelge 2.4. Devam. MLVA çalışmasında kullanılan primerler ve DNA dizileri

vntr16-F	5'-(WellRed dyeD2)CTCTTGAAAATATAAAACGCA-3'
vntr16-R	5'-GAATAATAAGGGTTCTCATGGTAT-3'
vntr17-F	5'-(cy5.5)TAGGTAAACAAATTTTCGTAATC-3'
vntr17-R	5'-GATCGTACAACAGCAATTATCAT-3'
vntr19-F	5'-(WellRed dyeD2)GTGATGAAATCGGACAAGTTAGGAG-3'
vntr19-R	5'-GAAATATTTTATTAAACATGCTTTCCATCC-3'
vntr23-F	5'-(cy5.5)TTTAGAAACGTTATCACGCTTA-3'
vntr23-R	5'-GTAATACGTATGGTTCATTCCC-3'
vntr35-F	5'-(cy5.5)AAATAATATGTTCCTTTTGCTG-3'
vntr35-R	5'-GTCCTGAAATAAATGCTGAAT-3'

Fragman analizi için; kapiler jel elektroforezi (Beckman Coulter CEQ™ 8000 Genetic Analysis System, ABD) cihazında kullanılmak üzere Map Marker (Size Standart 50-1200bp) (Bio Ventures, USA) Sample Loading Solution, (BC/SCIEX, USA), Separation Buffer (BC/SCIEX, USA), Separation Gel-LPAI (BC/SCIEX, USA) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Konvansiyonel Tanı Yöntemleri

Suşların canlandırılması ve seçici besiyerinde üretilmesi, koloni morfolojisi incelemeleri, penilisin direnç testleri ve gama fajı duyarlılık testleri ve T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığına bağlı Biyogüvenlik Seviye 3 (BSL3) Laboratuvarında çalışıldı.



Şekil 2.1. BSL3 laboratuvarı, konvansiyonel çalışmalar.

2.2.1.1. Suşların Canlandırması ve Selektif Besiyerinde Üretilmesi

Çalışmada kullanılan suşlar, önceden hazırlanmış ve tüplere 5 ml olarak dağıtılmış Nutrient Broth sıvı besiyerinde 37°C’de 1 gece inkübe edildi. Ardından %5 koyun kanlı agara tek koloni ekimi yapıldı. Çalışma sonrasında üreyen koloniler gliserollü buyyonda toplanarak daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C’lik derin dondurucuya kaldırıldı.

2.2.1.2. Penisilin Duyarlılık Testi

Nutrient broth besiyerinde canlandırılıp %5’lik koyun kanlı agarda çoğaltılan suşlar yine %5’lik koyun kanlı agara yayma ekimi yapıldı. Petrinin orta kısmına 10

ünitelik penisilin diski yerleştirildi. 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı (WHO, 2008).

2.2.1.3. Gama (Y) Fajı Duyarlılık Testi

Nutrient broth besiyerinde canlandırılıp %5’lik koyun kanlı agarda çoğaltılan suşlar yine %5’lik koyun kanlı agara yayma ekimi yapıldı. Petrinin orta kısmına 15 µl gama fajı damlatıldı. 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı (WHO, 2008).

2.2.2. Suşlardan DNA Ekstraksiyonu

Nutrient broth besiyerinde canlandırılıp %5’lik koyun kanlı agarda çoğaltılan suşların agar üzerinde tek kolonileri öze ile alındı ve 400 µl TE solüsyonu içerisinde homojen hale getirildi. 100 °C’de 10 dakika inkübe edildi, ardından 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı steril tüplere alındı (Dashti, 2009). Elde edilen DNA’ların saflığı ve konsantrasyonları spektrofotometre (NanoDrop) ile ölçüldü. Ölçülen DNA miktarları 50 ng/5µl olacak şekilde seyreltilip PCR yapılana kadar -20°C’de saklandı.

2.2.3. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

DNA ekstraksiyonu yapılan tüm örnekler HS Prime Taq Premix (2X) (GeNet Bio, South Korea) ile plazmid ve genomik DNA’daki bölgeleri hedefleyen primerler ve probalar kullanılarak gerçek zamanlı PCR kuruldu. DNA’lardan her qPCR için 5 µl konuldu. Cap (pXO2) ve Pts (PtsI) bölgelerine ait primer probalar HEX (yellow) kanalında, Lef(pXO1) ve Pur (PurA) bölgelerine ait primer probalar ise FAM (Green) kanalında okunmaktadır. Bu yüzden iki farklı kanaldaki primer problemleri kullanılarak 2 bölgeyi kapsayan multiplex PCR kuruldu. Buna göre Cap-Lef mix ve Pur- PTS mix olmak üzere iki mix hazırlandı ve Rotor-Gene Q Thermocycler (Qiagen, Holland) cihazı kullanılarak gerçek zamanlı PCR işlemi gerçekleştirildi. Ticari kit ve

primerler ile yapılan real-time PCR karışımları Çizelge 2.5'te, PCR döngüleri Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.5. Ticari kit ve primerler ile yapılan Real- time PCR karışımları.

Reajen	Hacim
HS Primer Taq Premix (2X)	10 µl
Forward primerler	0,6 µl – 0,6 µl
Reverse primerler	0,6 µl – 0,6 µl
Primer probları	0,3 µl – 0,3 µl
dH ₂ O	2 µl
Template DNA	5 µl
Toplam	20 uL

Çizelge 2.6. qPCR döngüleri.

Evre	Isı (°C)	Süre (Saniye)	Optik okuma	Döngü Sayısı
Evre 1	95	600	Kapalı	1
Evre 2	95	30	Kapalı	35
	50	30	Açık	

2.2.4. MLVA-31 Çalışması

MLVA çalışmasının ilk basamağı konvansiyonel PCR aşamasıdır. MLVA çalışmada 31 adet DNA bölgesi bakılacağı için 31 primer çifti kullanıldı. İzolat sayısı çok olduğu için her primer çiftine PCR kurmak zahmetli olacağından multiplex PCR hazırlandı. Multiplex PCR primer mix grupları, fragman analizi yaparken hangi kanalda okunacakları ve hedeflenen bölgeler Çizelge 2.7.'de verilmiştir.

Çizelge 2.7. Multiplex PCR mix grupları, analiz kanalları ve hedeflenen bölgeler.

Primer Mix	Kanal	Hedef DNA Bölgesi
A mix	D2	VrrB2
		Bams05
		Bams15
	D3	CG3
		Bams03
		Bams44
	D4	VrrC1
		Bams01
B mix	D2	Bams31
		Bams53
	D3	Bams13
	D4	VrrB1
		VrrC2
C mix	D2	Bams34
	D3	VrrA
		Bams21
	D4	Bams25
		Bams24
D mix	D2	Bams23
	D3	PXO2
		Bams30
	D4	PXO1
		Bams22
E mix	D2	Bams51
		VNTR16
	D3	VNTR19
		VNTR17
		VNTR23
	D4	VNTR35
		VNTR12

Tüm örnekler için ticari kit kullanılarak 5 multiplex PCR mix'i hazırlanmış ve termal döngü (SensoQuest, Germany) cihazına yüklenmiştir. Ticari kit ve primerler ile yapılan multiplex PCR karışımları Çizelge 2.8.'de, PCR döngüleri Çizelge 2.9.'da verilmiştir.

Çizelge 2.8. Ticari kit ve primer mix ile yapılan multiplex PCR karışımları.

Reajen	Hacim
HS Primer Taq Premix (2X)	10 µl
Primer mix F	1,5 µl
Primer mix R	1 µl
dH ₂ O	2,5 µl
Template DNA	5 µl

Çizelge 2.9. Multiplex PCR döngüleri.

Evre	Isı (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Evre 1	95	600	1
Evre 2	94	30	30
	57	45	
	72	45	
Evre 3	72	300	1
Evre 4	4	∞	1

Multiplex PCR ürünleri, oluşan ampliconları gözlemlemek için %1,5'luk agaroz jelde yürütüldü. 1:10 dilüsyon yapılarak kapiler jel elektroforezi (Beckman Coulter CEQTM 8000 Genetic Analysis System, ABD) cihazında analiz edilmeye hazır hale getirildi. Analiz plate'ine 2 ul dilüe edilmiş PCR örneği, üzerine 31 ul Sample loading mix (0,5 µl Size Marker + 30 µl Sample Loading Solution) eklendi. Ayrıca Saperation plate'i hazırlanarak cihaza yüklendi. Cihaz çalışması bittikten sonra her bölgenin fragman uzunlukları not edilerek kod'ları referans rehberine göre hesaplandı. Her bölgenin fragman uzunluklarına göre kod'larının olduğu rehber Çizelge 2.10.'da verilmiştir.

Çizelge 2.10. MLVA fragman uzunlukları ve kod rehberi (Beyer ve ark., 2012).

MLVA bölgeleri	Birim Uzunluk Boyutu	Tekrar sayısı (KOD)	Beklenen Fragment Uzunluğu (bp)	Gözlenen Fragment Uzunluğu (bp)
<i>bams1</i>	21	8	317	321
		10	359	363
		11	380	384
		13	422	426
		16	485	493
<i>bams3</i>	15	18	429	431
		28	579	585
		30	609	615
<i>bams5</i>	39	3	229	227
		5	307	304
		6	346	343
		7	385	382
<i>bams13</i>	9	30	454	457
		33	481	486
		38	526	530
		41	553	559
		42	562	568
		43	571	576
		44	580	585
		45	589	596
		70	814	826
		73	841	853
<i>bams15</i>	9	44	598	597
		45	607	606
		46	616	615
<i>bams21</i>	45	8	631	626
		9	676	672
<i>bams22</i>	36	10	627	623
		11	663	659
		12	699	694
		13	735	727-729
<i>bams23</i>	42	8	567	564
		9	609	605-607
		9,7	639	635
		10	651	644-646
<i>bams24</i>	42	9	595	603
<i>bams25</i>	15	4	391	395
<i>bams28</i>	24	14	493	501

Çizelge 2.10. Devam. MLVA fragman uzunlukları ve kod rehberi (Beyer ve ark., 2012).

<i>bams30</i>	9	48	646	654
		51	673	683
		53	691	703
		54	700	711
		57	727	738
		60	754	765
		69	835	850
		75	889	904
<i>bams31</i>	9	56	700	705
		59	727	731
		63	763	768
		64	772	777
		65	781	786
<i>bams34</i>	39	6	386	392
		7	425	431
		9	503	513
<i>bams44</i>	39	2	183	187
		7	378	382
		8	417	422
<i>bams51</i>	45	9	493	500
<i>bams53</i>	12	6	212	210-213
		8	236	237
<i>CG3</i>	5	1	153	152
		2	158	157
<i>pX01</i>	3	6	126	123
		7	129	126
		8	132	129
		9	135	132
		10	138	135
<i>pX02</i>	2	0	0	0
		6	135	134
		7	137	136
		8	139	138
		9	141	140
		10	143	142
		11	145	144
		12	147	146
<i>vrrA</i>	12	13	149	148
		2	290	288
		4	314	312
		5	326	324

Çizelge 2.10. Devam. MLVA fragman uzunlukları ve kod rehberi (Beyer ve ark., 2012).

<i>vrB1</i>	9	13 17	193 229	192 228
<i>vrB2</i>	9	14	162	160
<i>vrC1</i>	9	49 53 57	544 580 616	552 587-590 621-630
<i>vrC2</i>	18	15 19	532 604	533 604
<i>VNTR12</i>	2	6 7	115 117	114 116
<i>VNTR16</i>	8	0 8 9	0 273 281	0 271 279
<i>VNTR17</i>	8	0 3 4	0 378 386	0 379 387
<i>VNTR19</i>	3	4 5	96 99	93 96
<i>VNTR23</i>	12	3 4 5	185 197 209	184 196 208
<i>VNTR35</i>	6	3 4	109 116	109 116

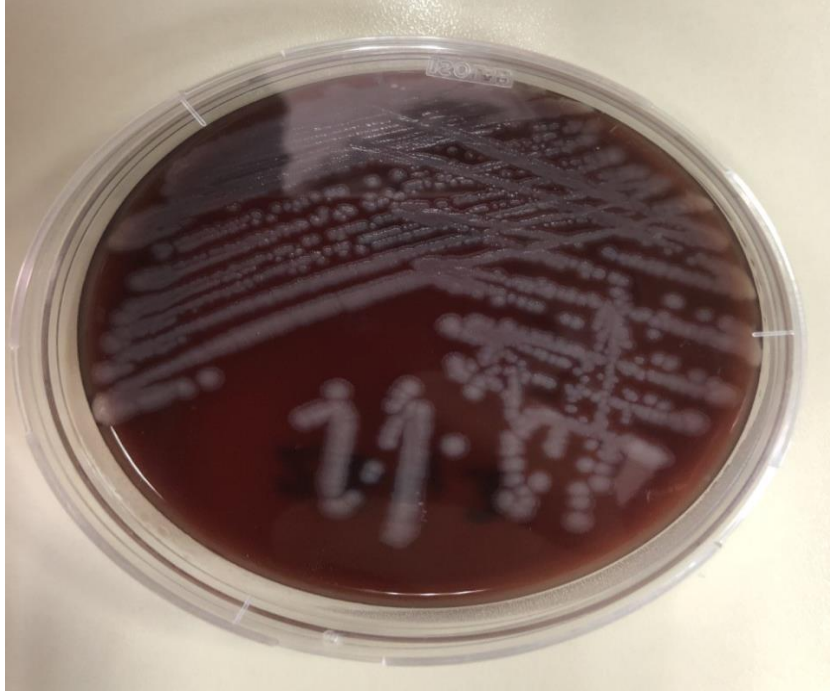
Cihazdan alınan fragman uzunlukları verileri ve tekrar kod'ları Bionumerix 7,5 (Applied-Maths, Belçika) programında analiz edilerek suşların birbirlerine olan yakınlıkları hesaplandı.

3. BULGULAR

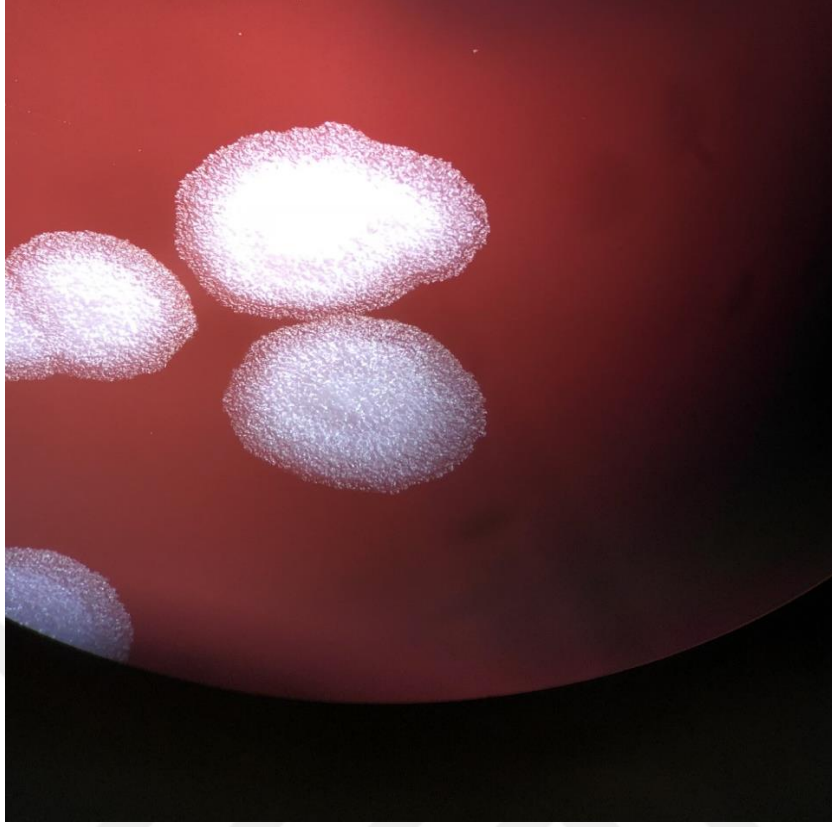
Tez çalışmasında, 28 adet insan, 82 adet hayvan orijinli suş ile 3 adet Refik Saydam Kültür Koleksiyonu'ndan alınan suşu ve 1 adet aşı suşunun MLVA-31 yöntemi ile moleküler karakterizasyonu sağlandı ve suşlar arasındaki klonal ilişki saptandı.

3.1. Konvansiyonel Tanı Yöntemleri ile Suşların Doğrulanması

Çalışmada kullanılan suşlar, nutrient broth besiyerinde canlandırılmasının ardından %5 koyun kanlı agara tek koloni ekimi yapıldı ve 37°C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası koyun kanlı agarda *B. anthracis*'in spesifik (medusa başı) koloni morfolojisi gözlemlendi. Koloni mikroskobu ile incelendiğinde buzlu cam görüntüsü tespit edildi. *B. anthracis*'in koloni morfolojisi Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.

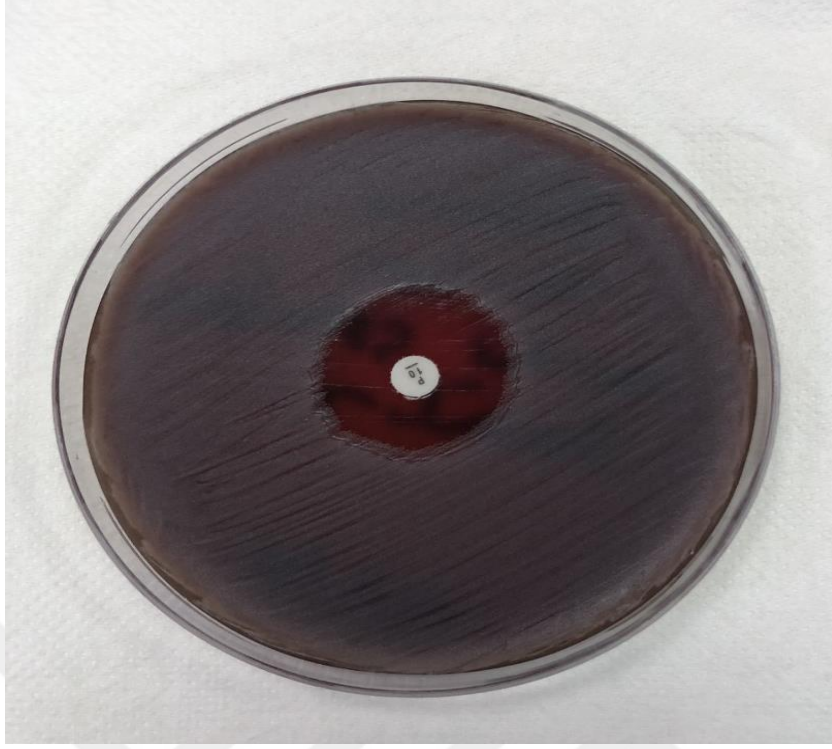


Şekil 3.1. Ba/A/65 suşunun koloni morfolojisi.



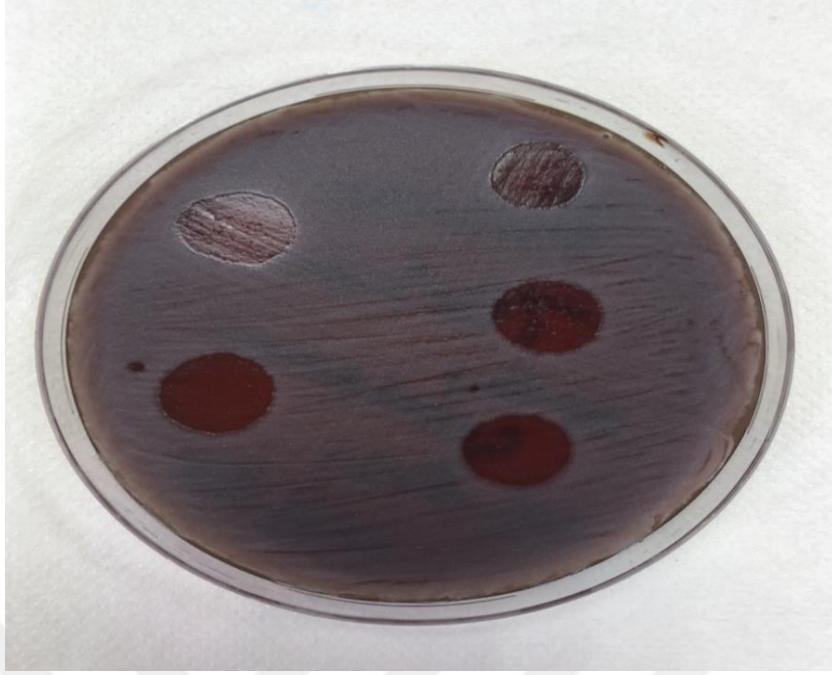
Şekil 3.2. Ba/H/05 suşunun koloni morfolojisi.

Koyun kanlı besiyerine yayma ekimi yapılan ve petrinin orta kısmına penisilin diski yerleştirilen suşların 37°C’de 1 gece inkübasyonu sonrası penisilin diskinin etrafında bakterinin üreyemediği bir zon oluştu. *B. anthracis* suşlarının penisiline duyarlı olduğu tespit edildi. Penisilin diskinin (10 ünite) *B. anthracis*’in üremesine etkisi Şekil 3.3.’te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Ba/A/28 suşunun penisilin duyarlılık testi.

Koyun kanlı besiyesine yayma ekimi yapılan ve petrinin orta kısmına Gama fajı damlatılan suşlar 37°C’de 1 gece inkübasyonun ardından incelendiğinde, fajın damlatıldığı zonda üreme olmazken petrinin diğer yerlerinde *B. anthracis* suşunun ürediği gözlemlendi. Çalışmada kullanılan suşların Gama fajına duyarlı olduğu tespit edildi. Gama fajının *B. anthracis*’e etkisi Şekil 3.4.’te gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Ba/A/06 suşunun Gama Fajı lizisi testi.

3.2. Gerçek Zamanlı PCR (qPCR) Bulguları

Kaynatma yöntemi ile DNA ekstraksiyonları yapılan tüm suşlar qPCR çalışmasına alındı ve iki tanesi plasmid diğer iki tanesi nükleer DNA'sında olacak şekilde 4 reaksiyon gerçekleştirildi. qPCR ardından her suşun 4 farklı bölgede Ct (cycle threshold) değerleri tespit edildi. Max sterne aşı suşu ve RSKK-14003 suşunda *PXO2* plazmid bölgesi için yapılan çalışmada negatif sonuç alındı, Ct değeri gözlenemedi. Çalışma sonucunda elde edilen Ct değerleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *B. anthracis* suşlarının qPCR testi sonucu elde edilen Ct değerleri.

SUŞ KODU	<i>pXO1</i>	<i>pXO2</i>	<i>purA</i>	<i>ptsI</i>
Ba/A/01	16,21	13,54	17,70	14,42
Ba/H/01	15,60	13,60	16,87	14,59
Ba/A/02	16,66	14,05	16,73	14,01
Ba/A/03	18,07	14,97	19,60	15,74
Ba/A/04	15,09	12,95	15,98	13,40
Ba/A/05	16,00	13,45	16,75	13,76

Çizelge 3.1. Devam. *B. anthracis* suşlarının qPCR testi sonucu elde edilen Ct değerleri.

Ba/A/06	16,22	13,65	16,07	12,84
Ba/A/07	16,58	14,09	17,51	14,55
Ba/A/08	15,54	13,39	17,37	14,75
Ba/A/09	16,86	14,94	19,42	15,86
Ba/A/10	15,94	13,60	16,92	14,04
Ba/A/11	16,25	13,56	16,99	14,13
Ba/A/12	15,89	13,30	16,88	14,48
Ba/A/13	14,67	12,69	17,30	14,54
Ba/A/14	14,63	12,39	17,10	14,43
Ba/H/02	15,69	13,57	17,02	14,41
Ba/H/03	16,36	14,04	18,01	15,35
Ba/H/04	15,71	13,15	17,75	14,86
Ba/H/05	16,26	14,05	16,27	14,21
Ba/H/06	15,08	13,06	17,32	14,71
Ba/H/07	16,97	14,26	18,46	15,39
Ba/A/15	15,09	12,72	16,07	13,25
Ba/A/16	14,70	12,50	16,32	13,52
Ba/A/17	15,32	13,13	17,76	14,24
Ba/A/18	15,61	13,07	17,02	14,44
Ba/A/19	15,97	13,58	17,27	14,70
Ba/A/20	15,67	13,55	16,88	13,81
Ba/A/21	14,80	12,64	16,57	13,61
Ba/H/08	15,49	13,40	17,12	14,41
Ba/H/09	14,02	12,15	17,00	13,88
Ba/H/10	14,86	13,02	16,70	13,98
Ba/H/11	15,28	13,23	15,66	13,36
Ba/A/22	14,34	12,52	15,69	13,44
Ba/H/12	15,81	13,29	18,46	15,59
Ba/H/13	14,85	18,78	16,77	14,28
Ba/H/14	15,05	12,90	18,99	15,23
Ba/H/15	14,97	13,16	15,91	13,98
Ba/H/16	15,54	13,56	16,67	14,88
Ba/A/23	16,02	14,29	16,85	13,98
Ba/A/24	15,58	13,59	17,38	15,34
Ba/A/25	15,37	13,26	17,28	15,03
Ba/A/26	15,06	13,09	16,53	14,37
Ba/A/27	15,21	13,20	17,48	14,57
Ba/A/28	16,24	14,09	17,19	15,09

Çizelge 3.1. Devam. *B. anthracis* suşlarının qPCR testi sonucu elde edilen Ct değerleri.

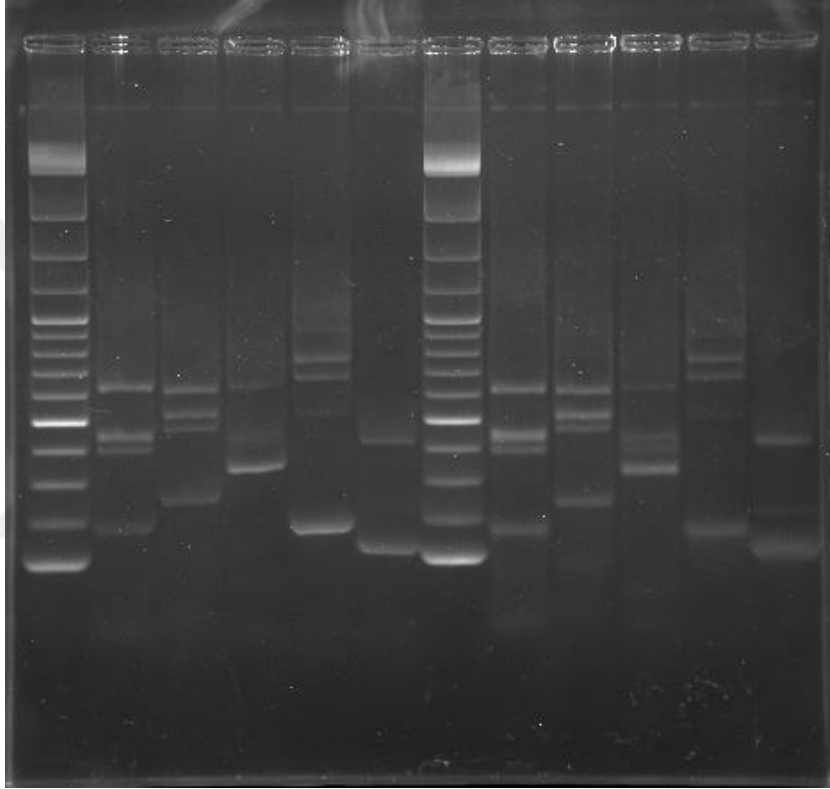
Ba/A/29	15,82	13,62	17,26	14,75
Ba/A/30	15,13	13,33	16,32	14,14
Ba/A/31	15,98	13,64	19,97	17,69
Ba/A/32	16,99	15,20	17,01	14,47
Ba/A/33	16,08	14,12	17,13	14,97
Ba/A/34	15,48	13,53	17,17	14,83
Ba/A/35	15,34	13,12	17,67	15,05
Ba/H/17	15,65	13,30	17,28	14,64
Ba/H/18	15,76	13,16	17,66	14,76
Ba/H/19	16,25	14,02	17,74	14,79
Ba/H/20	15,54	13,21	17,24	14,97
Ba/H/21	15,96	13,61	16,64	14,67
Ba/A/36	16,85	14,51	18,15	15,48
Ba/A/37	15,53	13,39	16,33	14,56
Ba/A/38	15,90	13,63	17,18	14,99
Ba/A/39	14,86	13,10	16,40	14,33
Ba/A/40	16,02	13,67	17,54	15,06
Ba/A/41	16,84	15,00	19,08	16,74
Ba/A/42	15,09	13,07	17,13	14,22
Ba/A/43	15,81	13,35	16,40	14,37
Ba/A/44	15,72	13,56	17,06	14,31
Ba/A/45	16,25	14,27	16,66	14,84
Ba/A/46	15,79	14,07	16,69	14,32
Ba/A/47	15,94	13,85	16,28	14,00
Ba/A/48	16,00	13,45	18,23	15,31
Ba/A/49	16,51	14,05	16,55	14,38
Ba/A/50	16,03	13,81	16,30	14,21
Ba/A/51	15,71	13,71	17,73	15,70
Ba/A/52	15,11	13,26	16,46	14,19
Ba/A/53	14,78	13,01	16,90	14,79
Ba/A/54	16,38	14,03	17,56	15,14
Ba/A/55	14,89	13,10	17,22	14,67
Ba/A/56	16,12	14,07	17,38	15,09
Ba/A/57	16,25	13,84	18,35	15,71
Ba/A/58	15,69	13,54	17,31	14,98
Ba/A/59	16,11	13,73	17,26	14,54
Ba/A/60	15,83	13,45	16,24	14,39
Ba/A/61	15,77	13,57	16,35	14,61

Çizelge 3.1. Devam. *B. anthracis* suşlarının qPCR testi sonucu elde edilen Ct değerleri.

Ba/A/62	16,17	13,87	16,69	14,69
Ba/A/63	15,13	13,09	16,79	14,69
Ba/A/64	16,38	14,49	17,27	14,46
Ba/A/65	15,94	13,86	16,67	14,54
Ba/H/22	16,46	14,53	18,70	15,31
Ba/A/66	15,66	13,18	16,60	14,58
Ba/A/67	16,25	13,97	16,79	14,39
Ba/A/68	15,07	12,72	17,15	14,84
Ba/A/69	17,64	15,63	17,82	16,09
Ba/A/70	15,86	13,64	17,74	14,94
Ba/A/71	15,81	13,70	17,35	15,03
Ba/A/72	15,76	13,71	17,61	15,14
Ba/H/23	14,92	13,26	16,43	14,37
Ba/A/73	15,64	13,90	17,66	15,01
Ba/A/74	16,38	14,51	17,85	15,84
Ba/A/75	16,35	14,52	16,52	14,55
Ba/A/76	16,18	14,31	18,88	15,86
Ba/A/77	15,43	13,79	16,83	14,04
Ba/A/78	16,30	14,12	15,08	15,68
Ba/H/24	17,73	13,53	16,97	14,02
Ba/H/25	16,46	17,56	15,09	14,86
Ba/H/26	16,90	15,21	14,70	15,28
Ba/H/27	17,56	16,60	15,32	14,34
Ba/H/28	17,22	14,14	15,61	15,81
Ba/A/79	17,38	13,35	15,97	14,85
Ba/A/80	15,35	15,20	13,85	15,05
Ba/A/81	15,42	16,28	16,48	14,97
Ba/A/82	16,58	18,14	16,24	14,71
Max Sterne	16,25	NEG	14,15	15,50
RSKK1120	17,26	15,87	13,51	17,15
RSKK9703	14,15	16,12	14,84	15,64
RSKK14003	16,72	NEG	16,48	15,87
RNTC	NEG	NEG	NEG	NEG
SNTC	NEG	NEG	NEG	NEG

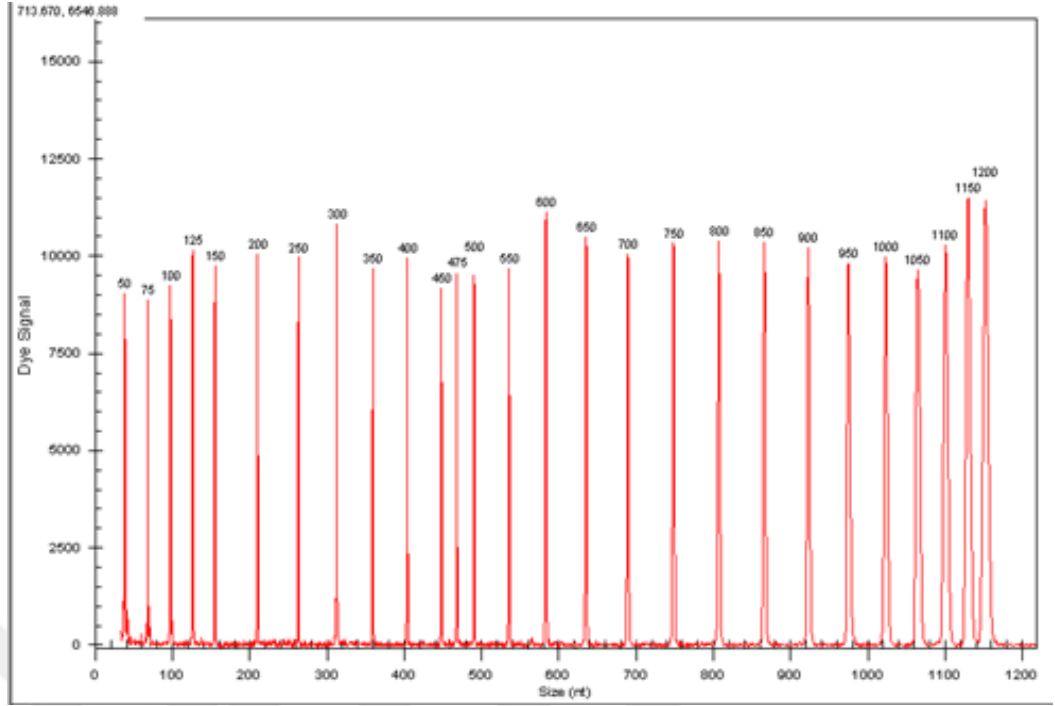
1.1. MLVA-31 Bulguları

MLVA çalışmasının ilk aşamasında her suş için 5 adet multiplex PCR kuruldu ve jel elektroforezinde beklenen bantlar gözlemlendi. Multiplex PCR ile elde edilen amplikonların jel elektroforezinde koşturulması ile gözlenen bantlar Şekil 3.5.'te verilmiştir.

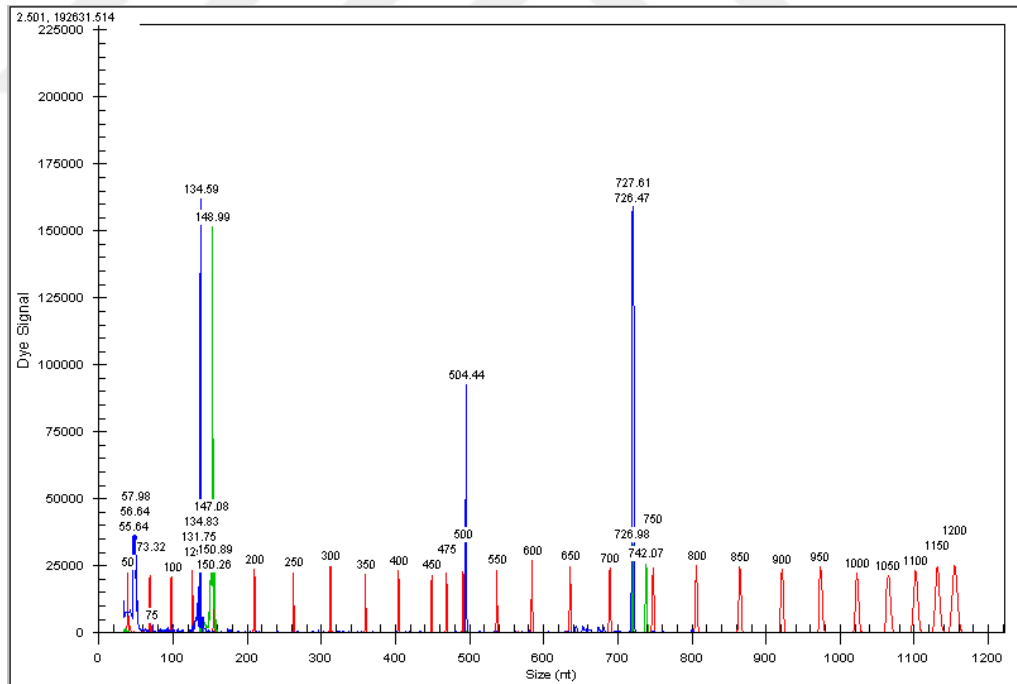


Şekil 3.5. Ba/H/22 ve Ba/A/64 multiplex PCR elektroforez görüntüsü.

Multiplex PCR ile oluşan amplikonlar kapiler jel elektroforezi (Beckman Coulter CEQ™ 8000 Genetic Analysis System, ABD) ile yapılan analiz sonucunda her bir VNTR bölgesinin fragman uzunlukları tespit edildi. Şekil 3.6.'da kapiler jel elektroforezinde kullanılan map marker'ın peak görüntüsü, Şekil 3.7.'de Ba/A/48 D miksinin piklerinin görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.6. Kapiler elektroforez cihazında map marker pikleri.



Şekil 3.7. Kapiler elektroforez cihazında Ba/A/48 D miksinin pikleri.

VNTR bölgelerinin fragman uzunluklarına göre kaç tekrar olduğu hesaplandı. Her suş için VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.2. Suşların A ve B mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

SUŞ NO		A mix								B mix					
		D2			D3			D4		D2		D3	D4		
		VrrB2	Bams05	Bams15	CG3	Bams03	Bams44	VrrC1	Bams01	Bams31	Bams53	Bams13	VrrB1	VrrC2	Bams28
Ba/H/01	Fr. Uz	159	307	615	158	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	5	46	2	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/H/02	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/H/03	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	211	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	6	73	17	15	14
Ba/H/04	Fr. Uz	150	307	615	158	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	13	5	46	2	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/H/05	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/H/06	Fr. Uz	150	307	615	158	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	13	5	46	2	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/H/07	Fr. Uz	159	385	615	153	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	7	46	1	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/H/08	Fr. Uz	159	385	615	153	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	7	46	1	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/H/09	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/H/10	Fr. Uz	150	385	615	158	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	13	7	46	2	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/H/11	Fr. Uz	159	385	615	153	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	7	46	1	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/H/12	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	871	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	76	17	15	14

Çizelge 3.2. Devam. Suşların A ve B mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/H/13	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	646	236	871	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	50	8	76	17	15	14
Ba/H/14	Fr. Uz	159	385	615	153	612	416	615	427	781	236	430	228	603	501
	Code	14	7	46	1	30	8	57	13	65	8	27	17	19	14
Ba/H/15	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/H/16	Fr. Uz	159	385	615	153	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	7	46	1	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/H/17	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	646	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	50	8	73	17	15	14
Ba/H/18	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	733	17	15	14
Ba/H/19	Fr. Uz	150	385	615	158	612	416	615	490	646	236	844	228	532	501
	Code	13	7	46	2	30	8	57	16	50	8	73	17	15	14
Ba/H/20	Fr. Uz	159	307	615	158	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	5	46	2	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/H/21	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/H/22	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/H/23	Fr. Uz	159	385	615	153	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	7	46	1	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/H/24	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	871	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	76	17	15	14
Ba/H/25	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	871	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	76	17	15	14

Çizelge 3.2. Devam. Suşların A ve B mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/H/26	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/H/27	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	871	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	76	17	15	14
Ba/H/28	Fr. Uz	159	385	615	153	612	416	615	427	781	236	430	228	603	501
	Code	14	7	46	1	30	8	57	13	65	8	27	17	19	14
Ba/A/01	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/02	Fr. Uz	159	385	598	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	44	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/03	Fr. Uz	159	385	615	153	612	416	615	427	691	236	456	228	603	501
	Code	14	7	46	1	30	8	57	13	55	8	30	17	19	14
Ba/A/04	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/05	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/06	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	664	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	53	17	15	14
Ba/A/07	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/08	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/09	Fr. Uz	159	385	598	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	44	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/10	Fr. Uz	159	385	615	153	612	416	615	427	691	236	456	228	603	501
	Code	14	7	46	1	30	8	57	13	55	8	30	17	19	14

Çizelge 3.2. Devam. Suşların A ve B mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/A/11	Fr. Uz	150	385	615	153	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	13	7	46	1	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/12	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/13	Fr. Uz	159	385	615	153	612	416	615	427	691	236	844	228	603	501
	Code	14	7	46	1	30	8	57	13	55	8	73	17	19	14
Ba/A/14	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/15	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/16	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	646	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	50	8	73	17	15	14
Ba/A/17	Fr. Uz	150	385	615	153	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	13	7	46	1	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/18	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	646	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	50	8	73	17	15	14
Ba/A/19	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/20	Fr. Uz	159	385	608	153	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	7	45	1	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/A/21	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/22	Fr. Uz	150	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	13	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/23	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14

Çizelge 3.2. Devam. Suşların A ve B mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/A/24	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/25	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/26	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/27	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/28	Fr. Uz	150	385	615	158	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	13	7	46	2	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/A/29	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	727	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	59	8	73	17	15	14
Ba/A/30	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	727	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	59	8	73	17	15	14
Ba/A/31	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/32	Fr. Uz	150	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	13	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/33	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	727	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	59	8	73	17	15	14
Ba/A/34	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/35	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/36	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14

Çizelge 3.2. Devam. Suşların A ve B mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/A/37	Fr. Uz	159	346	615	158	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	6	46	2	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/A/38	Fr. Uz	159	307	615	158	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	5	46	2	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/A/39	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/40	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	646	236	871	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	50	8	76	17	15	14
Ba/A/41	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/42	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/43	Fr. Uz	150	385	615	158	612	416	615	490	781	236	871	228	532	501
	Code	13	7	46	2	30	8	57	16	65	8	76	17	15	14
Ba/A/44	Fr. Uz	150	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	13	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/45	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/46	Fr. Uz	150	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	13	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/47	Fr. Uz	159	346	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	6	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/48	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	871	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	76	17	15	14
Ba/A/49	Fr. Uz	159	346	615	158	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	6	46	2	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14

Çizelge 3.2. Devam. Suşların A ve B mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/A/50	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/51	Fr. Uz	159	385	562	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	40	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/52	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/53	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/54	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/55	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/56	Fr. Uz	159	385	615	153	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	7	46	1	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/A/57	Fr. Uz	159	385	562	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	40	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/58	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	727	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	59	8	73	17	15	14
Ba/A/59	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/A/60	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	13	65	8	30	17	15	14
Ba/A/61	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/62	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14

Çizelge 3.2. Devam. Suşların A ve B mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/A/63	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/64	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	544	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	49	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/65	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14
Ba/A/66	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/67	Fr. Uz	150	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	13	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/68	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/69	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/70	Fr. Uz	159	385	608	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	45	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/71	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/72	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/73	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/74	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/75	Fr. Uz	159	385	615	153	612	416	615	427	781	236	456	228	603	501
	Code	14	7	46	1	30	8	57	13	65	8	30	17	19	14

Çizelge 3.2. Devam. Suşların A ve B mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/A/76	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/77	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/78	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/79	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	871	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	76	17	15	14
Ba/A/80	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
Ba/A/81	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	871	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	76	17	15	14
Ba/A/82	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
RSKK-1120	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
RSKK-9703	Fr. Uz	159	385	615	158	612	416	615	490	781	236	844	228	532	501
	Code	14	7	46	2	30	8	57	16	65	8	73	17	15	14
RSKK-14003	Fr. Uz	159	385	615	158	582	416	580	490	781	236	889	228	532	501
	Code	14	7	46	2	28	8	53	16	65	8	78	17	15	14
Max Sterne	Fr. Uz	159	385	615	158	582	416	580	490	781	236	889	228	532	501
	Code	14	7	46	2	28	8	53	16	65	8	78	17	15	14

Çizelge 3.3. Suşların C, D ve E mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

SUŞ NO		C mix					D mix						E mix					
		D2		D3		D4	D2		D3	D4		D2		D3		D4		
		Bams34	VrrA	Bams21	Bams25	Bams24	Bams23	PXO2	Bams30	PXO1	Bams22	Bams51	VNTR16	VNTR19	VNTR17	VNTR23	VNTR35	VNTR12
Ba/H/01	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	134	730	500	270	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	9	13	9	8	5	4	4	3	5
Ba/H/02	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	143	700	131	730	500	0	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	10	53	8	13	9	0	4	3	4	3	5
Ba/H/03	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	924	131	730	500	0	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	78	8	13	9	0	4	3	4	3	5
Ba/H/04	Fr. Uz	424	300	676	394	603	648	137	924	134	730	500	270	92	386	196	109	112
	Code	7	3	13	4	9	10	7	78	9	13	9	8	4	4	4	3	5
Ba/H/05	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	730	500	0	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	13	9	0	4	3	4	3	5
Ba/H/06	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	134	730	500	0	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	9	13	9	0	5	4	4	3	5
Ba/H/07	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	134	730	500	0	92	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	9	13	9	0	4	4	4	3	5
Ba/H/08	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	924	125	730	500	270	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	78	6	13	9	8	5	4	4	3	5
Ba/H/09	Fr. Uz	424	323	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	5	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/H/10	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	924	125	730	500	270	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	78	6	13	9	8	5	4	4	3	5
Ba/H/11	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	134	730	500	270	95	394	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	9	13	9	8	5	5	4	3	5
Ba/H/12	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	128	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	7	13	9	9	4	3	4	3	5

Çizelge 3.3. Devam. Suşların C, D ve E mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/H/13	Fr. Uz	424	323	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	5	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/H/14	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	879	128	730	500	0	92	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	73	7	13	9	0	4	4	4	3	5
Ba/H/15	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	735	137	730	500	0	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	57	10	13	9	0	4	3	4	3	5
Ba/H/16	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	134	730	500	0	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	9	13	9	0	5	4	4	3	5
Ba/H/17	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	128	658	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	7	11	9	8	4	3	4	3	5
Ba/H/18	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	0	92	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	0	4	4	4	3	5
Ba/H/19	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	128	658	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	7	11	9	9	4	3	4	3	5
Ba/H/20	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	131	730	500	0	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	8	13	9	0	5	4	4	3	5
Ba/H/21	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	735	137	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	57	10	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/H/22	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	735	137	730	500	0	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	57	10	13	9	0	4	3	4	3	5
Ba/H/23	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	924	134	730	500	280	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	78	9	13	9	9	5	4	4	3	5
Ba/H/24	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/H/25	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	149	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	13	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5

Çizelge 3.3. Devam. Suşların C, D ve E mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/H/26	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/H/27	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/H/28	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	134	730	500	270	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	9	13	9	8	5	4	4	3	5
Ba/A/01	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	137	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	10	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/02	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/A/03	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	924	134	730	500	280	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	78	9	13	9	9	5	4	4	3	5
Ba/A/04	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	139	735	131	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	8	57	8	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/A/05	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/06	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/07	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/A/08	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/A/09	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/10	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	134	730	500	270	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	9	13	9	8	5	4	4	3	5

Çizelge 3.3. Devam. Suşların C, D ve E mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/A/11	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/12	Fr. Uz	424	312	676	394	603	564	143	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	8	10	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/13	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	134	730	500	270	92	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	9	13	9	8	4	4	4	3	5
Ba/A/14	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	128	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	7	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/15	Fr. Uz	424	323	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	5	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/16	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	658	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	11	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/17	Fr. Uz	424	312	676	394	603	564	143	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	8	10	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/18	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	658	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	11	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/19	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/20	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	134	730	500	270	92	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	9	13	9	8	4	4	4	3	5
Ba/A/21	Fr. Uz	424	312	676	394	603	564	143	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	8	10	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/22	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	897	128	730	500	270	95	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	75	7	13	9	8	5	3	4	3	5
Ba/A/23	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5

Çizelge 3.3. Devam. Suşların C, D ve E mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/A/24	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	137	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	10	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/25	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	700	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	53	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/26	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	700	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	53	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/27	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/28	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	879	143	730	500	270	92	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	73	12	13	9	8	4	4	4	3	5
Ba/A/29	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/30	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/31	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	700	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	53	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/32	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	700	137	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	53	10	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/33	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/34	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/35	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/36	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	128	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	7	13	9	9	4	3	4	3	5

Çizelge 3.3. Devam. Suşların C, D ve E mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/A/37	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	128	730	500	280	92	394	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	7	13	9	9	4	5	4	3	5
Ba/A/38	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	134	730	500	0	92	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	9	13	9	0	4	4	4	3	5
Ba/A/39	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/A/40	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	658	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	11	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/41	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	184	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	3	3	5
Ba/A/42	Fr. Uz	424	300	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	3	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/A/43	Fr. Uz	424	300	676	394	603	648	141	735	134	730	500	294	92	376	196	109	112
	Code	7	3	13	4	9	10	9	57	9	13	9	11	4	3	4	3	5
Ba/A/44	Fr. Uz	424	300	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	3	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/45	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	730	500	0	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	13	9	0	4	3	4	3	5
Ba/A/46	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/47	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/A/48	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/49	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	897	134	730	500	270	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	75	9	13	9	8	5	4	4	3	5

Çizelge 3.3. Devam. Suşların C, D ve E mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/A/50	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	143	700	134	658	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	10	53	9	11	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/51	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/52	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	700	134	730	500	0	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	53	9	13	9	0	4	3	4	3	5
Ba/A/53	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/54	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	145	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	11	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/55	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/56	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	139	924	134	730	500	270	92	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	8	78	9	13	9	8	4	4	4	3	5
Ba/A/57	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	131	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	8	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/58	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/A/59	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	879	143	730	500	270	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	73	12	13	9	8	5	4	4	3	5
Ba/A/60	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	879	143	730	500	270	95	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	73	12	13	9	8	5	4	4	3	5
Ba/A/61	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/62	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	145	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	11	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5

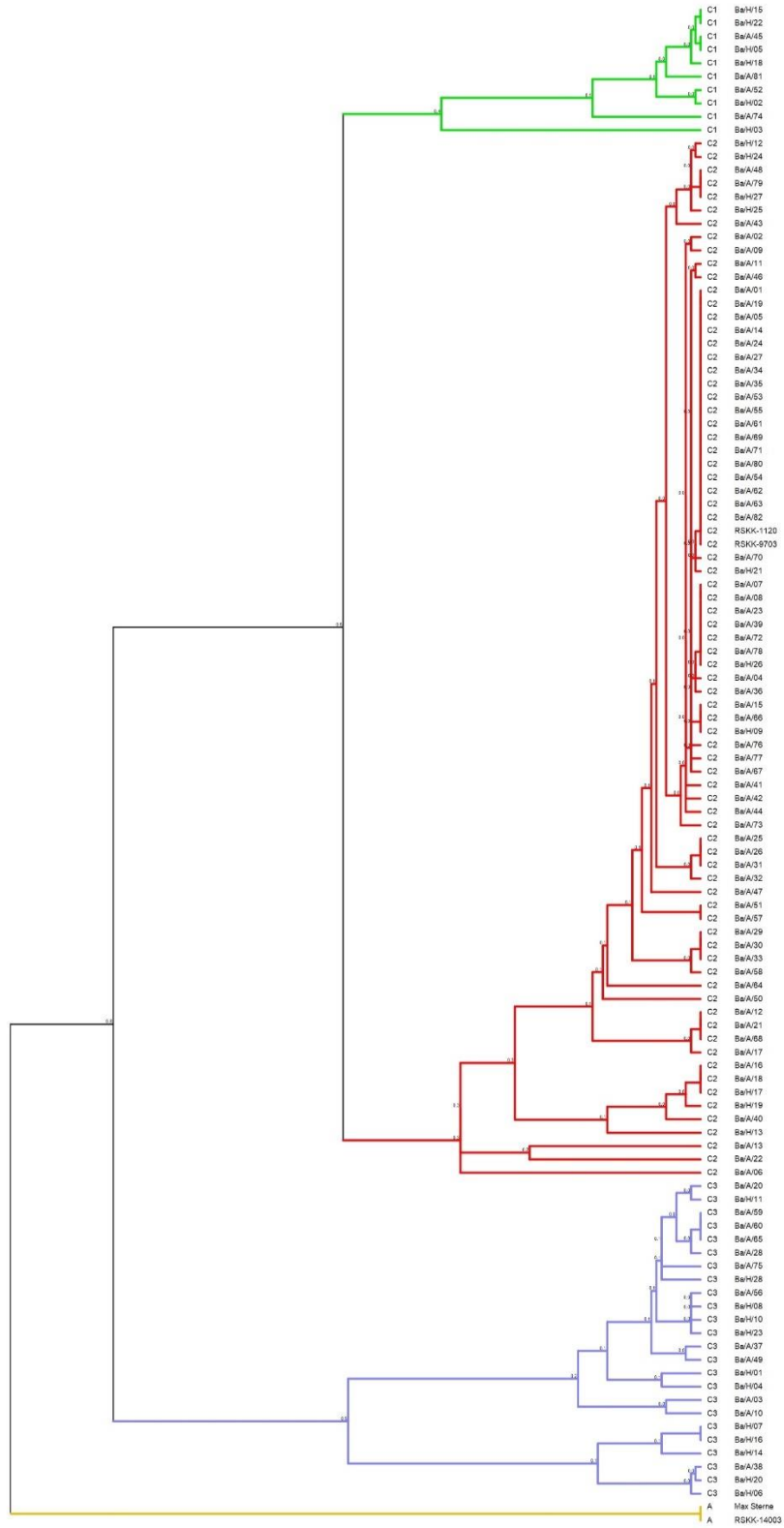
Çizelge 3.3. Devam. Suşların C, D ve E mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/A/63	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	145	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	11	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/64	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	139	735	131	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	8	57	8	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/65	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	137	879	143	730	500	270	92	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	7	73	12	13	9	8	4	4	4	3	5
Ba/A/66	Fr. Uz	424	323	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	5	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/67	Fr. Uz	424	323	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	5	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/A/68	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	143	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	10	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/69	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/70	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/71	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/72	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/A/73	Fr. Uz	424	288	676	394	603	648	139	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	2	13	4	9	10	8	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/74	Fr. Uz	424	312	676	394	603	564	143	735	134	730	500	0	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	8	10	57	9	13	9	0	4	3	4	3	5
Ba/A/75	Fr. Uz	424	288	676	394	603	648	137	897	131	730	500	280	95	386	196	109	112
	Code	7	2	13	4	9	10	7	75	8	13	9	9	5	4	4	3	5

Çizelge 3.3. Devam. Suşların C, D ve E mix VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayıları.

Ba/A/76	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	143	735	134	730	500	270	92	386	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	10	57	9	13	9	8	4	4	4	3	5
Ba/A/77	Fr. Uz	424	323	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	5	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/A/78	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	280	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	9	4	3	4	3	5
Ba/A/79	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/80	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	143	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	10	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
Ba/A/81	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	0	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	0	4	3	4	3	5
Ba/A/82	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
RSKK-1120	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
RSKK-9703	Fr. Uz	424	312	676	394	603	648	141	735	134	730	500	270	92	376	196	109	112
	Code	7	4	13	4	9	10	9	57	9	13	9	8	4	3	4	3	5
RSKK-14003	Fr. Uz	502	312	676	394	603	648	0	681	131	730	500	0	92	0	184	115	112
	Code	9	4	13	4	9	10	0	51	8	13	9	0	4	0	3	4	5
Max Sterne	Fr. Uz	502	312	676	394	603	648	0	681	131	730	500	0	92	0	184	115	112
	Code	9	4	13	4	9	10	0	51	8	13	9	0	4	0	3	4	5

Kapiler elektroforezi ile yapılan analizden elde edilen veriler ışığında RSKK-14003 suşunun Max Sterne aşı suşu ile tüm VNTR bölgelerinin uzunlukları ve tekrar sayılarının benzer olduğu belirlendi. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Refik Saydam Kültür Koleksiyonu'nda bulunan RSKK-14003 suşunun Max Sterne aşı suşu olduğu sonucuna varıldı. Elde edilen veriler Bionumerix 7.5 (Applied-Maths, Belçika) programında analiz edilerek suşlar arasındaki klonal yakınlık tespit edilerek grup ve genotipler belirlendi. Suşların fragman uzunlukları ve tekrar sayıları kullanılarak yapılan analiz sonucunda A, C1, C2 ve C3 olmak üzere 4 grup elde edildi. A grubunda tek bir genotip (G70) içerisinde RSKK-14003 ve Max Sterne aşı suşu yer aldı. C1 grubunda 8 (G1-G8) genotip 10 suş, C2 grubunda 40 (G9-G48) genotip 78 suş, C3 grubunda 21 (G49-G69) genotip 24 suş yer aldı. Bionumerix 7.5 (Applied-Maths, Belçika) programından elde edilen suşların birbirleriyle klonal yakınlığını gösteren dendrogram Şekil 3.8.'de verilmiştir. Analiz sonucu belirlenen grup, genotip ve her genotipte bulunan suş sayısı Çizelge 3.4.'te verilmiştir.



Şekil 3.8. Bionumerix 7.5 (Applied-Maths, Belçika) programı ile elde edilen 114 örneğin MLVA-31 UPGMA filogramı.

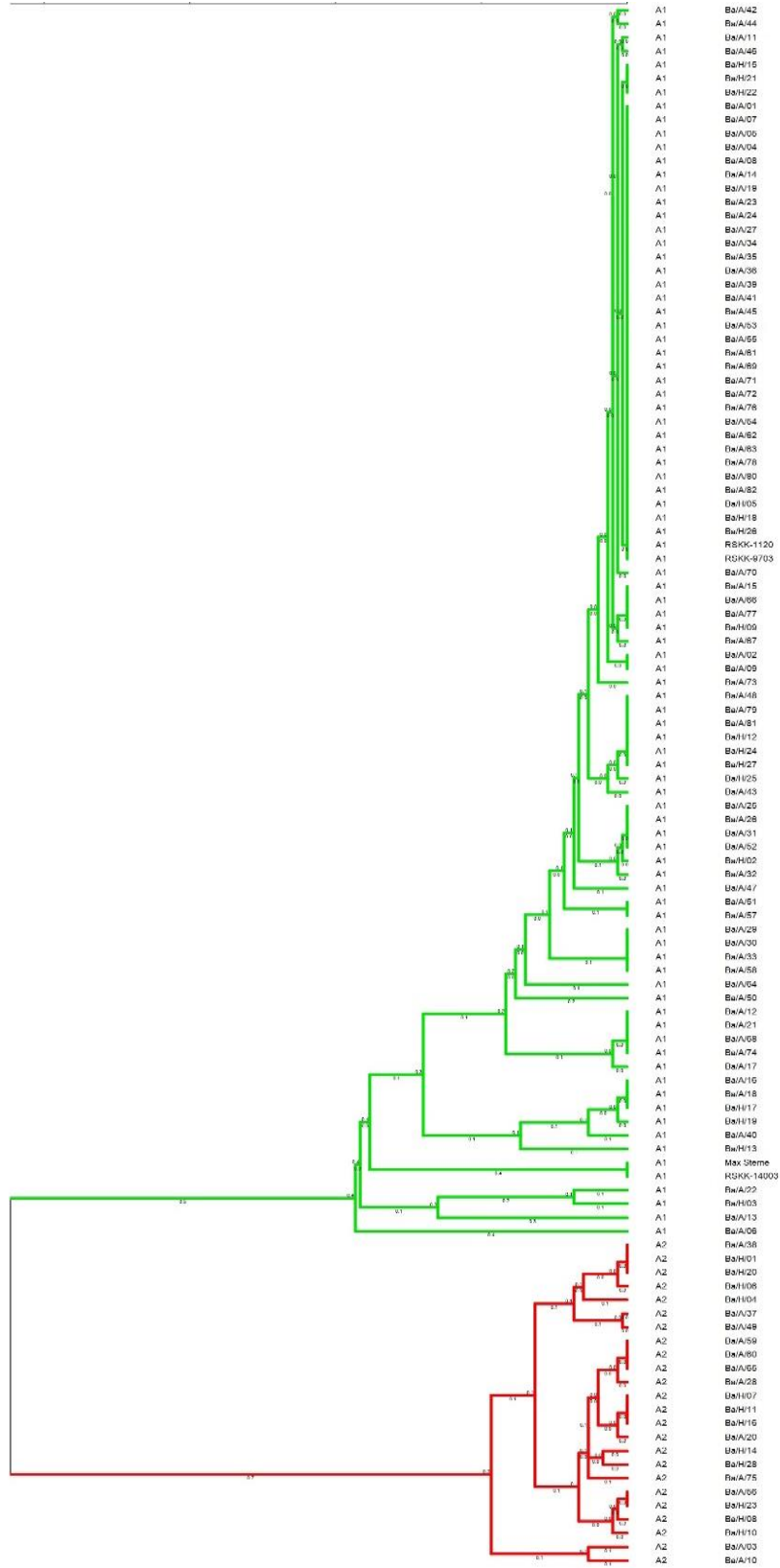
Çizelge 3.4. Bionumerix 7.5 (Applied-Maths, Belçika) programı ile belirlenen grup, genotip ve genotiplerde bulunan suş sayısı.

GRUP	GENOTİP	SUŞ SAYISI
C1	G1	2
	G2	2
	G3	1
	G4	1
	G5	1
	G6	1
	G7	1
	G8	1
C2	G9	1
	G10	1
	G11	3
	G12	1
	G13	1
	G14	1
	G15	1
	G16	1
	G17	1
	G18	20
	G19	1
	G20	1
	G21	7
	G22	1
	G23	1
	G24	3
	G25	1
	G26	1
	G27	1
	G28	1
	G29	1
	G30	1
	G31	1
	G32	3
	G33	1
	G34	1
	G35	2
	G36	3
	G37	1
	G38	1

Çizelge 3.4. Devam. Bionumerix 7.5 (Applied-Maths, Belçika) programı ile belirlenen grup, genotip ve genotiplerde bulunan suş sayısı.

	G39	1
	G40	3
	G41	1
	G42	3
	G43	1
	G44	1
	G45	1
	G46	1
	G47	1
	G48	1
C3	G49	1
	G50	1
	G51	3
	G52	1
	G53	1
	G54	1
	G55	1
	G56	1
	G57	1
	G58	1
	G59	1
	G60	1
	G61	1
	G62	1
	G63	1
	G64	1
	G65	2
	G66	1
	G67	1
	G68	1
	G69	1
A	G70	2

Karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla Bionumerix 7.5 (Applied-Maths, Belçika) programına 25 lokuslu MLVA analizi için 25 adet VNTR bölgesi tanımlandı ve 6 adet VNTR bölgesinin (VNTR12, VNTR16, VNTR17, VNTR19, VNTR23, VNTR35) sonuçları girilmeden analiz edildi. Elde edilen UPGMA filogramı Şekil 3.9.'da verilmiştir.



Şekil 3.9. Bionumerix 7.5 (Applied-Maths, Belçika) programı ile elde edilen 114 örneğin MLVA-25 UPGMA filogramı.

A grubunda tek bir genotip, G70 genotipinde iki adet suş yer aldı. Bunların RSKK-14003 ve Max Sterne suşu olduğu saptandı. İki suşun tüm VNTR bölgelerinin uzunlukları birbiri ile eşit bulundu. VNTR bölgeleri içindeki tekrar sayıları benzer olduğu belirlendi.

C1 grubunda; G1 genotipinde bulunan Ba/H/15 ve Ba/H/22 suşlarının tüm VNTR bölgeleri uzunlukları birbirine eşit bulundu. G2 genotipinde bulunan Ba/A/45 ve Ba/H/05 suşlarının da Tüm VNTR bölgeleri birbirine eşit olduğu belirlendi. G1 ve G2 genotiplerinin 29 VNTR bölgesinin uzunlukları eşit çıkarken genotipler arasındaki ayırt edici VNTR bölgesi *PXO1* ve *PXO2* bölgeleri olduğu saptandı. G1 genotipinde *PXO1* bölgesinin uzunluğu 137 bp iken, G2 genotipinde 131 bp, G1 genotipinde *PXO2* bölgesinin uzunluğu 137 bp iken, G2 genotipinde 141 bp olduğu ortaya kondu. Ba/H/18 suşunun bulunduğu G3 genotipini de G1 ve G2 den ayıran fark, *PXO1*, *PXO2* ve *VNTR17* bölgesinin uzunluğunun farklı olmasından kaynaklandığı anlaşıldı. G3 genotipinde *PXO1* 134 bp, *PXO2* 141 bp çıkarak ayırım sağlandı, ayrıca *VNTR17* bölgesi G1 ve G2 genotiplerinde 376 bp olarak saptanırken G3 genotipinde 386 bp olarak saptandı. G4 genotipinde Ba/A/81 suşunu diğer genotiplerden ayıran farkın *PXO1*, *PXO2*, *VNTR17* ve *Bams13* bölgeleri olduğu belirlendi. *Bams13* bölgesinin uzunluğu G4 genotipinde 871 bp iken, diğer genotiplerde 844 bp olduğu saptandı. G5 genotipinde bulunan Ba/A/52 suşunun ayırt edici bölgesi diğer 2 bölgeye ek olarak *Bams30* olduğu belirlendi. Diğer genotiplerde *Bams30* bölgesinin uzunluğu 735 bp iken, G5 genotipinde 700 bp uzunlukta saptandı. B/H/02 suşunun bulunduğu G6 genotipini diğer genotiplerden ayıran 5 VNTR (*PXO1*, *PXO2*, *VNTR17*, *Bams13* ve *Bams30*) bölgesinin farklı fragman uzunluğuna sahip olmasından kaynaklandığı ortaya kondu. G7 genotipinde (Ba/A/74) diğer genotiplerden farklı olarak *Bams23* bölgesinin uzunluğu 564 bp iken diğer genotiplerde bu uzunluk 648 bp olarak saptandı. G8 genotipinde (Ba/H/03) ayırt edici bölgenin *Bams53* olduğu anlaşıldı. *Bams53* diğer genotiplerde 236 bp uzunlukta iken G8 genotipinde 211 bp uzunlukta bulundu.

C2 grubunda; G9 (Ba/H/12) ve G10 (Ba/H/24) genotiplerini birbirinden ayıran *PXO1* bölgesi olduğu belirlendi. G9 genotipinde bu bölgenin uzunluğu 128 bp iken,

G10 genotipinde 134 bp olarak saptandı. G11 (Ba/A/48, Ba/A/79 ve Ba/H/27) genotipi içerisinde suşlar kendi içerisinde aynı uzunlukta VNTR bölgelerine sahipken, 270 bp uzunluğundaki *VNTR16* bölgesi diğer genotiplerde 280 bp uzunlukta bulundu. G12 (Ba/H/25) genotipini ayıran farkın *PXO2* bölgesinin 149 bp uzunlukta olması olarak ortaya kondu. Diğer genotiplerde bu uzunluk 141 bp olarak saptandı. G13 (Ba/A/43) genotipinde *VrrA* bölgesi 300 bp iken, diğer genotiplerde 312 bp, *VrrB2* bölgesi 150 bp iken, diğer genotiplerde 159 bp olarak saptandı. Ayrıca *VNTR16* bölgesi diğer genotiplerden farklı olarak 294 bp uzunlukta saptandı. G14 (Ba/A/02) genotipinde ayırt edici bölgelerin *Bams13* ve *Bams15* olduğu belirlendi. *Bams13* G14 genotipinde 844 bp uzunlukta iken diğer genotiplerde 871 bp, *Bams15* G14 genotipinde 598 bp iken diğer genotiplerde 615 bp uzunluğunda saptandı. G15 (Ba/A/09) genotipinin ayırt edici özelliği *VNTR16* (270 bp), *Bams13* (844 bp) ve *Bams15* (598 bp) bölgelerinin farklı uzunlukta olmasından kaynaklandı. G16 (Ba/A/11) genotipinde CG3 bölgesi 153 bp uzunluğunda iken diğer genotipler 158 bp uzunluğunda saptandı. G17 (Ba/A/46) genotipi *VrrB2*, *PXO1* ve *VNTR16* bölgelerindeki farklılıklardan dolayı diğer genotiplerden ayrıldı. G18 genotipi içerisinde 20 adet suş (Ba/A/01, Ba/A/19, Ba/A/05, Ba/A/14, Ba/A/24, Ba/A/27, Ba/A/34, Ba/A/35, Ba/A/53, Ba/A/55, Ba/A/61, Ba/A/69, Ba/A/71, Ba/A/80, Ba/A/54, Ba/A/62, Ba/A/63, Ba/A/82, RSKK-1120, RSKK-9703) yer almıştır. Bu suşların 31 VNTR bölgesi de birbirine benzer olup, genel olarak *PXO1* ve *PXO2* bölgelerinden meydana gelen uzunluk farkından dolayı diğer genotiplerden ayrıldıkları belirlendi. G19 (Ba/A/70) genotipinde *Bams15* bölgesinin uzunluğu 608 bp iken diğer genotiplerde 615 bp uzunluğunda saptandı. G20 (Ba/H/21) genotipi *PXO1* (137 bp) ve *PXO2* (137 bp) bölgelerinin uzunlukları nedeniyle diğer genotiplerden ayrıldığı belirlendi. G21 genotipinde 7 adet suş (Ba/A/07, Ba/A/08, Ba/A/23, Ba/A/39, Ba/A/72, Ba/A/78, Ba/H/26) yer aldı. Suşların 31 VNTR bölgesinin birbirine benzer olduğu, diğer genotiplerden ayıran farkın *VrrC2* bölgesinin diğer genotiplerde 532 bp olmasına rağmen G21 genotipinde 603 bp uzunluğunda olmasından kaynaklandı. Ayrıca, *Bams01* bölgesi diğer genotiplerde 490 bp iken G21 genotipinde 427 bp uzunluğunda saptandı. G22 (Ba/A/04) ve G23 (Ba/A/36) genotipi *PXO1* ve *PXO2* bölgelerindeki uzunluk farkından dolayı diğer genotiplerden ayrıldı. G24 (Ba/A/15, Ba/A/66 ve Ba/H/09) genotipi içindeki suşların

VNTR bölgelerinin uzunlukları aynı iken, diğer genotiplerden ayıran farkın *PXO1* ve *PXO2* bölgelerinin uzunlukları olduğu anlaşıldı. G25 (Ba/A/76) genotipinin *VNTR17* bölgesinin uzunluğu 386 bp iken diğer genotiplerde bu uzunluk 376 bp olarak saptandı. G26 (Ba/A/77) genotipi *VNTR16* bölgesinin 280 bp uzunluğunda olması sebebiyle diğer genotiplerden ayrıldı. G27 (Ba/A/67) genotipinin *VrrB2* bölgesinin uzunluğu 150 bp iken diğer genotiplerde bu uzunluk 159 bp olarak belirlendi. G28 (Ba/A/41) genotipinin *Bams23* bölgesinin uzunluğu 184 bp, diğer genotiplerin ise 196 bp olduğu saptandı. G29 (Ba/A/42) genotipinin *VrrA* bölgesinin uzunluğu 300 bp ve *VNTR16* bölgesinin uzunluğu 280 bp olduğu için diğer genotiplerden ayrıldı. G30 (Ba/A/44) genotipi *VrrB2* bölgesinin 150 bp uzunluğunda, G31 (Ba/A/73) genotipi *VrrA* bölgesinin 288 bp uzunluğunda olması sebebiyle diğer genoniplerden ayrıldı. G32 (Ba/A/25, Ba/A/26, Ba/A/31) genotipinde yer alan suşların VNTR bölgeleri birbiri ile aynı olmasına rağmen *Bams30* bölgesindeki (700 bp) uzunluk farkından dolayı diğer genotiplerden ayrıldı. G33 (Ba/A/32) genotipi *VrrB2* (150 bp) ve *Bams30* (700 bp) bölgelerindeki uzunluk farkından diğer genotiplerden ayrıldı. G34 (Ba/A/47) genotipi *PXO1* (131 bp), *VNTR16* (280 bp) ve *Bams05* (346 bp) bölge uzunluğu ile ayrı bir genotip oluşturdu. G35 (Ba/A/51 ve Ba/A/57) genotipinin *Bams15* bölgesinin uzunluğu 562 bp iken diğer genotiplerin 615 bp uzunluğunda olduğu saptandı. G36 (Ba/A/29, Ba/A/30 ve Ba/A/33) genotipinin suşları arasındaki VNTR bölgelerinin uzunluğu aynı bulunurken diğer genotipler ile *Bams31* bölgesinin uzunluğu arasındaki farktan dolayı ayrı bir genotip oluşturdu. Diğer genotiplerin *Bams31* bölgesinin uzunluğu 781 bp, G36 genotipinin *Bams31* bölgesinin uzunluğu 727 bp olarak belirlendi. G37 (Ba/A/58) genotipinin *VNTR16* bölgesi 280 bp, *Bams31* bölgesi 727 bp olması sebebiyle diğer genotiplerden ayrıldı. G38 (Ba/A/64) genotipinin *VrrC1* bölgesinin uzunluğu 544 bp iken diğer genotiplerin 615 bp olarak saptandı. G39 (Ba/A/50) genotipinin *Bams22* bölgesinin uzunluğu 658 bp iken diğer genotiplerin 730 bp olduğu belirlendi. G40 (Ba/A/12, Ba/A/21 ve Ba/A/ 68) genotipinin suşları arasında VNTR bölgelerinin uzunlukları aynı iken diğer genotipler ile *Bams23* bölgesindeki fark nedeniyle ayrıldı. Diğer genotiplerde *bams23* bölgesinin uzunluğu 648 bp iken G40 genotipinde bu bölgenin uzunluğu 564 bp olarak saptandı. G41 (Ba/A/17) genotipi *VrrB2* (150 bp), CG3 (153 bp) ve *Bams23* (564 bp) bölgelerindeki farklar nedeniyle diğer genotiplerden ayrıldı.

G42 (Ba/A/16, Ba/A/18 ve Ba/H/ 17) genotipi içerisindeki suşların tüm VNTR bölgeleri aynı uzunlukta olup diğer genotipler ile *Bams22* (658 bp) ve *Bams31* (646 bp) bölgelerinin uzunluk farkından dolayı ayrıldı. G43 (Ba/H/19) genotipi *VrrB2* (150 bp), *PXO1* (128 bp) ve *VNTR16* (280 bp) bölgelerinin uzunluk farkından dolayı diğer genotiplerden farklı olduğu belirlendi. G44 (Ba/A/40) genotipinin *Bams13* bölgesinin uzunluğu 871 bp iken diğer genotiplerde bu bölgenin uzunluğu 844 bp olarak saptandı. G45 (Ba/H/13) genotipinin *VrrA* bölgesinin uzunluğunun 323 bp, diğer genotiplerin bu bölge uzunluğunun 312 bp olması genotipi karşılaştırıldığı diğer genotiplerden ayırdı. G46 (Ba/A/13) genotipindeki *VrrC2* (603 bp), *CG3* (153 bp), *VNTR17* (386), *Bams01* (427 bp), *Bams30* (897 bp) ve *Bams31* (691 bp) bölgelerindeki uzunluk farkları ayrı bir genotip olmasını sağladı. G47 (Ba/A/22) genotipi *VrrB2* (150 bp), *PXO1* (128 bp) ve *PXO2* (141 bp) bölgelerinin uzunlukları farkından dolayı ayrı bir genotip oluşturdu. Son olarak G48 (Ba/A/06) genotipinin *Bams13* bölgesinin uzunluğu 664 bp iken diğer genotiplerin bu bölge uzunluğu 844 bp olarak belirlendi.

C3 grubunun G49 (Ba/A/20) ve G50 (Ba/H/11) genotiplerini birbirinden ayıran bölgelerden biri *VNTR17* olduğu ortaya kondu. *VNTR17* bölgesinin uzunluğu G49 genotipinde 386 bp iken G50 genotipinde 394 bp olarak saptandı. Aynı şekilde *Bams15* bölgesinin uzunluğu G49 genotipinde 608 bp iken G50 genotipinde 615 bp olarak saptandı. G51 (Ba/A/59, Ba/A/60 ve Ba/A/65) genotiplerinin suşları arasında VNTR bölgelerinin uzunlukları eşit olup *PXO1* bölgesinin uzunluğu 143 bp, diğer genotiplerin bu bölge uzunluğu 134 bp olarak saptandı. G52 (Ba/A/28) genotipinin *VrrB2* (150 bp) ve *VNTR19* (92 bp) bölgelerinin uzunluklarındaki farklılıktan dolayı diğer genotiplerden ayrıldı. G53 (Ba/A/75) genotipinde *VrrA* (288 bp), *CG3* (153 bp), *VNTR16* (280 bp) ve *PXO1* (131 bp) bölgelerindeki farklar ayrı bir genotip olmasını sağladı. G54 (Ba/H/28) genotipinde *Bams13* bölgesinin uzunluğu 430 bp iken diğer genotiplerde bu bölgenin uzunluğu 456 bp olduğu belirlendi. G55 (Ba/A/56) genotipini *PXO2* (139 bp) ve *Bams30* (924 bp) bölgelerindeki uzunluk farkı ayrı bir genotip olarak değerlendirilmesini sağladı. G56 (Ba/H/08) genotipinde *PXO1* bölgesni uzunluğu 125 bp iken diğer genotiplerde bu bölgenin uzunluğunun 134 bp olması ayrı bir genotip olmasını sağladı. G57 (Ba/H/10) genotipinde *VrrB2*

bölgesinin uzunluğu 150bp iken diğer genotiplerde 159 bp olarak saptandı. G58 (Ba/H/23), G59 (Ba/A/37), G60 (Ba/A/49) ve G61 (Ba/H/01) genotipleri *VNTR16*, *CG3*, *PXO1* ve *PXO2* bölgelerindeki farklı uzunluklar nedeniyle ayrı bir genotip olarak gruplandırıldı. G62 (Ba/H/04) genotipinde *VrrA* bölgesinin uzunluğu 300 bp iken diğer genotiplerde 312bp uzunlukta bulundu. Aynı şekilde, *Bams30* bölgesinin uzunluğu G62 genotipinde 924 bp iken diğer genotiplerde bu bölgenin uzunluğu 879 ve 897 bp olarak kaydedildi. G63 (Ba/A/03) genotipinde *Bams31* bölgesinin uzunluğu 691 bp iken diğer genotiplerde bu bölgenin uzunluğunun 781 bp olduğu belirlendi. G64 (Ba/A/10) genotipinin *VNTR16* ve *Bams30* bölgelerindeki farklı uzunluklar ayrı bir genotip olmasını sağladı. G65 (Ba/H/07 ve Ba/H/16) genotipinin suşları arasında *VNTR* bölgelerinin uzunlukları aynı olmakla birlikte diğer genotiplerden ayıran bölgesi *VNTR16* bölgesinin hiç olmamasından kaynaklandığı ortaya kondu. G66 (Ba/H/14) genotipinin *VNTR16* bölgesinin olmaması, *PXO1* ve *PXO2* bölgelerinin farklı uzunlukta olması sebebiyle diğer genotiplerden ayrıldı. G67 (Ba/A/38) genotipinin *Bams05* bölgesinin uzunluğu 307 bp iken diğer genotiplerin 385 bp uzunlukta olduğu saptandı. G68 (Ba/H/20) ve G69 (Ba/H/06) genotiplerinin *VNTR16* bölgelerinin olmaması *VrrB2*, *PXO1* ve *PXO2* bölgelerinin uzunluklarının diğer genotiplerden farklı olmasını sağladı.

Tespit edilen 70 adet genotipin Türkiye’de izole edildikleri yerleri gösteren harita Şekil 3.10.’da verilmiştir.



Şekil 3.10. Yetmiş adet genotipin Türkiye haritasında izole edildikleri yerler. (Kırmızı renk C1 kümesini, mavi renk C2 kümesini, siyah renk C3 kümesini ifade etmektedir).

4. TARTIŞMA

Şarbon dünya çapında dağılımı olan oldukça bulaşıcı ve potansiyel olarak öldürücülüğü yüksek zoonotik bir hastalıktır. Bu nedenle şarbon etkeni *Bacillus anthracis*'in biyolojik savaş ajanı olarak kullanım potansiyeli, II. Dünya Savaşı'ndan beri tanımlanması ve tiplendirilmesi gibi birçok araştırmaların yapılmasına neden olmuştur (Kamal ve ark., 2011).

Türkiye'de hayvan ve insanda şarbon vaka sayısında genel anlamda bir azalma görülmektedir, fakat hastalık esas olarak ülkenin doğu bölgelerinde görülmeye devam etmektedir (Topluoglu ve ark., 2020).

Bu tez çalışmasında farklı yıllarda ve Türkiye'nin farklı şehirlerinde meydana gelen şarbon vakalarından elde edilen hayvan ve insan orijinli *B. anthracis* izolatlarının MLVA-31 yöntemi kullanılarak genotipleri belirlenmiş, ayrıca MLVA-31 yöntemi ile vakaların moleküler epidemiyolojik analizi yapılmış ve zaman ve mekâna bağlı genotip dağılımı saptanmıştır. 2010-2021 yılları arasında Türkiye'nin farklı şehirlerinden 82 adet hayvan 28 adet insan izolatu ile yapılan çalışmada 3 adet RSKK (Refik Saydam Kültür Koleksiyonu) ve 1 adet Max sterne aşı suşu kullanılarak her bir izolatu genotipleri belirlenerek genotipler arasındaki bağlantı ve yakınlık ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada suşların MLVA-31 yöntemi ile analizinde 4 farklı küme (A, C1, C2 ve C3) ve A kümesinde 1, C1 kümesinde 8, C2 kümesinde 40, C3 kümesinde ise 21 genotip olmak üzere toplamda 70 genotip ortaya konuldu. C2 kümesi %68,4'lük saptanma oranıyla tüm suşlar arasında en baskın küme olarak belirlendi. Genotipler arasında en yaygın olanının ise C2 kümesinde bulunan G18 (20 suş) genotipi olduğu ortaya kondu. Ardından C2 kümesinde G21 (7 suş), G11, G24, G32, G36, G40, G42, G51 (3 suş) genotipleri geldiği görüldü. Yapılan analiz ile aynı genotipin farklı orijinde, farklı şehirlerde ve farklı yıllarda olduğu gözlemlendi. G2 genotipi 2012 yılında Van ilinde insandan izole edilirken, 2018 yılında Elazığ'da hayvandan izole

edilmiştir. Hayvanlardan insanlara bulaşın olduğu düşünüldüğünde aynı genotipin ilk olarak insandan daha sonraki tarihlerde hayvandan izole edilmesi ihbar edilmeyen veya kayıt altına alınmayan vakaların olabileceğini göstermektedir. G11 genotipi 2018 yılında Karabük'te hayvandan, 2021 yılında Eskişehir'de hayvandan, yine 2021 yılında İstanbul'da insandan izole edilmiştir. G18 genotipinin hepsi hayvan numunesi olup Ankara (2010, 2011, 2012, 2016, 2017, 2018), Kırşehir (2017), Sivas (2018), Karabük (2019), Yozgat (2019), Çankırı (2021), Samsun (2018), Van (2018) ve Iğdır illerinde görülmüştür. Bu genotipin İç Anadoluda yakın illerden doğuya doğru geçişinin hayvan hareketleri ile olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca RSKK-1120 ve RSKK-9703 suşları G18 genotipi içerisinde yer almaktadır. G21 genotipi hayvan izolatında Çorum (2011, 2016), Ankara (2011, 2019), Bingöl (2018), Ardahan (2020) illerinde; insan izolatında Amasya (2021) ilinde tespit edilmiştir. G24 genotipi Samsun'da 2012 ve 2019 yıllarında hayvandan, 2014 yılında ise insandan izole edilmiştir. G32 genotipinin hepsi hayvandan izole edilmiş olup 2016 yılında Kayseri ve Nevşehir illerinde, 2017 yılında Yozgat'ta tespit edilmiştir. G40 genotipinin hepsi hayvan izolatı olup Bolu (2011), Kastamonu (2012) ve Eskişehir (2019) illerinde görülmüştür. G42 genotipi 2012 yılında Eskişehir'de hayvanlardan izole edilirken 2018 yılında Trabzon'da insandan izole edilmiştir. G51 genotipi 2018 yılında Ankara'da 3 izolatta bulunmaktadır. G65 genotipi insandan 2012 yılında (Bursa) ve 2016 yılında izole edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda Türkiye'de yıllara ve şehirlere göre aynı genotiplerin tekrarlanmış olduğu görülmektedir. Bu sonucun nedeni olarak kaçak hayvan hareketleri ile farklı illere geçişler, şarbon baslinin yıllarca aynı merada kendini koruyabilmesi nedeniyle farklı yıllarda aynı genotipin tekrarlama olasılığı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında 31 lokus kullanılarak yapılan analizin 25 lokus kullanılarak yapılan analizden daha verimli olduğu gösterilmek istenmiştir. MLVA31 yönteminin MLVA25 yönetiminden farkı, 6 VNTR (VNTR12, VNTR16, VNTR17, VNTR19, VNTR23 ve VNTR35) bölgesinin daha analize eklenmiş olmasıdır. Bu çalışmada bu altı bölge olmadan 25 lokusun verileri MLVA-25 ile analiz edilerek 2 farklı küme (B1 ve B2) ve B1 kümesinde 33 genotip, B2 kümesinde ise 17 genotip olmak üzere 50 genotip belirlenmiştir. Tez çalışmasında, MLVA-31 analizinde 4

farklı küme (A, C1, C2, C3) ve 70 genotip ayrımı yapılmıştır. Eklenen 6 VNTR bölgesinin genotiplerin belirlenmesinde ve birbirleri ile olan bağlantılarının ortaya konmasında ayırım gücünün daha fazla olduğunu göstermiştir. Ayrıca ülkemizde *B. anthracis*'in hayvanlardan insana bulaşını gösterecek epidemiyolojik veri elde edebilmek için tasarlanmış bu kapsamda MLVA-31 çalışması hiç yapılmamıştır. Bu da bu tez çalışmasının özgünlüğünü göstermektedir.

Thierry ve ark. (2014), Fransız Ulusal Referans Laboratuvarı koleksiyonunu karakterize etmek için MLVA-31 analizini kullanmışlardır. Yüzotuz suş ile yapılan çalışmada 35 farklı genotip ve 4 klonal kompleks belirlenmiştir. Yapılan çalışmada MLVA8, MLVA15, MLVA25 ve MLVA31 karşılaştırılarak mevcut suş koleksiyonu için, Fransız suş çeşitliliğini yararlı çözünürlük ve doğrulukla genotiplendirmek için gereken VNTR lokuslarının sayısını optimize etmeye çalışılmış ve kısaltılmış bir MLVA şeması tasarlanmıştır. Buna göre VNTR sayısının artışı genotiplendirmede daha doğru sonuçlar alınacağını ortaya koymaktadır. Thierry ve ekibinin yaptıkları çalışma bu tez çalışmasını destekler niteliktedir.

Beyer ve ark. (2012), Namibya'da vahşi ve evcil hayvanlardan (bufalo, çita, eland, fil, sıgı antilobu, su aygırı, kudu, aslan, oryx/gemsbok, devekuşu, gergedan, sitatunga, akbaba, zebra, antilop, sığır, keçi, koyun, at) elde edilen geniş bir izolat koleksiyonu (384 izolat) içindeki genetik ilişkileri analiz etmek ve ülke içindeki ve dışındaki şarbon salgınlarının olası epidemiyolojik korelasyonlarını belirlemek için 31 işaretli bir MLVA analizini kullanmışlardır. Analiz sonucunda toplamda 37 genotip (GT) elde etmişlerdir. GT4, GT6 ve GT9'un daha sık bulunduğunu tespit etmişlerdir. GT6 genotipinin ilk olarak 1983-1988 yıllarında ölü filler ve zebra örneklerinden izole ettiklerini daha sonraki yıllarda aynı genotipe rastladıklarını göstermişlerdir. GT4 ve GT9 ilk olarak 1987 ve 1992'de bulunmuş sonraki yıllarda izole edilen örneklerde tekrar rastlanılmıştır. Parkta baskın bir salgın klonunun varlığı (GT4, GT6, GT9), her bir izolat çifti arasındaki genetik mesafeler ile izolasyon süreleri arasındaki zamansal mesafe arasındaki ilişkinin yanı sıra bunların aynı konakçı türünden olup olmadıkları değerlendirilerek ayrıca test etmişlerdir. Bu çalışmada izlenen vakaların dağılımı, kalıcı veya tekrarlayan salgınlar kavramını

desteklemektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, farklı yıllarda aynı genotipin tekrar ortaya çıkması, aynı veya farklı konakçı türünden izole edilmesi Beyer ve ark. (2012)'nin bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Rondinone ve ark. (2020) 1972'den 2018'e kadar İtalya'da dolaşan *B. anthracis* suşlarının genetik karakterizasyonu çalışmasında 196 hayvan, 3 insan ve 35 çevre olmak üzere toplam 234 *B. anthracis* suşu ile çalışmışlardır. 1972-2018 yılları arasında İtalya'nın çeşitli bölgelerinde izole edilen *B. anthracis* suşlarını, 31 lokuslu MLVA yöntemi ile analiz edilerek 55 genotip belirlemişlerdir. Sonuç olarak MLVA-31 yöntemi kullanılarak kromozomal ve plazmid hiper-değişken bölgelerinin analizi, *B. anthracis*'in çeşitliliği, evrimi ve moleküler epidemiyolojisinin incelenmesi için değerli bir yaklaşım olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle "MLVA-31, *B. anthracis*'in bir ülke içinde dağılımının anlaşılmasını sağlayan geçerli bir yöntemdir" sonucuna varmışlardır. Yakın zamanda İtalya'da yapılan bu çalışma tez çalışmasına referans olma özelliğindedir.

Türkiye'de yapılan benzer çalışmalarda ise; Durmaz ve ark. (2012), Türkiye'nin çeşitli illerinde insan (93 izolat), hayvan (155 izolat) ve çevresel (üç izolat) örneklerden toplam 251 *B. anthracis* izolatı elde etmiştir. 8 lokus içeren VNTR analizi (MLVA8) ile en yüksek frekansta (%41,8) genotip 43, ardından genotip 35 (%25,5) ve genotip 27 (%10,4) olan 12 genotip ortaya çıkarmıştır. İzolatların %86,8'ini içeren başlıca alt tip A3.a, baskın küme olmuştur. 251 izolat için MLVA25 analizi yapılmıştır, 33'ü sadece bir izolata sahip olan 62 farklı genotip verirken, kalan 218 izolatın 29 farklı genotipte (%86,9) olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular, Türkiye'deki şarbon vakalarında çok yüksek farklı yıllarda ve farklı şehirlere bulaşma oranlarına işaret etmektedir. Türkiye'de tespit edilen genotipler, A büyük kümesinde yer almaktadır. Ortatatlı ve ark. (2012), Türkiye'nin 16 farklı bölgesinden 55 *B. anthracis* izolatlarını genotiplendirmek için 25 lokuslu VNTR analizi (MLVA25) kullanmışlardır. Sekiz konumlu bir MLVA analizinde altı genotip (G (K) 13, G (K) 27, G (K) 35, G (K) 43, G (K) 44 ve G (K) 61) saptamışlardır. Bununla birlikte, 25 lokuslu MLVA'nın daha ayırıcı olduğunu ve 6 yerine 10 genotip varlığını ortaya koymuşlardır. Bu bölgelerden toplanan *B. anthracis* izolatları, *B.*

anthracis hareketinin hayvancılıktaki artışın ve sonuçta meydana gelen farklı şehirlere bulaşmanın bir sonucu olduğunu göstermişlerdir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması sonucunda Türkiye'nin farklı şehirlerinde 2010-2021 yılları arasında meydana gelen şarbon vakalarından elde edilen hayvan ve insan izolatlarının genotipleri belirlenerek birbirleri ile olan yakınlıkları ortaya konulmuştur. Hayvan ve insan kaynaklı suşların genetik benzerlik veya farklılıkların analizi, hastalığın kökenleri ve bulaşma modellerinin anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Bulgular *Bacillus anthracis*'in genotiplendirilmesinde MLVA-31 yönteminin, Türkiye'de son yapılan yöntem olan MLVA-25'e göre ayırım gücünün daha fazla olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte bu tez çalışmasında MLVA-31 yöntemiyle tespit edilen genotiplerin yıllara ve şehirlere göre dağılımına bakıldığında ülkemizde tekrarlayan aynı genotipte salgınların olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma ile hayvan ve insan kaynaklı suşlar arasındaki baskın *B. anthracis* tiplerinin tanımlanması ile ülkemizdeki suşların filocoğrafik ilişkisi anlaşılabilmiştir ve hastalığın moleküler epidemiyolojisi hakkında elde edilen önemli bilgiler literatürde yeni çalışmalar için kaynak sağlayacaktır. Bu nedenle, tek sağlık yaklaşımına uygun olarak, ülkemizde zaman zaman görülen şarbon vakalarına yönelik tıp ve veteriner alanlarında ortaklaşa yürütülecek moleküler epidemiyoloji çalışmalarına gereksinim duyulmaktadır.

Bu çalışmanın epidemiyolojik ve adli analizler için kullanılabilecek genetik bir veri sağlayacağı öngörülmektedir. Ülkemize özgü yerel genotipler belirlenmiş, ülkemizde hangi coğrafi bölgede hangi genotiplerin dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Gelecekteki çalışmalarda yurt dışından ithal edilen hayvanlarda şarbon enfeksiyonu gelişir ise bu suşun yerel ya da importe olup olmadığı, hangi ülke kaynaklı olduğu tespit edilebilecektir. Ayrıca doğal bir salgın suşu ile biyoterörizmle ilişkili suşlar tayin edilebilecektir. Ayrıca bu çalışma, daha sonra yapılacak olan *B. anthracis* ile ilgili moleküler çalışmalar için de önemli veri elde edilmesine olanak sağlayacaktır.

ÖZET

Türkiye’de İnsan ve Hayvan Orijinli *Bacillus anthracis* İzolatlarının Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA-31) ile Moleküler Karakterizasyonu

Şarbon bir otçul hastalıktır ve bu hastalığın ajanı Gram pozitif, aerobik, spor oluşturan, kapsüllü ve çubuk şekilli bir bakteri olan *Bacillus anthracis*’tir. Hastalık başta evcil koyun, keçi, sığır olmak üzere yaban geyiği ve antilop gibi ruminantlarda görülür. İnsanlar, direkt temas yoluyla (enfekte hayvanlar ve kontamine olmuş hayvan ürünleri) veya indirekt olarak *B. anthracis*’e maruz kalarak enfekte olurlar. Ülkemizde insan ve hayvanlardan izole edilen suşların moleküler genotiplendirilmesine yönelik 31 lokus ile yapılan MLVA çalışması bulunmamaktadır. Bu çalışmada; toplam 114 *B. anthracis* suşu (82 hayvan izolatu, 28 insan izolatu, 3 RSKK suşu ve 1 Max sterne aşısı suşu) MLVA-31 yöntemi ile analiz edilmiş, A, C1, C2 ve C3 olmak üzere 4 küme ve 70 adet genotip tespit edilmiştir. Türkiye’de baskın kümenin C2 (%68,4), baskın genotipin ise G18 (%17,5) ve G21 (%6,4) olduğu görülmüştür. MLVA-31 yönteminin MLVA-25 yöntemine göre ayırma gücünün daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Türkiye’de *B. anthracis* genotiplerinin temporal ve spasyal dağılımı incelenmiş, ülkemizde çapraz kontaminasyonun olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Bacillus anthracis*, Genotiplendirme, MLVA-31, Moleküler Epidemiyoloji.

SUMMARY

Molecular Characterization of *Bacillus anthracis* Isolates of Human and Animal Origin by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA-31) in Turkey

Anthrax is a herbivorous disease and the agent of this disease is *Bacillus anthracis*, a Gram-positive, aerobic, spore-forming, encapsulated and rod-shaped bacterium. The disease is seen primarily in domesticated sheep, goats, cattle, and grazing mammals such as wild deer and antelope. Humans become infected by direct contact (infected animals and contaminated animal products) or indirect exposure to *B. anthracis*. In our country, there are no MLVA studies with 31 loci for molecular genotyping of strains isolated from humans and animals. In this study; A total of 114 *B. anthracis* strains (82 animal isolates, 28 human isolates, 3 RSKK strains and 1 Max Sterne vaccine strain) were analyzed by the MLVA-31 method; 4 clusters as A, C1, C2 and C3 and 70 genotypes were determined. In Turkey, the dominant cluster was C2 (68.4%), while the dominant genotype was G18 (17.5%) and G21 (6.4%). It has been shown that the discrimination power of the MLVA-31 method is superior than the MLVA-25 method. The distribution of *B. anthracis* genotypes in Turkey according to years and places was examined, and it was determined that there was cross contamination in our country.

Keywords: *Bacillus anthracis*, Genotyping, MLVA-31, Molecular Epidemiology.

KAYNAKLAR

- ABDEL-GLIL MY, CHIAVERINI A, GAROFOLO G, FASANELLA A, PARISI A, HARMSSEN D, JOLLEY KA, ELSCHNER MC, TOMASO H, LINDE J, GALANTE D (2021). A whole-genome-based gene-by-gene typing system for standardized high-resolution strain typing of *Bacillus anthracis*. *Journal of clinical microbiology*, **59(7)**: e0288920
- ATEŞ ÖZCAN B (2019). Şarbon Hastalığı ve Önemi. *Sağlık ve Toplum Dergisi*, **29(1)**: 27-31.
- BALKAN ÇE, ÇELEBİ S (2018). Doğu Anadolu Bölgesinde Şarbon Etkeni ve Seroprevalansının Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **48(1)**: 52-59.
- BEYER W, BELLAN S, EBERLE G, GANZ HH, GETZ WM, HAUMACHER R, HILSS K A, KILIAN W, LAZAK J, TURNER WC, Peter CB. TURNBULL PCB (2012). Distribution and molecular evolution of *Bacillus anthracis* genotypes in Namibia. *PLoS Negl Trop Dis*, **6(3)**: e1534.
- BRITANNICA, T. Editors of Encyclopaedia (2021). Polymerase chain reaction. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>.
- BROWN ER, CHERRY WB (1955). Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J Infect Dis.*, **96(1)**: 34-39.
- BRUNO JG, KIEL JL (1999). In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosensors & Bioelectronics*, **14**: 457–464.
- BUCK CA, EISENSTARK A, NEWMAN FS, ANACKER RL (1963). Phage isolated from lysogenic *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, **85**: 1423.
- CARLSON CJ, KRACALIK IT, ROSS N, ALEXANDER K, HUGH-JONES ME, FEGAN M, ELKIN B, EPP T, SHURY TK, BAGIROVA M, GETZ WM, BLACKBURN JK (2018). The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock, and wildlife. *Nature Microbiology*, **4(8)**: 1337-1343.
- CELLA LN, SANCHEZ P, ZHONG WW, MYUNG NV, CHEN W, MULCHANDANI A (2010). Nano aptasensor for protective antigen toxin of anthrax. *Analytical Chemistry*, **82**: 2042–2047.
- CHATEAU A, VERREN SEV, REMAUT H, FIORAVANTI A (2020). The *Bacillus anthracis* cell envelope: composition, physiological role, and clinical relevance. *Microorganisms*, **8(12)**: 1864.

- CHIAVERINI A, ABDEL-GLIL MY, LINDE J, GALANTE D, RONDINONE V, FASANELLA A, CAMMA C, DALTERIO N, GAROFOLO G, TOMASO H (2020). Whole genome sequencing for studying *Bacillus anthracis* from an outbreak in the abruzzo region of Italy. *Microorganisms*, **8(1)**: 87.
- CROSS AR, BALDWIN VM, ROY S, ESSEX-LOPRESTI A E, PRIOR JL, HARMERA NJ (2019). Zoonoses under our noses. *Microbes and Infection*, **21(1)**: 10-19.
- DASHTI A A, JADAON M M, ABDULSAMAD A M, DASHTI H M (2009). Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Medical Journal*, **41(2)**: 117-122.
- DERZELLE S, THIERRY S (2013). Genetic diversity of *Bacillus anthracis* in Europe: genotyping methods in forensic and epidemiologic investigations. *Biosecure Bioterror*, **11(1)**: 166-176.
- DOĞANAY M, ALTINTAŞ N (2009). Zoonozlar Hayvanlardan İnsanlara Bulaşan Enfeksiyonlar. Birinci Baskı.
- DOGANAY M, DEMİRASLAN H (2015). Human anthrax as a re-emerging disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.*, **10(1)**: 10-29.
- DURMAZ R (2011). Şarbon basillerinin filogenetik dağılımı ve yaygın klonları. *ANKEM Derg*, **25(2)**: 92-96.
- DURMAZ R, DOGANAY M, SAHIN M, PERCIN D, KARAHOCAGIL MK, KAYABAS U, OTLU B, KARAGOZ A, BUYUK F, CELEBI O, OZTURK Z, ERTEK M (2012). Molecular epidemiology of the *Bacillus anthracis* isolates collected throughout Turkey from 1983 to 2011. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, **31(10)**: 2783-2790.
- ERKEKOĞLU P, KOÇER-GÜMÜŞEL B (2018). Biyolojik savaş ajanları: tarihçeleri, patofizyolojileri, tanıları, tedavileri ve önlemler. *Fabad J. Pharm. Sci.*, **43(2)**: 171-201.
- ESHRAHGH B, ZARRIN Y, FAZEL M (2020). Palpebral anthrax, a rare though important condition in villagers: A case report and literature review. *Int J Infect Dis*, **99**: 260-262.
- ESPINOSA EV, LAGANA C, VAZQUEZ F (2018). An historical, sociocultural view and in the fiction literature of *Bacillus anthracis* cases by shaving brushes. *Rev Esp Quimioter*, **31(3)**: 203-208.
- FUJINAMI Y, HIRAI Y, SAKAI I, YOSHINO M, YASUDA J (2007). Sensitive detection of *Bacillus anthracis* using a binding protein originating from gamma-phage. *Microbiology and Immunology*, **51**: 163–169.
- GARGIS AS, MCLAUGHLIN HP, CONLEY AB, LASCOLS C, MICHEL PA, GEE JE, MARSTON CK, KOLTON CB, RODRIGUEZ LM, HOFFMASTER AR, WEIGEL LM, SUE D (2018). Analysis of whole-genome sequences for the prediction of

- penicillin resistance and β -lactamase activity in *Bacillus anthracis*. *Msystems*,**3(6)**: e00154-18.
- GOEL AK (2015). Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance. *World J Clin Cases*,**3(1)**: 20-33.
- HAHN KR, JANZEN TW, THOMAS MC, SHIELDS MJ, GOJI N, VALLE E, AMOAKO KK (2014). Single nucleotide repeat analysis of *B. anthracis* isolates in Canada through comparison of pyrosequencing and Sanger sequencing. *Vet Microbiol.*,**169(3-4)**: 228-232.
- HAMULA CLA, ZHANG HQ, LI F., WANG ZX, LE XC, LI XF (2011). Selection and analytical applications of aptamers binding microbial pathogens. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*,**30**: 1587-1597.
- HEAD BM, RUBINSTEIN E, MEYERS AF (2016). Alternative pre-approved and novel therapies for the treatment of anthrax. Head et al. *BMC Infectious Diseases*,**16**: 621.
- IRENGE LM, DURANT JF, TOMASO H, PILO P, OLSEN J S, RAMISSE V, MAHIILON J, GALA JL (2010). Development and validation of a real-time quantitative PCR assay for rapid identification of *Bacillus anthracis* in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol*,**88**: 1179–1192.
- IRENGE LM, GALA JL (2012). Rapid detection methods for *Bacillus anthracis* in environmental samples: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*,**93**: 1411–1422.
- JANIK E, Michal CEREMUGA M, NIEMCEWICZ M, BIJAK M (2020). Dangerous pathogens as a potential problem for public health. *Medicina (Kaunas)*,**56(11)**: 591.
- JENSEN J, KLEEMEYER H (1953). Bacterial differential diagnosis of the anthrax by means of a new specific test called the string-of pearls-test. *Zentralbl Bakteriol Orig.*,**159(8)**: 494-500.
- KADANALI A, ÖZEL AS (2019). Şarbon: modern çağda kendini unutturmamayan hastalık. *Klimik Dergisi*,**32(3)**: 222-228.
- KALB SR, BOYER AE, BARR JR (2015) Mass spectrometric detection of bacterial protein toxins and their enzymatic activity. *Toxins*,**7**: 3497-3511.
- KAMAL SM, RASHID AKM, BAKAR MA, AHAD MA (2011). Anthrax: an update. *Asian Pac J Trop Biomed.*,**1(6)**: 496-501.
- KEIM P, PRICE LB, KLEVYTSKA AM (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*,**182(10)**: 2928-2936.

- KEIM P, VAN ERT MN, PEARSON T, VOGLER AJ, HUYNH LY, WAGNER DM (2004). Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect. Genet. Evol.*,**4(3)**: 205-213.
- KETEN D, GÜZEL TUNÇCAN Ö, HIZEL K (2016). Şarbon ve Orf. Türkiye Klinikleri. *J Inf Dis-Special Topics*,**9(3)**: 114-120.
- KILIÇ S (2006). Biyolojik silah olarak bakteriler: “Kategori A ajanlar”. *Türk Hij Den Biyol Derg.*,**63(1)**: 21-46.
- KIM J, GEDI V, LEE SC, CHO JH, MOON JY, YOON MY (2015). Advances in Anthrax detection: overview of bioprobes and biosensors. *Appl Biochem Biotechnol.*,**176(4)**: 957-977.
- KINCI MF, ŞEHİRLİ KINCI Ö, ACAVUT G, PAY RE, UĞURLU M, ALANBAY İ (2020). Şarbon: gebelik, postpartum dönem ve laktasyonda aşılama ve tedavi ilkeleri. *Jinekoloji- Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*,**17(3)**: 483-486.
- KOLTON CB, PODNECKY NL, SHADOMY SV, GEE JE, HOFFMASTER AR (2017). *Bacillus anthracis* gamma phage lysis among soil bacteria: an update on test specificity. *BMC Res Notes*,**10(1)**: 598.
- KUEHN A, KOVAC P, SAKSENA R, BANNERT N, KLEE SR, RANISCH H, GRUNOW R (2009). Development of antibodies against anthrose tetrasaccharide for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. *Clin. Vaccine Immunol.*,**16**: 1728–1737.
- KUROSAKI Y, SAKUMA T, FUKUMA A, FUJINAMI Y, KAWAMOTO K, KAMO N, MAKINO SI, YASUDA J (2009). A simple and sensitive method for detection of *Bacillus anthracis* by loop-mediated isothermal amplification. *J Appl Microbiol.*,**107(6)**: 1947-1956.
- LAURIDSEN LH, VEEDU RN (2012). Nucleic acid aptamers against biotoxins: a new paradigm toward the treatment and diagnostic approach. *Nucleic Acid Therapeutics*,**22**: 371–379.
- LIU D, WEI JC, CHEN QL, GUO XG, ZHANG EM, HE L, LIANG XD (2017). Genetic source tracking of an anthrax outbreak in Shaanxi province, China. *Infectious Diseases of Poverty*,**6**: 14.
- MABRY R, BRASKY K, GEIGER R, CARRION R, HUBBARD G.B, LEPPLA S, PATTERSON JL, GEORGIOU G, IVERSON BL (2006) Detection of anthrax toxin in the serum of animals infected with *Bacillus anthracis* by using engineered immunoassays. *Clin. Vaccine Immunol.*,**13**: 671-677.
- MAKINO SI, OKADA YL, MARUYAMA T, EZAKI T, SASAKAWA C, YOSHIKAWA M (1993). Direct detection of *Bacillus anthracis* DNA in animals by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.*,**31(3)**: 547-551.

- MANZULLI V, FASANELLA A, PARISI A, SERRECCHIA L, DONATIELLO A, RONDINONE V, CARUSO M, ZANGE S, TSCHERNE A, DECARO N, PEDARRA, GALANTE D (2018). Evaluation of in vitro antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis* strains isolated during anthrax outbreaks in Italy from 1984 to 2017. *J Vet Sci.*,**20(1)**: 58-62.
- MECHALY A, VITNER E, LEVY H, WEISS S, BAR-DAVID E, GUR D, KOREN M, COHEN H, COHEN O, MAMROUD E (2018). Simultaneous immunodetection of anthrax, plague, and tularemia from blood cultures by use of multiplexed suspension arrays. *J. Clin. Microbiol.*,**56**: e01479–e01517.
- MISSIAKAS D, SCHNEEWIND O (2017). Assembly and function of the *Bacillus anthracis* S-Layer. *Annu Rev Microbiol*,**71**: 79–98.
- MULLINS JC, VAN ERT M, HADFIELD T, NIKOLICH MP, HUGH-JONES ME, BLACKBURN JK (2015). Spatio-temporal patterns of an anthrax outbreak in white-tailed deer, *Odocoileus virginianus*, and associated genetic diversity of *Bacillus anthracis*. *BMC Ecol*,**15**: 23.
- ODALAR J, YARRARAPU SNS, MATHAI JK (2021). Anthrax infection. StatPearls.
- OIE World organisation for animal health, Terrestrial Manual (2018); Chapter 3.1.1. s. 310.
- OLIVEIRA M, MASON-BUCK G, BALLARD D, WOJCIECH BRANICKI W, AMORIM A (2020). Biowarfare, bioterrorism and biocrime: A historical overview on microbial harmful applications. *Forensic Sci Int.*,**314**: 110366.
- ORTATATLI M, KARAGOZ A, PERCIN D, KENAR L, KILIC S, DURMAZ R (2012). Antimicrobial susceptibility and molecular subtyping of 55 Turkish *Bacillus anthracis* strains using 25-loci multiple-locus VNTR analysis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*,**35(4)**: 355-361.
- OSMANAĞAOĞLU Ş (2010). Türk tarihinde veteriner hekim büyüklerimiz. *Vet Hekim Der Derg*,**81(1)**: 3-7.
- ÖĞÜTLÜ A (2012). Şarbon. *J. Exp. Clin. Med.*,**29**: 155-162.
- PILO P, FREY J (2011). *Bacillus anthracis*: molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. *Infect. Genet. Evol.*,**11(6)**: 1218-1224
- PILO P, FREY J (2018). Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect Genet Evol.*,**64**: 115-125.
- PORITZ MA, BLASCHKE AJ, BYINGTON CL, MEYERS L, NILSSON K, JONES DE, THATCHER SA, ROBBINS T, LINGENFELTER B, AMIOTT E, HERBENER A, DALY J, DOBROWOLSKI SF, TENG DF, RIRIE KM (2011). FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection. *PLoS ONE*,**6(10)**: e26047.

- PROSKE D, BLANK M, BUHMANN R, RESCH A (2005). Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*,**69**: 367–374.
- RONDINONE V, SERRECCHIA L, PARISI A, FASANELLA A, MANZULLI V, CIPOLLETTA D, GALANTE D (2020). Genetic characterization of *Bacillus anthracis* strains circulating in Italy from 1972 to 2018. *PLoS ONE*,**15**(1): e0227875.
- QIAO YM, GUO YC, ZHANG XE, ZHOU YF, ZHANG ZP, WEI HP, YANG RF, WANG DB (2007). Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Bacillus anthracis* spores. *Biotechnol Lett.*,**29**(12): 1939-1946.
- SALGADO JR, RABINOVIC L, GOMES MF D, ALLIL RCS, WERNECK MM, RODRIGUES RB, PICAIO RC, LUIZ FBO, VIVONI AM (2020). Detection of *Bacillus anthracis* and *Bacillus anthracis* like spores in soil from state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*,**115**: e200370.
- SAMUELS DC, BELOW JE, NESS S, YU H, LENG S, GUO Y (2020). Alternative applications of genotyping array data using multivariate methods. *Trends in genetics: TIG*,**36**(11): 857–867.
- SASTRY KS, TUTEJA U, SANTHOSH PK, LALITHA MK, BATRA HV (2003). Identification of *Bacillus anthracis* by a simple protective antigen-specific mAb dot-ELISA. *J. Med. Microbiol.*,**52**: 47–49.
- SAVRANSKY V, IONIN B, REECE J (2020). Current status and trends in prophylaxis and management of Anthrax Disease. *Pathogens.*,**9**(5): 370.
- SAWA T, MOMIYAMA K, MIHARA T, KAINUMA A, KINOSHITA M, MORIYAMA K (2020). Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: practical overview. *Microbiology and immunology*,**64**(5): 331–344.
- SCHOFIELD DA, WESTWATER C (2009). Phage-mediated bioluminescent detection of *Bacillus anthracis*. *Journal of Applied Microbiology*,**107**: 1468–1478.
- SCHUCH R, FISCHETTI VA (2009). The secret life of the anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage-mediated ecological adaptations. *PloS One*,**4**: e6532.
- SCHULZ ME, LERECLUS D, KOEHLER TM (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiol Spectr.*,**7**(3): 10.1128.
- SEMENOVA VA, STEWARD-CLARK E, MANIATIS P, EPPERSON M, SABNIS A, SCHIFFER J (2017). Validation of high throughput screening of human sera for detection of anti-PA IgG by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) as an emergency response to an anthrax incident. *Biologicals.*,**45**: 61–68.
- SIMONSEN KA, CHATTERJEE K (2021). Anthrax. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls.

- THIERRY S, TOURTEREL C, FLECHE P L, DERZELLE S, DEKHIL N, et al. (2014). Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. *PLoS ONE*,**9(6)**: e95131.
- TOURNIER JN, ROUGEAUX C (2020). Anthrax toxin detection: from in vivo studies to diagnostic applications. *Microorganisms*,**8(8)**: 1103.
- TUERK C, GOLD L (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment—Rna ligands to bacteriophage-T4 DNA-polymerase. *Science*,**249**: 505–510.
- TURNBULL PCB (2008). Anthrax in humans and animals. World Health Organization. 4th Ed.
- WANG DB, TIAN B, ZHANG ZP, WANG XY, FLEMING J, BI LJ, YANG RF, ZHANG XE (2015). Detection of *Bacillus anthracis* spores by super-paramagnetic lateral-flow immunoassays based on “Road Closure” Biosens. *Bioelectron.*,**67**: 608–614.
- WANG D, WANG B, ZHU L, WU S, LYU Y, FENG E, PAN C, JIAO L, CUI Y, LIU X, WANG H (2020). Genotyping and population diversity of *Bacillus anthracis* in China based on MLVA and canSNP analysis. *Microbiological research*,**233**: 126414.
- WATANABE T, MORIMOTO A, SHIOMI T (1975). The fine structure and the protein composition of gamma phage of *Bacillus anthracis*. *Canadian Journal of Microbiology*,**21**: 1889–1892.
- WHO, (2008). Anthrax in Humans and Animals. 4th Ed.
- YILMAZ S, DUYAN S, ARTUK C, DİKTAŞ H (2014). Mikrobiyolojik tanımlamada MALDI-TOF MS uygulamaları. *TAF Preventive Medicine Bulletin*,**13(5)**.
- ZASADA AA (2018). Injectional anthrax in human: A new face of the old disease. *Adv Clin Exp Med.*,**27(4)**: 553–558.
- ZASADA AA, ZACHARCZUK K, FORMINSKA K, WIATRZYK A, ZIOLKOWSKI R, MALINOWSKA E (2018). Isothermal DNA amplification combined with lateral flow dipsticks for detection of biothreat agents. *Anal Biochem.*,**560**: 60-66.
- ZASADA AA (2020). Detection and identification of *Bacillus anthracis*: from conventional to molecular microbiology methods. *Microorganisms*,**8(1)**: 125.

EKLER

Ek-1. Laboratuvar kullanım izni



Say1 • 80962070/806.01.03

Konu : Doktora Tez Çalışması

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ - HSGM NÜKROBİYOLOJİ REFERANS LABORATUVARLARI
BİYOLOJİKÜRÜNLER DAİRESİ BAŞKANLIĞI

T.C.

SAĞLIK BAKANLIĞI
Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü

28,09/2020 17:16 - 80962070 - 806.01.03 - E.1848

111

W125721564



ANKARA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜNE

Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda MM40702 sicil numarası ile görev yapmakta olan Bio Süleyman YALÇIN Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında doktora programına kayıtlıdır. İlgili personel doktora yeterlilik sınavını vermiş ve tez aşamasındadır. Doktora tez konusu "Türkiye 'de İnsan ve Hayvan Orijinli Bacillus anthracis İzolatlarının MultipleLocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) ile Moleküler Karakterizasyonu" olup tez çalışmasında kullanılacak her türlü kit ve sarf malzemesi Enstitü Bilimsel Araştırmalar Proje biriminden karşılanacaktır. Tez testlerinin Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı'nda mevcut cihazlar kullanılarak yürütülmesi planlanmaktadır. Tezden elde edilecek veriler, laboratuvarımızda B.anthraxis MLVA için validasyon çalışmalarının yapılması olanak sağlayacaktır. Tezde ayrıca hem hayvan hem de insan izolatları çalışılacak olup elde edilen veriler, Daire Başkanlığımızın gündeminde olan tek sağlık yaklaşımına da katkı verecektir. Elde edilen verilerin Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar ve Daire Başkanlığı ile de paylaşılması planlanmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, ilgili personelin doktora tez çalışmalarının Genel Müdürlüğümüz Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında yürütülmesi uygun görülmüştür. Bilgilerini ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır

Dr. Mahmut AVCI

Genel Müdür Yardımcısı

Ek-2. İnsandan izole edilen suşların kullanım izni



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ - HSGM
MİKROBİYOLOJİ REFERANS LABORATUVARLARI VE
BİYOLOJİK ÜRÜNLER DAİRESİ BAŞKANLIĞI
24/02/2021 15:53 - E-80962070 - 010.06.99 - 293



00133405029



Sayı : 80962070/
Konu : Süleyman YALÇIN'ın Tez Çalışması
İzin Talebi

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE
(Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü)

İlgi : 11.02.2021 tarihli E-37106781-000-22454/00134630601 sayılı yazınız.

İlgi yazıda; Süleyman YALÇIN'ın tez çalışması için talep edilen materyallerin (izolatların), Genel Müdürlüğümüz Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarlarında uygun biyogüvenlik ve biyoemniyet koşullarında çalışılmak üzere kullanılması uygundur. Bilgilerini ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır.
Dr. Mahmut AVCI
Bakan a.
Genel Müdür Yardımcısı



Ek-3. Hayvandan izole edilen suşların kullanım izni



Gıda

T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
ve Kontrol Genel Müdürlüğü

GIDANI KORU
SOPRANA SAHİP ÇIK

Sayı :E-71037622-325.99-1495769

Konu :Türkiye’de İnsan ve Hayvan Orijinli
Bacillus Anthracis İzolatlarının (MLVA31)
Yöntemi İle Moleküler Karakterizasyonu

SAĞLIK BAKANLIĞINA
(Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

İlgi : 29.04.2021 tarihli ve 23248055-599 sayılı yazınız.

Genel Müdürlüğünüz bünyesinde bulunan Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarında görevli Uzm. Biyolog Süleyman Yalçın tarafından yapılması planlanan "Türkiye' de insan ve hayvan orijinli *Bacillus anthracis* izolatlarının Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA31) ile moleküler karakterizasyonu" adlı tez çalışmasında, Bakanlığımız kuruluşlarından Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından MLVA çalışması için Genel Müdürlüğü'nüze gönderilmiş hayvan orijinli 79 adet *Bacillus anthracis* izolatının kullanılması amaçlı izin talebiniz incelenmiştir.

Yapılması planlanan tez çalışması için hayvan orijinli 79 adet *Bacillus anthracis* izolatının kullanılması Genel Müdürlüğümüzce uygun görülmüş olup, kullanılacak ajanın çift yönlü ajan olması nedeni ile çalışmalarda gerekli hassasiyetin gösterilmesi, çalışmanın ilerleyen süreçlerinde Genel Müdürlüğümüzden izin ve görüş alınması gereken konuların tarafımıza iletilmesi, tez çalışması sonuçlarının yayın haline getirilmeden önce son halinin Genel Müdürlüğümüz ile paylaşılması ve yayın için gerekli izinlerin alınması hususunda; Gereğini arz ederim.

Harun SEÇKİN
Bakan a.
Genel Müdür

Doğrulama Kodu: F36F5965-312B-48AF-A285-028CFCF21FE2

Eskişehir Yolu 9. Km. Lodumlu Mevkii 06800 Çankaya/ Ankara

Bilgi için:Burak DEVECİ
Veteriner Hekim
Telefon No:(312) 258 75 30

