



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX SUŞLARININ
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

Hazırlayan
Nimet Karadeli

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet Ünver

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ÇANAKKALE-2016



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX SUŞLARININ
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

Hazırlayan
NİMET KARADELİ

Tez Danışmanı
PROF. DR. AHMET ÜNVER

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ÇANAKKALE-2016

Bir yüksek lisans tezi olan bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi (BAP) tarafından **TYL-2015-476** proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY FORMU

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Nimet KARADELİ
Tez Başlığı : *Mycobacterium tuberculosis* complex Suşlarının Genotiplendirilmesi
Sınav Yeri : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Terzioğlu
Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 22.07.2016

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Sınav Jürisi

Danışman (Unvan ve Adı)	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Ahmet Ünver	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)		
Prof. Dr. Müşerref Tatman Otkun	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Ziya İlhan	Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi	

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/08/16 tarih ve 20/1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

THESIS APPROVAL FORM

Institute Name : Çanakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences

Programme Name : Medical Microbiology

Programme Level : Master of Science (X) Doctor of Philosophy ()

Department : Medical Microbiology



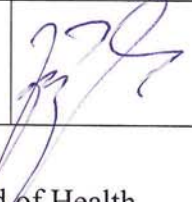
Student Name and Surname: Nimet KARADELI

Title of the Thesis : Genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex strains

Examination Place : Canakkale Onsekiz Mart University, Medical , Medical
Faculty, Terzioglu Campüs

Examination Date : 22.07.2016

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved as a Master of Science Thesis.

Supervisor (Title and Name)	Institution	Signature
Prof. Dr. Ahmet Unver	Canakkale Onsekiz Mart University Medical School	
Members of Examination Jury (Titles and Names)		
Prof. Dr. Muserref Tatman Otkun	Canakkale Onsekiz Mart University Medical School	
Prof. Dr. Ziya İlhan	Balıkesir University Veterinary School	

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated 19/08/16 and numbered 20/1.

BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8'de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

Tarih:

Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Nimet KARADELİ

İmza:

ÖZET

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTK) olarak tanımlanan mikroorganizma gruplarının neden olduğu kronik, nekrozitan bir hastalıktır. Tüberküloz, tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen, günümüzde önem kazanan hastalıklar arasındaki yerini korumaya devam etmektedir. Bu yüzden; daha hızlı, ucuz, duyarlı ve spesifik tanı yöntemleri kullanarak tanı ve tedaviye katkı sağlanması için bir çok araştırma geliştirme çalışmaları yapılmaktadır. Tüberkülozun toplum içerisindeki hızlı yayılım nedenlerinin anlaşılması ve daha etkili kontrol önlemlerinin geliştirilebilmesi için moleküler bazlı epidemiyolojik yöntemlerin yaygınlaşması gerekmektedir. Dünyada son yıllarda tüberkülozun moleküler epidemiyolojisiyle ilgili çalışmalarda görülen hızlı artışa karşın, ülkemizde MTK'in epidemiyolojik özelliklerini tespiti yönelik yapılan araştırmalar sınırlıdır. Bu yüzden çalışmamız, literatüre ışık tutarak, hem ulusal hemde yurt dışı alanda, hızlı tespit yöntemleriyle birlikte, etkili tedavide ışık tutacaktır. Bu çalışmada Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikobakteriyoloji Laboratuvarında, sıvı bazlı kültür sistemleriyle tanımlanmış MTK suşlarının PCR-RFLP yöntemi ile genotiplendirilmesi amaçlandı. Çalışmada, MTK olarak tanımlanan mikroorganizma grubunda, 1020 bp *gyrB* geni çoğaltıldıktan sonra *AfaI* and *TaqI* ile yapılan enzim kesim sonuçlarına göre, 75 (%98,7) izolat *M. tuberculosis* olarak ve 1 izolat (%1,3) *M. bovis* olarak belirlendi. MTK etkenlerin tiplendirilmesi hastalığın epidemiyolojisini daha iyi anlamaya ve daha etkin teşhis, tedavi ve kontrol yöntemlerinin alınmasına katkı sunabilecektir.

Anahtar Sözcükler: *gyrB*, MTK, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, PZR-RFLP.

ABSTRACT

Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains

Tuberculosis is chronic, necrotizing disease that caused group of microorganisms *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). Today, tuberculosis is continuing to maintain its place among the diseases gaining importance that is a treatable disease. Therefore; it is research and development works with using specific diagnostic methods that is faster, cheaper, and sensitive in order to contribute to the diagnosis and treatment. It should be widespread use of based on molecular epidemiological methods for understanding the reasons the rapid spread in society and development of more effective control measures of tuberculosis. In recent years, despite of the rapid increase studies of the molecular epidemiology of tuberculosis in the world, it is limited researches for detecting the epidemiological features of MTC in our country. So this study, shedding light on the literature, it is shed light on effective treatment together with the rapid detection methods both nationally and in the international in the area. In this study, aimed to genotyping with PCR- RFLP methods of MTC strains which identified with liquid-based culture systems on Canakkale Onsekiz March University, Research and Application Hospital, Department of Medical Microbiology, Mycobacteriology Laboratory by using PCR-RFLP method. The 1.020 bp fragment of *gyrB* genes of these isolates were amplified and restricted by endonucleases *AfaI* and *TaqI*. Based on this differentiation, 75 (% 98,7) MTC isolates were identified as *M. tuberculosis* while 1 isolate (%1,3) was determined as *M. bovis*. The typing of causative agents of tuberculosis in the area may potentially help better understand the epidemiology of tuberculosis and for effective diagnostic and preventive measures.

Key Words: *gyrB*, MTC, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, PCR-RFLP.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimin her aşamasında değerli fikirleriyle bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Ahmet Ünver' e,

Her zaman yanlarında çalışmaktan mutlu olduğum, bana her zaman bilgilerini ve görüşlerini sunmaktan vazgeçmeyen ve her yeni gün yeni bir bilgi edinmemi sağlayan çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Müşerref Otkun ve Sayın Doç. Dr. Alper Akçalı' ya,

Yüksek Lisans derslerim boyunca zevkle ve bilgiyle zaman geçirdiğim Sayın Yard. Doç. Ahmet Vural ve Sayın Yard. Doç. Dr. S. Zeynep Tekin' e,

Çalışmamızın güvenilirliği için pozitif kontrol örnekleri bize ulaştıran, Sayın Prof. Dr. Rıza Durmaz ve Sayın Dr. Mustafa Karataş' a,

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, dostluk, arkadaşlık ve hatta aile kavramını çok iyi hissettiren, her durumumda sıcaklıklarını hissettiğim başta Lab. Fidan Ünal ve Sayın Vildan Düzdağ olmak üzere diğer tüm çalışma arkadaşlarıma,

Çanakkale' de edindiğim ve bir ömür yanımda olmalarını temenni ettiğim hem iş hem okul arkadaşlarım Bio. Mümin Sargın, Bio Narçın Muriqi, Uzm. Bio. Sinem Kulaksız, Dyt. Zeynep Sivaslı ve Uzm. Hem. Derya Avcı' ya,

Sevgileriyle desteklerini esirgemeyen ve aile bütünlüğünü en içten yaşattıran, annem Kadriye Karadeli, babam Siyami karadeli, ablam Meral Karadeli, kardeşlerim Ayşe Açikkol, Kıymet Açikkol, Beytullah Açikkol ve sevgili yeğenim Zekiye Şöyle' ye,

Hem işimde, hem eğitimimde, hemde kalbimde özel bir yeri olan, sevgi, bilgi ve zamanıyla her zaman yanımda olan ve olduğunu hissettiren çok değerli eşim Uzm. Bio. Ümit Karadeli' ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ve her şeyimi borçlu olduğum canım babam Mehmet Açikkol ve biricik annem Halime Açikkol. Sizleri rahmet ve özlemlerle anıyorum...

Bir yüksek lisans tezi olan bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi (BAP) tarafından **TYL-2015-476** proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	İ
THESIS APPROVAL FORM.....	İİ
BEYAN FORMU.....	İİİ
ÖZET.....	İV
ABSTRACT.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	İX
TABLO LİSTESİ.....	XI
ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ.....	XII
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Tarihçe.....	3
2.2. Epidemiyoloji.....	6
2.2.1.Dünyada Tüberküloz.....	7
2.2.2.Türkiye’ de Tüberküloz.....	9
2.3.Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikleri.....	11
2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması.....	13
2.5. Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı.....	15
2.5.1. Mikroskopi.....	15
2.5.2. Kültür.....	17
2.5.3. Fenotipik Yöntemler.....	18
2.5.4. Genotipik Yöntemler.....	19
2.6. Mikobakterilerin Tiplendirilmesi ve PZR-RFLP Yöntemi.....	20
2.7. <i>M. bovis</i> ’in Tüberküloz Etiyolojisinde Önemi.....	23
3.GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	25
3.1.Kullanılan Gereçler.....	25
3.2. Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler.....	25
3.3.Materyal Seçimi.....	26
3.4.Yöntemler.....	27

3.4.1. <i>M. tuberculosis complex</i> Suşlarının Taze Kültürü.....	27
3.4.2. DNA Ekstraksiyonu	27
3.4.3. PZR- RFLP Yönteminin Uygulanması.....	29
4.BULGULAR.....	31
5.TARTIŞMA.....	35
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
7.KAYNAKLAR.....	41
8.EKLER.....	46
Ek-1 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ciltli Tez Yazım Kontrol Listesi.....	46
Ek-2 Etik Kurul Onay Formu.....	47
9.ÖZGEÇMİŞ.....	48

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

µl: Mikro litre.

⁰C: Santigrad derece.

AD: Anabilim Dalı.

AIDS: Oto immün yetmezlik sendromu (Auto iImmune Deficiency Syndrome).

AMTD: Amplified *M. tuberculosis* Direct test

ARB: Aside Dirençli Basil.

ART: Anti Retroviral Tedavi.

BCG: Bacillus Calmette-Guerin.

bp: Baz çifti (Baz pair).

BSA: Bovin serum albumin.

CPT: Co-Trimoxozole Tedavisi.

ÇOMÜDAM: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deney Hayvanları Araştırma

DOTS: Doğrudan gözetimli tedavi stratejisi.

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü.

EBr: Etidium bromid.

EDTA: Etilen Diamine Tetra Asetik asit.

EMB: Etambutol.

EZN: Erlich Ziehl Neelsen.

gr: Gram.

HCL: Hidro Klorik asit.

HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus).

INH: İzoniazid.

LAMP: Loop-Mediated-zotermal Çogaltma.

LED: Işık yayan diot (Light Emitting Diodes).

LJ besiyeri: Löwenstein Jensen besiyeri.

MDR: En az iki majör ilaca dirençli bakteri.

Merkezi.

MgCl₂: Magnezyum Klorür.

MGIT: Mikobakteri gelişimini uyarıcı tüp (Mycobacterium Growth Indicator Tube).

ml: Mili litre.

MOTT: *Mycobacterium tuberculosis* dışı Mikobakteri.
MTK: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks.
NAP: P-nitro-alfa-acetyl-aminobeta hydroxypropionate.
PAS: P- aminosalisilik asit.
PPD: Pürifiye Protein Derivatifi.
PZA: Pirazinamid.
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu.
RE: Restriksiyon enzimi.
RFLP: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi.
RIF: Rifampisin.
rpm: Dakikada devir sayısı (Revolution per minute).
rRNA: Ribozomal RNA.
RT: Tersten işleyen Transkriptaz enzimi (Reverse Transkriptase).
SDA: Zincir ayrıştırma amplifikasyonu (Strand Displacement Amplification).
TB: Tüberküloz.
TBE: Tris Buffer EDTA.
TCH: Thiophene-2- Carboxylic Acid Hydrazide.
TK besiyeri: Katı fazlı besiyeri.
TMA: Transkripsiyona bağlı çoğaltma (Transcription-Mediated Amplification).
VSD: Verem Savaş Dispanseri.
XDR: İki minör ilaca dirençli bakteri.

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. DSÖ Bölgelerine Göre Tahmini TB Hastalık Yüğü, 2010 (Yüz bin nüfusta).....	8
Tablo 2. Türkiye Tüberküloz Profili 2014	10
Tablo 3. Mikobakterilerin Woods ve Wahington Tarafından Sınıflandırılması.....	14
Tablo 4. EZN boyamada ARB değerlendirme tablosu.....	15
Tablo 5. <i>M. tuberculosis</i> complex türlerinin bazı biyokimyasal özellikleri.....	19
Tablo 6. <i>RsaI/AfaI</i> , <i>TaqI</i> ve <i>SacII</i> enzimleriyle MTK türlerinin RFLP paternleri.....	23
Tablo 7. Çalışma gruplarının dağılımları.....	31
Tablo 8: <i>gyrB</i> geninde <i>AfaI/RasI</i> , <i>TaqI</i> ve <i>SacII</i> enzimlerinin temsili aktivitesi.....	33
Tablo 9. MTK içerisinde bulunan türlerin çalışmadaki dağılımları.....	34

ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ

	Sayfa
Resim 1: Sıvı kültür örneğinden alınmış EZN boyamada kord faktör görüntüsü.....	11
Resim 2: EZN boyama ile ARB pozitif bakterilerin mikroskopik görüntüsü.....	13
Resim 3: LED floresans mikroskopta mikobakteri görüntüsü.....	16
Resim 4: Kullanılan mikobakteri kültür sistemleri.....	17
Resim 5: TK besiyeri görüntüleri.....	18
Resim 6: MTK tespit edilmiş hızlı ID test.....	21
Resim 7: RsaI restriksiyon enziminin <i>gyrB</i> genindeki aktivitesi.....	23
Resim 8: Çalışmadaki temsili örneklerden <i>gyrB</i> gen amplifikasyonunun agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.....	32
Resim 9: <i>AfaI</i> enzimiyle kesim işlemine alınan <i>gyrB</i> amplikonlarının agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü	33
Resim 10: <i>TaqI</i> enzimiyle kesim işlemine alınan <i>gyrB</i> amplikonlarının agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü	34

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tüberküloz; geçmişten günümüze dünyanın tüm coğrafyalarında yaygın, bulaşıcı ve ölümcül bir hastalık olarak bilinmektedir. Tüm bilinenlere rağmen yılda üç milyonu aşkın kişi bu hastalıktan dolayı ölmektedir. Yaşayan insanların üçte biri mutlaka bu hastalık ile karşılaşmıştır. (<http://www.who.int>, Erişim tarihi: 22 Şubat 2016)

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTK) olarak tanımlanan mikroorganizmaların neden olduğu, kronik ve nekrotizan bir hastalıktır (<http://www.who.int>, Erişim tarihi: 22 Şubat 2016). Dünya Sağlık Örgütü' nün bildirimleri, dünyadaki insanların üçte birinin *Mycobacterium tuberculosis* basilini vücuduna aldıkları yönündedir ve özellikle HIV virüsünün neden olduğu hastalıkların ortaya çıkmasından sonra, sosyo ekonomik düzeyleri kötü olan ülkelerde tüberküloz kontrol programlarının çökmesi epidemiyi artırmıştır. Göçlerden dolayı ise bu durum gelişmiş ülkeleri de içine alarak pandemi haline dönüşmüştür. Her yıl dünya ülkelerinden bildirilen duruma göre, 9 milyon kişi yeni akciğer tüberküloz vakası olarak kayıtlara geçmektedir. Bu vakaların çoğu genç yetişkindir ve yaklaşık olarak 2-3 milyon kişi bu hastalıktan yaşamını yitirmektedir (Karacalı A., 2010). *M. tuberculosis* insidansının artmasıyla birlikte en az iki majör ilaca dirençli (MDR) ve iki minör ilaca dirençli (XDR) suşları ortaya çıkmıştır. Bu anti-tüberküloz ilaçlarına karşı gelişen MDR ve XDR tüberküloz enfeksiyonu klasik tüberküloz enfeksiyonuna göre daha agresif ve ölümcül seyreder. Bu yüzden tüberküloz, önemi sürekli artan dünya çapında bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. MDR ve XDR gelişmiş suşların tür düzeyinde tanımlanarak yayılımlarının engellenmesi oldukça önemlidir. Tüberküloza bağlı ölüm oranlarının düşürülmesinde yüksek hassasiyet göstermesine rağmen daha ucuz olabilen tanıya yönelik yöntemler ve daha etkili tüberkülozla savaşan ilaçların giderek geliştirilmesi her açıdan önem taşımaktadır. Bundan dolayı da tüberküloz epidemiyolojisi çok iyi anlaşılmalıdır (Köksal F., 2003).

Toplum sağlığını tehlikeye sokmasından dolayı önemini yüksek tutan tüberkülozun toplum içerisindeki yayılma nedenlerinin ortaya çıkartılması ve etkisi güçlü olan kontrol önlemlerinin geliştirilerek artırılması adına, moleküler temelli epidemiyolojik yöntemlerin geliştirilmesi ve yaygınlaştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmaya Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarında, 01.01.2013 ve 31.12.2013 tarihleri arasında hasta örneklerinden izole edilip, tanımlanmış ve uygun şartlarda saklanmış MTK bakterileri ve kontrol grubu olarak referans laboratuvarları tarafından tanımlanmış *M. bovis* ve *M. tuberculosis* suşları dahil edilmiştir. MTK suşlarını, PZR-RFLP yöntemi ile tanımlayıp, sonucunda, bu gruba ait türlerin dağılımının belirlenmesi hastalığın epidemiyolojisini daha iyi anlamaya katkı sağlayacaktır. Ülkemizde *M. bovis* ve *M. caprae* gibi MTK üyelerinin belirlenmesi, bu üyelerin epidemiyolojisi ve klinik önemini anlamak için esastır. Çoklu ilaç direncine sahip suşların yayılımını engelleyebilmek için, tür tanımlanması önemlidir. Tür tanımlama çalışmaları rutin yöntemler arasına girdiğinde, hastaya etkili tedavinin başlanması hasta açısından bireysel, yayılımın engellenmesi açısından sosyolojik öneme sahiptir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Tüberküloz (TB) etkenlerinin varlığı, birçok teoriye göre insanlığın ortaya çıkışından çok öncelere dayanmaktadır. Fakat TB hastalığı; insanın daha iç içe olduğu toplu yaşama geçtiği dönemlerde fark edilmiştir. Zamanla toplumları büyük zararlara uğratmış hatta kitlesel ölümlere neden olmuştur. Kıtalararası ulaşım, göçler hastalığın daha çabuk yayılmasında etken olmuştur. Zengin ülkeler, bulaşmanın sonuçlarını fark ettikten sonra, toplumların fakir olmasının başlı başına etken teşkil ettiğini saptadılar. Bu yüzden hem ulusal hem de uluslar arası sağlık kuruluşları takip ve tedbirleri oluşturulmuştur (Seber E., 2010).

TB hastalığının sebebinin ne olduğu hakkında görüş ayrılığı ilk başlarda yaşanmıştır. Bazılarına göre hastalık genetik etiyojolojiye dayanıyordu, bazılarına göre ise kötü beslenmeden kaynaklanıyordu. TB hastalığının özelliklerini ilk olarak askeri bir hekim olan Fransız Jean Villemin ortaya koymuştur. İzlemleri sırasında, hastalığın oluşmasına bir mikroorganizmanın sebep olabileceğine inanıyordu ve bu inancını hiç bırakmayarak, TB hastalığının sebebinin bir mikroorganizma olduğunu ve bu hastalık oluştuktan sonra başka insanlara da bulaşacağını ispatladı. “Tüberkülozun Nedeni ve Özellikleri ile İnsandan Tavşana Bulaştırılması” adındaki eserini 1765 yılında yayınladı. Sonraki yıllarda tüberkülozlu balgamı, tavşanlara ve maymunlara enjekte ederek onları hasta ettiğini açıkladı (Dormandy T., 1999). 1940’ ta, Koch’ un hocası olan Jacop Henle, enfeksiyon hastalıklarında mikrobun tam izolasyonu için gerekli olan bazı koşullar ortaya sürdü. Bu koşullar, hastalık belirtisi görülen bölgede etkenin gösterilmesi, etkenin bu bölgeden izole edilmesi ve saf kültürde üretilmesidir. Koch hocasının öne sürdüğü bu koşulları deney hayvanlarında gerçekleştirdi. Koch, 1876 yılında bu koşulları göz önünde bulundurarak *Bacillus*

anthracis, *Kolera vibrio* bakterilerini bilim dünyasına kazandırdı (Dormandy T. 1999, Haggard HW., 1989).

Robert Koch 1882 yılında, vereme yakalanmış herkeste TB basilini mikroskopta gözlemledi. Bunun sonunda “Tüberküloz bulaşıcı bir hastalıktır fakat bu hastalık tedavi edilebilir ve hatta bu hastalıktan korunulabilir” tezini bilim dünyasına sundu (Dormandy T., 1999).

Yirminci yüzyılın başlarına doğru ilk senatoryumun açılmasıyla birlikte tüberküloz tedavisi için bambaşka yaklaşımlar başlamıştır. Seibert 1930’lu yılların sonlarına doğru tüberkülin proteinini saflaştırarak elde edilen Pürifiye Protein Derivatifi (PPD) ile tüberküloz enfeksiyonunun tespit edilmesine olanak sağlamıştır. Calmette ve Guerin, 1921 yılında ilk tüberküloz aşısı olan *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG)’i insanlığa kazandırmışlardır. Fransa’ da geliştirilen bu aşı ikinci Dünya Savaşından sonra tüm dünyada yaygın olarak kullanılarak günümüze kadar gelmiştir (Barış Yİ. 2002, Karacalı A., 2010).

Osmanlıda TB hastalığının etkisi, Topkapı ve Dolmabahçe Sarayında görülmüştür. III. Selimin değer verdiği Safinaz isimli kadının, Kafkasya’dan göç eden bir ailenin kızı olduğu bilinir. Genç kız giderek zayıflayıp öksürük nöbetlerine tutulduğu için saray doktorları tarafından tedavi edilmek istenmiştir. Kendisine ince hastalık teşhisi ve Gallopan Ftizi teşhisi konmuştur. III. Selim’in Safinaz’ın iyileştirilmesi için gösterdiği gayretler işe yaramamıştır (Barış Yİ., 2002). Osmanlıda yapılan nüfus sayım verilerine göre, XX. Yüz yılda (yy) İstanbul’ un nüfusu 1,2 milyondur. Yılda 2 800 kişinin akciğer vereminden öldüğü bildirilmiştir ve bu rakam genel ölümlerin % 15,8’ ine tekabül etmektedir. İzmir’in nüfusu 200 000 iken, 1892-1914 yılları arasında ölen 92 942 kişinin 14 700’ü veremden ölmüştür (Unat EK., 1979).

Yaşam standartlarının giderek iyileşmesiyle birlikte, Amerika ve Batı Avrupa ülkelerinde uygulanmaya başlayan tedavi ve yayılmayı önlemeye yönelik planlarla yüzyıl sona ermeden enfeksiyonun insidansı düşmeye başlamıştır. Bu iyi gelişme tüberkülozun XXI. yy başlarında hemen hemen tamamen yok edilebileceği umudunu yeşertmiştir. Tüberküloz görülme sıklığındaki düşüşün 1984 yılında durmasıyla

birlikte hayal kırıklıkları boy göstermiştir. Bu durum birkaç yıl sürdükten sonra, 1988-1994 yılları arasında Batı ülkelerinde de yıllık vaka sayısı artmıştır. Genel olarak yetişkin hastalığı olmakla birlikte, genç erişkinlerde (25-44 yaş) ve çocuklar arasında daha çok görülmeye başlanmıştır. Amerika’ da görülme yoğunluğunun artışı ve görülen yaş grupları arasındaki farklılık, enfekte göçmen sayısının fazlalığına, evsizler, intravenöz ilaç kullananlar ve HIV enfeksiyonlarına bağlanmıştır. Kalabalık ve havasız ortamlarda hastalığın geçişi daha kolay olduğundan dolayı, bakım evleri, evsizlerin barınakları ve hapishanelerde yaşayanlar büyük risk altındadır. Batı ülkelerinde tüberküloz hastalığının görülme sıklığı azalmasına rağmen bazı Asya ve Afrika ülkelerinde yılda 300/100 000’den fazla yeni olgu bildirilmektedir. Amerika’ da bu oran 6,8 /100 000’ dir. Bu Asya ve Afrika ülkelerinden bazılarında, HIV ile enfekte popülasyonun yaklaşık % 50’ si aynı zamanda MTK ile enfektedir (Harvey ve Champe, 2006).

1940’larda streptomisin ABD’de, PAS (P- aminosalisilik asit) ’ın İsveç’te bulunması ve kullanıma başlanması ile birlikte tüberküloz tarihinde yeni bir döneme girilmiştir. İlk başlarda, tekli kullanılan bu ilaçlara zamanla direnç gelişmiştir ve bu durum yeni ilaç bulma çabalarının başlamasına neden olmuştur. Robizek ve Selikof tarafından izoniazid (INH) geliştirilmiştir. 1952 yılından itibaren bu üç ilaçla 18-24 ay süren kombine tedaviler başlamıştır. Bu üç ilacı takiben 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında etambutol (EMB) ve 1966 yılında rifampisin (RIF) tedaviye kazandırılmıştır (<http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdernot.htm>, Erişim tarihi: 23 Şubat 2016).

Mikobakterilerin ataları olarak kabul edilen suşlar, büyük bir ihtimalle hala günümüzde varlıklarını koruyan mikobakterilerden ibarettir. Konak ve mikobakterilerin paralel evrimine ait hipotez 1950’li yıllarda ortaya atılan “*M. tuberculosis*’in *M. bovis*’ten türediği” görüşü uzun yıllar kabul görmüştür. Bu görüşe karşın, Brosh 2002 yılında bir evrim ağacı ortaya koydu ve bu ağaca göre, *M. tuberculosis*, *M. bovis*’ ten farklıdır ve TbD1 mutasyonu sonucunda yeni suşlar ortaya çıkmıştır. Öyle ki *M. bovis* diğerlerine göre daha küçük gen yapısına sahiptir ve büyük olasılıkla birbirini takip eden çok sayıda mutasyon sonucu ortaya çıkmıştır.

Günümüzdeki verilerin gösterdiği üzere, insan tüberkülozunun Doğu Afrika'da ortaya çıktığı ve dünyaya yayıldığı tezini doğrular niteliktedir. (Zeytinli Ü., 2010).

2.2. Epidemiyoloji

Aktif pulmoner tüberkülozlu hastalar öksürme yolu ile etrafına onlarca basil saçarlar ve havada damlacık içinde asılı basillerin oluşmasını sağlarlar. Değişken çevre şartlarına dirençli olmalarından dolayı çevrede uzun süre hayatlarını sürdürebilirler. İnsandan insana bulaşma havada asılı duran damlacıkların inhalasyonu yolu ile olduğundan dolayı, enfeksiyonun kişiden kişiye geçişinde uzun süre aynı ortamda olmak büyük rol oynar. Enfekte bir kişi mikroorganizmayı bir arada bulunduğu insanlara aktarabilir. Birçok yayına göre tüberküloza duyarlılık ırklar arasında bile değişkenlik gösterir. Koyu tenli ırklar (Amerika'daki yerliler ve Hawaiiililer gibi) tüberküloza daha duyarlıdır. İkizler arasında enfeksiyonun sıklığını araştıran çalışmalarda, tek yumurta ikizlerinde, ikizlerden biri enfekte olduğunda diğerinde atak oranı % 75, ayrı yumurta ikizlerinde sadece % 25 olması bu hastalığa yakalanmada genetik faktörlerin rol oynadığı gösterilmiştir (Harvey ve Champe, 2006).

TB başlangıçtan günümüze kadar insanlığı tehdit eden en büyük sorunlardan biridir. Çünkü hastalık sadece bireyi değil, içinde yaşadığı tüm toplumu etkiler. Bireyden bireye atlayıp, şehirleri, ülkeleri dolaşan ve hatta kıtadan kıtaya geçen tehlikeli bir gezgindir. Bu sebeplerden dolayı, dünya çapında bu yayılıma dur denilebilecek programlar oluşturulmuştur ve bunlar iki çeşittir:

- Kişiye yönelik: Hastalığın tedavisi ve hastanın günlük aktivitelerini eski haline getirebilecek düzeye gelmesini sağlayacak programlar.
- Topluma yönelik: TB enfeksiyonunun hızla yayılımını azaltmak ve TB hastalığının toplumdan silinmesini hızlandıracak programlar (Demir T., 1999).

TB epidemiyolojisi, enfekte ve hastalıkla sonlanmış nüfus oranlarını belirler. İnfeksiyon havuzunun daraltılıp yok edilebilmesi için etkin bir tedavi ve hala

yürürlükte olan TB savaş programlarını değerlendirmeye olanaklar sağlar. Akciğer TB epidemiyolojisinde verilere ulaşmada gerekli incelemeler; tüberkülin deri testi, akciğer grafisi ve balgamın mikroskopik incelemesidir (Kara İH., 2007).

2.2.1. Dünyada Tüberküloz

TB, son hazırlanan istatistiklere göre, HIV/AIDS'den sonra yetişkinlerde en çok ölüme neden olan ikinci enfeksiyon hastalığı olarak ciddiyetini halen devam ettirmektedir.

Sosyo-ekonomik durumlara bağlı sorunlar, sürekli bölgesel yer değiştirmeler, uluslar arası göçler, tüm ülkelerde uygulamaya konulan TB kontrol programlarının ihmal edilmesi, HIV salgınlarının baş göstermesi gibi nedenlere bağlı olarak, TB son 30 yıl içinde insidansında önemli artışlar kaydedilen bir hastalıktır. Uygulanan kötü kontrol programlarına bağlı olarak kazanılmış ilaç direnci oranı artmıştır. Özellikle “Çoklu İlaç Dirençli Tüberküloz” kavramının ortaya çıkması insan sağlığını negatif yönde etkilemeye başlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bu olumsuz gelişmelere karşılık 1993 yılında TB konusunu kırmızı alarımla, dünya çapında acil durum olarak ilan etmiştir. Bütün ülkelere oluşturduğu “Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisini (DOTS)” uygulamaları için öncülük etmiştir. DOTS balgamın mikroskopik araştırılmasının daha yaygın olması sonucunda bulaştırıcı olguların tespit edilmesi ve doğrudan gözetimli tedavi ile tedavi garantisinin sağlanması temeline dayanır. Uygulamaya geçirilen bu programın hedefi, tespit edilen tüm yayma pozitif olguların % 70' ine tanı konularak, bu tanı konuların ise en az % 85' nin kür edilmesidir. DOTS' ni kullanan ülke sayısı arttıkça, bakteriyolojik tanı oranları ve buna bağlı olarak tedavi başarıları da dünya çapında artmıştır. Afrika ülkelerinde HIV prevalansı yüksek olduğundan, Güneydoğu Asya ülkeleri ve eski Sovyetler Birliği ülkeleri başta olmak üzere, birçok ülkede hastalık insidansı gözle görülür şekilde etkilenmemiştir. Bazı ülkelerde ise artış sürmektedir (Kılıçaslan Z., 2007).

Tablo 1. DSÖ Bölgelerine Göre Tahmini TB Hastalık Yüğü, 2010 (Yüz bin nüfusta)

BÖLGE	Nüfus	Mortalite*	Prevalans*	İnsidans*
Afrika	836 970 000	30	332	276
Amerika	933 447 000	2,2	36	29
Doğu Akdeniz	596 747 000	16	173	109
Avrupa	896 480 000	6,8	63	47
Güney Doğu Asya	1 807 594 000	27	278	193
Batı Pasifik	1 798 335 000	7,5	139	93
DÜNYA GENELİ	6 869 573 000	15	178	128

*Hızlar, nokta tahmin değerlerini göstermektedir (TC Sağlık Bakanlığı., 2013).

Tablo 1’de DSÖ’ nün 2010 tahmini TB hastalık yükü verilerinin, 2012 yılında incelendiği raporu gösterilmiştir. Bu tablo incelendiğinde mortalite, prevalans ve insidansın en fazla görüldüğü bölge Afrika bölgesidir. Bu bölgeyi sırasıyla Güney Doğu Asya bölgeleri ve Doğu Akdeniz bölgeleri izler.

TB hastalığı kontrolü için; Stop TB Stratejisi, Binyıl Kalkınma Hedefleri, Dünya, Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi ve Sağlık Asamblesi Kararları kapsamında belirlenmiş hedefleri aşağıdaki gibi sıralanılabilir.

- TB insidans hızı artışının 2015 yılına kadar durdurulup geriye azalır şekle dönüşmesini sağlamak: İnsidans hızı, azalmakta olup 1990 yılında 52/100 000 iken 2011 yılında 4/100 000 ve 2012 yılında 22/100 000 şeklinde veriler arasına girmiştir.
- 1990 yıllarındaki TB prevalans seviyesinin yarısını, 2015 yılına kadar yakalamak: Prevalans, TB kontrol programları için önemli bir göstergedir ve 1990 yılında 51/100 000 iken 2012 yılında 23/100 000 olarak veriler arasına girmiştir.
- 1990 yılındaki TB’den ölüm hızının yarısını, 2015 yılına kadar yakalamak: Bu hız 1990 yılında 6,2/ 100 000 iken 2012 yılında 0,52/ 100 000 olarak hesaplanmıştır.

- Yayma pozitif olgularda, tedavi başarısının 2005 yılına kadar % 85 ve üstünde yapma: Bu hedefe 2004' te ulaşılmıştır ve 2011 yılı yayma pozitif TB olguların da tedavi başarısı oranı % 90'lara ulaşmıştır.
- 2050 yılına kadar küresel TB insidansını 1/1 milyonun altına düşürmek. Tüberkülozda eliminasyon, TB insidansının milyonda bir vakanın altında olmasıdır. Bu konuda dünya geneli için belirlenen hedef, 2050 yılıdır (TC Sağlık Bakanlığı., 2014).

2.2.2.Türkiye’de Tüberküloz

Türkiye’ de Veremle Savaş Cemiyeti 1918 senesinde kurulmuştur ve bu yıllardan itibaren tüberkülozla mücadele devam etmiştir. 1950 ve 1975 yıllarında hastalık prevalansı sırasıyla, % 0,25 ve % 0,1 olarak kayıtlara geçmiştir. Bu veriler dikkate alındığında, bu dönemler arasında yıllık enfeksiyon risk oranında % 10’ luk bir azalmanın olduğu dikkat çekmektedir. 1970 yıllarında resmi organlar tarafından “tüberküloz kontrol altına alınmıştır” şeklinde yapılan açıklamalar, halkın ve sağlık bakanlığının tüberküloza olan ilgisinin giderek azalmasına neden olmuştur. 1977 yılından sonra ki çalışmalarla, bu hastalığa karşı başta kişisel önlemler olmak üzere alınan diğer önlemlerin azalmasıyla birlikte enfeksiyon riskinin arttığı ispatlanmıştır (Karacalı A., 2010).

Son yıllarda bilgisayar sistemlerinin gelişmesiyle birlikte, veri depolama açısından gelişmeler olsa da, ülkemizde hasta bildirim ve kayıt sistemlerinde bir takım sorunlar devam etmektedir. Eldeki veriler genel olarak Verem Savaş Dispanserlerinden (VSD), Verem Savaş Daire Başkanlığına bildirilen verilere dayanmaktadır (Kılıçaslan Z., 2007).

VSD’ lerin 2010 yılı kayıtlarına göre, 16 551 tüberküloz hastası mevcuttur. Toplam olgu hızı yüz binde 24’den yüz binde 22,5’e düşmüştür. (TC Sağlık Bakanlığı., 2013).

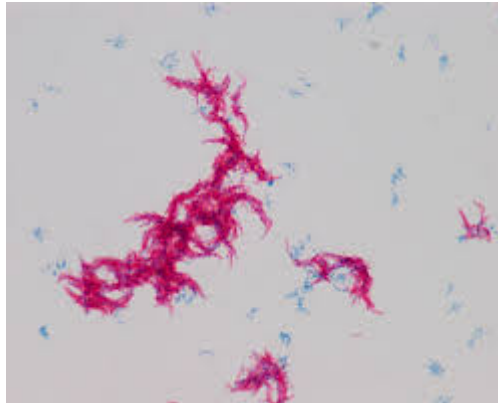
Tablo 2. Türkiye Tüberküloz Profili 2014 (www.who.int/tb/country, Erişim tarihi: 26 Şubat 2016).

2014 Tahmini TB Yüğü	Sayı (1000' de)	Oran (100 000 kişide)
Mortalite (TB)	0,47 (0,4-0,55)	0,61 (0,52-0,7)
Mortalite (HIV+TB)	<0,01(<0,01-0,012)	0,01 (0,01-0,02)
Prevelans (HIV+TB)	17 (8-30)	22 (10-39)
İnsidans (HIV+TB)	14 (12-16)	18 (16-21)
2014 TB Olgu Bildirimi	Yeni	Nüks
Pulmoner, bakteriyolojik olarak doğrulanmış	5799	568
Pulmoner, klinik teşhis konulmuş	1897	119
Ekstrapulmoner	4557	168
Toplam yeni ve nüks vaka		13108
Tedavi olmuş, nüks etmemiş vaka		270
Toplam doğrulanmış vaka		13378
TB/HIV 2014	Sayı	%
HIV durumu bilinen TB hastaları	9344	70
HIV pozitif TB hastaları	45	<1
Co-trimoxozole tedavisi altındaki TB hastaları (CPT) HIV pozitif TB hastaları	13	29
Antiretroviral tedavi (ART) altındaki HIV pozitif TB hastaları	28	62
İnsidans (TB)	0,045 (0,035-0,057)	0,06 (0,05-0,07)
2014 Laboratuvar TB Tespiti		
Yayma (100 000 kişide)		0,5
Kültür (5 milyon kişide)		9,9
İlaç Duyarlılık Testi (5 milyon kişide)		4,9
Xpert MTB/RIF Tespit edilen		24
İkinci kuşak ilaç duyarlılık testi mevcut mu?		Evet

DSÖ' nün 2015 yılında bildirdiğine göre, Türkiye' nin 2014 yılındaki TB durumu Tablo 2' de verilmiştir. Bu tabloya göre mortalite oranı 0, 01/100 000; prevelans 22/100 000; insidans 18/100 000' dir. Bu oranlar TB hastalığı yanında HIV hastalığını bulunduran bireyleri de içermektedir. Sadece TB olanların mortalite oranı ise 0, 61/100 000' dir. Laboratuvar' da yapılan tespitlere göre, yüz bin kişide 0,5 oranında yayma pozitif olgu, beş milyon kişide 9,9 oranında kültür pozitif olgu bildirilmiştir.

2.3. Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikleri

Mikobakteriler aerop, sporsuz, katalaz pozitif, kıvrık veya düzgün çomak şeklinde dallanmış mikroorganizmalardır. Üreme ortamı ve süresi, basilin büyüklüğünü ve şeklini değiştirebilir. Makrofaj içerisinde aktif çoğalan basiller normalden biraz daha uzundur ve tomurcuklanma benzeri yapı sergilerler. Patojen basiller, bölünmelerini takiben birbirlerinden ayrılmazlar ve kümeler şeklinde çoğalırlar. Bu kümeler kord faktör (serpentine cord) olarak isimlendirilir (Resim 1). Kord faktör oluşturma özelliği hidrofobiteden kaynaklanmaktadır. Koloni şekilleri, tür tespiti veya hastalık yapma özelliği için kesin bulgu olamaz (Köksal ve Yaman, 2003).

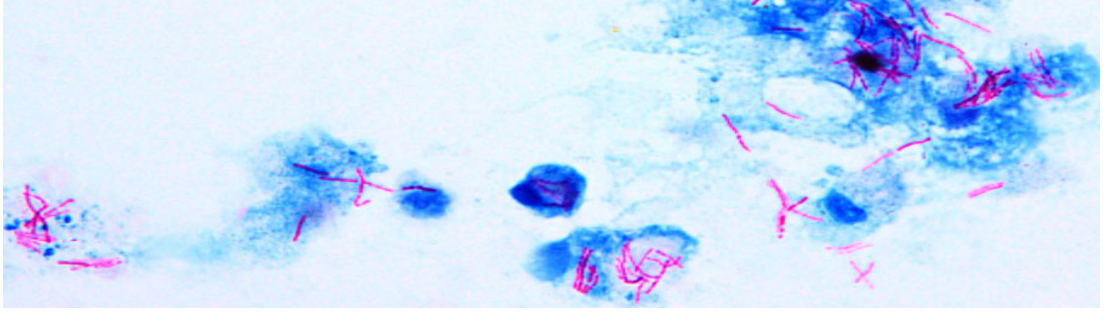


Resim 1. Sıvı kültür örneğinden alınmış EZN boyamada kord faktör görüntüsü (<https://www.studyblue.com>, Erişim tarihi: 12.07.2016).

Hücre duvar yapılarında arabinogalaktan, peptidoglikan, fosfotidilinozitolün glikozil derivatları, açıl trehaloz, oligosakkarid içeren lipidler ve mikolik asit mevcuttur. Temel olan bu yapılara ek olarak, antijenik özellik katan glikoproteinler ve porin yapılar da bulunabilmektedir. Mikolik asitler tüm hücre duvar ağırlığının % 50'sini, hücre lipidlerinin % 60'ını oluşturmaktadırlar. Mikolik asitler, mikobakterilerin en önemli virulans faktörlerindedir ve hücre duvarı permeabilitesini de etkilerler (Köksal ve Yaman, 2003).

Hücre duvarlarında peptidoglikan bulunduğundan dolayı mikobakterilerin gram pozitif bakterileri grubunda olduğu söylenemez. Duvar yapılarında protein ve polisakkaritlerin yerini lipid içerikli tabakanın yer alması gram pozitif bakteri duvar yapısı ile örtüşmez. Diğer bakterilerde olduğu gibi kapsül bulunmaz ama hücre duvarlarındaki fazla lipid katmanı, mikroorganizmayı çevresel koşulların etkisinden korur. Aynı zamanda normal boyalarla boyanamamasına neden olur. Bu nedenle mikobakterilerin boyanması alttan verilen ısı yardımıyla gerçekleşmektedir. Alkali anilin boya türevleriyle silik boyanırlar. Isı eşliğinde karbol fuksin uygulamasından sonra, asit alkol muamelesi ile dekolorize olmazlar ve karbol fuksin boyasını bırakmazlar. Bu yüzden aside dirençli basiller ismi (ARB) verilmiştir. Erlich Ziehl-Neelsen boya (EZN), Kinyoun Asit Fast gibi modifiye asidik boyalarla pozitif sonuç verirler. Bu boyamalarda basiller mavi zeminde kırmızı renkte görülürler (Resim 2). Mikobakteriler, yüksek duyarlılıklarından dolayı tercih edilen Auramin-Rodamin gibi floresan boya ile de kolay boyanırlar (Inderlied CB., 1999).

Mikobakteriler (*M. leprae* hariç) laboratuvar ortamlarında kültürü yapılarak üretilebilir. Üretilebilmeleri için yumurta içerikli veya agar içerikli hazırlanan besiyerleri (Löwenstein – Jensen Medium) kullanılır. Bunun yanında, yarı otomatize sistemlere entegre olan sıvı besiyerleri de (MGIT Broth) kullanılmaktadır. Katı besiyerleri genel olarak 3-6 hafta içinde bakteriyi üretir (Özkuyumcu C ve ark., 2009).



Resim 2. EZN boyama ile ARB pozitif bakterilerin mikroskopik görüntüsü (<http://veterinarymicrobiology.in/acid-fast-staining>, Erişim tarihi: 12.07.2016).

2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Actinomycetales takımında sınıflandırılmış olan *Mycobacterium* cinsi *Mycobacteriaceae* ailesinde yer alır. Toprakta yaygın olmak üzere tüm çevrede bulunan mikobakteriler, sığırlar evcilleştirilmeye başlandıktan itibaren insanlara bulaşmaya başlamıştır (Barış İY., 2003). *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium canettii* ve *Mycobacterium bovis BCG*'nin bakteriyolojik ve nükleik asit benzerlikleri temel alınarak “*M.tuberculosis complex*” (MTK) olarak bir grup altında toplanmışlardır (Çavuşoğlu C., 2003). AIDS 'in (Acquired Immune Deficiency Syndrome) ortaya çıkışından itibaren, diğer bazı mikobakteri türlerinin, MTK dışı mikobakterilerin (MOTT) (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis* ve *M. avium complex*) klinik öneminin anlaşılması, ilginin bu türler üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur (Barış İY., 2003).

1979'da Wolinski' nin klinikle uyumlu sınıflandırmasını dikkate alarak, 1987'de Woods ve Washington bir sınıflandırma oluşturmuşlardır (Wayne ve Kubica., 1986).

Tablo 3. Mikobakterilerin Woods ve Washington Tarafından Sınıflandırılması.

Klinik önemi olan mikobakteriler	İnsanda potansiyel patojen olan mikobakteriler
<i>M. tuberculosis</i> kompleks	<i>M. avium-intracellulare</i> kompleks
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. kansasii</i>
<i>M. bovis</i> (<i>M. bovis</i> BCG)	<i>M. fortuitum-chelonae</i> kompleks
<i>M. africanum</i>	<i>M. scrofloceum</i>
<i>M. microti</i>	<i>M. xenopi</i>
	<i>M. szulgari</i>
	<i>M. malmoense</i>
	<i>M. simiae</i>
	<i>M. genavense</i>
	<i>M. marinum</i>
	<i>M. ulcerans</i>
	<i>M. haemophilum</i>
	<i>M. celatum</i>

İnsanda nadiren hastalık yapan saprofitik türler		
Yavaş üreyenler	Orta hızda üreyenler	Hızlı üreyenler
<i>M. gordonae</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. thermoresistible</i>
<i>M. asiaticum</i>		<i>M. smegmatis</i>
<i>M.terrae-triviale</i> komp.		<i>M. vaccae</i>
<i>M. shimoidei</i>		<i>M. phlei</i>
<i>M. gastri</i>		<i>M. parafortuitum</i>
<i>M. nonchromogenicum</i>		
<i>M. paratuberculosis</i>		

2.5. Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı

TB solunum yolu örnekleri başta olmak üzere, bunun dışındaki diğer vücut sıvılarında *M. tuberculosis* tespit edilir. Balgam, endotrakeal aspirasyon, gastrik lavaj, bronkoalveolar lavaj yöntemleriyle alınan materyaller TB tespiti için sık kullanılır. Eğer hastada böbrek tüberkülozu düşünülüyor ise sabah idrarı bu inceleme için önemlidir. Son yıllarda her ne kadar moleküler tanı yöntemleri geliştirilerek ön plana çıkarılsada, tanıda, mikroskopide aside dirençli bakteri (ARB) aranması yanında Löwenstein Jensen (LJ) besiyerinde kültür "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Tedavinin etkinliğini izleyip aktif tüberkülozun çevreye yayılımını engellemek amacıyla kısa sürede sonuç veren yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Özkuyumcu C, 2009; Della-Latta ve Weitzman., 1998).

2.5.1. Mikroskopi

Tüberküloz araştırma amacıyla alınan materyallere ilk uygulanacak olan yöntem direkt mikroskopik incelemedir. Mikroskopik olarak bakterinin balgamda görülebilmesi için, en az $5-10 \times 10^3$ /ml basil olmalıdır. Laboratuvarlarda uygulanan ARB değerlendirme tablosu Tablo 4' te gösterilmiştir.

Tablo 4. EZN boyamada ARB değerlendirme tablosu.

X 1000 objektifle inceleme	ARB sayısı
ARB yok/ 300 alan	Aside dirençli bakteri görülmedi
1-2 ARB/ 300 alan	Şüpheli pozitif, örnek tekrarı önerilir
1-9 ARB/ 100 alan	(1+); Nadir ARB görüldü
1-9 ARB/ 10 alan	(2+); Az sayıda ARB görüldü
1-9 ARB/ alan	(3+); ARB görüldü
>9 ARB/ alan	(4+); Çok sayıda ARB görüldü

Dünya genelinde, yeni yayma-pozitif olguların % 70'nde basillerin tespit edilmesi başarı standardı olarak kabul edilir (Steingart KR ve ark., 2006). Yeni yayma-pozitif tüberküloz olgularının saptanmasında mikroskopik inceleme önemlidir (Perkins MD., 2000). Balgamın tüberküloz açısından mikroskopik incelenmesi, gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli pulmoner tüberküloz tanı yöntemlerinin başında gelir. Bu ülkelerde genellikle balgam örneği direkt olarak EZN ile boyanır. Mikroskopik incelemenin basit, hızlı, ucuz ve özgül bir yöntem olmasından dolayı, TB' nin endemik olduğu ülkelerde çok yaygındır. Bu konuda yapılan çalışmalara göre, mikroskopik inceleme duyarlılığı % 20-80 arasında değişmektedir (Trebucq A 2004, Van Deun A ve ark., 2000). Duyarlılık oranlarındaki farklı sonuçlar, kullanılan boyama yöntemi ve mikroskop kalitesiyle değişebilir. Aynı zamanda incelenen örneğin türü, yaymanın kalınlığı, dekolorizasyon süresi ve hatta incelemeyi yapan kişinin bu konudaki tecrübesiyle değişebilir. Mikroskopik inceleme için, EZN boyama, kinyoun boyama ve auramin-rodamin floresan boyama yöntemleri tercih edilen yöntemlerdendir. Mikroskopik incelemenin duyarlılığı kültür ve identifikasyon yöntemlerine göre daha düşüktür ama kültür sonuçlarının elde edilmesi birkaç haftayı bulabileceğinden dolayı, pozitif bir mikroskopik inceleme sonucu son derece önemli ve değerlidir. Kısaca, duyarlılığı çok yüksek olmayan bir yöntemin, yıllar boyunca gelişen teknoloji karşısında vazgeçilemeyen bir tanı aracı olarak kalabilmesi de bu durumu destekler niteliktedir (Alp A., 2011). Son yıllarda, DSÖ tarafından da önerilen, ışık mikroskobundan ve floresans mikroskoptan % 5-6 oranında daha fazla duyarlı olan LED Floresans Mikroskop (Light Emitting Diodes) ile incelemedir ve mikobakteri açısından görüntüsü Resim 3' te verilmiştir. (Sürücüoğlu S., 2013).

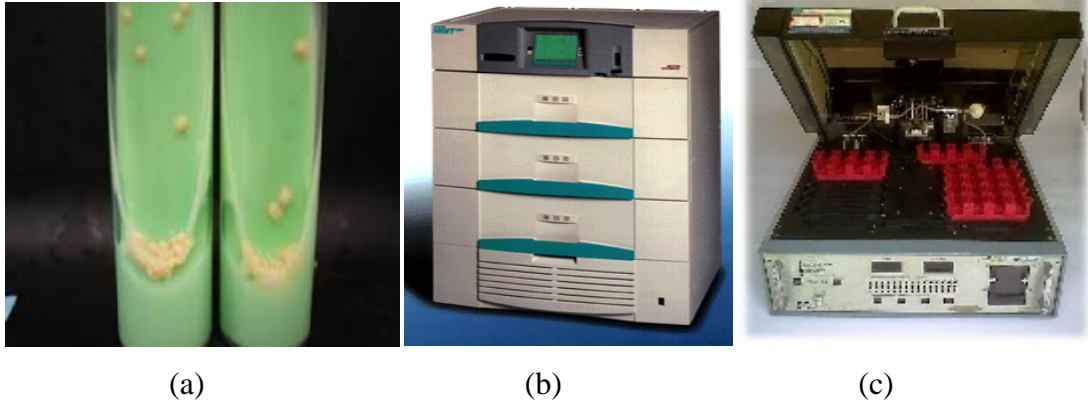


Resim 3. LED floresans mikroskopta mikobakteri görüntüsü (<https://www.klimud.org>, Erişim Tarihi: 12.07.2016).

2.5.2. Kültür

TB kültürü için yaygın olarak kullanılan katı besiyeri LJ besiyeri ve sıvı besiyeri sistemi ise BACTEC 460 TB radyometrik sistemidir (Siddiqi SH., 1989). LJ besiyeri, laboratuvar Őartlarında kolayca hazırlanabildiğinden ve ucuz olduğundan dolayı tercih edilir. Katı kültürden sonra, BACTEC 460 TB radyometrik sistemi hızlı ve güvenilir tanı sağladığından tercih edilen sistemler arasında yerini almıştır. Ancak ekim öncesinde ve sonrasında, laboratuvarda iŐ yükünü artırıcı ve iŐ kazalarına zemin hazırlayıcı gibi dezavantajları vardır.

Otomatize mikobakteri tanı sistemlerinden biri olan MGIT 960 sistemi, BACTEC 460 TB sisteminin olumsuz yönlerini azaltabilmek amacıyla üretilmiŐtir. Bu sistem, floresan veren bir indikatörün bulunduğu tüplerde bakterilerin üretilmesi esasına dayanmaktadır (Rishi S ve ark. 2007, Chan DS ve ark. 2008). MGIT 960 sisteminin kısa sürede sonuç vermesi en önemli avantajlarından biridir ve radyoaktif madde kullanılmaz. Bundan dolayı, günümüzde BACTEC 460 TB radyometrik sisteminin yerini almıştır (Resim 4).

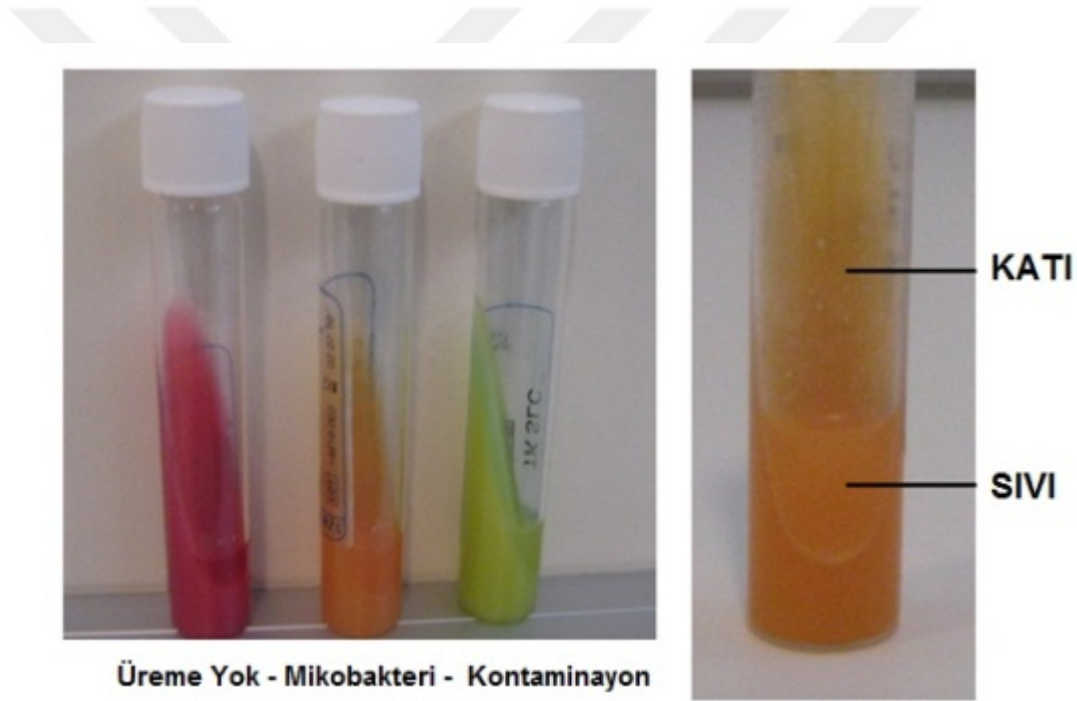


Resim 4. Kullanılan mikobakteri kültür sistemleri. a: LJ besiyerinde mikobakteri, b: MGIT 960 sistemi, c: BACTEC 460 sistemi (<https://www.klimud.org>, Erişim tarihi: 12.07.2016).

Middlebrook katı ve sıvı besiyerlerinin, hazırlanma aŐamalarında zorluklar vardır ve hazır alınmaları durumunda pahallıya mal olmaktadır. Bu yüzden fazla

tercih edilmemektedirler. Bunun yanında middlebrook katı besiyerleri, mikrokolonilerin erken dönemde saptanabilmesi amacıyla kullanıma oldukça uygundur. Kolonileri daha erken dönemde elde etmek amacıyla antibiyotik içeren selektif 7H11 besiyeri tercih edilir. Bu yöntem sayesinde koloni oluşumu bir hafta içinde saptanabilmektedir (Esteban J ve ark., 1996).

Hızlı bir TB tanı sistemi olan TK kültür sistemi, bazı merkezlerde yerini almıştır. Bu sistemde izolasyon için kullanılan TK besiyeri, çoklu renk indikatörleri kimyasından yararlanılarak hazırlanmıştır ve Resim 5' te gösterilmiştir (Baylan O ve ark. 2004, Kocagöz Tanıl., 2013).



Resim 5. TK besiyeri görüntüleri (<http://www.abmfuar.com>, Erişim tarihi: 12.07.2016).

2.5.3. Fenotipik Yöntemler

Genel olarak türlerin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde biyokimyasal reaksiyonlardan yararlanılmaktadır. Üreme hızları, koloni morfolojileri ve biyokimyasal testleriyle birlikte türler ayırt edilebilir. Çoğu bakteride sayıca daha az olan bu özellikler, MTK içinde yer alan türleri ayırt etmek için de yetersizdir. Bu

özelliklere ek olarak bazı biyokimyasal tepkimelerde bakılmalıdır ve bu kimyasal tepkimeler Tablo 5’ te gösterilmiştir. 1980’ li yıllarda, hücre duvarındaki mikolik asitlerin incelenmesi prensibi ile çalışan yüksek performanslı likid kromatografi ile mikobakterilerin identifikasyon metodu kullanılmaya başlanmıştır (Karacalı A., 2010).

Tablo 5. MTK türlerinin bazı biyokimyasal özellikleri.

Test	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. canettii</i>
BCG						
Koloni						
Morfolojisi	R	R	R	R	R	S
Pirazinamidaz	+	-	-	+	+	+
Niasin	+	-	-	+/-	+	-
Nitrat Kullanımı	+	-	-	+/-	-	+
Üreaz	+/-	-	+	+/-	+/-	+
TCH Duyarlılığı*	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Dirençli
Oksijen	Aerobik	Mikro Aerofilik	Aerobik	Mikro Aerofilik	Mikro Aerofilik	?
Pirüvat Kullanımı	-	+	+	-	-	-

* TCH: Thiophene-2- Carboxylic Acid Hydrazide

2.5.4. Genotipik Yöntemler

Tüberküloz tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin özgüllükleri oldukça yüksektir. Bu yöntemlerin özgüllüklerinin farklı olmasında, PZR yöntemiyle birlikte örnek türü ve örnek içindeki basil miktarıda önemlidir (Cheng ve ark., 2004). PZR’ ın hızlı ve güvenilir olduğunu kanıtlayan çalışmalar sonucunda PZR temelli birçok yöntem geliştirilmiştir. Tüberküloz PZR testleri içinde en ümit vadeden yöntemlerden biri, amplifikasyona dayalı olan yarı real-time özelliğinde “Xpert MTB/RIF” testidir (Alp A., 2011). Bu testin en önemli avantajlarından biri ise Rifampin için duyarlılık sonucuda vermesidir.

Solunum yolu örneklerinde TB etkenini tespit etmek için geliştirilmiş kitlerden biri “Gen Probe Amplified Mycobacterium Direct Test” (Gen-Probe)’tir. Test içeriği,

hedef molekül olarak seçilen rRNA saptanmasına dayanır. Bu şekilde duyarlılık artırılmıştır (Vlaspolder F ve ark., 1995).

Moleküler yöntemlerden bir diğeri olan, zincir ayrıştırma amplifikasyon (strand displacement amplification=SDA) yöntemi, özellikle solunum yolu örneklerinden tüberküloz basillerinin araştırılmasında oldukça kullanışlıdır. Bu yöntemi kültür ve mikroskopi pozitif örneklerle test ettiklerinde, tamamında pozitif sonuç alınmıştır. (Down JA ve ark., 1996).

LJ veya MGIT 960 sıvı ortamlarından alınan örneklerde tüberküloz basillerine özgü amplifikasyon (*IS6110* gen bölgesi primerleri ile) yapılarak, üreyen bakterinin MTK içinde olup olmadığı anlaşılabilir. Kısaca, mikobakterilerin tür tayininde tek gen amplifikasyonu ve akabinde enzim kesimi yöntemini içeren RFLP ile tayinler yapılmaktadır (Durmaz R., 2000).

2.6. Mikobakterilerin Tiplendirilmesi

MTK identifikasyon testi (BD, Polonya), EZN boya ile TB olduğu doğrulanmış pozitif MGIT tüplerinden alınan örnek üzerinde, MTK'nin kalitatif tespiti için kromatografik immüno testlerden biridir. MTK hücrelerinden protein türevi olan MPT64 salgılanır. Kültür tüpünden alınan örnekler test cihazına eklendiğinde, MPT64 antijeni, test stribine sabitlenmiş MPT64 antikoru ile bağlanır. Antijen-konjugat kompleksi, test stripi üzerinden reaksiyon alanına ilerler ve burada yakalanır (Resim 6). Bu sistemle hızlı olarak mikobakterinin MTK grubunda ya da MOTT grubunda olup olmadığı anlaşılır (Abdülmajed O., 2011).



Resim 6. MTK tespit edilmiş hızlı ID test; BD,Polonya. a: MTK ve b: MOTT (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Mikobakteriyoloji Laboratuvarı).

BACTEC 460 ve MGIT 960 sistemleriyle üretilmiş mikobakteriler NAP TB tür sistemiyle tayin edilebilirler. NAP (P-nitro-alfa-acetyl-aminobeta hydroxypropionate) kloramfenikol sentezinde bir ara üründür ve MTK olan mikobakterileri inhibe eder. Diğer mikobakteriler hafif veya hiç inhibisyon göstermezler (Abdülmajed O., 2011).

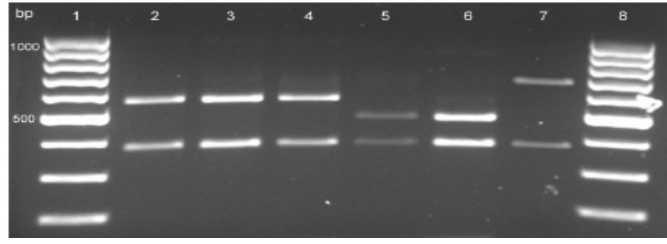
Amplified *M. tuberculosis* Direct test (AMTD) transkripsiyona bağlı çoğaltma (Transcription-Mediated Amplification: TMA) temeline dayanır. Bu yöntemde çoğaltılan hedef nükleik asit, rRNA (Ribozomal RNA)'dır. Önce RNA'nın "reverse transcriptase" (RT) enzimi ile DNA kopyası çıkarılır. Ürünler akridinyum ile işaretlenmiş özgül problarla hibridize edilir. Akridinyum parçalanarak açığa çıkan ışık, luminometrede ölçülür (Hanna and Musser., 2001). *M. tuberculosis* Amplikor Testi (Amplicor) PZR esaslı bir testtir. Bu yöntemde, mikobakteri DNA'sının 16S rRNA gen bölgesine ait tür spesifik primerler ve işaretli MTK'ya ait problar kullanılır (Hanna and Musser., 2001). Manuel Loop-Mediated-zotermal Çoğaltma (LAMP) testi, izotermal koşullarda *M. tuberculosis*'in 6 primer setini verimli şekilde çoğaltır. Test izotermal çoğaltma sıcaklığı olan 63⁰C'de aktif olan polimeraz enzimini kullanır (Abdülmajed O., 2011).

Real-time PZR amplifikasyon ve saptama işlemlerinin aynı ortamda gerçekleştiği yöntemlerden biridir. Bu yöntemde PZR sırasında oluşan ürünler özgül proplar veya çift sarmallı DNA'ya bağlanma özelliği gösteren boyalar (sebergreen, etidyum bromür vb) yardımıyla görüntülenmektedir (Soini ve Musser., 2001).

Cepheid GeneXPERT MTK/RIF sistemi, real-time PZR'ı ve rifampin direnci ile ilgili mutasyonlar için sahip olduğu 5 MTK probu kullanarak MTK teşhisine olanak sağlar (Abdülmajed O., 2011).

2.7. PZR-RFLP Yöntemi

MTK olarak adlandırılan mikobakteri türleri, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. pinnipedii*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti* ve *M. caprae*' dir. Bu türler başta insan olmak üzere evcil ve yabani hayvanlarda birincil infeksiyon nedenidir. Bu türlerin birbirleriyle yakın ilişkisi, DNA-DNA hibridizasyonu, multilokus elektroforez ve 16S rRNA ve 16S-23S rRNA genlerinin dizilenmesiyle gösterilmiştir (Kasai ve ark. 2000, Niemann ve ark., 2000). MTK türlerine ait kolonilerden, DNA izolasyonu gerçekleştirilip, *gyrB* veya *hsp65* genlerinin amplifikasyonu yapılarak MTK içindeki türlerin ayrımı RFLP metoduyla gerçekleştirilebilir (Bayraktar ve ark., 2011). Spesifik restriksiyon enzimleri (RE) yardımıyla gerçekleşen kesim sonucunda oluşan fragment dizilerindeki varyasyonlara RFLP denir. Bu fragment dizilerindeki varyasyonların saptanması amacıyla yapılan analize ise RFLP analizi denir. RE; DNA sekanslarında tanıdığı bölgelerde kesim işlemi yaparak RFLP oluşturur. RFLP analizi için bakterinin üremiş olması, üreyen bakteriden DNA eldesi ve mevcut DNA' larda RE' lerin tanıyabileceği gen bölgelerinin amplifiye edilmiş olması gereklidir. Bu işlemlerden sonra oluşan fragmentler agaroz jelde, elektroforez sonrasında görüntülenebilir. Marker DNA kullanılarak görüntülenen jeldeki bantlara bakılarak değerlendirme yapılır (Çiftçi A., 2003). RFLP metodu uygulanırken *gyrB* gen bölgesini tanıyıp, kendine özgü baz çifti (baz pair=bp) uzunluğunda kesen *RsaI/AfaI*, *TaqI* ve *SacII* gibi restriksiyon enzimleri mevcuttur. Bu enzimlerin hangi türün *gyrB* genini, hangi bp uzunluğunda keseceği birçok çalışmada ispatlanmış ve bilimsel veriler arasında yerini almıştır (Resim 7).



Resim 7. *RsaI* restiraksiyon enziminin *gyrB* genindeki aktivites (Bayraktar ve ark., 2011)

Resim 7' ye göre; 1. ve 8. sutunlar 100 bp DNA ladder; 2 ve 3. sutunlar *M. tuberculosis* (360-560 bp); 4. sutun *M. africanum* (360-560 bp); 5. sutun *M. bovis* (360-480 bp), 6. sutun *M. caprae* (360-480 bp); 7. sutun *M. microti* (360-660 bp) olarak türlerin ayrımı yapılmıştır (Bayraktar A ve ark., 2011). RFLP metoduyla MTK türlerinin ayrımı, hastalığın etkenine, bulaş yolu, yayılma hızı ve tedavi yöntemleri gibi özelliklerin daha hızlı ve güvenilir irdelenip yol çizilmesine büyük avantaj sağlar. Restriksiyon enzimlerinin RFLP analizi sonucunda gösterdiği aktiviteler ve tür ayrımları Tablo 6' da gösterilmiştir.

Tablo 6. *RsaI/AfaI*, *TaqI* ve *SacII* enzimleriyle MTK türlerinin RFLP paternleri (Bayraktar ve ark., 2011).

Enzim	Bant paterni	İdentifikasyon
<i>RsaI/AfaI</i>	360-560 bp	<i>M. tuberculosis/ M. africanum</i>
	360-480 bp	<i>M. bovis/ M. caprae</i>
	360-660 bp	<i>M. microti</i>
<i>TaqI</i>	250-440 bp	<i>M. tuberculosis</i>
	440 bp	<i>M. africanum</i>
<i>Sac II</i>	Kesim yok	<i>M. bovis</i>
	280-740 bp	<i>M. caprae</i>

2.8. *M. bovis*' in Tüberküloz Etiyolojisindeki Önemi

M. bovis, insanlarda ve hayvanlarda TB hastalığına neden olabilen, MTK içinde sınıflandırılan ve bu sınıfın içinde en geniş konak aralığına sahip mikobakteri türlerinden biridir (Aslan G ve ark., 2009 ve Mignard S ve ark., 2006). *M. bovis* BCG 13 yıl boyunca, *M. bovis*'in 230 kez pasajlanmasıyla elde edilen bir aşı suşudur (Ritz N ve ark., 2008).

Gelişmiş ülkelerde, *M. bovis*'in insanlardaki enfeksiyonu, çiftlik hayvanlarının tüberkülin testi ile taranması, hayvan bakıcılarının izlenmesi ve sütün pastörizasyonu gibi yöntemlerle kontrol altına alınmıştır. Yeni enfeksiyonların ise çok önceden alınan etkenden dolayı reaktivasyonla ortaya çıkmasına bağlandığı şeklinde açıklanmaktadır. HIV ve *M. bovis* ile ko-enfekte kişilerde yapılan çalışmalarda, bağışıklığı zayıflamış hastalarda fırsatçı enfeksiyon etkenidir (Romero ve ark., 2006). Olguların çoğunda, *M. bovis*'in klinik ve patolojik özellikleri *M. tuberculosis* enfeksiyonuyla aynıdır. Bu durumdan kaynaklanan sebeplerden dolayı, hastalarda *M. bovis*'in insidensi tespit edilememekte ve buna bağlı olarak, koruma ve tedavi stratejileri de belli bir plan dahilinde olamamaktadır. Çoklu ilaç direnci bulunan *M. bovis* suşlarının ve HIV ile ko-enfeksiyonun sıklığı sebebi ile *M. bovis*'e karşı etkin tedavi ve korunma stratejilerinin geliştirilmesine ayrıca önem verilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Aslan G ve ark., 2009).

Dünya Sağlık Örgütü ve Amerikan Genel Sağlık Kuruluşu verilerine göre, Güney Amerika'da her yıl *M. bovis*'in neden olduğu 7 000 yeni insan tüberküloz olgusuna rastlanıldığını ve kayıtlara geçmeyen olgularla birlikte insidansın sekiz kat daha yüksek olduğu kayıtlar arasındadır. Çoğu yayında tersi bildirilsede, bazı ülkelerde bildirilen sığır enfeksiyonunun taşınmasında insanların da *M. bovis*'in rezervuarı olarak davranabileceği bildirilmiştir (Wei CY ve ark., 2004).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, *M. bovis*'in sebep olduğu tüberküloz olguları her ne kadar seyrek gibi görünse de, gün geçtikçe literatüre yeni veriler eklenmektedir. Tüberküloz patojenlerinin tür düzeyinde ayrımını yapan laboratuvar yöntemleri kullanımda yaygınlaşırsa, büyük popülasyonları içine alan bölgesel çalışmalarda gerçek insidanslar ortaya çıkacaktır (Aslan G ve ark., 2009).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Gereçler

- Biyogüvenlik kabinleri (TEZ-SAN CLASS II ve ESCO Class II BSC)
- Löwenstein Jensen besiyeri (BBL)
- İnkübatör (Mettler)
- Hassas terazi (DENSU UFO plus mode JW)
- Buz dolabı ve Derin dondurucu (Arçelik ve Bosch)
- pH metreler (HANNA instrumentts HI 2211 ve DocuMeter pH)
- Santrifüj cihazı (Eppendorf Centrifuge 5424)
- Isıtıcılar (Biosan TDB 120 Thermo Block ve Biosan TDB 100 Dry Block)
- Vorteks cihazları (Heidolph REAX ve XH-II Aqitador)
- Diğer karıştırıcılar (Biosan Combi-Spin ve Hot Stirrer MS300HS)
- PZR cihazı (2720 Thermal Cycler/Applied biosystems)
- Agaroz jel elektroforez cihazı (Wealtec Elite 300 plus)
- Görüntüleme cihazları (Quantum Vilber Lourmat)

3.2. Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler

- DNA izolasyon kiti (İnvitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit, Lot: 1669675)
- Lizozim (Fluka Biochemika Lot: 1312852)
- Etil Alkol (Alkokim, 8698943970010)
- HCL (Merck, 1.00317.2501)
- Tris Buffer EDTA (TBE, gibco UltraPure Lot: 1665533)
- dATP (İnvitrogen Lot: 1628357)
- dCTP (İnvitrogen Lot: 1628355)
- dGTP (İnvitrogen Lot: 1628356)
- dTTP (İnvitrogen Lot: 1628352)

- MgCl₂ (İnvitrogen Lot: BM3B1d)
- PZR Buffer (10X; İnvitrogen Lot: BP5B1a)
- Taq DNA Polimeraz (İnvitrogen Lot: BK2B1c)
- MTUB- R (ACATACAGTTCGGACTTGCG; İnvitrogen Lot: A4735 B11)
- MTUB-F (TCGGACGCCTATGCGATATC; İnvitrogen Lot: A4735 B10)
- 10 X Afa I Buffer (İnvitrogen Lot: A1701A)
- Afa I (Rsa I) enzimi (İnvitrogen Lot: K2801BA)
- 10X Taq I Buffer (İnvitrogen Lot: A1301A)
- Taq I (TthHB8 I) enzimi (İnvitrogen Lot:K252DA)
- BSA (Bovin serum albumin; İnvitrogen Lot: A3401A)
- Agaroz (İnvitrogen Lot: 442893)
- DNA Marker (100 bp; Fermantase 4301)
- Etidium Bromid (EBr Lot: 0801)

3.3. Bakteriler

- MTK suşları (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Mikobakteriyoloji Laboratuvarı stokları).
- *M. tuberculosis* H37Rv kontrol suşu (Prof. Dr. Rıza Durmaz)
- *M. bovis* BCG kontrol suşu (TC Sağlık Müdürlüğü, Çanakkale)

3.4. Materyal Seçimi

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Mikobakteriyoloji Laboratuvarlarında, 01.01.2013- 31.12.2014 tarihleri arasında MTK olarak identifikasyonu yapılmış 76 adet suş çalışma materyali olarak seçildi. Çalışma materyali olarak seçilen bu suşlar, belirtilen tarihler arasında Mikobakteriyoloji laboratuvarına TB ön tanısı ile değişik polikliniklerden ya da dış merkez sağlık kuruluşlarından tetkik amaçlı gönderilen hasta örneklerinden izole edildi. İzole edilip, tanımlanan bu suşlar sıvı bazlı saklama besiyerlerinde -80 °C' de saklandı.

3.5.Yöntemler

3.5.1. *M. tuberculosis* complex İzolatları

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Mikobakteriyoloji laboratuvarında, MTK olarak tanımlanmış suşlar, -80 °C' den alınarak LJ besiyerlerine tekrar ekildi. Ekimi yapılan bu suşlar 37 °C' de üremeleri için, mikobakteriyoloji laboratuvarına ait etüvde inkübasyona alındı. İnkübasyona alınan suşlar 7-14 gün arasında tekrar üretildi. MTK kolonilerini içeren LJ besiyerleri, diğer işlemler yapıncaya kadar +4 °C' de muhafaza edildi.

Standart suş olarak PCR ve RFLP tekniklerinde pozitif kontrol amacıyla *M. tuberculosis* H37Rv ve *M. bovis* BCG (SII-BCG, Keymen İlaç) suşları kullanılmıştır.

3.5.2. DNA Ekstraksiyonu

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Araştırma laboratuvarında, MTK kolonilerini içeren LJ besiyerlerinden koloniler alınarak, bu kolonilerden İnvitrogen Genomik DNA izolasyon kiti ile DNA ekstraksiyon kiti tarafından sağlanan/sağlanmayan kimyasallar ile aşağıdaki basamaklar izlenerek gerçekleştirildi.

- LJ besiyerlerinden koloniler 1 ml TBE tamponu ile yıkanarak toplanır ve 1 saat boyunca 15 dakikada bir karıştırılarak 80 °C' de inkübe edildi.
- Daha sonra 5 000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilerek üst sıvı atıldı.
- Pelet üzerine taze hazırlanmış lizozim çözeltisinden (1 gr Lizozim, 13,30 ml TBE, 41,875 ml distile su) 200 µl eklendi.
- Pelet iyice vortekslenerek çözdürüldü. Hücre peletinin iyice çözüldüğünden ve herhangi bir hücre topağının olmadığından emin olunmalıdır.
- Hücre çözeltisi 3 dakikada bir karıştırılarak en az 30 dakika boyunca 37 °C ' de inkübe edildi.
- 10 000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve üst sıvı atıldı.

- 200 µl Genomik Digestion Buffer ve 20 µl Proteinaz K çözeltisi eklendi ve iyice vortekslendi.
- 200 µl Genomik lysis/Binding Buffer eklendi ve iyice vortekslendi.
- 55 °C ' de 30 dakika inkübasyona alındı.
- 200 µl % 96-100' lük etil alkol eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
- Hazırlanmış olan bu karışım (~ 640 ml) toplama tüpü bulunan spin kolonlara alındı ve 10 000 rpm' de oda ısısında 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri atıldı ve spin kolonlar yeni toplama tüplerine alındı.
- Etil alkol ile hazırlanmış 500 µl Wash Buffer 1 eklendi ve 10 000 rpm' de oda ısısında 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri atıldı ve spin kolonlar yeni toplama tüplerine alındı.
- Etil alkol ile hazırlanmış 500 µl Wash Buffer 2 eklendi ve maksimum hızda (20 000 rpm) oda ısısında 3 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri atıldı ve spin kolonlar DNA örneklerinin saklanacağı steril 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.
- Spin kolonlara 200 µl Elution Buffer eklendi ve oda ısısında 1 dakika inkübe edildi.
- Maksimum hızda (20 000 rpm) oda ısısında 2 dakika santrifüj edildi.
- Spin kolonlar atıldı.
- Mikrosantrifüj tüplerinde genomik DNA mevcuttur.

DNA varlığı % 2' lik agaroz jel elektroforez yardımıyla görüntülendi. DNA örnekleri, izolasyon sonrasında işleme alınacaksa + 4 °C' de, daha sonraki zaman dilimlerinde işleme alınacaksa -20 °C' de muhafaza edildi.

3.5.3. PZR- RFLP Yönteminin Uygulanması

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deneysel Hayvanlar Araştırma Merkezi (ÇOMÜDAM), Araştırma laboratuvarlarında, agaroz jel elektroforezinde varlığı tespit edilen DNA örnekleri, *M. tuberculosis* kontrol DNA'sı ve *M. bovis* BCG kontrol DNA'sı, *gyrB* geni açısından PZR işlemine alındı.

- **PZR ön hazırlık (50 µl' lik reaksiyon, 1 örnek için):**
- 5 µl 10 X PZR Buffer
- 1.5 µl MgCl₂
- 1 µl MTUB-F (5'-TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC- 3')
- 1 µl MTUB-R (3'- ACA TAC AGT TCG GAC TTG CG-5')
- 1µl dNTP (10µm)
- 7 µl MTK DNA'sı
- 0.2 µl Taq DNA polimeraz
- 33.3 µl ddH₂O

Pozitif kontrol olarak kalıp DNA yerine aynı miktarda *M. tuberculosis* H37Rv ve *M. bovis* BCG DNA'sı ve negatif kontrol olarak ise kalıp DNA yerine ddH₂O kullanıldı.

Bu oranlar dikkate alınarak, her bir MTK DNA'sı için, PZR tüplerinde karışımlar hazırlandı ve PZR işlemi için hazır hale getirildi. Termal Cycle cihazı aşağıdaki şartlara ayarlandı.

- **PZR şartları:**
 - 80 °C 5 dakika
 - 94 °C 1 dakika
 - 65 °C 1 dakika
 - 72 °C 1 dakika
 - 72 °C 10 dakika
 - +4 °C Sonsuz
- 35 siklus

Termal Cycle cihazında bu şartlar sağlandıktan sonra, PZR tüplerinde hazırlanan örnekler, *gyrB* amplifikasyonu için PZR işlemine tabi tutuldu. PZR işlemi sonrasında, PZR ürünleri % 2' lik agaroz jel elektroforezinde, pozitif kontrollerle birlikte görüntülendi. *gyrB* açısından amplifiye olan örnekler RFLP gerçekleştirmek için, yeni PZR tüplerinde enzim kesim işlemine alındı.

- **RFLP metodunun uygulanması**

- ***AfaI* (*RsaI*) restriksiyon enzimi muamelesi (20 µl, 1 örnek için)**

- 0.5 µl *AfaI*
 - 2 µl 10X *AfaI* Buffer
 - 2 µl BSA
 - 15.5 µl PZR ürünü (*gyrB*)
- 37 °C' de 1 saat
- 65 °C' de 20 dakika

- ***TaqI* restriksiyon enzimi muamelesi (20 µl, 1 örnek için)**

- 0.5 µl *TaqI*
 - 2 µl 10X *TaqI* Buffer
 - 2 µl BSA
 - 15.5 µl PZR ürünü (*gyrB*)
- 65 °C' de 1 saat

AfaI ve *TaqI* restriksiyon enzimleri, MTK içerisindeki türlerin ayrımı için kullanılan iki enzimdir. *gyrB* geni amplifiye olmuş MTK türleri, her iki enzim için pozitif ve negatif örnek, bu enzimlerin kesim aktivitesinin belirlenmesi için işleme alındı. Referans yayınlardan alınan bp değerlerine göre enzim kesim sonuçları analiz edildi. Bu analizler, 100 bp' lik marker DNA, *RsaI* açısından ve *TaqI* açısından pozitif kontrol ve negatif kontrol kullanılarak, enzim kesim ürünleri ile birlikte % 2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek yapıldı. Yürütme işleminden sonra, görüntüleme cihazında sonuçların varlığı ortaya konuldu.

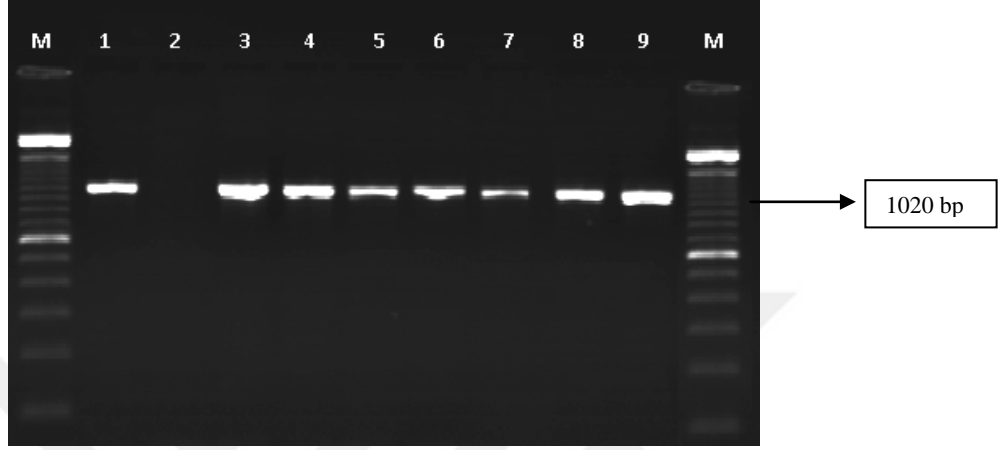
4. BULGULAR

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda, 01.01.2013- 31.12.2014 tarihleri arasında MTK olarak tanımlanmış 76 adet örnek işleme alındı. Bu örnekler yaşları 23 ile 82 arasında değişen ve yaş ortalaması 48 olan 76 farklı hastaya aittir. Hastaların % 23,7' si kadın (18 kişi) ve % 76,3' ü erkektir (58 kişi). Bu hastalara ait tüberküloz kültürü için çalışma materyalleri, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi; Göğüs hastalıkları kliniklerinden (ÇOMÜ GH) 28 (% 36,85), Enfeksiyon hastalıkları kliniklerinden (ÇOMÜ EF) 1 (% 1,31) ; Çanakkale Devlet Hastanesi Göğüs hastalıkları kliniklerinden (ÇDH GH) 14 (% 18,42) ve Çanakkale Verem Savaş Dispanserinden (ÇVSD) 33 (% 43,42) kişi, TB hastalığı ön tanısı ile Mikobakteriyoloji laboratuvarımıza gönderilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Çalışma gruplarının dağılımları.

	Cinsiyet			Klinik	
	Sayı	%		Sayı	%
Erkek	58	76,3	ÇOMÜ GH	28	36,85
Kadın	18	23,7	ÇOMÜ EF	1	1,31
			ÇDH GH	14	18,42
			ÇVSD	33	43,42
Toplam	76	100		76	100

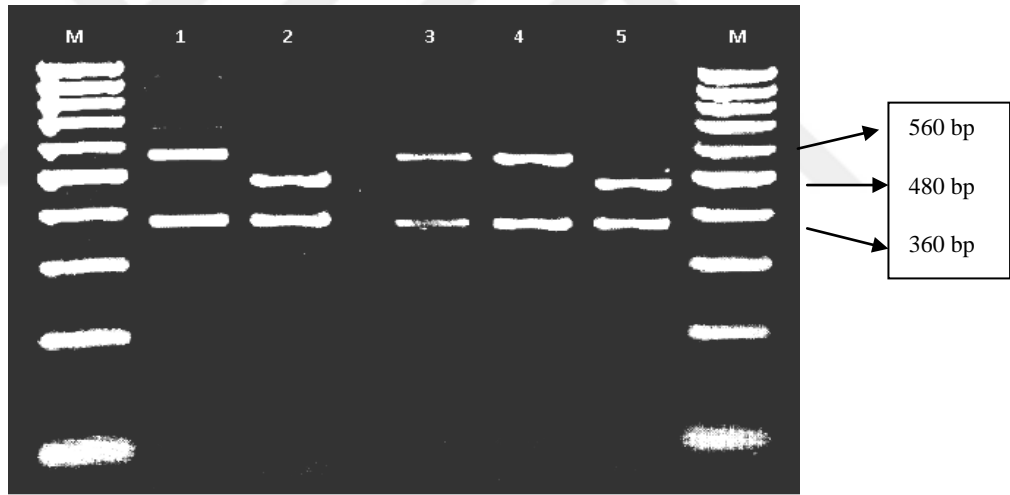
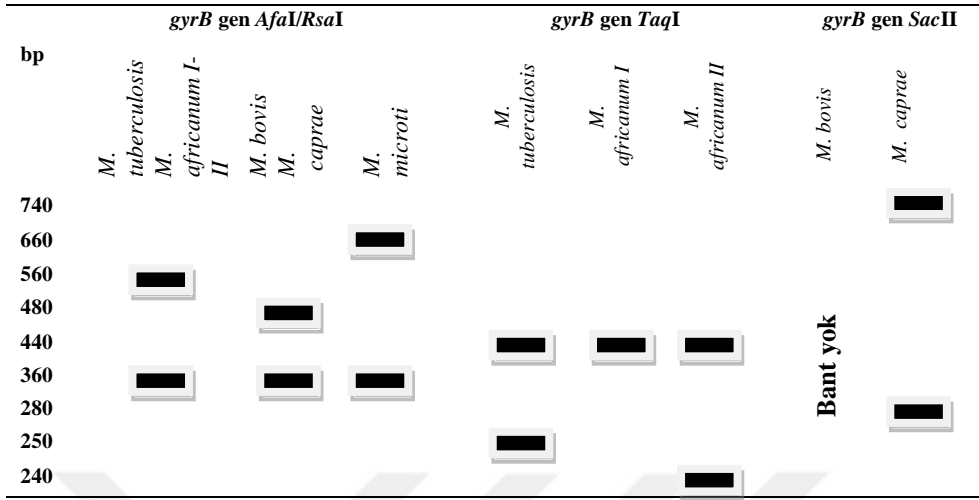
Çalışma grubu olarak seçilen izolatlardan DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve hedeflenen *gyrB* gen bölgesi PZR ile amplifiye edildi. Amplikonlar marker DNA kullanılarak agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür ile görüntüledi. Bu sonuçlardan temsili bir görüntü Resim 8’de gösterilmiştir.



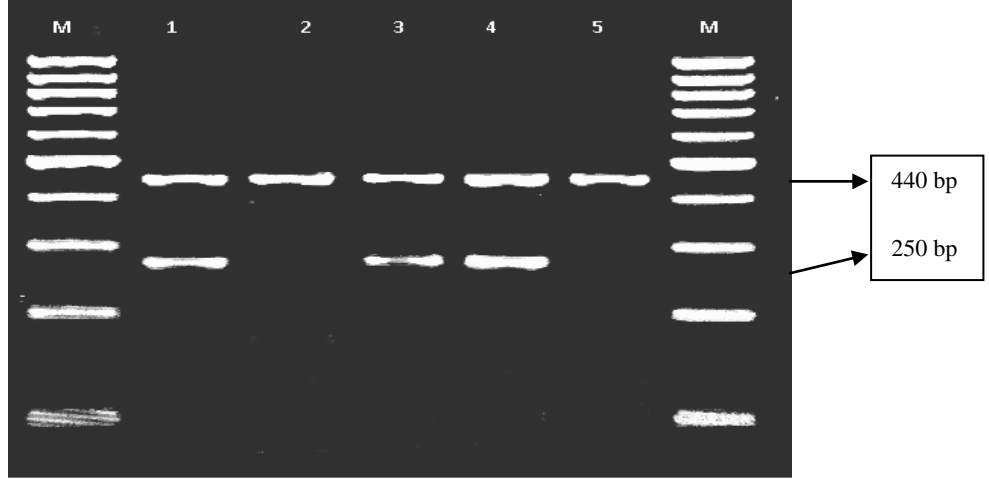
Resim 8. Çalışmadaki temsili örneklerden *gyrB* gen amplifikasyonunun agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi. Şerit M; 100 bp’ lik marker DNA, şerit 1; pozitif kontrol (Fermantas, Canada), şerit 2; negatif (no template) kontrol, şeritler 3-9; *gyrB* geni amplifiye edilen MTK suşları.

gyrB ile amplifiye olan örnekler *AfaI* ve *TaqI* restriksiyon enzimleriyle kesim işlemine alındı. Bu sonuçlardan temsili görüntüler Resim 9 ve 10’da gösterilmiştir. *AfaI* ve *TaqI* enzim kesimi sonrası ortaya çıkan DNA fragman büyüklükleri analiz edildi Resim 11’de gösterilen beklenen fragmentasyona bakılarak MTK türleri/tipleri ayırımı gerçekleştirildi. Bu sonuçlara göre araştırma kapsamında incelenen 75 izolat *M. tuberculosis* ve 1 izolat ise *M. bovis* olarak değerlendirildi. Enzim kesim sonuçları değerlendirme tablosu bp’ lerle birlikte temsili olarak Tablo 8’ de gösterilmiştir.

Tablo 8. *gyrB* geninde *AfaI/RsaI*, *TaqI* ve *SacII* enzimlerinin temsili aktivitesi.



Resim 9. *AfaI* enzimiyle kesim işlemine alınan *gyrB* amplikonlarının agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü. Şerit M; 100 bp' lik marker DNA (Fermantas, Canada),, şerit 1; *M. tuberculosis* pozitif kontrol, şerit 2; *M. bovis* pozitif kontrol, şerit 3 ve 4; *M. tuberculosis* olarak değerlendirilen MTK izolatları, şerit 5; *M. bovis* olarak değerlendirilen MTK izolatı.



Resim 10. *TaqI* enzimiyle kesim işlemine alınan *gyrB* amplikonlarının agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü. Şerit M; 100 bp' lik marker DNA (Fermantas, Canada), şerit 1; *M. tuberculosis* pozitif kontrol, şerit 2; *M. bovis* pozitif kontrol, şerit 3 ve 4; *M. tuberculosis* olarak değerlendirilen MTK izolatları, şerit 5; *M. bovis* olarak değerlendirilen MTK izolatu.

Sonuçlar göz önüne alındığında, 76 örneğin sadece bir tanesi (% 1,3) hem *AfaI* hem de *TaqI* restriksiyon enzimleriyle işleme alındığında, *M. bovis* olarak tanımlanmıştır. Geriye kalan 75 (% 98,7) örnek ise yine bu iki enzim tarafından da işleme alındığında *M. tuberculosis* olarak tanımlanmıştır.

Tablo 9. MTK içerisinde bulunan türlerin çalışmadaki dağılımları.

MTK	Sayı	%
<i>M. tuberculosis</i>	75	98,7
<i>M. bovis</i>	1	1,3
Diğer MTK türleri	-	-
Toplam	76	100

5. TARTIŞMA

Tüberküloz, gelişmiş yada gelişmekte olan ülkelerde ciddi sağlık problemi olarak önemini hala korumaktadır (Aktaş AE ve ark., 2014). *M. tuberculosis*' in tüm insanlığın üçte birini enfekte ettiği bilim dünyasında tartışılmaktadır. Düşük ya da orta gelirli ülkelerde yaşayan bu bakteriyle enfekte bireylerin sadece % 5-10 ' u aktif ve aynı zamanda bulaştırıcı hastalığa sahiptir. *M. tuberculosis*' in neden olduğu bu hastalık yılda yaklaşık 1,3 milyon ölüme neden olmaktadır (Midori MK ve ark., 2011).

MTK olarak isimlendirilen bir grup mikroorganizma genel olarak TB hastalığına neden olmaktadır. Bu grup içerisinde bulunan mikroorganizmalar aside dirençli boyanan bakterileri içermektedir. TB enfeksiyonu ve hastalığın meydana getirdiği sonuçlar değişkenlik gösterir. Hastalığa doğuştan bağışıklık kazanılabildiği gibi sonradan meydana gelen enfeksiyonlarda tam bağışıklık kazanılabilir. Bunun yanında enfeksiyondan 10 yıl sonra bile hastalık tekrar meydana gelebilir (Mireia Coscolla ve Sebastien Gagneux, 2014).

Özbey N ve ark. (2012) Çanakkale bölgesinde, 2009-2011 yıllarını kapsayan bir çalışmada, TB olgularının tespitinde kullanılan yöntemlerin değerlendirilmesini amaçlamışlardır. Bu çalışma sonucunda ortaya çıkartılan TB olgularının sayısı ise 1048 örnekte, 78 (% 7,44) adet TB pozitif kültür şeklindedir. Bu 78 örneğin 71 (% 91) tanesi MTK, 7 (% 9) tanesi MOTT olarak belirtilmiştir (Özbey N ve ark., 2012).

Birçok çalışmada MTK suşlarının virulanslarının klinikte farklılıklar gösterebileceği bilim dünyasında ifade edilmiştir (Coscolla M. veGagneux S, 2010). Dizanteri, difteri ve kolera etkenleri gibi toksijenik faktörleri olmadığından, yaptığı hastalık üzerine enfeksiyon etkilerini ve varyasyonlarını belirlemek oldukça zordur. Bazı MTK suşlarının genotip-fenotip belirlenmeside sınırlı kalmıştır (Comas I ve ark., 2009).

MTK alt türlerini belirleyebilmek adına genotiplendirme yöntemleri kullanılır. Bu yöntemler TB salgın mekanizmalarını incelemek için oldukça önemlidir. MTK için genotiplendirme özellikle son yıllarda hastalık etkeninin ayırt edilmesi ve

yeniden ortaya çıkmasını engellemeye yönelik mekanizmaların geliştirilebilmesi için kullanılır (Midori MK ve ark., 2011).

Klinik önemi olan MTK türleri içerisinde, *M. tuberculosis*, *M. bovis* (*M. bovis* BCG), *M. africanum* ve *M. microti* suşları bulunur (Comas I ve ark., 2009). MTK türleri içerisinde, dünya çapında *M. tuberculosis* yaygındır. Aynı tutmak gerekirse de Afrika bölgesinde *M. africanum* yaygındır. Diğer MTK türleri nadir olduğu için genellikle rutin laboratuvar çalışmalarında diğer türler isimlendirilmez. Fakat bu türlerin, farklı konak tercihleri, patojenitesi, coğrafi dağılımı ve ilaç dirençleri farklılık gösterebildiği için tanımlanması ve tedavi yöntemlerinin belirlenmesi açısından büyük avantaj sağlayacaktır (Pinsky ve Banaei., 2008).

Rutin uygulama olarak seçilecek olan bir yöntemde aranılan en önemli özelliklerden biri, kullanılan bu yöntemin özgünlüğünün ve duyarlılığının yüksek olmasıdır. PZR işlemlerinden en iyi verimi alabilmek için, bu işlemde önce dikkat edilmesi gereken temel basamak nükleik asit izolasyon basamağıdır. Nükleik asitin bol miktarda ve saf olarak elde edilmesi, bu basamaktan sonra yapılacak olan diğer testlerinde güvenli sonuçlar vermesine katkı sağlayacaktır. Mikobakteriler ile yapılan moleküler çalışmaların çoğunda özgünlükler yüksek bulunmaktadır. Farklı sonuçların elde edilmesinin sebepleri arasında, kullanılan yöntemin yanı sıra, örnekte bulunan mikroorganizma miktarı büyük önem taşımaktadır. Bu önem doğrultusunda mikroorganizma miktarı az olsa bile, mevcut örnekten en iyi şekilde yararlanabilmek için DNA izolasyon basamağının dikkatli ve kontrollü bir şekilde, güvenilirliği kanıtlanmış yöntemlerle yapılması gerekmektedir.

Teorik açıdan bakıldığında koloni sayısı az olsa bile hasta materyalinden çalışılıyorsa, o örnekte bir basilin bulunması bile DNA izolasyonu açısından yeterlidir. Ancak birçok çalışmada, Mikobakteri DNA izolasyonu sonucunda özgünlüğün yüksek olmadığı da gösterilmiştir. Bunun nedenleri arasında ise DNA izolasyonu esnasında basillerin kaybedilmesi veya koloni yaşlarına bağlı olarak kullanılan malzemelerin inhibasyon özelliği gösterebileceği belirtilmektedir (Alp A ve ark., 2007).

Mikobakteriler ile ilgili yapılan moleküler çalışmalarda farklı DNA izolasyon ve amplifikasyon protokolleri kullanılmıştır. Alp A ve ark. (2007) yılında yaptığı bir

çalışmada; kaynatma yöntemi ve otomatize izolasyon cihazları ile Mikobakteri DNA izolasyonlarını karşılatırmışlardır. Bu çalışma sonucunda otomatize izolasyon sistemlerinin güvenilirliğini ve kalitesini daha yüksek bulmuşlardır. Abdulmajed O. (2011) yılında yaptığı çalışmada İnvitrogen marka genomik DNA izolasyon kitini kullanmıştır. Enzimatik yöntemle işleyen bu protokole göre, kaliteli ve yeterli miktarda DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Kaynatma ve enzimatik reaksiyonları içeren yöntemler literatürde oldukça sık karşılaşılan yöntemlerdir. Bizim çalışmamızda LJ besiyerinden alınan kolonilerin fiziksel parçalanması, TBE içerisinde ve ısı yardımıyla gerçekleştirildi ve akabinde İnvitrogen Genomik DNA izolasyon kitiyle işleme devam edildi. DNA varlıkları agaroz jel elektroforezi yardımıyla gözlemlendi.

Tüberkülozun tanısında kullanılan moleküler yöntemler genellikle PZR tabanlı teknikler olup hızlı identifikasyon amacı ile PZR-RFLP yöntemi tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bayram G. (2007) yılında yaptığı çalışmasında mikobakterilere ait türlerin belirlenmesi amacıyla PZR-RFLP yöntemini kullanmış ve sonucunda bu yöntemin, diğer yöntemlere göre hızlı, ucuz ve güvenilir olduğunu belirtmiştir.

PZR temelli yöntemler, bakteri kolonileri az olsa bile uygulanabilir ve nispeten diğer yöntemlere göre daha hızlıdır. PZR temelli yöntemlerin içerisinde, yüksek ayırım güçlerinden dolayı, en yaygın kullanılanları arasında, spoligotipleme, MIRU tiplemesi ve VNTR tiplemesidir (Karahan ZC ve ark., 2006). Karahan ve ark., (2006) yılında yaptıkları çalışmada PZR-RFLP yöntemini tercih etmişler ve çalışmalarını hızlı bir şekilde sonlandığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada mikobakterilerin identifikasyonu için moleküler teknik olarak PZR-RFLP tekniği kullanılmıştır. Bu teknik kullanılarak tüm mikobakterilere spesifik olan *gyrB* genine ait PZR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesilerek mikobakteri türleri belirlenmiştir. Bu yöntem seçilirken, Türkiye Tüberküloz etken profili göz önünde bulunduruldu ve gerekli restriksiyon enzimleri bu profile göre seçildi. *RsaI* ve *TaqI* restriksiyon enzimlerinin kesim yaptığı ve bu kesimler sonucunda moleküler ağırlıklarına göre belirlenen mikobakteri türlerinin araştırılması

amaçlandı. *RsaI*; *M. tuberculosis*/*M. africanum*; *M. bovis*/*M. caprae*; *M. microti* ayrımını yapmaktadır. *TaqI* enzimi ise; *M. tuberculosis* ve *M. africanum* ayrımını yapmaktadır.

MTK üyelerinin tür tanımlaması yapılması için *gyrB* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması oldukça önemlidir (Kasai H ve ark., 2000). Zanden ve arkadaşlarının (2002) çalışmasında, 314 adet MTK üyesi içinde % 96,5 *M.tuberculosis* ve % 2,8 *M.bovis* tespit etmişlerdir. Parsons ve arkadaşları (2002) 605 adet MTK içeren bir çalışmada, *M.tuberculosis* oranını % 96 ve *M.bovis* oranını ise % 3 olarak bildirmişlerdir.

Niemann ve arkadaşları (2002) ise, PZR-RFLP yöntemine dayanan çalışmalarında, MTUB-F ve MTUB-R primerleri ile *gyrB* gen bölgesini çoğaltmışlardır. Bu bölgeyi *RsaI* ve *TaqI* RE enzimleri kesim işlemine almışlar ve *M.tuberculosis*, *M.bovis*, ve *M.africanum* türlerini ayırt etmeyi amaçlamışlardır. Bu çalışma sonucunda, MTK suşlarının % 77' si *M.tuberculosis*, % 18 *M.bovis*, % 2 *M.microti* ve % 2 *M.africanum* oranları ortaya çıkmıştır.

Bayraktar ve ark. (2011) yılında *gyrB* genini incelemek amacıyla, PCR-RFLP yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada bizim enzimlerimize ek olarak *SacII* enziminide çalışmalarına eklemişlerdir. Bu enzim *M. bovis* ve *M. caprae* türlerinin ayrımını yapmaktadır. Bayraktar ve ark. (2011) yaptıkları bu çalışmada, 188 adet MTK türü kullanmışlardır. 188 adet MTK türü içerisinde *M. tuberculosis* olarak tanımladıkları sayı 177 (% 94, 1) dir. Bunun yanında *M. bovis*, 8 (% 4,3), *M. caprae* 3 (% 1,6) olarak sonuçları arasına girmiştir.

Ağaçayak A ve ark (2007) yılında, PCR-RFLP yöntemiyle MTK türlerini ayırt etmek için bir çalışma yapmışlardır. MTK ayrımı için, *gyrB* bölgesi *RsaI* RE enzimi ile muamele edildiğinde, *M .bovis* ve *M. microti* türleri birbirinden ayrılır fakat *M. tuberculosis* ve *M. africanum* ayrımı yapılamaz. Bu iki türün ayrımı ise, *RsaI* RE enzimine ek olarak *TaqI* RE enzimi ile kesim işleminin yapılması sonucunda gerçekleşir (Şekil 2 ve 3). Bu çalışmalarında Ağaçayak ve ark , 44 MTK suşunda; 34 (% 77,3) *M. tuberculosis*, 8 (% 18,2) *M. bovis*, 1 (%2,3) *M. microti* ve 1 (% 2,3) *M.africanum* tanımladılar.

Chimara E ve ark. (2004) yılında 311 adet MTK suşunda gyrB-RFLP yöntemiyle çalışma yapmış ve bu izolatlardan 306 (% 98,4) tanesini *M. tuberculosis*, 3 (% 1) tanesini *M. bovis*, 2 (% 0,6) tanesini *M. bovis BCG* olarak tanımlamışlardır.

Bu çalışmada ise, gyrB gen bölgesi amplifiye olmuş 76 MTK örneği kullanıldı. Çalışmaya göre 75 (% 98,7) adet *M. tuberculosis*, 1 (% 1,3) tanesinde *M. bovis* tanımlaması yapıldı. *M. tuberculosis* tüm MTK türleri içerisinde oranı en fazla bildirilen etken arasındadır. Bu çalışma sonucunda da % 98,3 oranında bu etkenin belirlenmesi literatürdeki diğer benzer çalışmalarla örtüşmektedir. Bununla beraber TB etyolojisinde *M. tuberculosis* ve *M. bovis* oranları bazı varyasyonlar göstermektedir. Önceki bildirimlerdeki ve bu çalışma sonuçlarında bu orandaki farklılıkların coğrafi bölge, hastaların sosyo-ekonomik durumu ve kullanılan yöntemlerdeki farklılıklardan kaynaklanması muhtemeldir.

Bu çalışmada kullanılan örnekler sadece Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine başvuran hastalara ait değildir. Çanakkale merkez ilçe ve köylerine hizmet veren Çanakkale Verem Savaş Dispanseri ve Çanakkale Devlet Hastanesi Göğüs hastalıkları polikliniklerine ait hasta örnekleride çalışma kapsamındadır. Bu bakımdan bu çalışma sonuçları Çanakkale Tüberküloz etyoloji profilini ortaya koyması bakımından da önemli olabilir.

Çalışmanın sonuçları ele alındığında, Çanakkale ilinde mevcut MTK türlerinin büyük çoğunluğunun *M. tuberculosis* olduğu ve az sayıda *M. bovis* türüne rastlanıldığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar bölgede hastalığın epidemiyolojisini daha iyi anlamaya ve böylece teşhis, tedavi ve kontrol yöntemlerine katkı sunabilecektir. Mevcut çalışmaya göre daha büyük coğrafi alanları kapsayabilecek daha fazla izolat ile daha detaylı moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılarak yapılan ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüberküloz etyolojisini daha iyi anlamak hastalığa karşı teşhis, tedavi ve korunma yöntemleri açısından oldukça önemlidir. Günümüzde tüberkülozun tanısında, izolatların identifikasyon ve duyarlılığının belirlenebilmesinde kültür halen altın standart olarak yerini korumaktadır. Ancak, mikobakterilerin izolasyonları ve biyolojik tiplendirmeleri için uzun sürelere ihtiyaç bulunmaktadır.

PZR-RFLP yöntemi, kolay, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren uygulanabilir bir yöntemdir. MTK alt türlerin ayrımını yapabilen bu yöntem, tüberküloz epidemiyolojisini daha iyi anlamak ve buna göre tedbirler almak adına pratik ve hızlıca uygulanabilen bir yöntemdir.

Bu çalışmada Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Mikobakteriyoloji laboratuvarında klinik örneklerden izole edilmiş ve MTK olarak tanımlanmış 76 adet suş *gyrB* gen amplifikasyonu takiben *RsaI* ve *TaqI* restriksiyon enzimleriyle, RFLP işlemine tabi tutuldu. İzolatlardan biri *M. bovis* olarak geri kalanları ise *M. tuberculosis* olarak belirlendi. Böylece TB etyolojisi ile ilgili daha detaylı sonuç hızlı ve pratik bir şekilde elde edilmiş ve hastalığın bölgedeki epidemiyolojisi hakkında bilgi ortaya koymuştur. MTK alt türlerinin belirlenmesi açısından bu çalışma Çanakkale bölgesinde bir ilk niteliğindedir ve bu yaklaşım hastalığın teşhis, tedavi ve kontrol yöntemlerine katkı sunabileceği için mikobakteriyoloji laboratuvarlarında uygulanması tavsiye edilmektedir.

PCR ve RFLP yöntemlerinin direk klinik örneklerle uygulanabileceği bilinmektedir. Bu yöntem ile kültür sonucunu beklemeden daha hızlı sonuçlar üretmesi imkân dâhilindedir. Özellikle yayma ve kültür negatif olan olgularda ortamda bulunan basil sayısı düşük miktarda olduğu durumlarda PZR-RFLP yöntemi ile mikobakterilerin duyarlı, hızlı ve pratik detaylı identifikasyonu mümkün olabilecektir.

7. KAYNAKLAR

- Ahmet Aaçayak, Yasemin Bulut, Adnan Seyrek. Elazığ Yöresinde Tüberkülozlu Hastaların Balgam Örneklerinde Mikobakteri Tür Dağılımının PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi. Mikrobiyol Bült, 2007;41:203-209.
- Alpaslan Alp, Şehnaz Alp, Zeynep Sarıbaş, Gülşen Haşçelik. Mikobakterşyel DNA izolasyonunda üç farklı yönteminin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bült, 2007; 41:395-402.
- Alpaslan Alp. Tüberkülozun laboratuvar tanısında güncel durum, Hacettepe Tıp Der, 2011; 42:28-33.
- Alper Çiftçi, Antimikrobiyal direncin genetik metodlar ile saptanması, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2003, 01;01:22-28.
- Ayşe Esin Aktaş, Nimet Yiğit, Ahmet Ayyıldız, Ayşe Baştıopçu. Comparison of the Mycobacterium Growth Indicator Tube Method and the Method of Proportion for Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium Tuberculosis. Eurasian J Med. 2014 Jun; 46(2): 96–101. doi: 10.5152/eajm.2014.23.
- Ayşe Karacalı, Çukurova bölgesinde izole edilen Mycobacterium tuberculosis izolatlarının tür tayininde IS6110-RFLP yönteminin kullanılması. 2010, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Yüksek Lisans tezi, 48 sayfa, Adana, (Prof. Dr. Salih Köksal).
- Banu Bayraktar, Emin Bulut, Ayşe Bayrı Barış, Buket Toksoy, Nazan Dalgıç, Çiğdem Çelikkın, Dilek Sevgi, *Species Distribution of the Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Isolates from 2007 to 2010 in Turkey: a Prospective Study*. Journal of Clin microbiol, 2011:3837-3841.
- Barış İY. Çağlar boyu tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun. 2003; 1-7.
- Baylan O, Kisa O, Albay A, Dogancı L. Evaluation of a new automated, rapid, colorimetric culture system using solid medium for laboratory diagnosis of tuberculosis and determination of anti-tuberculosis drug susceptibility. Int J Tuberc Lung Dis, 2004; 8:772-7.
- Chan DS, Choy MY, Wang S, Sng LH. An evaluation of the recovery of mycobacteria from urine specimens using the automated Mycobacteria Growth Indicator Tube system (BACTEC MGIT 960). J Med Microbiol 2008; 57:1220-2.
- Cheng VCC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005; 24:711-20.
- Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* Highlights the Limitations of Current Methodologies. PLoS ONE.2009;4:e7815.
- Coscolla M, Gagneux S. Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity Drug Discovery Today: Disease Mechanisms. Pubmed 2010;7:e43–e59.

- Cumhur Özkuyumcu, Dürdal Us, Banu Sancak, Alpaslan Alp, Zeynep Sarıbaş, Aslı Çakar, Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2009:76-77.
- Çavuşoğlu C. Mycobacterium tuberculosis’de Moleküler Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri, 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım, Samsun, 2003; 367.
- Della-Latta P, Weitzman I. Mycobacteriology. In: Isenberg HD (ed). Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press.1998: 169-183.
- Demir T. Tüberküloz Epidemiyolojisi. Erişkin ve çocukta tüberküloz. Ed.Öngen G. İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Komisyonu yayınları, No:13,1999:9-13.
- Down JA, O’Connell MA, Dey MS et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens by strand displacement amplification of DNA. J Clin Microbiol 1996; 34: 860-865.
- Durmaz R. Türkiye’de tüberküloz basillerinin moleküler epidemiyolojisi. XXIX Türk Mikrobiyolojisi Kongresi Program ve Özet Kitabı. Cengiz AT, Erdem B, Dolapçı Gİ, Tekeli FA (eds). Ankara, 2000. s:119-121.
- Engin Seber, Tüberkülozun Dünyü, ANKEM Derg, 2010;24(Ek 2):52-60.
- Erica Chimara, Lucilaine Ferrazoli, Sylvia Cardoso Leao. Mycobacterium tuberculosis Complex Differentiation Using gyrB Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 2004; 99(7): 745-7488.
- Esteban J, Jimenez-Arriero M, Soriano F. Observation of microcolonies on Middlebrook 7H11 medium for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and the Mycobacterium avium complex in clinical samples. Clin Microbiol Infect ,1996; 2:232-3.
- Gönül Aslan, Necdet Kuyucu, Mukadder Çalikoğlu, Gülden Ersöz, Mahmut Ülger, Selami Günal, Gürol Emekdaş, Mycobacterium bovis’ in etken olduğu tüberküloz olguları. ANKEM Derg,2009;23(4):182-187.
- Gül Bayram, Mikobakteri Türlerinin İdentifikasyonu İçin PZR-RFLP (Parça Uzunluk Polimorfizmi) Tekniği ve Klasik Yöntemlerin Uygulanması. 2007, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, 63 sayfa, Mersin, (Prof. Dr. Gürol Emektaş).
- Hanna S and Musser J.M., Moleculer Diagnosis of Mycobacteria.. Clin. Chemist. 2001;47:5.809-14.
- Howard W. Hagard , The doctor in History, Dorset, New York, 1989:332-350.
- Inderlied CB. Mycobacteria In: Armstrong D, Cohen J (Eds). Infectious Diseases, Mosby Company, London. 1999; 1(8): 1-22.

- İsmail Hamdi Kara, Tüberküloz: Güncel epidemiyoloji ve hastalık yönetimi. Türk Aile Hek Der, 2007; 11(1): 33-42.
- Kasai, H., T. Ezaki, and S. Harayama, Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. J. Clin. Microbiol, 2000, 38:301–308.
- Kocagöz Tanıl, Mikrobiyolojik Tanıda Klasik Yöntemlerde Yeni Yaklaşımlar. ANKEM Derg 2013;27(Ek 2):150-153.
- Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun. 2003; 34-47.
- Köksal F. Tüberküloz basilinin kaynak ve evrimi. *Tüberküloz Sempozyum Kitapçığı*, Malatya. 2003; 34-47.
- Midori Kato-Maeda, John Z. Metcalfe, Laura Flores. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: application in epidemiologic studies. Future Microbiol. 2011 Feb; 6(2): 203–216. doi: 10.2217/ fmb.10.165.
- Mignard S, Pichat C, Carret G: *Mycobacterium bovis* infection, Lyon, France, Emerg Infect Dis, 2006;12(9):1431-3.
- Mireia Coscolla ve Sebastien Gagneux. Semin Immunol. 2014 Dec; 26(6): 431–444. Published online 2014 Oct 22. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.012.
- Niemann S, Richter E, Rüşch-Gerdes S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide susceptible subtypes of *Mycobacterium bovis*. J Clin Microbiol 2000; 38: 152-7.
- Niemann, S., D. Harmsen, S. Rüşch-Gerdes, and E. Richter, Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol, 2000,38:3231–3234.
- Olkar Abdülmajed, Klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin karşılaştırılması. 2011, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, 88 sayfa, Kayseri, (Prof. Dr. A. Nedret Koç).
- Özbey N, Akçalı A, Tatman -Otkun M. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi 2009-2011 yılı Tüberküloz Laboratuvar Verilerinin Değerlendirilmesi. Türk Hij Der Biyol Derg, 2012; 69(3):149-54.
- Parsons LM, Brosch R, Cole ST, et al. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. J Clin Microbiol 2002; 40: 2339-45.
- Perkins MD. New diagnostic tools for tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4(Suppl 2):S182-8.

- Pinsky, B. A, and N. Banaei. 2008. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. *J. Clin. Microbiol.* 46:2241–2246.
- Richard A. Harvey, Pamela A. Champe, 2006, *Microbiology. Mikrobiyoloji, Özdem Anđ, Nobel Matbacılık, İstanbul, 2006:246-247.*
- Rishi S, Sinha P, Malhotra B, Pal N. A comparative study for the detection of *Mycobacteria* by BACTEC MGIT 960, Lowenstein Jensen media and direct AFB smear examination. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25:383-6.
- Ritz N, Hanekom WA, Robins-Browne R, Britton WJ, Curtis N: Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis, *FEMS Microbiol Rev*,2008;32(5):821-41.
- Romero B, Aranaz A, de Juan L et al: Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals, *J Clin Microbiol*, 2006;44(9):3405-8.
- Siddiqi SH. Procedure for primary isolation of mycobacteria from clinical specimens. p. II.1-II.13. In *BACTEC TB System Product and Procedure Manual* 1989, Becton Dickinson, Maryland.
- Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem.* 2001; 47: 809-814.
- Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, 2006; 6:664-74.
- Süheyla Sürücüoğlu, *Tüberkülozun mikrobiyolojik tanısı, KLİMİK Toplantısı, İzmir, 2013.*
- TC Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, *Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi.* Ankara, 2014.
- TC Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı, *Türkiye’de Verem Savaşı 2012 Raporu.* Ankara, 2013.
- Thomas Dormandy. *A History of Tuberculosis, The White Death The Hambleton*,1999, London.
- Trebuçq A. Revisiting sputum smear microscopy, *Int J Tuberc Lung Dis*, 2004; 8:805.
- Unat EK. Osmanlı İmparatorluğunun son 40 yılında Türkiye'nin tüberküloz tarihçesi üzerine. *Cerr. Tıp Fak. Derg.* 1979;10(4): 273-284.
- Ülkü Oral Zeytinli, Çukurova bölgesinde akciğer tüberkülozlu hastalardan izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının spoligotyping ve MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat*) yöntemiyle tiplendirilmesi. 2010, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık tezi, 73 sayfa, Adana, (Prof. Dr. Fatih Köksal).

- Van der Zanden AG, Kremer K, Schouls LM, et al. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for Mycobacterium tuberculosis complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4628-39.
- Van Deun A, Maug AK, Cooreman E, Hossain MA, Chambuganj N, Rema V, et al. Bleach sedimentation method for increased sensitivity of sputum smear microscopy: does it work? *Int J Tuberc Lung Dis*, 2000; 4:371-6.
- Vlasplolder F, Singer P, Roggeveen C. Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2699-2703.
- Wayne LG, Kubica GP. Mycobacteria In: P.H.A.Sneath, (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2. The Williams & Wilkins Co, Baltimore. JCM1986; 1435-1457.
- Wei CY, Hsu YH, Chou WJ, Lee CP, Tsao WL: Molecular and histopathologic evidence for systemic infection by Mycobacterium bovis in a patient with tuberculous enteritis, peritonitis, and meningitis: a case report, *Kaohsiung J Med Sci*, 2004;20(6):302-7.
- Y. İzzettin Barış, Dünyada tüberkülozun tarihçesi. *Toraks Dergisi*, 2002; 338-340.
- Y. İzzettin Barış, Osmanlı padişahlarının yaşamlarından kesitler, hastalıkları ve ölüm sebepleri. *Bilimsel Tıp Yayınları*, Ankara 2002.
- Zeki Kılıçaslan, Dünyada ve Türkiyede Tüberküloz, *Ankem Derg*, 2007;21 (Ek 2):76-80.
- Zeynep Ceren Karahan, Alper Tekeli , Figen Atalay, Nejat Akar. Mycobacterium tuberculosis suşlarının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile genotiplendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2006; 59:139-143.
- <http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdernot.htm>, Erişim tarihi: 23 Şubat 2016.
- <http://veterinarymicrobiology.in/acid-fast-staining>, Erişim tarihi: 12.07.2016.
- <http://www.abmfuar.com>, Erişim Tarihi: 12.07.2016.
- <http://www.who.int> , Erişim tarihi: 22 Şubat 2016.
- <http://www.who.int/tb/country/data/profiles/en/>, Erişim tarihi: 26 Şubat 2016.
- <https://www.klimud.org>, Erişim tarihi: 12.07.2016.
- <https://www.studyblue.com>, Erişim Tarihi: 12.07.2016.


8. EKLER

Ek 1. ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CİLTLİ TEZ YAZIM KONTROL LİSTESİ

KONTROL BAŞLIĞI	ÖĞRENCİ	DANIŞMAN
Tez yazımında kullanılan yazı tipi	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfa kenar boşlukları	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İç kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Onay sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Beyan sayfası içeriği ve düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İçindekiler sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Teşekkür sayfası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Türkçe özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İngilizce özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Simgeler ve kısaltmalar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekiller dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tablolar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin ön sayfalarının sıralaması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ön sayfaların numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfalarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Başlıklarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekil, resim ve tablo numaralandırması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Yöntem ve Gereç	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Bulgular	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tartışma	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sonuç ve Öneriler	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kaynaklar	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Atıflar (alıntı ve göndermeler)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ekler (etik kurul onayı, vs)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tez planı	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Dil (anlatım, yazım –imla)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kâğıt ve baskı özelliği	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin son şeklinin elektronik kopyası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tarih: ... / ... / 20...	Tarih: ... / ... / 20...	
Öğrenci Adı ve Soyadı,	Danışmanın Adı ve Soyadı,	
İmza	İmza	

Ek 2. Etik Kurul Onay Formu



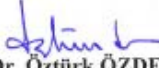
T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : KLİ.ARŞ.ETİK.KURUL.BŞK./050.99-177 15/10/2014
Konu : Başvuru İncelemesi

Sayın Prof. Dr. Ahmet ÜNER

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Mycobacterium Tuberculosis Kompleks Suşlarının Genotiplendirilmesi" başlıklı EK-2014-113 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 15/10/2014 tarih ve 18-04 nolu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.


Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkan

Karar Tarihi :15.10.2014 15:30
Karar No :2014-18

Karar-04) EK-2014-113 no'lu araştırma ile ilgili olarak, proje araştırmacılarından Nimet AÇIKKOL'un sunumunun dinlenmesinin ve raportörün hazırladığı değerlendirilmenin okunması sonrasında yapılan oylamada "ETİK KURUL ONAYINI ALIR." kararı verilmiştir.

9.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nimet	Soyadı	KARADELİ
Doğum Yeri	Acıpayam	Doğum Tarihi	01.01.1988
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	18073818668
E-mail	Nimet_biyo08@hotmail.com	Tel	02862635950/1064

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	...
Lisans	Pamukkale Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi	2012

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Yıl
1. Biyolog	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2013-2016
2. Öğretmen	Milli Eğitim Bakanlığı	2016- ...

Katıldığı Kongreler/Sempozyum ve Bildiriler

Erişkin Aşı Sempozyumu/İzmir/2014
Ekmud Çanakkale Enfeksiyon Akademisi/Çanakkale/2014
Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü öğrenci Kongresi/Çanakkale/2016
Vural A., Tekin S.Z., Kiraz A., Açikkol N. , Ünver A. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesinde kan kültürlerinden elde edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal direnç özellikleri, 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, İSTANBUL, TÜRKİYE, 18-20 Nisan 2014, cilt.11, no.1, ss.1-1.