



**T.C.  
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIVAS YÖRESİNDEN İZOLE EDİLEN  
FRANCISELLA TULARENSIS SUBSPECIES HOLARCTICA  
İZOLATLARININ MOLEKÜLER FİLOGENETİK ANALİZİ**

**SİNEM DEMİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**SIVAS-2018**

**T.C.  
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİVAS YÖRESİNDEN İZOLE EDİLEN  
FRANCISELLA TULARENSIS SUBSPECIES HOLARCTICA  
İZOLATLARININ MOLEKÜLER FİLOGENETİK ANALİZİ**

**SİNEM DEMİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
DR.ÖĞR.ÜYESİ MEHMET ATAŞ**

**SİVAS-2018**

**“Sivas Yöresinden İzole Edilen *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* İzolatlarının Moleküler Filogenetik Analizi”** adlı Yüksek Lisans Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

\_\_\_\_\_

Üye

\_\_\_\_\_

Üye

\_\_\_\_\_

Üye (Danışman)

\_\_\_\_\_

ONAY

Bu tez çalışması, 27/12/2018 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

## ÖZET

### SİVAS YÖRESİNDEN İZOLE EDİLEN FRANCISELLA TULARENSIS SUBSPECIES HOLARCTICA İZOLATLARININ MOLEKÜLER FİLOGENETİK ANALİZİ

Sinem DEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ATAŞ

2018, 64 sayfa

*Francisella tularensis* insanlarda ve hayvanlarda Tularemi hastalığına neden olan fakültatif intrasellüler bir bakteridir. Tularemi hastalığına alt tür *tularensis* ve alt tür *holarctica* neden olmaktadır. *F. tularensis* subsp. *tularensis* yalnızca Kuzey Amerika’ da bulunurken, *F. tularensis* subsp. *holarctica* ise Avrupa ve Asya ülkelerinden izole edilmektedir.

Ülkemizdeki tularemi salgınlarının su kaynaklı olduğu ve etkenin *F. tularensis* subsp. *holarctica* olduğu bilinmektedir. 2011-2012 yıllarında Sivas ilinde gözlenen tularemi salgın bölgelerindeki su örneklerinden kültür yöntemi ile sekiz *F. tularensis* subsp. *holarctica* izole edilmiştir. Bu çalışmada izole edilen sekiz *F. tularensis* subsp. *holarctica* izolatının tul4, fopA, RD1 ve 16S rRNA gen bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve sekans analizi yöntemiyle araştırılmıştır. Sekans analizi yapılan gen bölgeleri birbirleri ile ve GenBank’ ta bulunan örnekler ile karşılaştırılmıştır. Tüm örnekler tul4 ve fopA gen bölgesi açısından benzer bulunmuştur. 16S rRNA gen bölgesi açısından dört izolat, RD1 gen bölgesinde ise iki izolat benzer bulunmuştur. İncelen gen bölgeleri açısından GenBank’ ta yapılan sekans karşılaştırmasında *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS ve *F. tularensis* subsp. *holarctica* PHIT-FT049 örnekleri ile % 95-100 benzerlik saptanmıştır.

Çalışmamız sonucunda; sekiz *F.tularensis* subsp. *holarctica* izolatının tul4 ve fopA gen bölgelerinin özdeş olduğu, ilimizdeki tularemi salgınlarında 16S rRNA ve RD1 gen bölgeleri bakımından benzer ve farklı baz dizilimine sahip kökenlerin bulunduğu ortaya konulmuştur. *F.tularensis*’in ülkemizdeki filocoğrafyasının detaylı olarak ortaya

ıkarılabilmesi için salgın bölgelerinden yeni izolatların üretilmesi ve ileri moleküler teknikler ile araştırılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Tularemi, Sivas, holarctica, 16S rRNA, tul4, RD1, fopA



## ABSTRACT

### MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSIS OF FRANCISELLA TULARENSIS SUBSP. HOLARCTICA STRAINS WHICH ISOLATED FROM SIVAS REGION

Sinem DEMİR

Master Thesis

Department of Pharmaceutical Microbiology

Supervisor: Assistant Professor Dr. Mehmet ATAŞ

2018, 64 pages

*Francisella tularensis* is a facultative intracellular bacteria that caused Tularemia disease at human and animals. Tularemia is caused by subspecies *tularensis* and subspecies *holarctica*. *F. tularensis* subsp. *tularensis* is found only in North America, while *F. tularensis* subsp. *holarctica* is isolated from European and Asian countries.

It is known that tularemia outbreaks in our country is water-borne and causative agent *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Eight *F. tularensis* subsp. *holarctica* were isolated from the water samples in tularemia outbreaks observed in Sivas during 2011-2012. In this study; tul4, fopA, RD1 and 16S rRNA gene regions of eight *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolates were amplified by PCR method and investigated by sequencing method. Sequence analysis of the gene regions were compared with each other and the samples found in GenBank. All samples were similar in terms of tul4 and fopA gene region. Four isolates were found in terms of the 16S rRNA gene region and two isolates were found in the RD1 gene region. In the sequence comparison of GenBank' in terms of examined gene regions, 95-100 % similarity was determined with *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS and *F. tularensis* subsp. *holarctica* PHIT-FT049.

As a result of our study; the tul4 and fopA gene regions of eight *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolates were found to have identical and different base sequence origins in 16s rRNA and RD1 gene regions in tularemia outbreaks in our province. In order to reveal the phytogeography of *F. tularensis*' in Turkey, it is necessary to produce new isolates from epidemic regions and to investigate them with advanced molecular techniques.

**Key Words:** Tularemia, Sivas, holarctica, 16S rRNA, tul4, RD1, fopA

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana örnek olan, kıymetli fikirleriyle yol gösteren, yetişmemde sonsuz emeği olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ATAŞ' a,

Yüksek lisans süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana destek veren, ilgisini ve yardımlarını hiç esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Tutku TUNÇ'a,

Sekans ve filogenetik analiz çalışmalarında katkı ve emeklerini esirgemeyen (MG Biyoenformatik) Moleküler Biyolog Murat GÜLER' e,

Hayatımın her aşamasında yanımda olup, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen CANIM AİLEME en içten teşekkürlerimi sunuyorum.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	viii
TABLolar DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ .....	xii
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1 Tarihçe .....	3
2.2 Mikrobiyolojik Özellikler .....	3
2.3 Epidemiyoloji .....	4
2.4 <i>F. tularensis</i> 'in Alt Türleri .....	5
2.4.1 <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> (Biovar tip A) .....	5
2.4.2 <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> (Biovar tip B) .....	6
2.4.3 <i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i> .....	6
2.5 Patogenez .....	7
2.6 <i>F. tularensis</i> 'in Bulaşma Yolları .....	7
2.7 <i>F. tularensis</i> 'in Biyolojik Silah Olarak Kullanımı .....	8
2.8 Tularemi Hastalığında Klinik Bulgular .....	9
2.9 Tedavi .....	10
2.10 Filogenetik Analiz .....	11
2.11 <i>F. tularensis</i> 'in İzolasyonu ve Tiplendirilmesi .....	12
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>14</b>
3.1 Materyal .....	14
3.2 Besiyeri ve Kimyasallar .....	15
3.2.1 Glucose Cystein Blood Agar (GCBA) Besiyerinin Hazırlanması .....	15
3.2.2 Etidyum Bromür Çözeltisi (5 mg/ml) .....	15
3.3 Çalışmada Kullanılan Primerler .....	16
3.4 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Alet ve Ekipmanları .....	16

3.5	Dizi Analiz Programları ve Veritabanları .....	17
3.6	DNA izolasyonu .....	17
3.7	PCR Analizi.....	19
3.7.1	PCR Karışımının Hazırlanması .....	19
3.7.2	fopA Amplifikasyonu .....	20
3.7.3	16S rRNA Amplifikasyonu .....	20
3.7.4	RD1 Amplifikasyonu .....	21
3.7.5	tul4 Amplifikasyonu .....	21
3.8	Agaroz Jel Elektorezi.....	22
3.8.1	Jel ve Elektroforez Tamponu.....	22
3.8.2	Agaroz Jelin Hazırlanması.....	22
3.8.3	Elektroforez ve Görüntüleme İşlemi.....	22
3.9	Sekans Analizi.....	22
3.10	Filogenetik Analizi .....	23
<b>4.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>24</b>
4.1	PCR Bulguları .....	24
4.2	Filogenetik Analiz Bulguları .....	26
	<b>TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>31</b>
	<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>37</b>
	<b>EK-1 .....</b>	<b>42</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>50</b>
	<b>ETİK KURUL KARARI.....</b>	<b>51</b>

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> İncelenen izolat örneklerinin yerleşim birimlerine göre dağılımı .....	14
<b>Tablo 2.</b> Primerlerin baz dizileri bağlandıkları spesifik gen bölgeleri, PCR ürünlerinin uzunlukları.....	16
<b>Tablo 3.</b> PCR reaksiyon karışımı. ....	19
<b>Tablo 4.</b> 16S rRNA Gen Bölgesi GenBank Erişim Numaraları.....	23



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> tul4 gen bölgesinin agaroz jelde görünümü .....	24
<b>Şekil 2.</b> fopA gen bölgesinin agaroz jelde görünümü .....	24
<b>Şekil 3.</b> 16S rRNA gen bölgesinin agaroz jelde görünümü.....	25
<b>Şekil 4.</b> RD1 gen bölgesinin agaroz jelde görünümü .....	25
<b>Şekil 5.</b> tul4 gen bölgesi BLAST analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç. ....	26
<b>Şekil 6.</b> fopA gen bölgesi BLAST analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç .....	27
<b>Şekil 7.</b> 16s rRNA gen bölgesi BLAST analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç .....	28
<b>Şekil 8.</b> RD1 gen bölgesi BLAST analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç.....	29

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>NCBI</b>	National Center For Biotechnology Information
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Tool
<b>MEGA</b>	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
<b>NJ</b>	Neighbour Joining
<b>LVS</b>	Live Vaccine Strain
<b>GCBA</b>	Glucose Cystein Blood Agar
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleosid Trifosfat
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Distile Su

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tularemi Kuzey yarımküreye özgü bakteriyel zoonoz bir hastalıktır. Hastalık etkeni gram negatif, kokobasil görünümünde bir bakteri olan *Francisella tularensis*'tir. *F.tularensis* insanlara başlıca artropod ısırıkları, enfekte hayvanlarla direk temas, enfekte hayvan dokuları, kontamine su ve yiyecekler, enfekte aerosollerin solunması yolu ile bulaşmaktadır (WHO, 2007; Ellis ve ark., 2002).

*F.tularensis* subsp. *tularensis* (Tip A) bilinen en enfeksiyöz patojenlerden biridir ve Kuzey Amerika'dan izole edilmektedir. Keneler, geyik sinekleri gibi artropodlar veya enfekte aerosoller aracılığı ile insan ve hayvanlara bulaşmaktadır. *F.tularensis* subsp. *holarctica* (Tip B) Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'dan izole edilmektedir. *F.tularensis* subsp. *holarctica*'nın etken olduğu tip B tularemi vakaları nehir, göl, akarsu, dere gibi sucul ortamlar ve bu ortamlarda yaşayan misk sıçanı ve kunduzlarla ilişkilidir. Tavşanlar ve diğer hayvanlardan da izole edilmiştir. (Ellis ve ark., 2002; WHO, 2007).

*F. tularensis* laboratuvar bulaşması yönünden çok dikkatli olunması gereken bir etkidir. Eğer laboratuvar ortamında canlı bakteri ile çalışılıyorsa biyogüvenlik düzeyi III (Biosafety level III) ortam koşulları sağlanmış olmalı, şüpheli örneklerle çalışılıyorsa biyogüvenlik II düzeyinde çalışılması gerekmektedir (Çelebi, 2010).

Tularemi hastalığının epidemiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır. Hastalığın rezervuar ve vektörlerine ilişkin pek çok bilgi boşluğu bulunmaktadır. Tularemidde kültür işleminin biyogüvenlik düzeyi 3 (BGD-3) laboratuvar ortamına ve deneyimli personele ihtiyaç duyması nedeniyle, son yıllarda klinik örneklerde bakteriye ait spesifik gen bölgelerinin Polimerase Chain Reaction (PCR) ile gösterilmesi önem kazanmıştır (Çelebi, 2010). Moleküler analizlerle *F. tularensis*'in alttürlerinin DNA dizin temelli tiplendirilmesi laboratuvar çalışanları açısından güvenli bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Keim ve ark., 2007). Taksonomik sınıflandırmalar, günümüzde DNA baz temelli yaklaşımlara dayandırılabilir. Bu gelişme genusun sistematığına kılavuzluk eden filogenetik modellerin oluşturulmasını kolaylaştırmaktadır. Bunun sonucunda ise, başarılı epidemiyolojik araştırmaların yanı sıra, kesin ekolojik analizler de yapılabilmektedir. Yapılacak olan bu çalışmada Sivas ilindeki su örneklerinden izole edilen *F.tularensis* subsp. *holarctica* izolatlarının Dünya'nın farklı bölgelerinden izole edilen bakteriler ile aralarındaki

filogenetik ilişkiyi ortaya çıkarmak ve ilerde yapılacak olan benzer çalışmalar için kaynak oluşturmak amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Tarihçe

Tularemi ilk McCoy ve Chapin tarafından 1911'de Kaliforniya'nın Tulare şehrinde veba benzeri hastalıktan ölen sincaplardan salgın bir hastalık etkeni olarak tanımlanmıştır. Etken *Bacterium tularensis* olarak adlandırılmıştır. 1914 yılında *Francisella tularensis*'in insandan ilk izolasyonu ise Lamb ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. 1920 yılında Edward Francis'in çalışmaları ile hastalığın klinik bulguları, tanısı ve epidemiyolojik özellikleri ortaya konmuştur. 1947 yılında *Bacterium tularensis* adı Edward Francis'in anısına *F. tularensis* olarak değiştirilmiştir (Kılıç, 2010).

Ülkemizde tularemi tarihi, seroloji ve klinik bulgular temelinde bir olguya tanı konulduğunda 1913'e kadar uzanmaktadır. Ancak, klinik ve mikrobiyolojik olarak Tularemi, ilk olarak Lüleburgaz bölgesinde askeri garnizon ve yakınında bulunan köylerde açığa çıkan salgın ile 1936 yılında tanımlanmıştır. Türkiye'deki Tularemi (1936-2009), analizin uygunluğu açısından üç dönemde: 1936 ve 1953 yılları arasındaki ilk salgın 18 yıl, orta 16 yıl (1988-2004) ve son 5 yıl (2005-2009) olarak değerlendirilebilir. 1953 ile 1988 arasında herhangi bir tularemi vakası bildirilmemiştir ve bu varyasyonun nedenleri hala bilinmemektedir. Günümüzde Türkiye'nin birçok bölgesi Tularemi hastalığı yönünden endemik olarak kabul edilmektedir (Kılıç, 2010).

### 2.2 Mikrobiyolojik Özellikler

*F. tularensis*, gram boyama ile bipolar soluk boyanan, gram negatif, kokobasil görünümündedir. Zorunlu aerob, sporsuz, pleomorfik, fakültatif intrasellüler ve katalaz pozitifdir. Sıvı besiyerinde üremesi çok güçtür. Bu zor üreyen organizmanın üreyebilmesi için kanlı agara sistein veya sistin eklenmesi gerekmektedir. *F. tularensis* yüksek lipid içeriğine sahiptir ve infekte hayvanlardan elde edilen virulent izolatlar kapsül oluşturur (Stewart, 1995).

*F. tularensis* vahşi suşları ve canlı aşı suşlarının (LVS -live vaccine strain) yüzeyinde eksopolisakkarid bir kapsül vardır (Svensson ve ark., 2005). Kapsülün bileşimi tam olarak bilinmemektedir. Yapılan biyokimyasal analizlerde kapsülün karbonhidratlar, amino asitler



ve yağ asitleri içerdiği bulunmuştur. *F. tularensis*'in kapsülünün bakteriyi serum komplemanının öldürücü etkisinden koruduğu bilinmektedir (Sandstrom, 1988).

Kapsül materyali çıkartılmış bakterilerin farelerde hastalığa neden olmaması kapsülün virülans rolünü göstermektedir (WHO, 2007).

Lipopolisakkarit (LPS) tüm gram negatif bakterilerin dış membranının ana bileşeni olduğu gibi *F. tularensis*'in de ana bileşenidir. Bu LPS yapılar yangısal sitokinler açığa çıkarmaktadırlar. Ancak *F. tularensis* polisakkariti diğer enterik bakterilerinkine göre bin kez daha az etkilidir. Bakterinin yapısındaki Tip 4 pilusları, konak hücreye adezyonuna, titreşim hareketi yapmasına, DNA'nın içeriye alınmasına ve biofilm yapımına aracılık etmektedir (Molly ve ark., 2006).

*Francisella* cinsinin sınıflandırılması biyokimyasal reaksiyonları değişken, zayıf veya geç reaksiyon şeklinde olduğu için karışıktır (Celebi ve ark., 2006). Bu sebeple bu bakterilerin dünyanın farklı bölgelerinde farklı isimlendirildiği gözlemlenmiştir. Biyokimyasal testlerle *F. tularensis* subsp. *tularensis* ile *F. tularensis* subsp. *holarctica* arasında tam ve doğru bir ayırım yapılamaz. Etkenin alt türleri serolojik olarak birbirlerinden ayırt edilemez (Svensson ve ark., 2005).

### 2.3 Epidemiyoloji

Tularemi, esas olarak kuzey yarım kürede ve genellikle 30-71° kuzey enlemleri arasında görülen bir zoonotik hastalıktır. Bakterinin doğal rezervuarlarının çoğunlukla kemirici hayvanlardan kaynaklandığı bilinmektedir. *F. tularensis* subsp. *holarctica* ise su sıçanı, kunduz gibi suda yaşayan kemiricilerden izole edilmiştir (Eliasson ve ark., 2006). *F. tularensis* subsp. *tularensis*, özellikle tavşan, sincap, sıçan, geyik ve rakun gibi karada yaşayan canlılarda görülmektedir. Tularemi bu hayvanlarda çoğunlukla ölümcül hastalık yapar. Ancak bazı kemiricilerde bakteri belirgin bir hastalık tablosu oluşturmadan aylarca varlığını sürdürebilir (Ellis ve ark., 2002).

Tularemi hastalığı insanlara farklı yollardan bulaşabilmektedir. Bulaşma insanlarda, bakteriyi taşıyan enfekte hayvan tarafından ısırılma, kontamine hayvan ürünleriyle temas ve kontamine tozların solunması yoluyla oluşmaktadır. Daha virülan olan ve Kuzey Amerika'da görülen *F. tularensis* subsp. *tularensis* genellikle kene ısırması ile bulaşır. Kuzey Avrupa ve

Kuzey Asya’da ise sivrisinekler en önemli vektördür. Tularemi, insandan insana bulaşmamaktadır. Hastalık genellikle tavşan ve kene kaynaklı enfeksiyon olması nedeniyle “avcı hastalığı”, “geyik sineği ateşi”, “tavşan ateşi” ve “kene ateşi” olarak adlandırılmıştır (Şahin, 2009).

Hastalığın yeterince tanınmaması ve bildirim eksikliği nedeniyle Dünyada tularemi insidansı tam olarak bilinmemektedir. Avrupa ve Asya’da su kaynaklı, artropod kaynaklı ve aerosol kaynaklı yüzlerce kişinin etkilendiği salgınlar ortaya çıkmıştır. Tularemi hastalığı her mevsimde görülebilmesine karşın, doğadaki etkinliklerin artmasına bağlı olarak yaz aylarında ve avcılık nedeniyle de kış aylarında daha sık görülmektedir (Eliasson ve ark., 2006).

#### **2.4 *F. tularensis*’in Alt Türleri**

İlk zamanlarda *Francisella* cinsi içerisinde bulunan bakteriler *Bacterium*, *Brucella* ve *Pasteurella* türleri ile birlikte sınıflandırılmıştır. 1960’lı yıllarda yapılan fenotipik, genetik ve hücre duvarı analizleri sonucunda *Francisella* cinsi *Francisellaceae* ailesinin tek cinsi olarak kabul edilmiştir (Friend, 2006).

*F. tularensis* sıcak kanlı ve soğuk kanlı omurgalılar, omurgasızlar ve eklembacaklılarda dahil olmak üzere 250’ den fazla hayvan türünü enfekte edebilme yeteneğine sahiptir. Tavşanlar, kunduzlar gibi yarı sucul hayvanlar, fareler, sıçanlar, hamsterler, sincaplar tulareminin rezervuarı olarak düşünülmektedir. İnsan enfeksiyonlarında başlıca tavşanlar ve fareler küresel olarak önem taşımaktadır. Tularemi epidemiyolojisinde karasal ve su döngüsü olmak üzere iki döngü tanımlanmıştır (Hopla, 1974; Mörner, 1992).

*F.tularensis* insanlarda ve tavşanlardaki virülansına, 16S dizilimine, biyokimyasal reaksiyonlarına ve epidemiyolojik özelliklerine göre üç alt türe ayrılmaktadır. *F. novicida* bazı yazarlar tarafından alt tür bazıları tarafından ise çok yakın ilişkili ayrı bir tür olarak sınıflandırılmıştır (Olsufjev ve Meshcheryakova, 1982; Chanturia, 2011).

##### **2.4.1 *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Biovar tip A)**

İnsanlar ve hayvanlar için en virülan alt türdür. Gliserol ve sitrülünü fermente etme kapasitesine sahiptir. Vücuda solunum yoluyla alınan 10 bakteri enfeksiyon gelişimi için

yeterlidir. Bu nedenle A grubu biyolojik silah ajanlarından biridir. Kuzey Amerika’da hakim olarak görülebilmektedir Avrupa’da yaygın değildir (Eden ve ark., 2017).

Alt tür *tularensis* karasal döngüde önem taşımaktadır. Tavşanlar, keneler, sivrisinek ve diğer sinek türleri bu alt tür için önemli konaklardır. En az 15 kene türünün *F. tularensis* ile doğal enfekte olduğu bildirilmiştir (Kılıç ve ark., 2015).

*F. tularensis* subsp. *tularensis* kendi içerisinde A.I ve A.II olarak 2 gruba ayrılmıştır. A.I grubu Kuzey Amerika’nın doğusunda daha baskın bulunmasına rağmen, tüm Kuzey Amerika’da görülmektedir. *F. tularensis* subsp. *tularensis* A.II grubu ise yalnızca Kuzey batı Amerika’da hakimdir (Farlow ve ark., 2005; Kugeler ve ark., 2009).

#### **2.4.2 *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Biovar tip B)**

Alt tür *holarctica* su kaynaklı tularemi salgınlarından sorumludur. Kuzey Amerika, Avrupa, Asya, Türkiye ve Japonya’da görülürken, *F. tularensis* subsp. *holarctica* biovar *japonica* Japonya’dan izole edilmiştir. İnsanlara ve hayvanlara orta derece de virulandır. Alt tür *tularensis*’in aksine gliserolü ve sitrülünü fermente edemez (Pilo, 2018). Fakat biovar *japonica* gliserolü fermente edebilmektedir. Eritromisin direnç ve duyarlılıklarına göre eritromisin duyarlı (EryS, biovar I) ve eritromisin dirençli (EryR, biovar II) olmak üzere de ikiye ayrılmaktadırlar (Sjöstedt, 2015).

*F. tularensis* subsp. *holarctica* ile ilgili B.16, B.4, B.6 ve B.12 olmak üzere 4 grup tanımlanmıştır. B.16 (*F. tularensis* subsp. *holarctica* biotip *japonica*) Japonya’da ve Avustralya’da bulunmuştur (Pilo, 2018). B.16 grubu ülkemizden de izole edilmiştir (Kılıç ve ark., 2015). B.4 Avrasya ve Kuzey Amerika’da, B.6 Kuzey Amerika ve Avrupa’da B.12 ise Avrasya ve Kuzey Amerika’da görülmektedir. Son zamanlarda *F. tularensis* subsp. *holarctica*’nın farklı bir grubu Çin’ in Tibet bölgesinden izole edilmiştir (Lu ve ark., 2016; Pilo, 2018).

#### **2.4.3 *F. tularensis* subsp. *mediasiatica***

Orta Asya ülkelerinde bulunmakta ve orta derecede virulandır. İnsan ve hayvanlar için virulansı orta derecededir. Alt tür *tularensis*’te olduğu gibi gliserolü ve sitrülünü fermente eder (Pilo, 2018; Eden ve ark., 2017).

## 2.5 Patogenez

*F. tularensis*, fagositozu engelleyen lipidden zengin bir kapsüle ve etkinliği tam olarak aydınlatılmamış bir endotoksine sahiptir (Wilke, 2006). Deri ve mukozalardan giren, ağızdan alınan bakteri insanda hastalık oluşturabilmek için yeterlidir (Penn, 2005; Helvacı, 2009). İnoküle olan etken ortalama 3-5 gün sonra giriş yerinde önce bir papül sonra da ülser oluşturur. Monosit ve makrofajlarda hücre içi uzun süre yaşayabilen bakteri daha sonra lenfohematojen yolla retiküloendotelyal sistem (RES) organlarına yayılarak karaciğer, dalak, kemik iliği, akciğer ve böbreği de tutabilen granülomlar oluşturur (Wilke, 2006). Ayrıca hastalıkta nadiren erken dönemde bakteriyemi olur. İnfeksiyozitesi yüksek, ekzotoksini olmayan bakteri insandan insana bulaşmaz. Bakterinin protein yapılarına karşı oluşan hücresel immun yanıt, konağın hastalıktan iyileşmesinde asıl rolü oynar (Penn, 2005).

## 2.6 *F. tularensis*'in Bulaşma Yolları

*F. tularensis* insanlara enfekte hayvanlarla direk temas, hayvan ısırıkları, arthropod vektörler, enfekte hayvanların karkasları ile kontamine olmuş yiyecek ve içecekler, arthropod ısırıkları, enfekte toz ve aerosollerin solunum yolu ile alınması gibi değişik yollarla bulaşmaktadır (Kılıç, 2010).

Etken karasal döngü ve su döngüsü olmak üzere iki döngüyle doğada yayılır. Karasal döngüde; vahşi tavşanlar, kara kemiricileri ile artropodlar (keneler ve akarlar) *F. tularensis* için ana rezervuarlardır. Bazı keneler hem vektör olarak hem de bakteriyi vücudunda ömür boyu taşıyarak rol oynamaktadırlar (Kılıç, 2010).

*F. tularensis* subsp. *holarctica*'nın doğadaki ana rezervuarı; kunduz, misk sıçanı ve diğer sıçan türleri olduğu tahmin edilmektedir. *F. tularensis* çevre şartlarına oldukça dayanıklı, özellikle suda yaşayan amipler içinde yaşayabilmekte ve su kaynaklı salgınlara neden olabilmektedir (Eliasson ve ark., 2006; Gürcan, 2007).

Hastalık kene veya sinek gibi vektörlerin ısırması veya idrar, dışkı hayvan çıkartılarıyla dokunma sonucu insana bulaş söz konusu olabilmektedir. Bu yol Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa ülkeleri ile Kuzey Avrasya'da en sık görülen geçiş türüdür. Deri ve mukozal yol ile bulaşma gelişimi için enfektif doz 10-50 etken yeterlidir (Tarnvik ve ark., 2004).

Kontamine olmuş suların içilmesi sonucu gelişen tularemi salgınları özellikle Güney Avrupa ve Türkiye’de görülmektedir. Ülkemizde başlıca bulaş yolu kontamine olmuş sular oluşturmakta ve etken olarak da *F.tularensis* subsp. *holarctica* görülmektedir (Kılıç ve ark., 2015). Suların kontaminasyonundan kunduzlar, tarla faresi ve su fareleri sorumlu tutulmaktadır. Enfekte hayvanların çıkartılarıyla veya bu hayvanların ölüsüyle, karada yaşayan hayvanların sulara girip çıkması ile kirlenen sular tularemi açısından risklidir (Kılıç, 2010; Sağlık Bakanlığı, 2011).

Solunum yolu ile bulaş da aerosol halinde bulunan kontamine su veya toz partiküllerinin solunması ile olur. Çevrede hasta hayvanların dışkı, idrar gibi çıkartılarıyla kontamine olmuş saman, ot ve tahılların hasatı sırasında veya depolarda çalışanların bakteriyi tozlarla solması sonucu solunum sisteminde enfeksiyon gelişir (Sjöstedt, 2007).

Laboratuvar çalışanları da solunum yolu ile bulaş açısından yüksek risk grupları arasında bulunmaktadır. Bu yüzden tanısız amaçlı yapılan işlemler sırasında gerekli güvenlik önlemleri alınmalıdır. Solunum yolu ile bulaş riski ve enfektif dozunun düşük olması nedeniyle biyoterörizm ile ilişkili etkenler arasında sayılmaktadır (Eliasson ve ark., 2006; WHO, 2007).

## **2.7 *F. tularensis*'in Biyolojik Silah Olarak Kullanımı**

Tularemi, biyoterörizm açısından “tehlikeli” olarak değerlendirilen bir durumdur. Böylesi bir durumda, hastalarda pnömonik ya da tifoidal tularemi gelişebileceği belirtilmektedir. Ancak, sıklığı daha az olmasına karşın, oküloglandüller, farengial, ülseroglandüller ya da glandüller hastalıkların oluşması da beklenmektedir (Kılıç, 2006).

*F. tularensis*'in biyolojik silah olarak geliştirilmesine yönelik ilk çalışmalar 1930'lu yıllarda başlamıştır. İlk biyolojik silah üretimi ve denemeleri Japon Ordusu tarafından 1932-1945 yılları arasında Mançurya'da gerçekleştirilmiştir. Ayrıca II. Dünya Savaşı sırasında Doğu Avrupa'da, Alman ve Rus Askerleri'nde görülen farklı klinik tularemi formlarının, *F.tularensis*'in Ruslar tarafından askeri saldırı amaçlı kullanımına bağlı olabileceği öne sürülmüştür. Savaş sonrası farklı ülkelerde *F. tularensis* üzerindeki biyolojik silah kullanımı açısından çalışmalar devam etmiştir. ABD Silahlı Kuvvetleri tarafından 1960 yılında *F. tularensis* silah haline getirilmiş ve füze başlıklarına yerleştirilmişlerdir (Lietenberg, 2001).

*F. tularensis*, biyolojik silah olarak aerosol formda ortama verilebileceği gibi, gıda veya su kaynaklarına yönelik sabotaj amacı ile de kullanılabilir. Ayrıca enfekte vektörler aracılığı ile hem insan hem de hayvanlara karşı kullanılabilir (Lietenberg, 2001).

Dünya Sağlık Örgütü Uzmanlar Komitesi'ne göre, aerosol formdaki 50 kg virulan *F.tularensis* toz materyalinin 5 milyon nüfuslu kente havadan salınmasıyla 250.000 kişinin etkileneceği ve 19.000 kişinin öleceği hesaplanmıştır (WHO, 2007; Kılıç, 2006).

## 2.8 Tularemi Hastalığında Klinik Bulgular

Tularemi hastalığı; *F. tularensis* bakterisinin alt türüne, inokulum sayısına, bakterinin vücuda giriş yerine, tedaviye başlama zamanına ve konağın immun yeteneğine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Tularemi, asemptomatik veya subklinik bir seyir gösterebileceği gibi özellikle *F. tularensis* subsp. *tularensis* 'in etken olduğu durumlarda hızla ilerleyen ve mortal seyreden dramatik bir tablo görülebilir. Tularemi başlıca yedi klinik formda sınıflandırılır; ülseroglandüler, glandüler, oküloglandüler, orofaringeal, tifoidal, pnömonik ve intestinal tularemidir (Gotschlich ve Berkin, 1938; Kılıç, 2006; Sağlık Bakanlığı, 2011).

**1. Ülseroglandüler tularemi:** Genellikle kene, sinek gibi vektör bir artropodun veya bir av hayvanının ısırmasından dolayı oluşur. Bazen de av hayvanına veya etine çıplak elle temas bulaş yolu olabilir. Isırılan veya enfekte hayvanla temas eden bölgede önce papül oluşur, daha sonra bu papül ülser halini alır ve bölgesel lenfadenopati gelişir. Dünya'da en sık bu tularemi formu görülür (Aydemir, 2009; Helvacı, 2009).

**2. Glandüler tularemi:** Ülseroglandüler formdan tek farkı bakteri giriş yerini işaret eden bir cilt veya mukoza lezyonu görülmez (Syrjala ve ark., 1985).

**3. Oküloglandüler tularemi:** Kontamine suyla temas sonrası ya da ellerle etkenin göze bulaştırılması sonucu oluşur (Helvacı, 2009). Hastada şiddetli konjunktivit ve periorbital ödem görülür. Nadiren görülen bir formdur (Syrjala ve ark., 1985).

**4. Orofaringeal tularemi:** Kontamine sularla ya da besinlerle ilişkili tularemi formudur. *F. tularensis* subsp. *holarctica* alt türü ile ilişkilidir. Ülkemizde görülen tularemi olguları en sık bu formda karşımıza çıkar (Dirik, 1939; Karadenizli ve ark., 2005). Hastada ateş ve boğaz ağrısı mevcuttur. Muayenede tonsillit, farenjit bulguları görülür. Ağız içinde, tonsiller üzerinde veya farenkste enflamasyon görülebilir. Ağrılı lenfadenopati de tabloya eşlik eder (Helvacı, 2009).

**5. Tifoidal tularemi:** Bu form, yüksek ateş ve sistemik semptomlar ile seyreder. Bakterinin giriş yeri genellikle belirlenemez. Muhtemelen çok fazla sayıda bakteri alındığında gelişir. Lenfadenopatiler belirgin değildir veya belli bir anatomik lokalizasyon göstermez. Bu nedenle tanısı zordur (Syrjala ve ark., 1985).

**6. Pnömonik tularemi:** Bakterinin solunum yoluyla alınması sonucunda meydana gelir. Bakterinin inhalasyonu veya akciğerlere hematogen yayılımı gelişebilir. Genellikle, ateş, hafif balgamın eşlik ettiği öksürük, keskin ve şiddetli göğüs ağrısı vardır (Aydemir, 2009).

**7. İntestinal tularemi:** Tulareminin bu formunda bulantı, kusma, ishal ve karın ağrısı ile karakterize bir tablo seyreder (Karadenizli ve ark., 2005).

## 2.9 Tedavi

Tularemi tedavisinde temel amaç etkenin vücuttan eradikasyonu, semptomların düzeltilmesi, lenf bezi süpürasyonunun önlenmesi, daha ağır klinik tablolara ilerlemesinin engellenmesidir (Sağlık Bakanlığı, 2011).

Bütün tularemi formları için ilk seçenek streptomisin ve ikinci seçenek olarak tetrasiklin veya kinolonlar tercih edilir. Streptomisin ve tetrasiklin, bir takım yan etkilerine rağmen uzun yıllar tularemi tedavisinde tercih edilen ilaçlar olmuş; son zamanlarda ise kinolonlar, tedavide yer almaya başlamıştır. Tigesiklin tetrasiklinlerin en yeni üyesidir. Yeni semisentetik glisilsiklin olan bu antibiyotik ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (Kılıç ve Yeşilyurt, 2011). Tedavi süresi 7-14 gündür. Beta laktam antibiyotikler ve azitromisin tularemi tedavisinde etkili değildir. Ülkemizde sıklıkla orofaringeal tipte görülen salgınlarda izole edilen etken *F.tularensis* alt tür *holarctica'* dır. Bu olgular daha hafif klinik seyir göstermekle birlikte mevcut antibiyotiklerle yapılan tedavilerde apseleşme ve süpürasyon gibi komplikasyonlara rastlanmaktadır. Bu nedenle, alternatif tedavi seçeneklerinin araştırılması önem kazanmaktadır (Sağlık Bakanlığı, 2011; Kılıç ve Yeşilyurt, 2011).

Antibiyotik tedavisi ne kadar erken başlanırsa o kadar iyi sonuçlar alınır. Ülkemizde genellikle tularemi tanısı atlanarak başka hastalıklarla karıştığı için etkin tularemi tedavisi çok geç verilir. Bu da hastanın tedavisini güçleştirir. Tam iyileşme sağlanabilmesi için hem etkin antibiyotiğin verilmesi hem de hastalığın erken döneminde tedavinin başlanması oldukça önemlidir (Kılıç, 2005).

## 2.10 Filogenetik Analiz

Filogenetik analiz, ortak bir ata soyundan gelen türlerin yakın ilişkilerini ve organizmalar arası farklılıkların grafiksel olarak gösterilmesi anlamındadır. Moleküler filogenetik analiz ise hızlı DNA dizilenmesinin oluşumundan sonra daha yaygın hale gelmiştir (Lepp ve Relman, 2004). Filogenetik ağaçlar; köklü, köksüz ya da kladogram, dendrogram ve filogram olarak farklı şekillerde gruplandırılırlar. Bu noktada oluşturulan ağaçta yer alan taksonlar arası mesafenin anlamlı ya da ortak bir atadan köken alıp almaması filogenetik ağaç tipini belirlemektedir (Mount, 2017; Sarıçam ve Müştak, 2015).

Filogenetik ağaç oluşturma metotları, uzaklık tabanlı ve karakter tabanlı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Uzaklık tabanlı metotlar, bir aşama sırası içinde düzenlenmiş birimler olan taksonların aralarındaki uzaklıklara göre kümelendirilerek yerleştirilmesi ya da oluşturulan birden fazla ağaçtan optimal olanın seçilmesine göre kendi içerisinde ikiye ayrılır. Bunlar Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) ve Neighbour Joining (NJ) yöntemidir. Karakter tabanlı metotlar, daha karmaşık olduğu için daha fazla emek ve zaman isteyen metotlardır. Tek veri seti üzerinden farklı ağaç topolojileri oluştururlar. Bunlar Maksimum likelihood, Maksimum parsimoni ve Bayes metotlarıdır (Freeman ve Herron, 1999).

Farklı bir algoritma kümesi olan ve kümeleme analizine filogenetik ağaçlar oluşturmak için Neighbor-joining (NJ; Komşu katılımı-bağlama) yöntemi kullanılmaktadır. NJ yöntemi genetik mesafe matrisinden faydalanarak kümelemeyi gerçekleştiren bir yöntemdir. NJ metodu köksüz ve dal uzunlukları farklı ağaçlar oluşturur. Filogenetik ağacın dalları boyunca mutasyon hızının farklı olabileceğini kabul eder (Lepp ve Relman, 2004).

Ağaçların güvenilirlik derecesini istatistiksel olarak değerlendirmek için kullanılan test “bootstrap (seç-bağla)” olarak adlandırılan yöntemdir. Seç bağla testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur. Örneğin, çalışmada kullanılan dizinin baz çifti kadar yeni bir dizi oluşturmak için bu pozisyonlardan birini bilgisayar rastgele seçer ve bunu yeni dizinin ilk ögesi olarak seç bağla testine başlar. Daha sonra rastgele seçtiği bir pozisyon yeni veri setinin ikinci veri noktasını oluşturmaktadır. Bu verinin rastgele bir örnekleme orijinal veri seti oluşturuluncaya kadar devam eder. Sonra, yeni veri seti filogenisini hesaplamak için kullanılır. Yeniden örneklenmiş veri setinden



oluşan ağaçlarda belirli bir dalın ortaya çıkma yüzdesi hesaplanır. Seç-bağla tahmininde bir dal ne kadar çok kere açığa çıkarsa, o dalın gerçekte var olduğuna dair güven artmaktadır (Felsenstein, 1985; Freeman ve Herron, 1999).

### **2.11 *F. tularensis*'in İzolasyonu ve Tiplendirilmesi**

*F. tularensis*'in tanısında kültür altın standart olarak değerlendirilmektedir. Kültür çalışmalarında %9 koyun kanlı Cystine heart agar (CHAB), Thioglycollate-glucose blood agar (TGBA), 1% IsoVitaleX™ eklenmiş Mueller-Hinton agar, Buffered charcoal yeast extract (BCYE) gibi besiyerleri kullanılmaktadır (WHO, 2007).

Hasta serumunda, kontamine materyallerde ve kültürde üretilmiş bakterilerin tanımlanmasında Direct fluorescence assay (DFA), Slide Aglütinasyon, Mikroaglütinasyon testi ve ELİSA testleri serolojik tanıda sıklıkla kullanılan testlerdir (WHO, 2007).

*F. tularensis*'i tiplendirmek için; Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Canonical Insertion-Deletions (INDELs), PCR, Multilocus Sequence Typing (MLST), Multilocus Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) Analysis (MLVA), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Ribotyping, Regional Difference (RD) Analysis, Whole-Genome-Based Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis and Even Whole Genome Sequencing (WGS)-Based MLST gibi çeşitli moleküler tiplendirme metodları kullanılmaktadır (Lai ve ark., 2016).

VNTR analizi *F. tularensis* kökenlerinin ayrımı için uygun bir yöntem olup laboratuvarlar arası karşılaştırmalara olanak sağlaması bakımından önem taşımaktadır (Farlow ve ark., 2005; Johansson ve ark., 2004). Çoklu lokus VNTR analizi (MLVA) ile *F. tularensis* subsp. *tularensis* iki gruba (A.I ve A.II), *F. tularensis* subsp. *holarctica* ise beş gruba ayrılmıştır (B.I, B.II, B.III, B.IV ve B.V) (Johansson ve ark., 2004). *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* ise M.I, M.II ve M.III olmak üzere kısa süre önce üç gruba ayrılmıştır (Timofeev ve ark., 2017). Başlangıçta *F. tularensis* subsp. *holarctica* için açıklanan beş grup, MLVA yöntemi kullanılarak yapılan ayrıntılı araştırmalar sonucunda B.12 [B.I], B.4 [B.II], B.6 [B.IV] ve B.16 [B.V] (biovar *japonica*) olmak üzere dört gruba düşürülmüştür (Svensson ve ark., 2009; Karlsson ve ark., 2013).

İki fragment bazlı yöntem olan INDELs ve PFGE, *F.tularensis* soylarını genotiplemek için kullanılmaktadır (Sissonen ve ark., 2015). PFGE'de, suşların DNA fragmanlarının (10 kb-10 Mb boyutunda) bantlama paternleri, restriksiyon enzim sindirimi ve en yaygın olarak *F. tularensis* suşlarının popülasyon yapısını araştırmak için kullanılan bakteriyel genomik DNA'nın elektroforez ayrılmasından sonra karşılaştırılmaktadır (Kugeler ve ark., 2009; Lai ve ark., 2016).

*F.tularensis* alt tür ve onların alt gruplarının filocoğrafyasının belirlenmesi için Real-Time PCR, high density microarray kullanarak kökenlerin tiplendirilmesi ve genom içerisinde bulunan nokta mutasyonların SNP analizi gibi ileri moleküler yöntemler kullanılmaktadır. (Vogler ve ark., 2009; Lai ve ark., 2016; Pilo, 2018)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1 Materyal

Tez çalışmamızda; 2011-2012 yıllarında Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ataş'ın doktora tezi çalışmaları sırasında su örneklerinden kültür yöntemi ile izole ettiği 7 adet *F. tularensis* subsp. *holarctica* izolatu ve 2013 yılında Şarkışla Belkent çeşmesinden alınan su örneğinden izole edilen 1 adet izolat (Belkent2013 izolatu) kullanıldı (Ataş, 2012). Adı geçen izolatların yerleşim birimlerine göre dağılımı **Tablo 1.** de gösterilmiştir.

Örnek No	Örnek İsmi	İzole edildiği Bölge
1	Çiçekoğlu	Sivas-Gemerek-Çiçekoğlu Köyü
2	Bahçeici	Sivas-Gürün-Bahçeici Köyü
3	Karaören	Sivas-Gürün-Karaören Köyü
4	Hüyük	Sivas-Şarkışla-Hüyük Köyü
5	Maksutlu	Sivas-Şarkışla-Maksutlu Köyü
6	Döllük	Sivas-Şarkışla-Döllük Köyü
7	Belkent2012	Sivas-Şarkışla- Belkent 2012
8	Belkent2013	Sivas- Şarkışla- Belkent 2013

**Tablo 1.** İncelenen izolat örneklerinin yerleşim birimlerine göre dağılımı

## **3.2 Besiyeri ve Kimyasallar**

### **Brain Heart Infusion Agar**

26 gram Brain Heart Infusion Agar hassas terazide tartılarak üzerine 500 mililitre saf su eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. Otoklavda 15 dakika 121 °C’de bekletilerek sterilizasyonu yapıldı.

### **L-Cystein**

L-Cystein % 0.1’lik 0.5 gram hassas terazide tartım yapıldı.

### **D (+) Glukoz**

D (+) Glukoz % 1 olacak şekilde 5 gram tartıldı.

### **3.2.1 Glucose Cystein Blood Agar (GCBA) Besiyerinin Hazırlanması**

*F.tularensis*'in seçici besiyeri olan Glukoz Sistein Blood Agar (GCBA) hazırlanmasında, otoklavdan alınan Brain Heart Infusion Agar besiyerinin 50 °C’ye kadar soğuması beklendikten sonra, içerisine % 9 olacak şekilde taze insan kanı eklendi. Manyetik karıştırıcı ile eklenen bileşenlerin iyice karışması sağlandı ve hazırlanan besiyeri 90 mm çaplı petri plaklarına 20 ml olacak şekilde dağıtıldı.

### **3.2.2 Etidyum Bromür Çözeltisi (5 mg/ml)**

Toz halde bulunan Etidyum Bromürden hassas terazide 50 mg tartıldı. 10 ml saf suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. Etidyum Bromür çözeltisinin ışık görmesini engellemek için renkli şişeye konuldu.

### 3.3 Çalışmada Kullanılan Primerler

Hedef gen bölgesi	Primer	Sekans	bp
<b>fopA</b>	FNA7L	CTTGAGTCTTATGTTTCGGCATGTGAATAG	401
	FNB1L	CCAACTAATTGGTTGTACTGTACAGCGAAG	
<b>tul4</b>	TUL4-435	GCTGTATCATCATTTAATAAACTGCTG	410
	TUL4-863	TTGGGAAGCTTGTATCATGGCACT	
<b>16S rRNA</b>	F11	TACCAGTTGGAAACGACTGT	1100
	F5	CCTTTTTGAGTTTCGCTCC	
<b>RD1</b>	F	TTTATATAGGTAAATGTTTTACCTGTACCA	900/1100 <sup>a</sup>
	R	GCCGAGTTTGATGCTGAAAA	1500 <sup>b</sup> ve 1400 <sup>c</sup>

**Tablo 2.** Primerlerin baz dizileri bağlandıkları spesifik gen bölgeleri, PCR ürünlerinin uzunlukları. <sup>a</sup>subspecies *holarctica*. <sup>b</sup>subspecies *tularensis*. <sup>c</sup>subspecies *mediasiatica*

### 3.4 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar alet ve ekipmanları

1. Biyogüvenlik Kabini Sınıf II (ESCO Class II BSC)
2. Mikrodalga Fırın (ARÇELİK MD 891 I)
3. Etüv (Nüve EN500)
4. Hassas Terazi (RADWAG Wagi Electroniczne AS 220.R2)
5. Thermal Block (Wealtec HB-1)
6. Vorteks (Benchmark)
7. Mikrosantrifüj (Sigma 1-14 microfuge)
8. Termal cycler (GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems)
9. Elektroforez Tankı (Cleaver runWIEW)
10. Görüntüleme Cihazı (Vilbert Lourmat Photodocumentation and Imaging Systems)
11. Eppendorf Tüpü (1.5 ml) (ISOLAB 078.03.002)
12. Eppendorf Tüpü (2 ml) (ISOLAB 078.03.004)

13. Mikropipet (100-1000 µl) (BOECO BOE 9621000)
14. Mikropipet (1-10 µl) (BOECO BOE 9620010)
15. Mikropipet (10-100 µl) (BOECO BOE 9620100)
16. PCR Tüpü (0,2 ml) (THERMO SCIENTIFIC AB-0620)
17. TBE Buffer (10x Powder) ( BIO BASIC A0024)
18. Pipet Uçları (Fitreli, DNaz, RNaz Free) (10, 100, 200, 1000 µl) (NEST)
19. DNA Minikit (Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit (K0721))
20. dNTP Set (100 mM, 4x0.25 ml) (GeneDireX DN046-0250)
21. Gel Loading Solution (6x) (SIGMA G 7654)
22. Etidium Bromide (SIGMA-ALDRICH E8751)
23. Taq DNA Polymerase (2,5 U/µl) (GeneAll AmpONE 501-025)
24. DNA Ladder (100bp) (GeneDireX DM001-R500)
25. D (+) Glukoz (TEKKİM TK.09027.01002 )
26. Brain Heart Infusion Agar (BIOMARK 411041)
27. Agaroz (Biomax 104514PR)
28. Alkol (% 96'lık)
29. L-Cysteine Hydrochloride Monohydrate (MERCK 1028390025)

### 3.5 Dizi Analiz Programları ve Veritabanları

- a. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7)
- b. Basic Local Alignment Tool (BLAST)
- c. National Center for Biotechnology Information (NCBI)

### 3.6 DNA İzolasyonu

Derin dondurucuda -20 °C'de saklanan izolatlar Glukoz Sistein Blood Agar (GCBA) besiyerine pasajlanarak % 5 CO<sub>2</sub>' li ortamda 72 saat (3 gün) inkübe edildi. GCBA besiyerinde saf olarak üretilen her suş için, öze ile 1 koloni alınıp 180 µl ATL buffer içinde süspanse edildi. DNA izolasyonu, Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit (K0721) protokolüne göre yapıldı.

## **DNA İZOLASYON PROTOKOLÜ**

- 1.** Bakteri örnekleri 1.5 ml ependorf tüp içerisinde ezilerek homojenize edildi.
- 2.** İçerisinde bakteri örnekleri bulunan 1.5 ml ependorf tüplerin içerisine 180 µl Digestion Solution eklendi. Aynı tüplere 20 µl Proteinaz K eklenir. Vortekslenerek homojen bir karışım elde edildi.
- 3.** Örnekler 56 °C'ye ayarlı olan termal blokta yaklaşık olarak 30 dakika inkübe edilerek, ara sıra vortekslendi.
- 4.** Tüpler üzerine 20 µl RNase A solüsyonu katıldı. Vortekslenerek 10 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi.
- 5.** Tüpler üzerine 200 µl Lizis solüsyonu katıldı. 15 saniye vortekslenerek homojen bir karışım elde edildi.
- 6.** Tüpler üzerine 400 µl %50 etil alkol eklendi ve vortekslenerek karışması sağlandı.
- 7.** Ependorf tüpleri içerisinde sindirilmiş halde bulunan örnekler, toplama tüpleri içerisinde bulunan kolonlara aktarıldı. Kolonlar 1 dakika 6000 x g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonlarda bulunan sıvının altta bulunan toplama tüplerine geçtiği gözlemlendi. Sıvı içeren tüpler atıldı ve kolonlar 2 ml'lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
- 8.** Kolonların içerisine 500 µl Wash Buffer I konuldu. 1 dakika 8000 x g' de santrifüj edildi. Kolonların içerisinde bulunan 2 ml'lik toplama tüplerinin içindeki sıvılar dököldü ve kolonlar yine aynı toplama tüpleri içerisine konuldu.
- 9.** Kolonların içerisine 500 µl Wash Buffer II konuldu. 3 dakika maksimum hızda ( $\geq$  12000 x g) santrifüj edildi. Toplama tüpleri atıldı ve kolonlar steril 1.5 ml ependorf tüplerin içerisine yerleştirildi.
- 10.** Kolonların içerisinde bulunan DNA'yı yıkamak için kolonların içerisine 200 µl Elution Buffer konuldu. Oda ısısında 2 dakika inkübe edildi ve 1 dakika 8000 x g'de santrifüj edildi.
- 11.** Saflaştırma kolonları atıldı. Elde ettiğimiz DNA örnekleri PCR çalışması yapılınca kadar -20 °C'de saklandı.

### 3.7 PCR Analizi

Sivas yöresindeki su örneklerinden kültür yöntemi ile izole edilen 8 *F. tularensis* subsp. *holarctica* izolatının tul4, fopA, 16S rRNA ve RD1 gen bölgeleri, konvansiyonel PCR (Polymerase Chain Reaction) yöntemi kullanılarak çoğaltıldı. PCR çalışmamızda pozitif (+) kontrol olarak *F. tularensis* subsp. *holarctica* NCTC 10857 LVS suşu kullanıldı.

Çalışmamızda; *F.tularensis*'in 17 kDa'luk dış membran proteinlerini kodlayan tul4 gen bölgesi, 43 kDa'luk dış membran proteinini kodlayan fopA gen bölgesi, *F. tularensis*' in tanımlanması için amplifiye edilen 16S rRNA geni ve alt türlerin ayırımı için kullanılan RD1 "Farklılık Bölgeleri 1 (Regions of Difference)" hedef gen bölgesi klasik PCR yöntemi ile çoğaltıldı (Wang ve ark., 2010).

#### 3.7.1 PCR Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon Karışımı			
	Hacim	Son Konsantrasyon	Stok Konsantrasyon
<b>10X Taq Buffer</b>	5 µl	1X	10X
<b>dNTP</b>	4 µl	0.2 mM	2.5 mM
<b>Taq DNA Polimeraz</b>	0.5 µl	1.25 U	2.5 U
<b>Forward</b>	1 µl	0.2 µM	10 µM
<b>Revers</b>	1 µl	0.2 µM	10 µM
<b>Kalıp DNA</b>	5 µl		
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	33.5 µl		
<b>Toplam</b>	50 µl		

**Tablo 3.** PCR reaksiyon karışımı



Bu ana karışımdan tüplere 45'er µl dağıtıldı ve her tüpe 5 µl örnek DNA'sı eklenerek toplam reaksiyon hacmi 50 µl'ye tamamlandı. Bu karışıma göre hazırlanan örnekler çoğalma için önceden programlanmış ısı döngü (thermo cyclers) cihazına yerleştirildi.

Reaktif hazırlanması, DNA ekstraksiyonu, amplifikasyon ve agaroz jel elektroforezi kontaminasyondan kaçınmak için ayrı odalar da yapıldı. Tepkime karışımları hazırlandığı zaman kontaminasyonları belirlemek için, her bir amplifikasyon setinde *F. tularensis* DNA pozitif ve ayrıca DNA içermeyen negatif kontrol olarak saf su kullanıldı. PCR uygulamasının her aşamasında kontaminasyonun önlenmesi ve toksik maddelerden korunmak amacıyla eldiven kullanıldı.

### 3.7.2 fopA Amplifikasyonu

Amplifikasyon işleminde hedef DNA başlangıçta 94 °C'de 4 dk bekletilerek denatüre edildi. Bu aşamadan sonra;

94°C'de 40 sn denatürasyon	}	40 döngü
64°C'de 30 sn primerlerin bağlaması		
72°C'de 45 sn primerlerin uzaması		

En son aşamada 72 °C'de 5 dk bekletilerek reaksiyon tamamlandı. Amplifikasyon sonrasında reaksiyon tüpleri değerlendirme aşamasına kadar 4°C'de bekletildi.

fopA gen bölgesine yönelik PCR amplifikasyonu ürünleri için % 1.5' lik agaroz jel elektroforezinde 401 bp' lik bölgede bantın görülmesi *Francisella* subsp. *holarctica* PCR (+), bantın gözlenmemesi PCR (-) olarak değerlendirildi (Wang ve ark., 2010).

### 3.7.3 16S rRNA Amplifikasyonu

Amplifikasyon işleminde hedef DNA başlangıçta 94 °C'de 3 dk bekletilerek denatüre edildi. Bu aşamadan sonra;

94°C'de 30 sn denatürasyon	}	40 döngü
55°C'de 1 dk primerlerin bağlaması		
72°C'de 35 sn primerlerin uzaması		

En son aşamada 72 °C’de 5 dk bekletilerek reaksiyon tamamlandı. Amplifikasyon sonrasında reaksiyon tüpleri değerlendirme aşamasına kadar 4°C’de bekletildi.

16S rRNA gen bölgesine yönelik PCR amplifikasyonu ürünleri için % 1.5’ lik agaroz jel elektroforezinde 1044 bp’ lik bölgede bantın görülmesi *Francisella* subsp. *holarctica* PCR (+), bantın gözlenmemesi PCR (-) olarak değerlendirildi (Wang ve ark., 2010).

### 3.7.4 RD1 Amplifikasyonu

Amplifikasyon işleminde hedef DNA başlangıçta 95 °C’de 3 dk bekletilerek denatüre edildi.

Bu aşamadan sonra;

95°C’de 30 sn denatürasyon	}	30 döngü
58°C’de 1 dk primerlerin bağlaması		
72°C’de 1 dk primerlerin uzaması		

En son aşamada 72 °C’de 5 dk bekletilerek reaksiyon tamamlandı. Amplifikasyon sonrasında reaksiyon tüpleri değerlendirme aşamasına kadar 4°C’de bekletildi.

RD1 gen bölgesine yönelik PCR amplifikasyonu ürünleri için % 1.5’ lik agaroz jel elektroforezinde 900 bp’ lik bölgede bantın görülmesi *Francisella* subsp. *holarctica* PCR (+), bantın gözlenmemesi PCR (-) olarak değerlendirildi (Broekhuijsen ve ark., 2003).

### 3.7.5 tul4 Amplifikasyonu

Amplifikasyon işleminde hedef DNA başlangıçta 94 °C’de 4 dk bekletilerek denatüre edildi.

Bu aşamadan sonra;

94°C’de 40 sn denatürasyon	}	40 döngü
64°C’de 30 sn primerlerin bağlaması		
72°C’de 45 sn primerlerin uzaması		

En son aşamada 72 °C’de 5 dk bekletilerek reaksiyon tamamlandı. Amplifikasyon sonrasında reaksiyon tüpleri değerlendirme aşamasına kadar 4°C’de bekletildi.

tul4 gen bölgesine yönelik PCR amplifikasyonu ürünleri için % 1.5’ lik agaroz jel elektroforezinde 410 bp’ lik bölgede bantın görülmesi *Francisella* subsp. *holarctica* PCR (+), bantın gözlenmemesi PCR (-) olarak değerlendirildi (Sjöstedt, 2007).

### **3.8 AgaroZ Jel Eelektorezi**

#### **3.8.1 Jel ve Elektforez Tamponu**

TBE buffer (Tris-borate-EDTA), agaroZ jel ve elektforez tamponu için 1X alışma gücünde kullanılmıştır. Toz halinde bulunun TBE buffer 17,025 gram hassas terazide tartıldıktan sonra üzerine 1 litre saf su eklendi ve manyetik karıştırıcı ve ısı yardımı ile berraklaşana kadar karıştırılarak hazırlandı.

#### **3.8.2 AgaroZ Jelin Hazırlanması**

Amplifikasyon sonucu elde edilen ürünlerin değerlendirilmek amacıyla % 1.5' lik agaroZ jel kullanıldı. AgaroZdan 1.5 gram hassas terazide tartımı yapıldı ve üzerine 100 ml 1x TBE buffer eklendi. Hazırlanan agaroZ mikrodalga fırını yardımıyla eritildi ve sıcaklığın 50 0C'ye kadar düşmesi beklendi. eker ocak içerisinde stok Etidyum Bromür zeltisinden 10 l alınarak 100 ml agaroZ üzerine eklendi. AgaroZ jel, düz zeminde bulunan yatay jel tablasına boşaltıldı ve taraklar yerleştirildi. 20 dakika boyunca jelin katılaşması beklendi ve taraklar jelden dikkatlice çıkarıldı.

#### **3.8.3 Elektforez ve Görüntüleme İşlemi**

Jel tankı, kuyucukların katottan anota doğru olacak şekilde elektforez kabına yerleştirildi. 5 l DNA rneği 1 l yükleme tamponu (6x) (SIGMA G 7654) ile karıştırıldı ve sırasıyla jele yüklendi. Elektforez işlemi, Cleaver runWIEW elektforez cihazı ile 100 volt (V) akımda 60 dakika yapıldı. DNA bantlarının görüntülenmesi ise jel görüntüleme sistemiyle (Vilbert Lourmat Photodocumentation and Imaging Systems) gerçekleştirildi.

### **3.9 Sekans Analizi**

Tu14, fopA, 16S rRNA ve RD1 gen bölgelerine yönelik yapılan PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerine ticari bir firma (MG Biyoenformatik, Türkiye) aracılığıyla sekans analizi yaptırıldı. Sekans analizinde Applied Biosystems™ 3730xl DNA Analyzer cihazı kullanılmıştır. Dizileme işlemleri ileri ve geri yönlü olmak üzere çift yönlü olarak gerçekleştirilmiştir. Ham sekanslar FASTA formatında düzenlenerek ileri ve geri yönlü diziler Geneious R9 programı kullanılarak birleştirilmiştir. Dizi okumalarında kalitesiz ve hatalı okumalar kontrol edilmiştir. Her bir primer çifti için ortak okuma bölgeleri çoklu hizalama yapılarak konsensüs diziler .ab1 ve .fasta formatında kaydedilmiştir. Fasta dosyaları kullanılarak

diğer analizler gerçekleştirilmiştir. Her bir bölge için 8 örnek ayrı ayrı Mafft programı kullanılarak çoklu hizalamalar gerçekleştirilmiştir (Kato ve ark., 2009). Öncelikle NCBI’da tul4, fopA, 16S rRNA ve RD1 gen bölgelerine benzer genlerin bulunması için BLAST programı kullanılmıştır.

### 3.10 Filogenetik Analizi

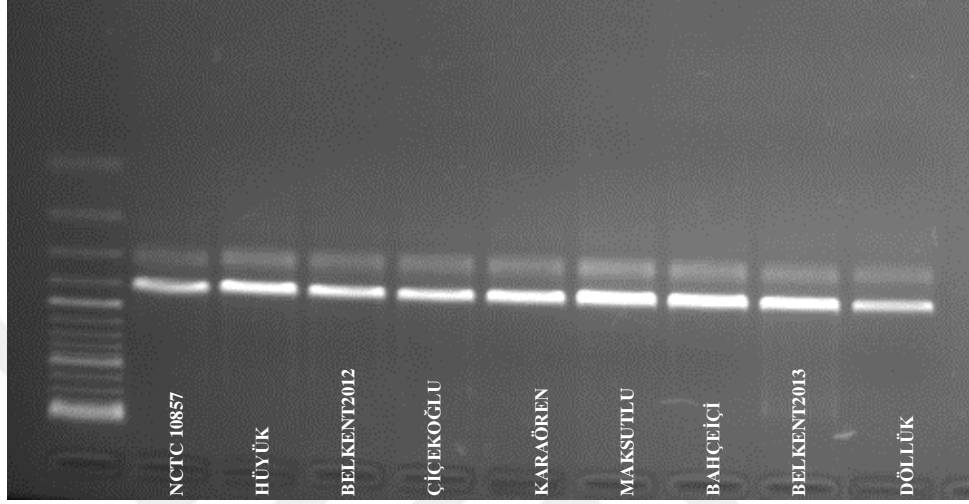
Tul4, fopA, 16S rRNA ve RD1 sekansları NCBI veri tabanında bulunan sekanslarla karşılaştırılarak benzerlikler saptandı. Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGAX (versiyon) 10.0.5 programına girilerek filogenetik analizi yapıldı (Kumar ve ark., 2015). Aynı zamanda MEGAX 10.0.5 programında Kimura-2 genetik uzaklık modeli ve Neighbor-joinin (komşu-bağlama) yöntemi kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturuldu (Kimura, 1980; Tamura ve ark., 2013). 16S rRNA gen bölgesi sekans sonuçları GenBank veri tabanına yüklenen örneklerin erişim numaraları **Tablo 4**’ de görülmektedir.

Örnek Adı	Gen bölgesi	İzolat adı	GenBank numarası
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> strain Bahceici16S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	16S rRNA	Bahçeici	MK249699.1
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> strain Belkent201216S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	16S rRNA	Belkent2012	MK249700.1
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> strain Belkent201316S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	16S rRNA	Belkent2013	MK249701.1
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> strain Cicekoglu16S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	16S rRNA	Çiçekoğlu	MK249702.1
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> strain Dolluk16S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	16S rRNA	Döllük	MK249703.1
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> strain Huyuk16S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	16S rRNA	Hüyük	MK249704.1
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> strain Karaoren16S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	16S rRNA	Karaören	MK249705.1
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> strain Maksutlu16S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	16S rRNA	Maksutlu	MK249706.1

**Tablo 4.** 16S rRNA Gen Bölgesi GenBank Erişim Numaraları

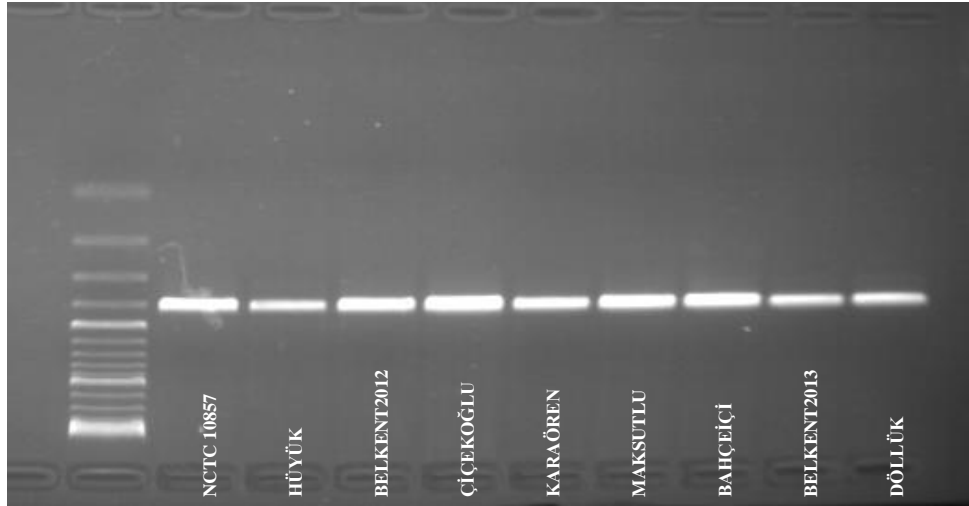
## 4. BULGULAR

### 4.1 PCR Bulguları



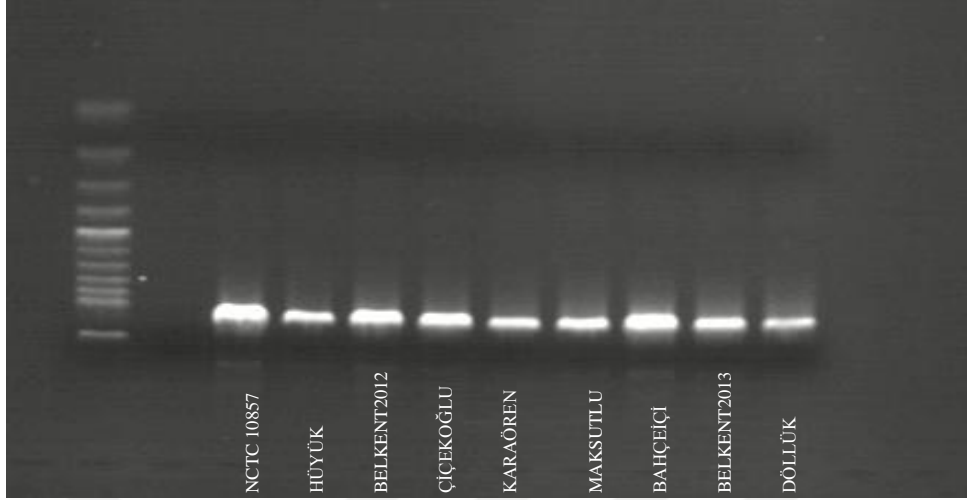
Şekil 1. tul4 gen bölgesinin agaroz jelde görünümü (Marker=100 bp )

*F. tularensis* bakterisinin dış zar proteinlerini kodlayan tul4 gen bölgesine yönelik PCR çalışmasında yaklaşık 410 bp'lik bölgede bant gözlemlendi (Şekil 1).



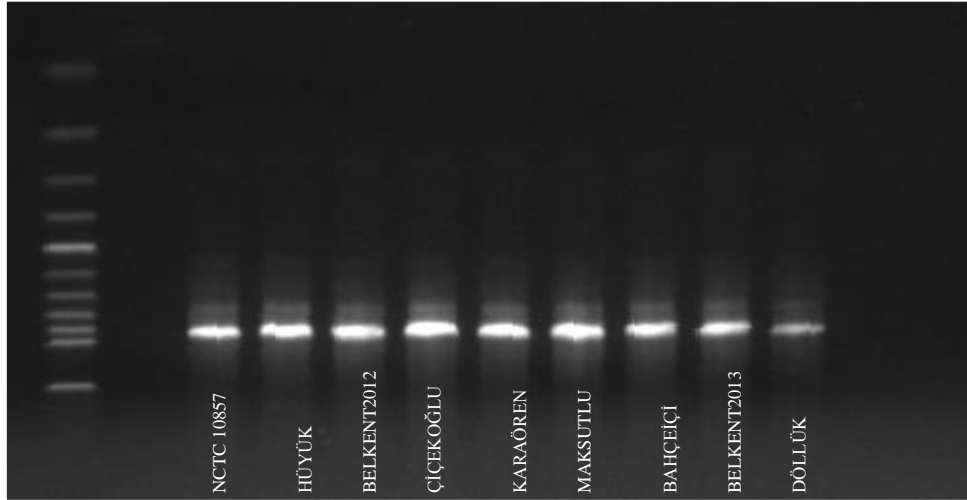
Şekil 2. fopA gen bölgesinin agaroz jelde görünümü (Marker=100 bp )

*F. tularensis* bakterisinin dış zar proteinlerini kodlayan fopA gen bölgesine yönelik yapılan PCR çalışmasında yaklaşık 400 bp'lik bölgede bant gözlemlendi (Şekil 2).



**Şekil 3.** 16S rRNA gen bölgesinin agaroz jelde görünümü (Marker=100 bp)

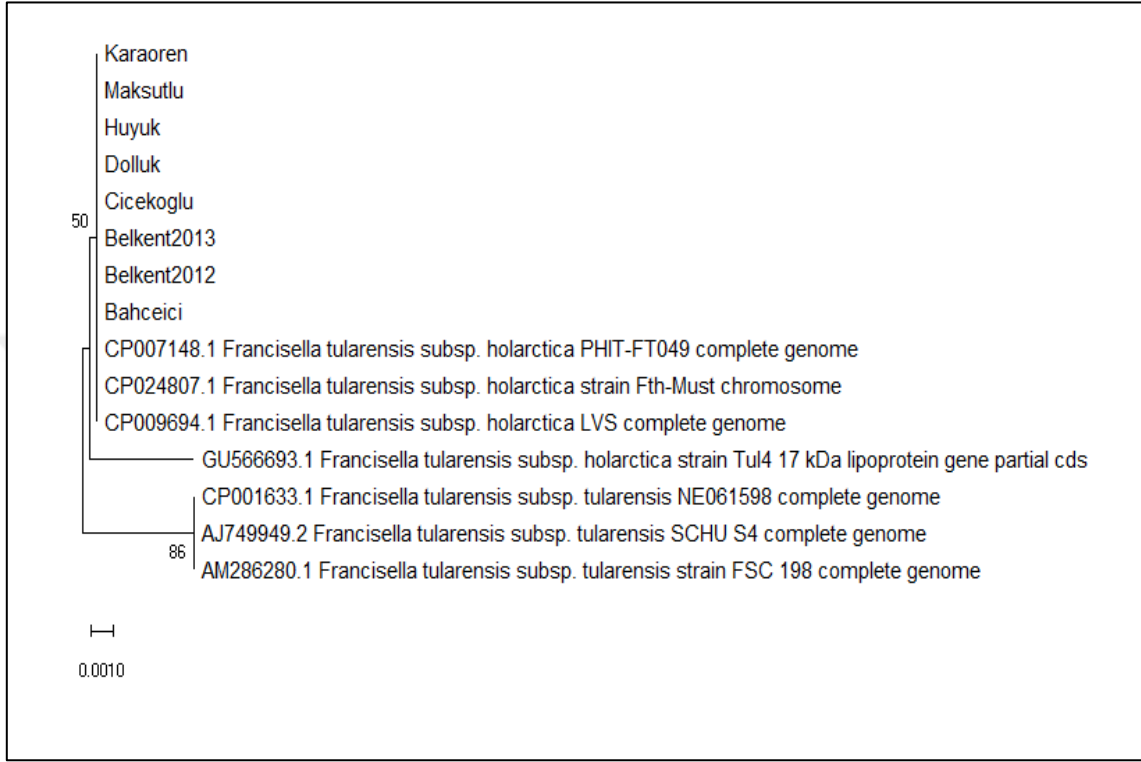
16S rRNA gen bölgesine yönelik PCR çalışmasında 1100 bp'lik bölgede bant gözlemlendi (Şekil 3).



**Şekil 4.** RD1 gen bölgesinin agaroz jelde görünümü (Marker=100 bp )

RD1 gen bölgesine yönelik PCR çalışmasında yaklaşık 1000 bp'lik bölgede bant gözlemlendi (Şekil 4).

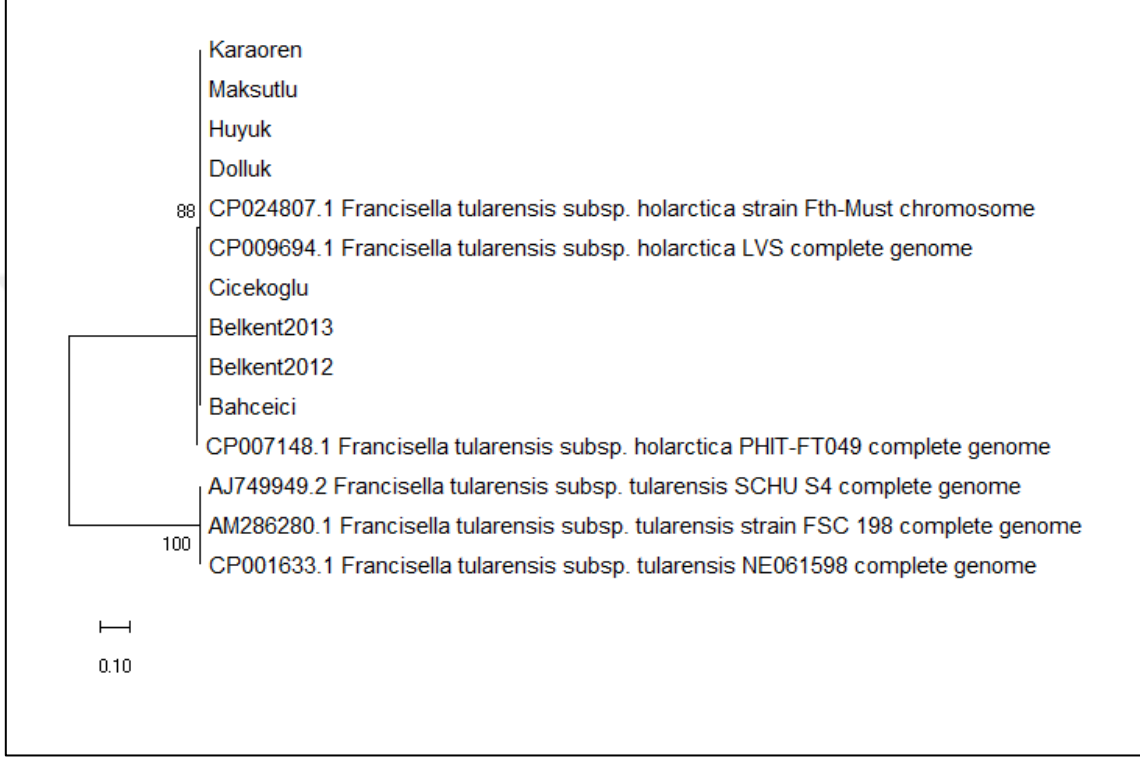
## 4.2 Filogenetik Analiz Bulguları



Şekil 5. tul4 gen bölgesi BLAST analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç

*F. tularensis* bakterisinin tul4 gen bölgesine yönelik PCR çalışmasında yaklaşık 410 bp'lik bölgede bant gözlemlendi. PCR ürünün 360 bp'lik kısmı sekanslandı. Sekans sonuçları MEGA X programı aracılığı ile eşleştirildi. Yapılan eşleştirme sonucunda tüm örneklerde bu bölgenin polimorfizm göstermediği ve aynı olduğu görüldü. Sekans analizi sonuçları NCBI BLAST programı aracılığı ile GenBank' da bulunan sekans sonuçları ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda Sivas bölgesi izolatları tul4 gen bölgesi bakımından *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, complete genome (Erişim No:CP009694.1) ile % 100 oranında benzer bulundu. Kılıç ve arkadaşları (Kılıç ve ark., 2015) tarafından ülkemizde su örneklerinden izole edilen ve "biovar *japonica*" olduğu belirtilen izolat ile yapılan karşılaştırmada *F. tularensis* subsp. *holarctica* PHIT-FT049, complete genome (Erişim No:CP007148.1) sonuçları ile %100 oranında benzediği görüldü. tul4 gen bölgesi sekans

analizleri tüm örneklerimizde aynı bulunduğundan oluşturulan filogenetik ağaçta örneklerimizin ve GenBank'tan seçilen örneklerin kümелendiği gözlemlendi (Şekil 5).

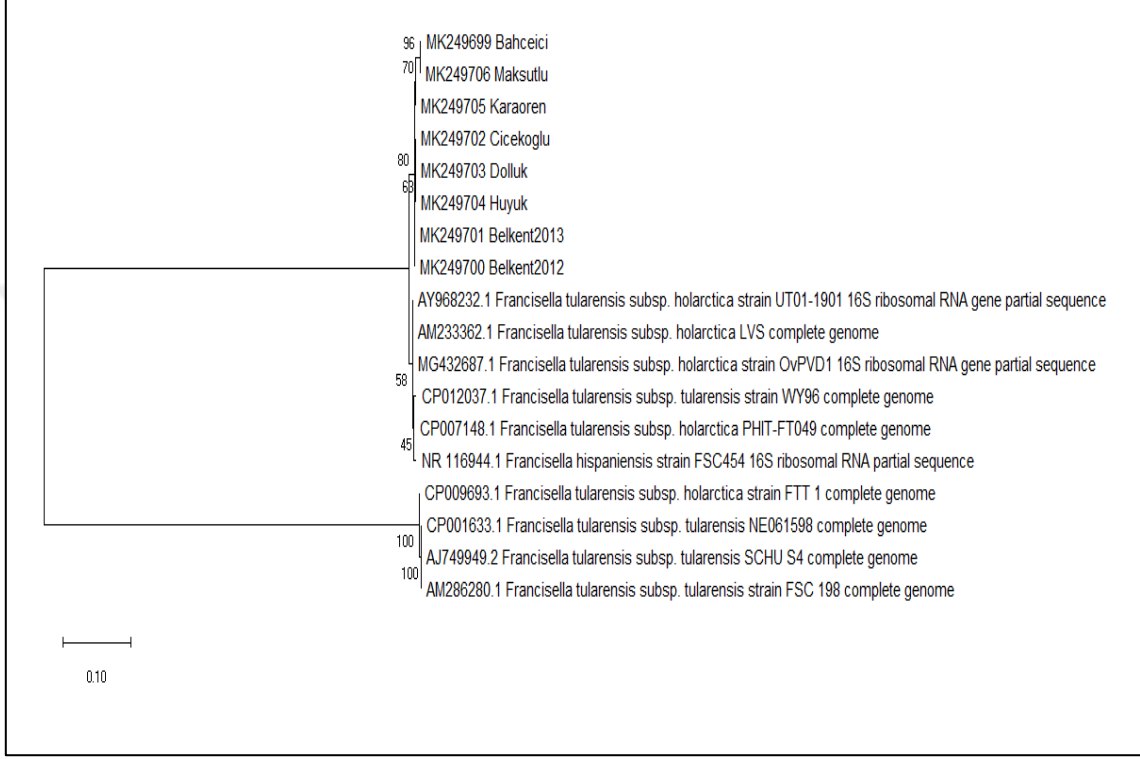


**Şekil 6.** fopA gen bölgesi BLAST analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç

fopA gen bölgesine yönelik yapılan PCR çalışmasında yaklaşık 400 bp'lik bölgede bant gözlemlendi. PCR ürünün 364 bp'lik kısmı sekanslandı. Sekans sonuçları MEGA X programı aracılığı ile eşleştirildi. Yapılan eşleştirme sonucunda tüm örneklerde bu bölgenin polimorfizm göstermediği ve aynı olduğu görüldü. Sekans analizi sonuçları NCBI BLAST programı aracılığı ile GenBank' da bulunan sekans sonuçları ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda Sivas bölgesi izolatları fopA gen bölgesi bakımından *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, complete genome (Erişim No:CP009694.1) ile % 100 oranında benzer bulundu. Kılıç ve arkadaşları (Kılıç ve ark., 2015) tarafından ülkemizde su örneklerinden izole edilen ve "biovar *japonica*" olduğu belirtilen izolat ile yapılan karşılaştırmada *F. tularensis* subsp. *holarctica* PHIT-FT049, complete genome (Erişim No:CP007148.1) sonuçları ile % 99 oranında benzediği görüldü. fopA gen bölgesinde polimorfizm



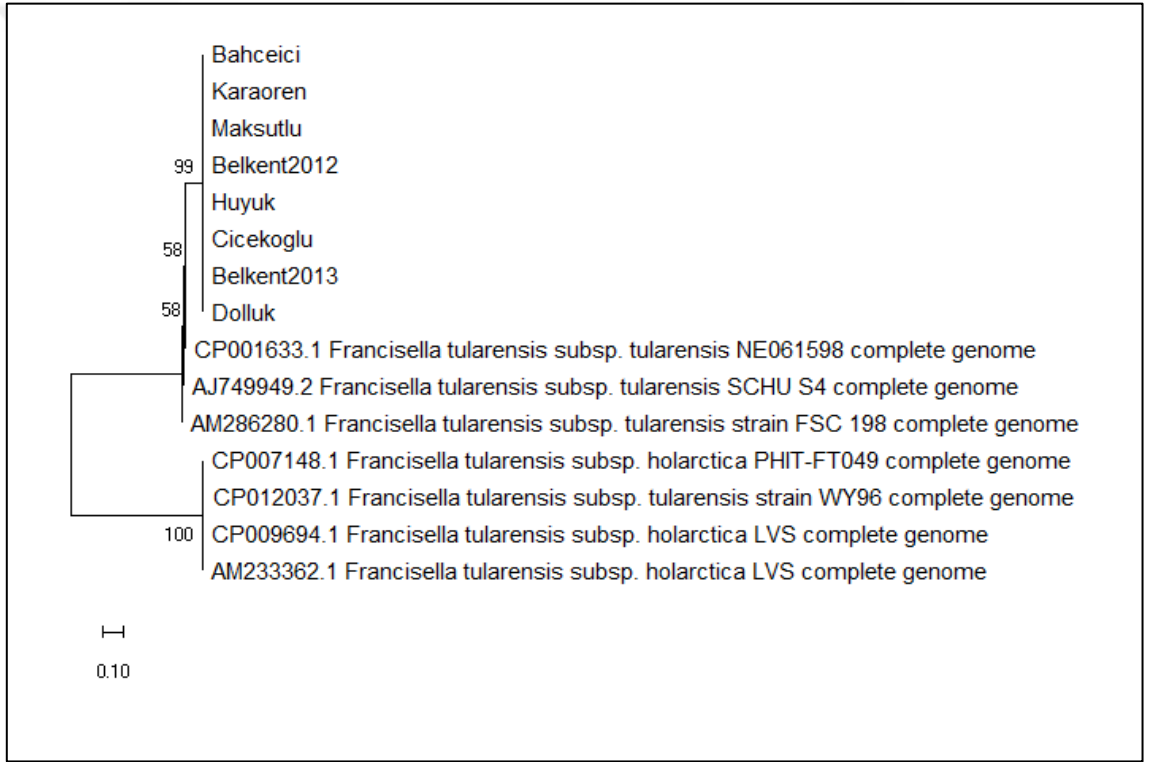
saptanmadığından oluşturulan filogenetik ağaçta örneklerimizin ve GenBank'tan seçilen örneklerin kümelendiği gözlemlendi (Şekil 6).



**Şekil 7.** 16s rRNA gen bölgesi BLAST analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç

16S rRNA gen bölgesine yönelik PCR çalışmasında yaklaşık 1100 bp'lik bölgede bant gözlemlendi. Sekans analizi sonrası yapılan dizi birleştirmeleri ile PCR ürünün 1063 bp'lik kısmı elde edildi. Sekans sonuçları MEGA X programı aracılığı ile eşleştirildi. Yapılan eşleştirme sonucunda tüm örneklerde Belkent2012 ve Belkent2013 izolatlarının birbiri ile aynı Çiçekoğlu ve Döllük izolatlarında birbiri ile aynı olduğu bulundu. Diğer dört izolatın ise polimorfizm saptandı. Sekans analizi sonuçları NCBI BLAST programı aracılığı ile GenBank' da bulunan sekans sonuçları ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda Sivas bölgesi izolatları 16S rRNA gen bölgesi bakımından *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, complete genome (Erişim No:CP009694.1) ile % 98 oranında benzer bulundu. Kılıç ve arkadaşları (Kılıç ve ark., 2015) tarafından ülkemizde su örneklerinden izole edilen ve "biovar *japonica*" olduğu belirtilen izolat ile yapılan karşılaştırmada *F. tularensis* subsp.

*holarctica* PHIT-FT049, complete genome (Erişim No:CP007148.1) sonuçları ile % 98 oranında benzediği görüldü. 16S rRNA gen bölgesi sekans sonuçları kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçta Bahçeici ve Maksutlu izolatlarının birbirine daha yakın olduğu ve diğer örneklerden ayrılarak gruplandığı gözlemlendi. Diğer örneklerin ise bu iki izolattan farklı kümelenendiği görüldü. Çalışmamızda kullanılan izolatlar GenBank'tan seçilen referans sekanslar ile karşılaştırıldığında bizim örneklerimizin seçilen örneklerden farklı grupta olduğu bulunmuştur (Şekil 7).



**Şekil 8.** RD1 gen bölgesi BLAST analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç

RD1 gen bölgesine yönelik PCR çalışmasında yaklaşık 1000 bp'lik bölgede bant gözlemlendi. PCR ürünün 835 bp'lik kısmı sekanslandı. Sekans sonuçları MEGA X programı aracılığı ile eşleştirildi. Yapılan eşleştirme sonucunda tüm örneklerde bu bölgenin polimorfizm gösterdiği tespit edildi. Sekans analizi sonuçları NCBI BLAST programı aracılığı ile GenBank' da bulunan sekans sonuçları ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda Sivas bölgesi izolatları RD1 gen bölgesi bakımından *F. tularensis* subsp.

*tularensis* NE061598, complete genome (Erişim No:CP001633.1), *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, complete genome (Erişim No:AJ749949), *F. tularensis* subsp. *tularensis* strain FSC 198, complete genome (Erişim No:AM286280) ile % 99, *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, complete genome (Erişim No:CP009694.1) ile % 95 oranında benzer bulundu. Kılıç ve arkadaşları (Kılıç ve ark., 2015) tarafından ülkemizde su örneklerinden izole edilen ve “biovar *japonica*” olduğu belirtilen izolat ile yapılan karşılaştırmada *F. tularensis* subsp. *holarctica* PHIT-FT049, complete genome (Erişim No:CP007148.1) sonuçları ile % 99 oranında benzediği görüldü. RD1 gen bölgesi açısından Bahçeiçi ve Karaören izolatlarının aynı sekansa sahip oldukları diğer izolatların sekanslarında ise farklılık olduğu ve polimorfizm bulunduğu gözlemlendi (şekil 8).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ülkemizde ilk tularemi olgusu 1936 yılında Lüleburgaz Askeri garnizonunda görülmüştür. Bu salgında dere suyunun farelerin deri altına enjekte edilmesi ile ilk kez *F. tularensis* bakterisi izole edilmiştir (Özel, 1938; Şimşek ve ark., 2012). Lüleburgaz salgınında Gülhane ve Çorlu olarak adlandırılan iki *F. tularensis* kökeni izole edilmiştir. Bir yıl sonra ortaya çıkan salgında Kaynarca deresinden başka bir köken izole edilmiştir. Gedikoğlu ve arkadaşları tarafından Bursa’da görülen salgınlarda 10 yıllık bir süreç içerisinde 205 hastanın 10’un da *F. tularensis* kültür yöntemi ile izole edilmiştir (Gedikoğlu, 1996). Gürcan ve arkadaşları tarafından Bolu’nun Gerede ilçesinde Yazıkara ve Nuhören köylerindeki hastaların lenf nodu aspiratlarından 2 suş izole edilmiş ve *F.tularensis* subsp. *holarctica* olarak tiplendirilmiştir. Yazıkara ve Nuhören suşları yapılan MLVA analizi sonucunda Bulgaristan’dan izole edilen suşlarla benzer bulunmuştur (Gurcan ve ark., 2008).

Ülkemizde tularemi tanısında 2004 yılından beri moleküler yöntemler kullanılmaktadır. 2004 yılında Amasya ilinin Suluova ilçesinde görülen tularemi salgınında ilçe içerisinde geçen dereleden alınan su örnekleri ve hasta lezyonlarında PCR yöntemi ile *F.tularensis* varlığı tespit edilmiştir. Adı geçen çalışmada *F. tularensis*’ in dış membran proteinlerini kodlayan tul4 ve fopA gen bölgelerine yönelik primerler kullanılmıştır (Gürcan ve ark., 2004). Şimşek ve arkadaşları 2008-2009 yıllarında Çorum, Sivas ve Samsun illerinde görülen salgın bölgelerinden toplanan 154 klorlanmamış su örneğini kültür ve PCR yöntemi ile incelemişlerdir. Bu çalışmada Çorum’dan alınan su örneklerinden 1 suş, Sivas’tan alınan su örneklerinden 1 suş ve Samsun’dan alınan su örneklerinden 2 suş olmak üzere toplamda 4 su örneğinden *F. tularensis* izole etmişlerdir. Bu 4 kökenin tümü yapılan 16S rRNA sekans analizleri sonucu *F.tularensis* subsp. *holarctica* LVS suşuyla %100 benzerlik göstermiştir (Şimşek ve ark., 2012).

Ülkemizde görülen tularemi salgınlarının kontamine olmuş içme ve kullanım sularından kaynaklandığı ve etkenin *F. tularensis* subsp. *holarctica* olduğu bilinmektedir (Helvacı ve ark., 2000; Kılıç, 2010).

Karadenizli ve arkadaşları 2008 yılında Çorum’ da, 2009 yılında Sivas’ta ve 2012 yılında Kocaeli’ nde gözlenen Tularemi salgınlarında hastalardan ve su örneklerinden kültür yöntemiyle *F. tularensis* subsp. *holarctica* izole etmişlerdir. *F. tularensis* subsp. *holarctica*

izolatları tüm genom sekanslama yöntemiyle sekanslanmış ve single nucleotide polimorfizms (SNPs) yöntemiyle araştırılmıştır. Araştırma sonucunda Sivas'tan ve Çorum'dan alınan su örneklerinden izole edilen *F. tularensis* subsp. *holarctica* suşları benzer bulunmuştur. Sivas'tan alınan su örneği ile hastadan alınan tonsil swab örneğinden izole edilen *F. tularensis* subsp. *holarctica* izolatları arasında yalnızca 1 SNP bulunmuştur. Tüm genom çoklu eşleştirme ve canonical single nucleotide polimorfizms (canSNP) analizleri sonucunda Kocaeli, Çorum ve Sivas' taki hastalardan ve su örneklerinden izole edilen *F. tularensis* subsp. *holarctica* izolatlarının tümünün B.12 grubuna ait olduğu tespit edilmiştir (Karadenizli ve ark., 2015).

Kılıç ve arkadaşları 2010-2013 yılları arasında ülkemizin farklı bölgelerinde gözlenen tularemi salgınlarında 6 su örneği, 1 rodent dalağı ve 33 insan örneğinde (lenf nodu, boğaz swabı, kanı ve konjunktival swab) kültür yöntemi ile *F. tularensis* subsp. *holarctica* izole etmişlerdir. Bu çalışmada 2011 yılında Sivas' taki bir hastadan alınan boğaz swab örneğinde ve 2012 yılında Sivas'tan alınan bir su örneğinde kültür yöntemi ile bakteri üretilmiştir. tul4 gen bölgesine yönelik primer ile yapılan PCR sonucunda örneklerin *F. tularensis* subsp. *holarctica* olduğu doğrulanmıştır. Bu çalışmada canSNP yöntemi kullanılmış ve izole edilen *F. tularensis* subsp. *holarctica* izolatları 3 ana grup ve ayrıca alt gruplara ayrılmıştır. 11 örneğin B.16 grubuna, 7 örneğin B.6 grubuna (2 alt grup: B.6/7/10, n = 1; ve B.10/11, n = 6) ve 22 örneğin B.13 grubuna (2 alt grup: B.27, n = 5; ve B.20/21/33, n = 17) ait olduğunu bildirmişlerdir. Bu alt gruplardan B.6/7/10 ve B.10/11'in ve B.16 grubunun ülkemizde daha önce bilinmediği, çalışmada toplanan 7 çevresel örneğin ise Türkiye içerisinde filogenetik çeşitliliği bilinen B.16, B.6 ve B.13 gruplarına ait olduğu belirtilmiştir (Kılıç ve ark., 2015).

Özsürekcı ve arkadaşları 2009-2011 yıllarında ülkemizin değişik bölgelerinde ortaya çıkan salgınlarda 14 hastadan aldıkları lenf nodu aspirasyon örneklerinde PCR yöntemiyle *F.tularensis* pozitifliği saptamışlardır. Pozitif bulunan 14 örnek canSNP yöntemi ile analiz edildiğinde örneklerin B.20/21/33 (n=11), B.28/29 (n=2) ve B.7/8 (n=1) filogenetik grubuna ait olduğunu bulmuşlardır. B.28/29 grubunun daha önce Gürcistan sınırından izole edilmesinden dolayı ülkemizde bulunmasının şaşırtıcı olmadığını, B.20/21/33 filogenetik grubunun ise geniş bir coğrafik dağılım göstermesinden dolayı ülkemizde de bulunmasının beklenen bir durum olduğunu bildirmişlerdir (Özsürekcı ve ark., 2015).

2009-2010 yıllarında Sivas ilinde görülen tularemi salgınında iki hastanın lenf gangliyonu örneğinde *F. tularensis* PCR'si pozitif bulunmuş ve salgınların su kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Engin ve ark., 2011).

*F. tularensis* subsp. *holarctica* eritromisin direnç ve duyarlılıklarına göre eritromisin duyarlı (EryS, biovar I) ve eritromisin dirençli (EryR, biovar II) olmak üzere de iki gruba ayrılmaktadırlar (Sjöstedt, 2015). Kılıç ve arkadaşları 2009 ve 2010 yılları arasında ülkemizde görülen salgınlardan izole ettikleri insan (n=210), su (n=39) ve bir kemiriciden (n=1) izole ettikleri 250 örneğin antibiyotik duyarlılıklarını inceledikleri çalışmalarında 249 örneğin *F. tularensis* subsp. *holarctica* biovar II (eritromisin dirençli), bir örneğin ise eritromisin duyarlılığı, gliserolü fermente etmesi ve RD1 gen bölgesi sekansının biovar *japonica* ile eşleşmesinden dolayı biovar *japonica* olarak tiplendirmişlerdir (Kılıç ve ark., 2013).

Gürcan ve arkadaşları ülkemizin batı karadeniz bölgesinden kültür yöntemi ile izole ettikleri ve PCR yöntemiyle *F. tularensis* subsp. *holarctica* olarak tiplendirdikleri Nuhören ve Yazıkara suşlarının eritromisine dirençli olduğunu bulmuşlardır. Altı lokusa yönelik yapılan MLVA tiplendirilmesinde Nuhören ve Yazıkara suşları Bulgaristan' da insanlardan izole edilen *F. tularensis* subsp. *holarctica* ile benzer bulunmuştur (Gurcan ve ark., 2008).

Ülkemizde görülen tularemi salgınlarının kontamine olmuş su ve gıdalardan kaynaklandığı olguların en fazla orofarengeal formda görüldüğü ve etkenin de *F. tularensis* subsp. *holarctica* olduğu bilinmektedir (Kılıç ve ark., 2015).

Çalışmamızda 2011-2013 yılları arasında Sivas ilinde görülen tularemi salgın bölgelerinden alınan su örnekleri kullanılmıştır. Su örnekleri Gürün, Gemerek ve Şarkışla ilçeleri ve bu ilçelere bağlı köylerinin içme suyu şebekelerinden ve köy çeşmelerinden alınmıştır. *F. tularensis* subsp. *holarctica* Gürün ilçesine ait iki köyden (Bahçeici ve Karaören), Şarkışla ilçesine bağlı üç köyden (Maksutlu, Döllük ve Hüyük ) ve Şarkışla merkez Belkent çeşmesinden (2012 ve 2013 yıllarında) ayrıca Gemerek ilçesinin Çiçekoğlu köyünden kültür yöntemiyle izole edilmiştir (Ataş, 2012).

Çalışmamızda sekiz *F.tularensis* izolatının tul4, fopA, 16S rRNA ve RD1 gen bölgeleri konvansiyonel PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Amplifikasyon ürünlerinin sekans analiz sonuçları birbirleriyle ve GenBank' ta bulunan sekans analizleriyle karşılaştırılmıştır.

*F.tularensis* izolatının tul4 ve fopA gen bölgeleri sekans analizi sonucunda herhangi bir farklılık saptanamamış ve bütün örneklerin tul4 gen bölgeleri ve fopA gen bölgeleri kendi içinde özdeş bulunmuştur. GenBank' la yapılan eşleştirme sonucunda örneklerimizin tul4 gen bölgesi sekansları *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, complete genome (Erişim No:CP009694.1) örneği ile % 100 oranında benzer bulunmuştur. Kılıç ve arkadaşları tarafından su örneğinden izole edilen ve biovar *japonica* olarak tiplendirilen *F. tularensis* subsp. *holarctica* PHIT-FT049, complete genome (Erişim No:CP007148.1) örneği ile de % 100 oranında benzediği saptanmıştır. fopA gen bölgesi açısından GenBank'la yapılan eşleştirme sonucunda örneklerimizin tul4 gen bölgesi karşılaştırma sonuçlarına benzer şekilde *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, complete genome (Erişim No:CP009694.1) ile % 100, *F. tularensis* subsp. *holarctica* PHIT-FT049, complete genome (Erişim No:CP007148.1) sonuçları ile % 99 oranında benzeştiği saptanmıştır.

RD1 gen bölgesine yönelik PCR ile *F. tularensis* alt türlerini birbirinden ayırmak mümkündür. Bu gen bölgesine yönelik PCR sonucunda *F. tularensis* subsp. *tularensis* 1500 bp'lik bölgede, subsp. *holarctica* 900/1100 bp' lik bölgede, subsp. *mediasiatica* 1400 bp' lik bölgede bant vermektedir (Broekhuijsen ve ark., 2003). Çalışmamızda RD1 gen bölgesi yönelik yapılan PCR sonucunda yaklaşık 1000 bp' lik bölgede bant gözlenmiştir. Alt tür tesbitine yönelik yapılan bu çalışma ile örneklerin alt tür *holarctica*' ya ait olduğu saptanmıştır. Amplifikasyon ürünlerinin sekans analiz sonuçları birbirleriyle ve GenBank' ta bulunan sekans analizleriyle karşılaştırılmıştır. *F.tularensis* izolatının RD1 gen bölgesi sekans analizi sonucunda sekanslanan 835 bp karşılaştırılmış ve Bahçeici ile Karaören izolatlarının bu gen bölgesi bakımından birbiri ile aynı olduğu bulunmuştur. Bahçeici ve Karaören örneklerinin her ikisi de Gürün ilçesindeki tularemi salgınlarından izole edilmiştir. Diğer altı örnek Bahçeici ve Karaören izolatlarından ve birbirlerinden baz dağılımı açısından farklı bulunmuştur. GenBank' ta yapılan karşılaştırmada örneklerimiz RD1 gen bölgesi bakımından *F. tularensis* subsp. *tularensis* NE061598, complete genome (Erişim No:CP001633.1), *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, complete genome (Erişim No:AJ749949), *F. tularensis* subsp. *tularensis* strain FSC 198, complete genome (Erişim No:AM286280), *F. tularensis* subsp. *holarctica* PHIT-FT049, complete genome (Erişim No:CP007148.1) ile % 99, *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, complete genome (Erişim No:CP009694.1) ile % 95 oranında benzer bulundu.

16S rRNA gen bölgesi eşleşme sonuçlarına göre Şarkışla ilçe merkezinde bulunan Belkent tatlı su çeşmesinden 2012 yılında izole edilen köken ile aynı çeşmeden 2013 yılında izole edilen kökenin sekans eşleşmeleri benzer bulunmuştur. Aynı zamanda Çiçekoğlu (Gemerek) ve Döllük (Şarkışla) izolatları da kendi aralarında benzer oldukları gözlemlendi. Diğer dört izolatin ise birbirlerinden farklı sekanslara sahip oldukları saptanmıştır. 16S rRNA gen bölgesi bakımından *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, complete genome (Erişim No:CP009694.1) ile % 98, *F. tularensis* subsp. *holarctica* PHIT-FT049, complete genome (Erişim No:CP007148.1) sonuçları ile % 98 oranında benzer bulundu.

Çalışmamız sonucunda incelenen sekiz *F. tularensis* subsp. *holarctica* izolatında tul4 ve fopA gen bölgelerinde polimorfizm bulunmadığı, RD1 ve 16S rRNA gen bölgelerinde ise polimorfizm bulunduğu saptandı. Örnekler 2011-2013 yıllarında izole edilmiş ve % 16 gliserollü buyyon içerisinde alınarak -20 °C’ de saklanmıştır. Yılda bir GCBA besiyerine yapılan pasajlar ile tekrar canlandırılmış ve tekrar gliserollü buyyon içerisinde alınarak günümüze kadar sürekliliği devam ettirilmiştir. Yapılan bu pasajlar sonucunda bakterilerin mutasyona uğrayarak gen bölgelerindeki bazı da değişimler olması beklenebilecek bir durumdur. Ülkemizde yapılan çalışmalar *F. tularensis* subsp. *holarctica*’ nın farklı filogenetik gruplarının farklı salgın bölgelerinden izole edildiğini göstermektedir. Kılıç ve arkadaşları *F. tularensis* subsp. *holarctica*’ nın biovar *japonica*’ nın bulunduğu B.16 grubu da dahil olmak üzere dört filogenetik grubun ülkemizde bulunduğunu (B.4, B.6, B.12 ve B.16) ve Batı Avrupa’nın aksine Türkiye’de tek bir filogenetik tipin baskın olmadığını bildirmektedirler. Ülkemizden izole edilen biovar *japonica* (B.6) kökenlerinin ise Japon kökenlerinden oldukça farklı olduğunu belirtmişlerdir (Kılıç ve ark., 2015).

Ülkemizde su örneğinden izole edilen ve sekans analizleri GenBank’ ta bulunan *F. tularensis* subsp. *holarctica* PHIT-FT049, complete genome (Erişim No:CP007148.1) örneği biovar *japonica* olarak tiplendirilmiştir. Yapılan sekans karşılaştırılmasında PHIT-FT049 örneği ile bizim örneklerimiz arasında tul4 gen bölgesi açısından % 100, fopA ve RD1 gen bölgeleri açısından % 99 ve 16S rRNA gen bölgesi açısından % 98 oranında benzerlik bulunmuştur.

Ülkemizde tularemi hastalığının başlıca bulaş yolu kontamine olmuş sular oluşturmakta ve etken olarak da *F.tularensis* subsp. *holarctica* görülmektedir. Çalışmamız



sonucunda; Sivas ilinde görülen tularemi salgın bölgelerindeki su örneklerinden izole edilen sekiz *F. tularensis* izolatının *F.tularensis* subsp. *holarctica* olduğu, bu izolatların tul4 ve fopA gen bölgelerinin özdeş olduğu, ilimizdeki tularemi salgınlarında 16S rRNA ve RD1 gen bölgeleri bakımından benzer ve farklı baz dizilimine sahip kökenlerin bulunduğu ortaya konulmuştur. Bütçe yetersizliği nedeni ile örneklerimizin *holarctica* alt türünün hangi filogenetik alt grubuna dahil olduğu tespit edilememiştir. Çalışmalarımız sonucu elde ettiğimiz veriler ileride yapılacak olan çalışmalar için kaynaklık etmesi bakımından önem taşımaktadır.

*F. tularensis*'in tanısı ile yeni alt tür ve filogenetik grupların ortaya çıkarılması için bakterinin kültür yöntemi ile üretilmesi gerekmektedir. Kültürünün zor olması, uzun sürmesi, yüksek biyogüvenlik düzeyinde çalışmayı gerektirmesi bakımından kültür yönteminin bazı zorlukları bulunmaktadır. Ülkemizde gözlenen tularemi salgınlarında etkenin kültür yöntemi ile üretilmesi, tüm genom analizi, SNP, canSNP gibi ileri moleküler yöntemler ile tiplendirilerek *F. tularensis*' in ülkemizdeki filocoğrafik dağılımının belirlenmesine yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır..

## KAYNAKÇA

- Ataş, M. (2012). Çeşitli Su Örneklerinden İzole Edilen Acanthamoeba Türlerinde Francisella tularensis Araştırılması, Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Aydemir H. (2009). Tularemiye Ayırıcı Tanı. In: Gürcan Ş, ed. Francisella tularensis ve Tularemi. İstanbul: Nobel Matbaacılık, 245-55.
- Broekhuijsen, M., Larsson, P., Johansson, A., Byström, M., Eriksson, U., Larsson, E., Prior, R.G., Sjöstedt, A., Titball, R.W., Forsman, M. (2003). Genome-Wide DNA Microarray Analysis of Francisella tularensis Strains Demonstrates Extensive Genetic Conservation within the Species but Identifies Regions That Are Unique to the Highly Virulent F. tularensis subsp. tularensis. *Journal of clinical microbiology*, 41 (7):2924-2931.
- Celebi, G., Baruönü, F., Ayoğlu, F., Çınar, F., Karadenizli, A., Uğur, M.B., Gedikoğlu, S., (2006). Tularemi a Reemerging Disease in Northwest Turkey Epidemiological Investigation and evaluation of treatment responses. *Jpn. J. Infect. Dis*, 4 (59):229-234.
- Chanturia, G. (2011). Phylogeography of Francisella tularensis subspecies holarctica from the country of Georgia. *BMC Microbiology*, 1 (11):139.
- Çelebi, B. (2010). Tularemi: Laboratuvar Tanı, III. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyum Kitabı, 13-18.
- Dirik, K. (1939). Van Gölü Havzasında Tularemi. *Türk Hij Tec Biol Derg*, 2:193-5.
- Eden, J. S., Rose, K., Ng, J., Shi, M., Wang, Q., Sintchenko, V. (2017). Francisella tularensis ssp. holarctica' in Ringtail Possums, Australia. *Emerg. Infect. Dis*, 23:1198–1201.
- Eliasson, H., Broman, T., Forsman, M., Back, E. (2006). Tularemi: current epidemiology and disease management. *Infect. Dis. Clin. North Am*, 2 (20): 289-311.
- Ellis J, Oyston PC, Gren M, Titball RW. (2002). Tularemi. *Clin Microbiol Rev*, 15: 631-46.
- Engin, A., Altuntaş, E.E., Cankorkmaz, L., Kaya, A., Elaldı, N., Şimşek, H., Dökmetaş, İ., Bakır, M. (2011). Sivas İlinde Saptanan İlk Tularemi Salgını: 29 Olgunun Değerlendirilmesi. *Klimik Dergisi*, 24:17-23.
- Farlow, J., Wagner, D. M., Dukerich, M., Stanley, M., Chu, M., Kubota, K. (2005). Francisella tularensis in the United States. *Emerg. Infect. Dis*, 11:1835–1841.
- Felsenstein, J., (1985). Confidence limits on phylogeny: an appropriate use of the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Freeman, S. ve Herron, J. (1999). *Evrimsel Analiz*. Ankara: Palme Yayıncılık, 438-708.
- Friend, M. (2006). Tularemi: Reston, Va., U.S. Geological Survey, Circular 1297, 1-68.
- Gedikoğlu, S. (1996). Francisella tularensis isolation from various clinical specimen. *Clin. Microbiol. Infect*, 3 (2):233-235.
- Gotschlich, E. ve Berkin, T. (1938). 1936 yılında Trakya'da tularemiye ait yapılan epidemiyolojik ve bakteriyolojik araştırmalar. *Türk Hijyen ve Tecrübi Biyoloji Dergisi*, 1:115-23.

- Gurcan, S., Karabay, O., Karadenizli, A., Karagol, C., Kantardjiev, T., Ivanov, IN. (2008). Characteristics of the Turkish isolates of Francisella tularensis. *Jpn J Infect Dis*, 61 (3): 223-5.
- Gürcan, Ş. (2007). Türkiye'de Francisella tularensis ve tularemi. *Mikrobiyol Bul*, 41:621-36.
- Gürcan, Ş., Otkun, MT., Otkun, M., Arıkan, OK., Ozer, B. (2004). An outbreak of tularemia in Western Black Sea region of Turkey. *Yonsei Medical J*, 45:17-22.
- Helvacı, S. (2009). Tularemi Klinik Özellikler. In: Gürcan Ş, ed. Francisella tularensis ve Tularemi. İstanbul: Nobel Matbaacılık, 205-7.
- Helvacı, S., Gedikoğlu, S., Akalin, H. & Oral, H. (2000). Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. *Eur J Epidemiol*, 16:271-6.
- Hopla, CE. (1974). The ecology of tularemia. *Adv Vet Sci Comp Med*, 18:25-53.
- Johansson, A., Forsman, M. ve Sjöstedt, A. (2004). The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of Francisella tularensis. *APMIS*, 112:898-907.
- Karadenizli, A., Forsman, Mats., Sjödin, Andreas., Şimşek, Hülya., Taner, M., Öhrman, C., Myrtenäs, K., Lärkeryd, A., Johansson, A., Özdemir, L., Sjödin, A. (2015). Genomic analyses of Francisella tularensis strains confirm disease transmission from drinking water sources, Turkey, 2008, 2009 and 2012. *Euro Surveill*, 20 (21):2113.
- Karadenizli, A., Gurcan, S., Kolayli, F., Vahaboglu, H. (2005). Outbreak of tularemia in Golcuk, Turkey in 2005: Report of 5 cases and overview of literature from Turkey. *Scand J Infect Dis*, 37:712-6.
- Karlsson, E., Svensson, K., Lindgren, P., Byström, M., Sjodin, A., Forsman, M. (2013). The phylogeographic pattern of Francisella tularensis in Sweden indicates a Scandinavian origin of Eurosiberian tularaemia. *Environ.Microbiol*, 15:634–645.
- Katoh, K., Asimenos, G. ve Toh, H., (2009). Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis*, 39-64.
- Keim, P., Johansson, A., Wagner, D.M. (2007). Molecular epidemiology, evolution, and ecology of Francisella. *Ann NY Acad Sci*, 1105:30-1866.
- Kılıç, S. (2005). Tularemi, RSHM Aylık Epidemiyoloji Raporu, 4 (4):146-1499.
- Kılıç, S. (2006). Biyolojik Silah Olarak Bakteriler: "Kategori A Ajanlar". *Türk Hij Den Biyol Derg*, 1,2,3 (63):7-46.
- Kılıç, S. (2010). A General Overview of Francisella tularensis and the Epidemiology of Tularemia in Turkey. *Flora*, 15:37-58.
- Kılıc, S., Birdsell, D. N., Karagoz, A., Celebi, B., Bakkaloglu, Z., Arıkan, M. (2015). Water as source of Francisella tularensis infection in humans, Turkey. *Emerg. Infect. Dis*, 21: 2213–2216. doi: 10.3201/eid2112.150634
- Kılıc, S., Celebi, B., Acar, B., and Atas, M. (2013). In vitro susceptibility of isolates of Francisella tularensis from Turkey. *Scand. J. Infect. Dis*, 45:337–341. doi: 10.3109/00365548.2012.751125
- Kılıç, S., Yeşilyurt, M. (2011). Tularemi: Güncel Tedavi Seçeneklerine Genel Bir Bakış. *Klinik Dergisi*, 24:2-10.

- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111–120. <http://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kugeler, K. J., Mead, P. S., Janusz, A. M., Staples, J. E., Kubota, K. A., Chalcraft, L. G., et al. (2009). Molecular epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States. *Clin. Infect. Dis*, 48:863–870. doi: 10.1086/597261
- Kumar, S., Stecher, G. ve Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*.
- Lai, X.-H., Zhao, L.-F., Chen, X.-M. ve Ren, Y. (2016). Rapid Identification and Characterization of *Francisella* by Molecular Biology and Other Techniques. *The Open Microbiology Journal*, 10:64-77.
- Lepp , P. W. ve Relman, D. (2004). Molecular Phylogenetic Analysis. In *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. ASM Pres*, 13:161-180.
- Lietenberg, M. (2001). Biological weapons in the twentieth century: a review and analysis. *Crit Rev Microbiol*, 4 (27):267-320.
- Lu, Y., Yu, Y., Feng, L., Li, Y., He, J., Zhu, H., et al. (2016). Phylogeography of *Francisella tularensis* from Tibet, China: evidence for an asian origin and radiation of holarctica-type tularemia. *Ticks Tick Borne Dis*, 7:865–868.
- Molly K. McLendon., Michael A. Apicella., Lee-Ann H. Allen. (2006). *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a Potential Agent of Biowarfare. *Annual Review of Microbiology*, 60:167–185.
- Mount, D. (2017). Bioinformatics Sequence and Genome Analysis. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 52-137.
- Mörner, T. (1992). The ecology of tularaemia. *Rev. Off. Int. Epizoot*, 11:1123–1130. doi: 10.20506/rst.11.4.657
- Olsufjev, N. G., and Meshcheryakova, I. S. (1982). Intraspecific taxonomy of tularemia agent *Francisella tularensis* McCoy et Chapin. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol*, 26: 291–299.
- Özel, T. (1938). Talat Vasfi özel'in 1937 yılı yazında Trakya'da tularemi tetkikatı. *Türk Hijyen ve Tecrübi Biyoloji Dergisi*, 1:158-184.
- Özsürekli, Y., Birdsell, D.N., Çelik, M., Öncel, E.K., Johansson, A., Forsman, M., Vogler, A.J., Keim, P., Ceyhan, M., Wagner, D. M. (2015). Diverse *Francisella tularensis* Strains and Oropharyngeal Tularemia, Turkey. *Emerg Infect Dis*, 21 (1):173–175.
- Penn R.L. (2005). *Francisella tularensis* (Tularemia). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Mandell, G.L, Bennett, J.E, Dolin, R. (eds.) 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2674-2685.
- Pilo, P. (2018). Phylogenetic Lineages of *Francisella* in Animals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8:258.
- Sağlık Bakanlığı. (2011). Tularemi Hastalığının Kontrolü için Saha Rehberi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Zoonotik Hastalıklar Daire Başkanlığı. Ankara.
- Sandström, G., Löfgren, S., Tärnvik, A. (1988). A capsule-deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished



WHO. (2007). WHO Guidelines on Tularemia, World Health Organization, WHO/CDS/EPR/2007.7.

Wilke, A. (2006). Tularemi, ANKEM Derg, 20(Ek 2):222-226.



## EK-1

### **tu14 GEN BÖLGESİ SEKANS SONUÇLARI**

**>HUYUK (BELKENT2012, CICEKOGLU, KARAOREN, MAKSUTLU, BAHCEICI, BELKENT2013, DOLLUK)**

TTATAATCGATTTGAGTATATGTGAATATTTAAAAATAGGAGTATCTATATGAAAAATAATTA  
AGCTTAGTCTTTTATCTTTATCAATCGCAGGTTTAGCGAGCTGTTCTACTCTAGGGTTAGGTGGCT  
CTGATGATGCAAAGCTTCAGCTAAAGATACTGCTGCTGCTCAGACAGCTACTACTGAGCAAGC  
TGCTGCTGTATCTAAGCCAACTGCAAAGTAAGTTAAATAAACTTGGTCAGGATAAAAATAAAA  
GCAACTGTATATACAGCATAACAATAAACCACAAGGAAGTGTAAGATTACAATGGCAGGCTC  
CAGAAGGTTCTAAGTGCCATGATACAAGCTTCCAAA

### **fopA GEN BÖLGESİ SEKANS SONUÇLARI**

**>HUYUK (BELKENT2012, CICEKOGLU, KARAOREN, MAKSUTLU, BAHCEICI, BELKENT2013, DOLLUK)**

TCCAATAATTGGTTGACTGTACAGCGAAGTATTTATTGATGTTATAACCGATTGTGAAGTTAG  
CACCAGCACCTGATGGAGAGTTAGGAGTTCCAGCTAGACCGTTAGCATCTACACCTAAGTACCA  
CTGGCCAGTTCTATCTTGAGGACCCCAAGTATTGTCCTTGTTAGTCAAAGCGCTATAAGTATTTG  
CAAAGGAGCAATGAAATTATTAGCTGCAAACCCTGCTTTGTGTAGTAGCTGAATTAGTGTT  
TGCTGACGTATCGATATTATCTGAACCTGCAGCGATAGATGCTGTAGCTGAACCTAATAATACA  
GTTGTAGCTATAACAATACTTTTTAATCTCATCAAAAACCTCC

### **16S rRNA GEN BÖLGESİ SEKANS SONUÇLARI**

**>HUYUK**

AAGGTGGCTTTCGGGCTGTTCGAGATGGATGAGCCTGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
GGGCCACCAAGGCTACGATCCATAGCTGATTTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGA  
CACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGAT  
CCAGCAATGCCATGTGTGTGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCACTTTAGTTGGGGAGGAAAG  
CCTCAAGGTTAATAGCCTTGGGGGAGGACGTTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGC  
CAGCAGCCGCGTAATACGGGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTCTGT  
AGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTTGGAACTGCATTTGATACTGG  
CAAAGTAGAGTACGGTAGAGGAATGGGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCA  
GAAGGAACACCAATGGCGAAGGCAACATTCTGGACCGATACTGACACTGAGGGACGAAAGCGT

GGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTACTAGCTGTTGG  
AGTCGGTGTAAAGGCTCTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTACTCCGCCTGGGGACTACGGCC  
GCAAGTCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTTCTAGAGAAAGATTGGT  
GCCTTCGGGAACGCAGTGACAGGTGCTGCACGGCTTTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAACGTTGGG  
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGATAGTTACCATCATTAAGTTGGGTACTCAATTA  
GACTGCCGCTGACAAGGCGGAGGAAGTTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCGTTACGAAC  
AGGGCTAACACGTGCTAACATCGGTTTTACGAAGGCTGCA

**>BELKENT2012**

AAGGTGGCTTTCGGGCTGTTCGACAGATGGATGAGCCTGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
GGGCCACCAAGGCTACGATCCATAGCTGATTTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGA  
CACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGAT  
CCAGCAATGCCATGTGTGTGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCACTTTAGTTGGGGAGGAAAG  
CCTCAAGGTAAATAGCCTTGGGGGAGGACGTTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGC  
CAGCAGCCGCGTAATACGGGGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTCTGT  
AGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTTGGAAGTGCATTTGATACTGG  
CAAAGTAGAGTACGGTAGAGGAATGGGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCA  
GAAGGAACACCAATGGCGAAGGCAACATTCTGGACCGATACTGACACTGAGGGACGAAAGCGT  
GGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTACTAGCTGTTGG  
AGTCGGTGTAAAGGCTCTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTACTCCGCCTGGGGACTACGGCC  
GCAAGTCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTTCTAGAGAAAGATTGGG  
GCCTTCGGGAAACGCAGTGACAGGTGCTGCACGGCTTTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAACGTTGG  
GTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGATAGTTACCATCATTAAGTTGGGTACTCAATTA  
AGACTGCCGCTGACAAGGCGGAGGAAGTTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCGTTACGAA  
CAGGGCTAACACGTGCTAACATCGGTTTTACGAAGGCTGCA

**>CICEKOGLU**

AAGGTGGCTTTCGGGCTGTTCGACAGATGGATGAGCCTGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
GGGCCACCAAGGCTACGATCCATAGCTGATTTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGA  
CACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGAT  
CCAGCAATGCCATGTGTGTGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCACTTTAGTTGGGGAGGAAAG  
CCTCAAGGTAAATAGCCTTGGGGGAGGACGTTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGC  
CAGCAGCCGCGTAATACGGGGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTCTGT  
AGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTTGGAAGTGCATTTGATACTGG  
CAAAGTAGAGTACGGTAGAGGAATGGGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCA  
GAAGGAACACCAATGGCGAAGGCAACATTCTGGACCGATACTGACACTGAGGGACGAAAGCGT



GGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTACTAGCTGTTGG  
AGTCGGTGTAAAGGCTCTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTACTCCGCCTGGGGACTACGGCC  
GCAAGTCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTTCTAGAGAAAGATTGGT  
GCCTTCGGGAAACGCAGTGACAGGTGCTGCACGGCTTTCGTCAGCTCGTGTGTGAAACGTTGG  
GTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTATTGATAGTTACCATCATTAAGTTGGGTACTCAATTA  
AGACTGCCGCTGACAAGGCGGAGGAAGTTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCGTTACGAA  
CAGGGCTAACCACGTGCTAACATCGGTTTTACGAAGGCTGCA

**>KARAOREN**

AAGGTGGCTTTCGGGCTGTTCGACAGATGGATGAGCCTGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
GGGCCACCAAGGCTACGATCCATAGCTGATTTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGA  
CACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGAT  
CCAGCAATGCCATGTGTGTGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCACTTTAGTTGGGGAGGAAAG  
CCTCAAGGTAAATAGCCTTGGGGGAGGACGTTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGC  
CAGCAGCCGCGTAATACGGGGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTCTGT  
AGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTTGGAAGTGCATTTGATACTGG  
CAAAGTAGAGTACGGTAGAGGAATGGGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCA  
GAAGGAACACCAATGGCGAAGGCAACATTCTGGACCGATACTGACACTGAGGGACGAAAGCGT  
GGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTACTAGCTGTTGG  
AGTCGGTGTAAAGGCTCTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTACTCCGCCTGGGGACTACGGCC  
GCAAGTCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGTAGCATGTGGTTTAATT  
CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTTCTAGAGAAAGATTGGG  
GCCTTCGGGAAACGCAGTGACAGGTGCTGCACGGCTTTCGTCAGCTCGTGTGTGAAACGTTGG  
GTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTATTGATAGTTACCATCATTAAGTTGGGTACTCAATTA  
AGACTGCCGCTGACAAGGCGGAGGAAGTTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCGTTACGAA  
CAGGGCTAACCACGTGCTAACATCGGTTTTACGAAGGCTGCA

**>MAKSUTLU**

AAGGTGGCTTTCGGGCTGTTCGACAGATGGATGAGCCTGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
GGGCCACCAAGGCTACGATCCATAGCTGATTTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGA  
CACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGAT  
CCAGCAATGCCATGTGTGTGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCACTTTAGTTGGGGAGGAAAG  
CCTCAAGGTAAATAGCCTTGGGGGAGGACGTTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGC  
CAGCAGCCGCGTAATACGGGGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTCTGT  
AGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTTGGAAGTGCATTTGATACTGG  
CAAAGTAGAGTACGGTAGAGGAATGGGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCA  
GAAGGAACACCAATGGCGAAGGCAACATTCTGGACCGATACTGACACTGAGGGACGAAAGCGT

GGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTACTAGCTGTTGG  
AGTCGGTGTAAAGGCTCTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTACTCCGCCTGGGGACTACGGCC  
GCAAGTCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGTAGCATGTGGTTAATT  
CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGCTTGACATCCTGCGAACTTTCTAGAGAAAGATTGGG  
CCTTCCGGAACACGCAGTGACAGGTGCTGCACGGCTTTCGTCAGCTCGTGTGTGAAACGTTGG  
GCTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTATTGATAGTTACCATCATTAAAGTTGGGTACTCAATTA  
AGACTGCCGCTGACAAGGCGGAGGAAGTTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCGTTACGAA  
CAGGGCTAACCACGTGCTAACATCGGTTTTACGAAGGCTGCA

**>BAHCEICI**

AAGGTGGCTTTCGGGCTGTTCGACAGATGGATGAGCCTGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
GGGCCACCAAGGCTACGATCCATAGCTGATTTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGA  
CACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGAT  
CCAGCAATGCCATGTGTGTGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCACTTTAGTTGGGGAGGAAAG  
CCTCAAGGTTAATAGCCTTGGGGGAGGACGTTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGC  
CAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTCTGT  
AGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTTGGAAGTGCATTTGATACTGG  
CAAAGTAGAGTACGGTAGAGGAATGGGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCA  
GAAGGAACACCAATGGCGAAGGCAACATTCTGGACCGATACTGACACTGAGGGACGAAAGCGT  
GGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTACTAGCTGTTGG  
AGTCGGTGTAAAGGCTCTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTACTCCGCCTGGGGACTACGGCC  
GCAAGTCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGTAGCATGTGGTTAATT  
CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGCTTGACATCCTGCGAACTTTCTAGAGAAAGATTGGG  
CCTTCCGGAACCCGCAGTGACAGGTGCTGCACGGCTTTCGTCAGCTCGTGTGTGAAACGTTGGG  
CTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTATTGATAGTTACCATCATTAAAGTTGGGTACTCAATTA  
GACTGCCGCTGACAAGGCGGAGGAAGTTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCGTTACGAAC  
AGGGCTAACCACGTGCTAACATCGGTTTTACGAAGGCTGCA

**>BELKENT2013**

AAGGTGGCTTTCGGGCTGTTCGACAGATGGATGAGCCTGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
GGGCCACCAAGGCTACGATCCATAGCTGATTTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGA  
CACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGAT  
CCAGCAATGCCATGTGTGTGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCACTTTAGTTGGGGAGGAAAG  
CCTCAAGGTTAATAGCCTTGGGGGAGGACGTTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGC  
CAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTCTGT  
AGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTTGGAAGTGCATTTGATACTGG  
CAAAGTAGAGTACGGTAGAGGAATGGGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCA  
GAAGGAACACCAATGGCGAAGGCAACATTCTGGACCGATACTGACACTGAGGGACGAAAGCGT

GGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTACTAGCTGTTGG  
AGTCGGTGTAAAGGCTCTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTACTCCGCCTGGGGACTACGGCC  
GCAAGTCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTTCTAGAGAAAGATTGGG  
GCCTTCGGGAAACGCAGTGACAGGTGCTGCACGGCTTTCGTCAGCTCGTGTGTGAAACGTTGG  
GTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTATTGATAGTTACCATCATTAAGTTGGGTACTCAATTA  
AGACTGCCGCTGACAAGGCGGAGGAAGTTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCGTTACGAA  
CAGGGCTAACCACGTGCTAACATCGGTTTTACGAAGGCTGCA

**>DOLLUK**

AAGGTGGCTTTCGGGCTGTTCGACAGATGGATGAGCCTGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
GGGCCACCAAGGCTACGATCCATAGCTGATTTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGA  
CACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGAT  
CCAGCAATGCCATGTGTGTGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCACTTTAGTTGGGGAGGAAAG  
CCTCAAGGTAAATAGCCTTGGGGGAGGACGTTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGC  
CAGCAGCCGCGTAATACGGGGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTCTGT  
AGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTTGAACTGCATTTGATACTGG  
CAAACCTAGAGTACGGTAGAGGAATGGGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCA  
GAAGGAACACCAATGGCGAAGGCAACATTCTGGACCGATACTGACACTGAGGGACGAAAGCGT  
GGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTACTAGCTGTTGG  
AGTCGGTGTAAAGGCTCTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTACTCCGCCTGGGGACTACGGCC  
GCAAGTCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTTCTAGAGAAAGATTGGT  
GCCTTCGGGAAACGCAGTGACAGGTGCTGCACGGCTTTCGTCAGCTCGTGTGTGAAACGTTGG  
GTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTATTGATAGTTACCATCATTAAGTTGGGTACTCAATTA  
AGACTGCCGCTGACAAGGCGGAGGAAGTTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCGTTACGAA  
CAGGGCTAACCACGTGCTAACATCGGTTTTACGAAGGCTGCA

**RD1 GEN BÖLGESİ SEKANS SONUÇLARI**

**>HUYUK**

GCTTCTTACTGGATGTTTCAAACCTGGCTGTATCTTTGAGTTTTATAATGTTCTTTGATTATATTTTT  
TAGATTTGAATAGTCATTATTAAGACATCGCACTCATCTAAAATATTTACGATATTATTTACAC  
AATCTTCTTGATACTGTTGTTTTTCAAATAGCATTCAACATCTCTTTATAGCTACCTGCATTATG  
CAACTTTTGCATAATGCTTTTTTATTTGTGTGGTGTGTGATTTTTTGCACATACCTATTTTATACTT  
CCAACTTGTGCATTTTTTACACTACTTAAATTTTCTATTCTTAGTAGTTTCAAACCTTGTAAAGAATTA  
TTTACAAGCTCACTTTTTAATAAACATCAATTTTAGTCATTCTACGGCTTGACCGTAGAATTCATT

CTCCACCTAGTCAAGAATGCTCTCATATAAGTCTAACCAATCAGGATTAACCTCATTATCAGAT  
CTATCTTCCACTGTCTTTGCCAGTTTTAAGTCTTTTTTCTCTGTCAAAGCATCTTGTATATATTTAA  
ATTGCTCATACTAACTAAAATTTTTATATCAGACTTTTTAGTAAATCCATCAGCCAAACCTTGT  
CTATGCTCTAAACTCTTTTGATAAGAGTTGCTGCTACTCCGATATATAGAGTACCATATTTCTTAC  
TCGCCATATCTACACAAAGCCAAATTATAACCTTTATTAGCAGGTATTCCACGGTCAAGCCGTAG  
AATGACGATGCTGTATTCTATGTCACCTGGGCTTGACACTGGACCACCCCAAGATCAATATCCGT  
CTTCTAACTCTACAATTATCTGATTGGTTCTTTTTAGTGTTTTCA

**>BELKENT2012**

GCTTCTTACTGGATGTTTCAAACCTGGCTGTATCTTTGAGTTTTATAATGTTCTTTGATTATATTTTT  
TAGATTTGAATAGTCATTATTAAGACATCGCACTCATCTAAAATATTTACGATATTTTACAC  
AATCTTCTTGATACTGTTGTTTTTCAAATAGCATTCAACATCTCTCTTATAGCTACCTGCATTATG  
CAACTTTTGCATAATGCTTTTTATTTGTGTGGTGTGTGTATTTTTTGCACATACCTATTTTATACTT  
CCAACCTTGTGCATTTTTTACACTACTTAAATTTTCTATTCCCTAGTAGTTTCAAACCTTGTAAAGAATTA  
TTTACAAGCTCACTTTTTAATAAACATCAATTTTAGTCATTCTACGGCTTGACCGTAGAATTCATT  
CTCCACCTAGTCAAGAATGCTCTCATATAAGTCTAACCAATCAGGATTAACCTCATTATCAGAT  
CTATCTTCCACTGTCTTTGCCAGTTTTAAGTCTTTTTTCTCTGTCAAAGCATCTTGTATATATTTAA  
ATTGCTCATACTAACTAAAATTTTTATATCAGACTTTTTAGTAAATCCATCAGCCAAACCTTGT  
CTATGCTCTAAACTCTTTTGATAAGAGTTGCTGCTACTCCGATATATAGAGTACCATATTTCTTAC  
TCGCCATATCTACACAAAGCCAAATTATAACCTTTATTAGCAGGTATTCCACGGTCAAGCCGTAG  
AATGACGATGCTGTATTCTATGTCACCTGGGCTTGACACTGGACCACCCCAAGATCAATATCCGT  
CTTCTAACTCTACAATTATCTGATTGGTTCTTTTTAGTGTTTTCA

**>CICEKOGLU**

GCTTCTTACTGGATGTTTCAAACCTGGCTGTATCTTTGAGTTTTATAATGTTCTTTGATTATATTTTT  
TAGATTTGAATAGTCATTATTAAGACATCGCACTCATCTAAAATATTTACGATATTTTACAC  
AATCTTCTTGATACTGTTGTTTTTCAAATAGCATTCAACATCTCTCTTATAGCTACCTGCATTATG  
CAACTTTTGCATAATGCTTTTTATTTGTGTGGTGTGTGTATTTTTTGCACATACCTATTTTATACTT  
CCAACCTTGTGCATTTTTTACACTACTTAAATTTTCTATTCCCTAGTAGTTTCAAACCTTGTAAAGAATTA  
TTTACAAGCTCACTTTTTAATAAACATCAATTTTAGTCATTCTACGGCTTGACCGTAGAATTCATT  
CTCCACCTAGTCAAGAATGCTCTCATATAAGTCTAACCAATCAGGATTAACCTCATTATCAGAT  
CTATCTTCCACTGTCTTTGCCAGTTTTAAGTCTTTTTTCTCTGTCAAAGCATCTTGTATATATTTAA  
ATTGCTCATACTAACTAAAATTTTTATATCAGACTTTTTAGTAAATCCATCAGCCAAACCTTGT  
CTATGCTCTAAACTCTTTTGATAAGAGTTGCTGCTACTCCGATATATAGAGTACCATTTTCTTAC  
TCGCCATATCTACACAAAGCCAAATTATAACCTTTATTAGCAGGTATTCCACGGTCAAGCCGTAG  
AATGACGATGCTGTATTCTATGTCACCTGGGCTTGACACTGGACCACCCCAAGATCAATATCCGT  
CTTCTAACTCTACAATTATCTGATTGGTTCTTTTTAGTGTTTTCA

**>KARAOREN**

GCTTCTTACTGGATGTTTCAAACCTGGCTGTATCTTTGAGTTTTATAATGTTCTTTGATTATATTTTT  
TAGATTTGAATAGTCATTATTAAGACATCGCACTCATCTAAAATATTTACGATATTATTTACAC  
AATCTTCTTGATACTGTTGTTTTTCAAATAGCATTCAACATCTCTCTTATAGCTACCTGCATTATG  
CAACTTTTGCATAATGCTTTTTATTTGTGTGGTGTGTGTATTTTTTGCACATACCTATTTTATACTT  
CCAACTTGTGCATTTTTTACACTACTTAAATTTTCTATTCCCTAGTAGTTTCAACTTGTAAAGAATTA  
TTTACAAGCTCACTTTTTAATAAACATCAATTTTAGTCATTCTACGGCTTGACCGTAGAATTCATT  
CTCCACCTAGTCAAGAATGCTCTCATATAAGTCTAACCAATCAGGATTAAACTCATTATCAGAT  
CTATCTTCCACTGTCTTTGCCAGTTTTAAGTCTTTTTTCTCTGTCAAAGCATCTTGTATATATTTAA  
ATTGCTCATACTAAACTAAAATTTTTATATCAGACTTTTTAGTAAATCCATCAGCCAAACCTTGT  
CTATGCTCTAAACTCTTTTGATAAGAGTTGCTGTCACTCCGATATATAGAGTACCATATTTCTTAC  
TCGCCATATATACACAAAGCCAAATTATAACCTTTATTAGCAGGTATTCCACGGTCAAGCCGTAG  
AATGACGATGCTGTATTCTATGTCACCTGGGCTTGACACTGGACCACCCCAAGATCAATATCCGT  
CTTCTAACTCTACAATTATCTGATTGGTTCTTTTTAGTGTTTTCA

**>MAKSUTLU**

GCTTCTTACTGGATGTTTCAAACCTGGCTGTATCTTTGAGTTTTATAATGTTCTTTGATTATATTTTT  
TAGATTTGAATAGTCATTATTAAGACATCGCACTCATCTAAAATATTTACGATATTATTTACAC  
AATCTTCTTGATACTGTTGTTTTTCAAATAGCATTCAACATCTCTCTTATAGCTACCTGCATTATG  
CAACTTTTGCATAATGCTTTTTATTTGTGTGGTGTGTGTATTTTTTGCACATACCTATTTTATACTT  
CCAACTTGTGCATTTTTTACACTACTTAAATTTTCTATTCCCTAGTAGTTTCAACTTGTAAAGAATTA  
TTTACAAGCTCACTTTTTAATAAACATCAATTTTAGTCATTCTACGGCTTGACCGTAGAATTCATT  
CTCCACCTAGTCAAGAATGCTCTCATATAAGTCTAACCAATCAGGATTAAACTCATTATCAGAT  
CTATCTTCCACTGTCTTTGCCAGTTTTAAGTCTTTTTTCTCTGTCAAAGCATCTTGTATATATTTAA  
ATTGCTCATACTAAACTAAAATTTTTATATCAGACTTTTTAGTAAATCCATCAGCCAAACCTTGT  
CTATGCTCTAAACTCTTTTGATAAGAGTTGCTGTCACTCCGATATATAGAGTACCATATTTCTTAC  
TCGCCATATATACACAAAGCCAAATTATAACCTTTATTAGCAGGTATTCCACGGTCAAGCCGTAG  
AATGACGATGCTGTATTCTATGTCACCGGGCTTGACACTGGACCACCCCAAGATCAATATCCGT  
CTCTCTAACTCTACAATTATCTGATTGGTTCTTTTTAGTGTTTTCA

**>BAHCEICI**

GCTTCTTACTGGATGTTTCAAACCTGGCTGTATCTTTGAGTTTTATAATGTTCTTTGATTATATTTTT  
TAGATTTGAATAGTCATTATTAAGACATCGCACTCATCTAAAATATTTACGATATTATTTACAC  
AATCTTCTTGATACTGTTGTTTTTCAAATAGCATTCAACATCTCTCTTATAGCTACCTGCATTATG  
CAACTTTTGCATAATGCTTTTTATTTGTGTGGTGTGTGTATTTTTTGCACATACCTATTTTATACTT  
CCAACTTGTGCATTTTTTACACTACTTAAATTTTCTATTCCCTAGTAGTTTCAACTTGTAAAGAATTA  
TTTACAAGCTCACTTTTTAATAAACATCAATTTTAGTCATTCTACGGCTTGACCGTAGAATTCATT  
CTCCACCTAGTCAAGAATGCTCTCATATAAGTCTAACCAATCAGGATTAAACTCATTATCAGAT

CTATCTTCCACTGTCTTTGCCAGTTTTAAGTCTTTTTTCTCTGTCAAAGCATCTTGTATATATTTAA  
ATTGCTCATACTAAACTAAAATTTTTATATCAGACTTTTTAGTAAATCCATCAGCCAAACCTTGT  
CTATGCTCTAAACTCTTTTGATAAGAGTTGCTGTCACTCCGATATATAGAGTACCATATTTCTTAC  
TCGCCATATATACACAAAGCCAAATTATAACCTTTATTAGCAGGTATTCCACGGTCAAGCCGTAG  
AATGACGATGCTGTATTCTATGTCACCTGGGCTTGACACTGGACCACCCCAAGATCAATATCCGT  
CTTCTAACTCTACAATTATCTGATTGGTTCTTTTTAGTGTTTTCA

**>BELKENT2013**

GCTTCTTACTGGATGTTTCAAACCTGGCTGTATCTTTGAGTTTTATAATGTTCTTTGATTATATTTTT  
TAGATTTGAATAGTCATTATTAAGACATCGCACTCATCTAAAATATTTACGATATATTTACAC  
AATCTTCTTGATACTGTTGTTTTTCAAATAGCATTCAACATCTCTCTTATAGCTACCTGCATTATG  
CAACTTTTGCATAATGCTTTTTATTTGTGTGGTGTGTGTATTTTTTGCACATACCTATTTTATACTT  
CCAACCTGTGCATTTTTTACACTACTTAAATTTTCTATTCTAGTAGTTTCAAACCTGTAAGAATTA  
TTTACAAGCTCACTTTTTAATAAACATCAATTTTAGTCATTCTACGGCTTGACCGTAGAATTCATT  
CTCCACCTAGTCAAGAATGCTCTCATATAAGTCTAACCAATCAGGATTAACCTCATTATCAGAT  
CTATCTTCCACTGTCTTTGCCAGTTTTAAGTCTTTTTTCTCTGTCAAAGCATCTTGTATATATTTAA  
ATTGCTCATACTAAACTAAAATTTTTATATCAGACTTTTTAGTAAATCCATCAGCCAAACCTTGT  
CTATGCTCTAAACTCTTTTGATAAGAGTTGCTGTCACTCCGATATATAGAGTACCATTTTTCTTAC  
TCGCCATATCTACACAAAGCCAAATTATAACCTTTATTAGCAGGTATTCCACGGTCAAGCCGTAG  
AATGACGATGCTGTATTCTATGTCATCCGGCTTGACACTGGACCACCCCAAGATCAATATCCGT  
CTCTCTAACTCTACAATTATCTGATTGGTTCTTTTTAGTGTTTTCA

**>DOLLUK**

GCTTCTTACTGGATGTTTCAAACCTGGCTGTATCTTTGAGTTTTATAATGTTCTTTGATTATATTTTT  
TAGATTTGAATAGTCATTATTAAGACATCGCACTCATCTAAAATATTTACGATATATTTACAC  
AATCTTCTTGATACTGTTGTTTTTCAAATAGCATTCAACATCTCTCTTATAGCTACCTGCATTATG  
CAACTTTTGCATAATGCTTTTTATTTGTGTGGTGTGTGTATTTTTTGCACATACCTATTTTATACTT  
CCAACCTGTGCATTTTTTACACTACTTAAATTTTCTATTCTAGTAGTTTCAAACCTGTAAGAATTA  
TTTACAAGCTCACTTTTTAATAAACATCAATTTTAGTCATTCTACGGCTTGACCGTAGAATTCATT  
CTCCACCTAGTCAAGAATGCTCTCATATAAGTCTAACCAATCAGGATTAACCTCATTATCAGAT  
CTATCTTCCACTGTCTTTGCCAGTTTTAAGTCTTTTTTCTCTGTCAAAGCATCTTGTATATATTTAA  
ATTGCTCATACTAAACTAAAATTTTTATATCAGACTTTTTAGTAAATCCATCAGCCAAACCTTGT  
CTATGCTCTAAACTCTTTTGATAAGAGTTGCTGTCACTCCGATATATAGAGTACCATTTTTCTTAC  
TCGCCATATATACACAAAGCCAAATTATAACCTTTATTAGCAGGTATTCCACGGTCAAGCCGTAG  
AATGACGATGCTGTATTCTATGTCATCTGGGCTGACCACTGGACCACCCCAAGATCAATATCCGT  
CTCTCTAACTCTACAATTATCTGATTGGTTCTTTTTAGTGTTTTCA

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Sinem DEMİR
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas-1990
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD, 58140-Sivas
E-posta Adresi	<a href="mailto:sinemdemir@yahoo.com">sinemdemir@yahoo.com</a>

### Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Sivas Milli Piyango Lisesi, 2009
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2016
Yüksek Lisans	Sivas Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2018
Ünvan	Biyolog

### İş Tecrübesi

## ETİK KURUL KARARI



### CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sivas Yöresinden İzole Edilen <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> İzolatlarının Moleküler Filogenetik Analizi
-----------------------	--

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı TR-58140 Merkez/Sivas
	TELEFON	0 346 219 10 10 / Dahili: 2092
	FAKS	-
	E-POSTA	gokaek2014@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ataş			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Farmasötik Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yüksek lisans tezi			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez  
İmza:





CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK  
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI

Sivas Yöresinden İzole Edilen *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* İzolatlarının Moleküler Filogenetik Analizi

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>					
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	ILAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
DİĞER:	<input type="checkbox"/>						
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2017-10/11	Tarih: 04.10.2017					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden gerekli izin alınarak gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Helsinki Bildirgesi, Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Muhittin Sönmez

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Muhittin Sönmez	Anotomi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yalçın Karagöz	Biyoistatistik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hatice Özer	Patoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ercan Özdemir	Fizyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Gülay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ataş	Farmasötik Mikrobiyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Recai Zın	Endodonti	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İzinli
Yrd. Doç. Dr. Binnur Bağcı	Beslenme ve Diyetetik	Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimler Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Engin Altınkaya	İç Hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez  
İmza: