

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIK GÖRÜLEN BAKTERİYEL TÜRLERİN TANISINI GERÇEKLEŞTİRMEK ÜZERE
BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİN YAPILMASI VE KÜTLE
SPEKTROSKOPİSİNE DAYALI BİR PANELİN GELİŞTİRİLMESİ**

Osman Mutluhan UĞUREL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. Dilek TURGUT BALIK**

**EŞ DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. Oğuz ATA**

İSTANBUL, 2015

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIK GÖRÜLEN BAKTERİYEL TÜRLERİN TANISINI GERÇEKLEŞTİRMEK ÜZERE
BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİN YAPILMASI VE KÜTLE SPEKTROSKOPİSİNE
DAYALI BİR PANELİN GELİŞTİRİLMESİ**

Osman Mutluhan UĞUREL tarafından hazırlanan tez çalışması 04/08/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

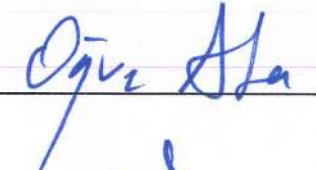
Yrd. Doç. Dr. Oğuz ATA
İstanbul Aydın Üniversitesi

Jüri Üyeleri

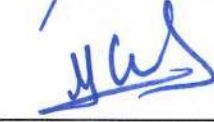
Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Oğuz ATA
İstanbul Aydın Üniversitesi



Doç. Dr. Merih ÇETİNKAYA
KSS Eğitim ve Araştırma Hastanesi



Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi



Öğr. Gör. Dr. Özkan DANIŞ
Marmara Üniversitesi



Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2014-07-04-YL04 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez çalışmasında üretilen verilerin fikri haklarının korunması amacıyla Yıldız Teknik Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi ile patent sözleşmeleri imzalanmıştır.

ÖNSÖZ

Tanıştığım günden bu yana, gerek tez çalışmam, gerekse şahsi meselelerimde, bilgi ve deneyimlerini paylaşma konusunda sürekli cömert davranan, her konuda desteğini esirgemeyen değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK'a;

Bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek değerli fikirleri ile çalışmama katkıda bulunan eş danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Oğuz ATA'ya;

Tez çalışmasının yürütülmesine maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu ve Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne;

Tez çalışmamı yürütürken paylaştıkları bilgilerden dolayı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, *Mycoplasma* Laboratuvarı'ndan Sayın Dr. Ümit ÖZDEMİR'e;

Tez çalışmam sırasında desteklerini hissettiğim Biyomühendislik Bölümü Rekombinant DNA Teknolojileri Laboratuvarında kendileri ile çalışmayı bir şans saydığım çok değerli grup arkadaşlarıma;

Desteklerini hiçbir konuda esirgemeyen sevgili aileme, anne ve babama;

Her çalışmamda kendisinden güç aldığım sevgili eşim, Erennur UĞUREL'e;

Teşekkürü bir borç bilirim.

Ağustos, 2015

Osman Mutluhan UĞUREL

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Mikrobiyom	1
1.1.2 Mikrobiyolojik Tanının Önemi	3
1.1.3 Günümüzde Klinik Mikrobiyolojide En Çok Kullanılan Tanı Yöntemleri	4
1.1.3.1 Geleneksel Yöntemler	5
1.1.3.1.1 Kültür Temelli Yöntemler	5
1.1.3.1.2 Mikroskopi Temelli Yöntemler	5
1.1.3.2 Hızlı Yöntemler	5
1.1.3.2.1 İmmünolojik Yöntemler	5
1.1.3.2.2 Biyosensör Temelli Yöntemler	6
1.1.3.2.3 Nükleik Asit Temelli Yöntemler (Klasik Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	6
1.1.3.3 Bakteriyel Tanılamaya Yönelik Geliştirilen Yeni Yaklaşımlar.....	7
1.1.3.3.1 Yeni Nesil Dizileme ve Filogenetik Olarak Korunmuş Gen Bölgeleri.....	7
1.1.3.3.2 SNP Analizi Uygulamaları	9
1.1.4 Mikrobiyolojik Tanılarda Biyoinformatik Araçların Rolü	11
1.1.5 Büyükbaş Hayvancılıkta Karşılaşılan Bazı Önemli Hastalıklar ve Etkenleri	13
1.1.5.1 Solunum Sistemi Hastalıkları.....	15
1.1.5.2 Mastitis.....	16
1.1.5.3 Abortus.....	18
1.2 Tezin Amacı	18
1.3 Hipotez	19
BÖLÜM 2	
MATERYAL VE YÖNTEM	20
2.1 Materyal.....	20
2.1.1 Biyoinformatik çalışmalarda kullanılan DNA dizileri	20

2.1.2	Deneyisel çalışmalarda kullanılan referans suşlar.....	25
2.1.3	Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler, Enzimler ve Kitler	25
2.1.4	Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	25
2.2	Yöntem.....	26
2.2.1	Biyoinformatik Analizler	26
2.2.2	Deneyisel Çalışmalar.....	28
2.2.2.1	Genomik DNA İzolasyonu.....	28
2.2.2.2	Genomik DNA Örneklerinin Miktar ve Safılık Tayini	28
2.2.2.3	Kütle Spektroskopisi Temelli Deney Tasarımı	28
2.2.2.3.1	Deney Tasarımı	29
2.2.2.3.2	Primer ve Prob Tasarımı	29
2.2.2.3.3	Multiplex PCR Uygulaması.....	32
2.2.2.3.4	dNTP Nötralizasyonu (SAP Uygulaması).....	32
2.2.2.3.5	Tek Baz Spesifik Uzama Reaksiyonu	33
2.2.2.3.6	Rezin Uygulaması.....	36
2.2.2.3.7	Ürünlerin Çipe Aktarılması	37
2.2.2.3.8	MALDI-TOF ile Genotipleme.....	37
BÖLÜM 3		
SONUÇLAR VE ÖNERİLER		38
3.1	Biyoinformatik Analizler.....	38
3.1.1	DNA dizilerinin Kullanılabilir Hale Getirilmesi	38
3.1.2	SNP Analizi	41
3.2	Deneyisel Çalışmalar	44
3.2.1	DNA'ların Safılık ve Miktar Analizi	44
3.2.2	Çalışılan Örneklerin Gruplandırılması	44
3.2.3	Genotipleme Sonuçları	46
3.3	Sonuçların Değerlendirilmesi ve Öneriler	48
KAYNAKLAR.....		52
ÖZGEÇMİŞ.....		59

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
Da	Dalton
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mg ⁺²	Magnezyum
ng	Nanogram
nL	Nanolitre
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Derece Santigrat

KISALTMA LİSTESİ

bç	Baz çifti
DDBJ	DNA Japonya Veritabanı
ddNTP	Dideoksiribonükleozid trifosfat
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EMBL	Avrupa Moleküler Biyoloji laboratuvarı
MALDI	Matriks destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon
MS	Kütle spektrometrisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. 1 İnsan gastrointestinal sisteminden kültür edilen bakteri sayısının yıllara göre değişimi.....	1
Şekil 1. 2 Yıllara göre antibiyotik direnci ve biyolojik risk grafiği	4
Şekil 1. 3 RFLP Tekniği İle Mikrobiyolojik Tanı Konması.....	7
Şekil 1. 4 16S rDNA gen dizilimi karşılaştırmasına dayanan evrensel filogenetik ağaç .	9
Şekil 1. 5 Sequenom MassArray platformu deney akış şeması	10
Şekil 1. 6 MALDI-TOF MS platformunun okuma prensibi	11
Şekil 1. 7 Yıllara göre GenBank’da depolanan DNA dizisi ve baz sayısındaki artış	12
Şekil 2. 1 Primerlerin dört aşamalı uzama probu ayarlama metoduna göre gruplandırılması	34
Şekil 2. 2 Tek baz spesifik uzama reaksiyonunun şematik gösterimi	36
Şekil 3. 1 Programın kullanıcı arayüzü.....	39
Şekil 3. 2 Oluşturulan veritabanından alınan bir Excel tablosuna ait ekran görüntüsü	40
Şekil 3. 3 MUSCLE programında yapılan dizi hizalama işleminin Jalview görüntüsü ...	42
Şekil 3. 4 Türler arasında 8 SNP ile yapılan genotip farkları.....	43
Şekil 3. 5 MassArray Typer 4.0 Analyzer yazılımına ait kullanıcı arayüzü görüntüsü ..	46
Şekil 3. 6 <i>M. mycoides subsp. mycoides</i> SC kültüründen izole edilen örneğe ait T1_SNP2 nolu SNP’nini genotipleme sonuçları	47

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1. 1	Yıllara göre Dünya büyükbaş ve küçükbaş hayvan varlığı (milyon baş).... 14
Çizelge 1. 2	Yıllara göre Türkiye büyükbaş ve küçükbaş hayvan varlığı 14
Çizelge 2. 1	Biyoinformatik çalışmalarda kullanılan gen dizilerinin isimlerive GenBank erişim numaraları 21
Çizelge 2. 2	Panel tasarımında kullanılan gen dizilerinin GenBank erişim numaraları 23
Çizelge 2. 3	Biyoinformatik Analizlerde Kullanılan Yazılım ve Araçlar 26
Çizelge 2. 4	Tez çalışmasında kullanılan tür-numara listesi 27
Çizelge 2. 5	SNP allelleri arasındaki kütle farklılıkları [37] 29
Çizelge 2. 6	SNP'ler ve genotipleme primerleri..... 31
Çizelge 2. 7	Multiplex PCR karışımı 32
Çizelge 2. 8	SAP reaksiyonu bileşenleri 33
Çizelge 2. 9	Tek baz spesifik uzama reaksiyonu bileşimi..... 35
Çizelge 2. 10	Tek baz spesifik uzama reaksiyonu koşulları 35
Çizelge 3. 1	Örneklerin DNA konsantrasyonu ve saflık tayini44
Çizelge 3. 2	Deneyisel çalışmalarda kullanılan örnekler 45
Çizelge 3. 3	Genotipleme analizi sonuçları..... 49

**SIK GÖRÜLEN BAKTERİYEL TÜRLEİN TANISINI GERÇEKLEŞTİRMEK ÜZERE
BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİN YAPILMASI VE KÜTLE
SPEKTROSKOPİSİNE DAYALI BİR PANELİN GELİŞTİRİLMESİ**

Osman Mutluhan UĞUREL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Eş Danışman: Yrd. Doç. Dr. Oğuz ATA

Gıda güvenliği ve sürdürülebilir hayvancılık, artan dünya nüfusu ile birlikte günümüzde hızla önemini arttırmaktadır. Bu kavramları tehdit eden en önemli unsurlardan biri enfeksiyon hastalıklarıdır. Çiftlik hayvanlarında et ve süt üretiminde verim kaybına ve tedavi edilmediği takdirde ölümlere neden olarak önemli ekonomik kayıplara yol açan enfeksiyonlar, bazı durumlarda insanlarda da ciddi hastalıklara sebep olabilirler. Öngörülen belirtileri taşıyan bireylerden alınan numunelerde bu bakterilerin tespit edilmesi ve tanısının yapılması uygulanacak tedavi yönteminin belirlenmesinde kilit önem taşımaktadır. Günümüzde patojenlerin tanısında kullanılan en yaygın yöntemler kültür, serolojik, biyokimyasal ve moleküler tanı yöntemleridir. Ucuz ve kolay olmasına karşın uzun sürede sonuç vermesi, tür düzeyinde tanıya imkan vermemesi ve düşük hassasiyetleri kültür tabanlı yöntemlerin ve serolojik yöntemlerin en büyük sınırlamasıdır. Moleküler tabanlı metotlar ise çoklu örneğe bir anda bakılmasını son derece sınırlamakta bu durum da iş yükünü ile beraber maliyeti de arttırmaktadır. Bu tez çalışmasında 26 farklı patojenin tanısını, çoklu örnekte ve yüksek doğrulukta gerçekleştirmeyi mümkün kılan bir panel geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla 26 patojene ait iki farklı gen bölgesinde bulunan ilk kez bu tez çalışmasında belirlenmiş

olan 208 SNP (tek nükleotit polimorfizmi) tespit edilmiştir. Patojen olduğu bilinen türler için biyoinformatik araçlarla belirlenen türe özgü SNP'lerden 17 tanesi seçilerek, MALDI-TOF MS/iPLEX genotipleme sistemi ile test edilmesi sonucunda, sistemin uygulanabilirliği gösterilmiştir. Yapılan tez çalışması ile, istenildiği taktirde tür sayısının genişletilmesi veya panele dahil olan türlerin kullanıcı ihtiyacına göre seçilerek kullanımının sağlanması nedeniyle; kaynaktan bağımsız olarak, yüksek doğrulukta çoklu örnekte tanı yapabilen, kullanıcı kolaylığı sunan, bir panel tasarlanmıştır. Tasarlanan panelin, ticari kullanıma sunulmasından önce optimizasyon ve validasyon çalışmalarının yapılması, bu tez kapsamında çalışılan 26 mikroorganizmanın tek panelde ilk kez türe özgü tanısının gerçekleştirilmesine imkan sunarak, benzer mikroorganizmalarla yapılacak olan araştırmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyoinformatik, pneumoniae, mastitis, abortus, tanı paneli, SNP kütle spektroskopisi

**DEVELOPMENT OF DIAGNOSIS PANEL FOR COMMON BACTERIA USING
BIOINFORMATICS TOOLS AND MASS SPECTROSCOPY**

Osman Mutluhan UĞUREL

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Co- Adviser: Yrd. Doç. Dr. Oğuz ATA

Nowadays, food security and sustainable livestock are two of very important concepts with growing world population. Infections are one of threatening facts of these concepts. Infections can cause significant economic losses in livestock, leading to yield loss in dairy and meat production, even it may cause deaths if it is left untreated. Additionally these pathogens can infect humans and cause significant illness. In taken samples from patients who carries expected symptoms, detection and diagnosis of these bacteria has got key importance for determining the subsequent treatment. Nowadays, the most common methods for the diagnosis of this bacterium are culture, serological, biochemical and molecular methods. Although being cheap and easy, giving results in a long time, not allowing to species level diagnosis and low sensitivity are significant limitations of serological and culture-based methods. Molecular based methods also do not allow to analyze the multiple samples as a group and this situation increases the workloads. In this thesis, it is aimed that developing a panel for the diagnosis of 26 pathogens in multiple samples with high accuracy. For this purpose, 208 SNPs (single nucleotide polymorphisms) that designated first time in this thesis, have been identified from two gene region of 26 different pathogen. 17 of species-specific SNPs that have been determined by the bioinformatics of these pathogens have been chosen and analyzed by MALDI-TOF MS / iPLEX genotyping system and that

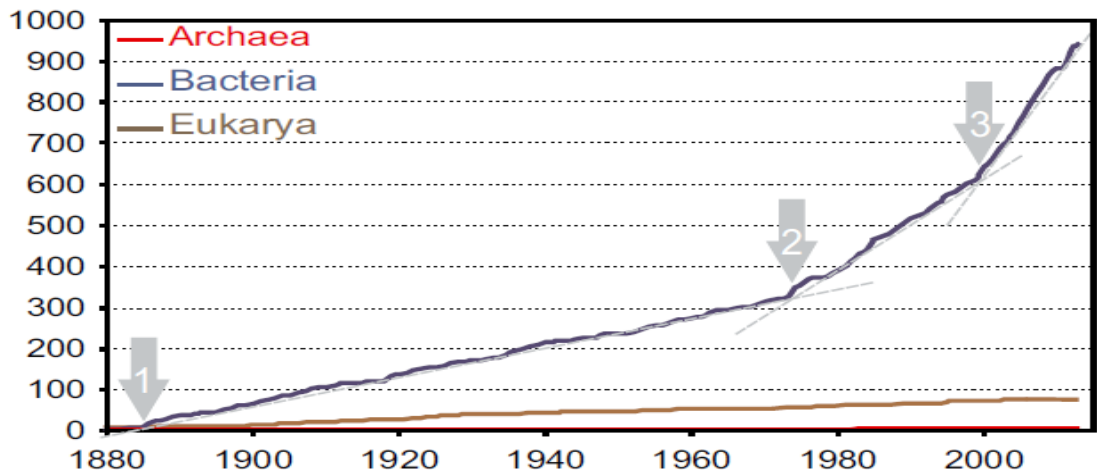
show the feasibility of system. In this thesis, a user friendly diagnostic have designed panel that have got features like; reducible or expandable number of target species as user needs, independent from source, identify capable in multi sample with high accuracy. Species-specific diagnosis of these 26 microorganisms in single panel, performing optimization and validation studies, before presenting to commercial use, species-specific diagnosis of these microorganisms and also shed light to the new researches with other microorganisms.

Keywords: Bioinformatics, pneumoniae, mastitis, abortus diagnosis panel, mass spectrometry

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Mikrobiyom

Bakteri aleminin içinde bulunduğu prokaryotlar, yaşadığımız dünyada baskın yaşam formudur. Son zamanlardaki biyoinformatik gelişmeler ve ilerleyen dizileme teknolojileri, çeşitli ortamlardaki mikrobik topluluklar hakkında kapsamlı araştırmalar yapılmasına imkan sağlamıştır (Şekil 1.1) [1], [2]. Dünya üzerinde yaklaşık 10^{30} mikrobiyal hücre olduğu [3] ve sadece bir insan vücudunda 10^{14} civarında mikroorganizma olduğu [4] düşünülmektedir. Bir organizma içerisinde bulunan mikroorganizma topluluğunun tümü mikrobiyom olarak adlandırılır [5], [6].



Şekil 1. 1 İnsan gastrointestinal sisteminden kültür edilen bakteri sayısının yıllara göre değişimi (1- İlk bakterinin izole edilmesi, 2- Aneerobik teknikler, 3- Moleküler teknikler) [2]

Mikroorganizmalar vücut içerisinde komuniteler halinde çeşitli yerlerde bulunabilirler. Örneğin memeli mikrobiyomu vücut üzerinde genel olarak 4 yerde kolonize olur. Bunlar gastrointestinal sistem, deri, ürogenital sistem ve solunum sistemidir[6]. Bu mikroorganizmalar bulunduğu yere, sayıya ve çeşitliliğe bağlıdır ve konak organizma ile olan ilişkileri genel olarak simbiyotik etkileşim olarak adlandırılır.

Simbiyotik etkileşimleri bulunan organizmaların etkileşimlerinin sonuçları, birçok değişkene bağlıdır. Bu ortak yaşam ilişkisinde konak popülasyonunu azaltan ve konağa zarar veren ilişki durumu patojenite (parazite) olarak adlandırılır. Konak popülasyonu değişmiyor ve yaşamı bu canlıdan etkilenmiyorsa bu ilişki kommensalizm (ortakçı) olarak adlandırılır. Konak popülasyonu ve konak ile ortak yaşam süren organizma karşılıklı birbirinden yarar sağlıyor ise bu ilişki mutualizm olarak adlandırılır [7], [8].

Latince *mutuus* (karşılıklı olarak) kelimesinden türetilmiştir [9]. Organizmalar doğrudan kendilerine katkı sağladıkları gibi tesadüfen aynı zamanda başka canlılara da faydalı olabilirler. Bu şekilde yan ürünlerin iki yönde de faydalı olması maliyet gerektirmeyen mutualizm şeklinde açıklanabilir. Örneğin, insan vücudu için sindirilebilir olmayan bitki polisakaritleri, kolon mikrobiyel büyüme için temel substratlar iken, butirat gibi mikrobiyal fermentasyon ürünleri konak için önemli bir enerji kaynağıdır [10]. En iyi bilinen mutualizm örneği hipermastigid kamçılılar ile termitler arasındaki ilişkidir. Kamçılılar termitlerin bağırsakları dışında yaşamlarını sürdüremez iken termitlerin parçalayamadığı selülozu da kamçılılar parçalayarak karşılıklı faydalı bir ilişki sürdürürler [9].

Kommensal terimi Ortaçağ Latincesinde "masada birlikte" anlamına gelen "*commensalis*" teriminden gelir ve genellikle zarar vermeden ama belirgin faydası olmadan bir arada bulunan ortakları ifade eder [11].

Barınma, besin bulma ve sığınma amaçlı konaktan faydalanabildiği gibi bir yerden başka bir yere taşınmak amaçlı olarakta konakla beraber olabilir. Kesin olarak konağa zararı ya da yararı bulunmamaktadır. İnsan ve bazı hayvanların intestinal sisteminde yaşayan parazitlerin çoğu kommensal yaşam sürmektedirler [9].

Patojenitede ise bakteri konak dokusuna tutunan ve enfeksiyon oluşturarak kendisi fayda sağlarken konağa zarar vermektedir. Enfeksiyon oluşturan bakteriye patojen,

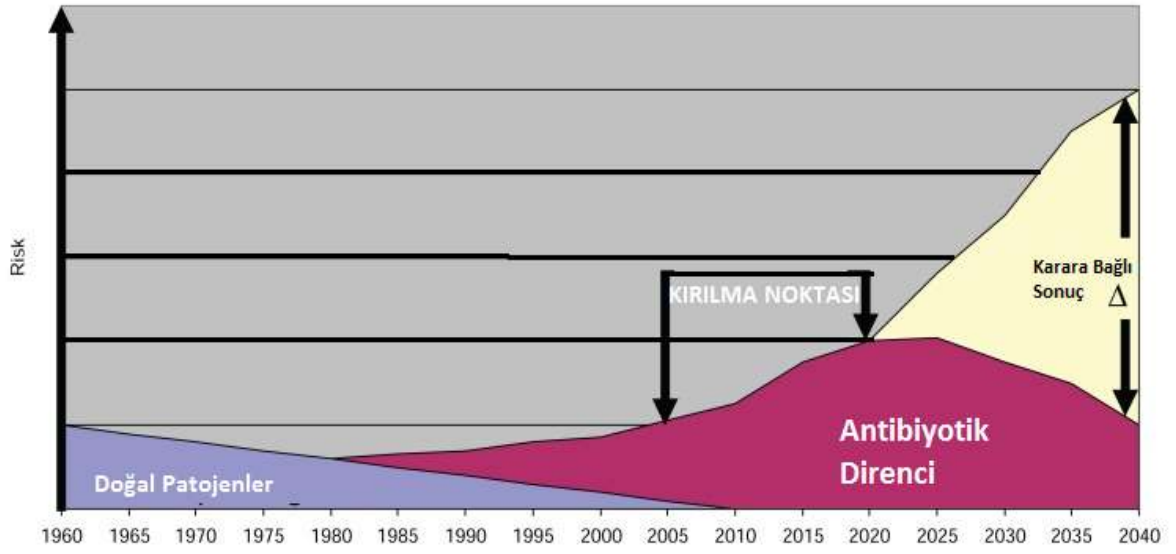
bakterinin enfeksiyon oluşturma kabiliyetine ise patojenite adı verilir. Aynı türe ait suşlar arasında patojen olanı belirtilmesi için virulan kelimesi kullanılır. Bazı bakteriler her zaman patojendir. Bazıları ise konak bağışıklık sisteminin hasara uğraması gibi faktörler olduğunda enfeksiyon oluştururlar. Bunlar fırsatçı patojen olarak adlandırılırlar [12].

1.1.2 Mikrobiyolojik Tanının  nemi

Sağlık hizmetlerinin ilk basamağı toplum sağlığının korunmasıdır. Bu nedenle de sağlık hizmetleri tüm dünyada toplumsal bir özellik taşımakta ve ülkelerin sağlık harcamaları giderek artmaktadır [13], [14]. Sağlık harcamalarının en temel kısmını sağaltım masrafları oluşturmaktadır.

Günümüzde bakterilerin, enfeksiyon hastalıklarının en temel etkenlerinden biri olduğu bilinmektedir. Çeşitli yollarla vücuda giren bu patojen bakteriler, vücut mikrobiyomunda bir nevi işgalci tür olarak belirerek hastalıklara sebep olabilirler. Normal florada bulunmayan patojenler, hava, su, gıda veya kan yolu ile rahatlıkla bulaşabilmektedir. Bu sebeple enfeksiyonların kontrolü, toplum sağlığının korunması açısından, insanlarla yakın ilişkide olan türler içinde gereklidir. Gerek gelişmiş, gerekse gelişmekte olan ülkelerde bakteri kaynaklı enfeksiyon hastalıkları en önemli morbidite nedenlerinden biridir. Bakteriyel etkenlerin hızlı ve doğru tanısı, koruyucu ve önleyici sağlık modelinin uygulanması için gereklidir [15].

Bakteriler,  evresel değişikliklere hızla uyum sağlayabilen canlılardır. Bunun bir  rneği de, özellikle son yıllarda sayıları oldukça artan antibiyotik direnci vakalarıdır. Antibiyotik direnci, söz konusu antibiyotiğin tedavi dozunda işe yaramamasını ifade etmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar antibiyotik direnci vakalarının artışına dikkat çekmekte, bu durumun önümüzdeki yıllarda oluşturabileceği riskler hakkında tartışmalara yol açmaktadır (şekil 1. 2). Halk sağlına yönelik bu risklerin önemine dikkat çekmek amacıyla Dünya Sağlık  rg t , 2011 Dünya Sağlık Gününün temasını antibiyotik direnci olarak belirlemiş ve direnç gelişimini durdurmak için tüm dünyayı bu konuyu düşünmeye, konuyla ilgili harekete geçmeye ve sorumluluk almaya çağırmıştır [16].



Şekil 1. 2 Yıllara göre antibiyotik direnci ve biyolojik risk grafiği [17]

Enfeksiyon etkeninin erken tanınması hastalıkların kontrol altında tutulmasını sağlamakta, hekimler için uygun tedavinin seçiminde yardımcı olmakta ve uygunsuz antimikrobiyal kullanımını önleyerek etkenlerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesini önlemektedir [15].

1.1.3 Günümüzde Klinik Mikrobiyolojide En Çok Kullanılan Tanı Yöntemleri

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizmaların tanısı için uygulanan tanı yöntemleri; geleneksel yöntemler ve hızlı yöntemler olmak üzere iki grupta incelenebilir. Halen altın standart olarak kabul edilen yöntem, geleneksel yöntemler içinde anılan kültür yöntemidir. Ayrıca boyalı ve boyasız mikroskopik inceleme de geleneksel yöntemler içinde sayılabilir. Hızlı yöntem terimi ise, farklı tiplerdeki minyatürize biyokimyasal kitleri, antikor temelli serolojik testleri, biyosensörleri ve nükleik asit amplifikasyon kökenli yöntemleri de içine alan bir grup testi kapsamaktadır. Bu test yöntemleri manuel veya otomatik kullanıma sahip olabilmektedir [18], [19]. Ancak hızla gelişen günümüz teknolojisi yeni nesil olarak adlandırılan bir dizi yöntemi de beraberinde getirmektedir.

1.1.3.1 Geleneksel Yöntemler

1.1.3.1.1 Kültür Temelli Yöntemler

Kültür yöntemi, mikroorganizmaların üremesi için gerekli uygun besiyeri ve koşulların sağlanması ve üreme dönemlerini tamamlamasıyla gerçekleşmektedir ve günümüzde halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Kültürde üretilen mikroorganizmaların tür seviyesindeki ayrımı tam olarak yapılamamakla birlikte, metabolik aktivitelerini gösterdikleri fenotipik testler mikroorganizmanın türü hakkında bir fikir verebilir. Üreme için geçen zaman mikroorganizma türüne göre değişebilmekte ve 4-6 saatten birkaç haftaya kadar uzayabilmektedir. Ayrıca tanımlama için yapılacak olan fenotipik testler, 24-48 saat daha ek süreye gereksinim duyabilmektedir. Günümüzde kültür temelli otomatize sistemler de bulunmaktadır [20].

Altın standart olarak kabul edilmesine rağmen yapılan çalışmalar, kültür testlerinin duyarlılığının % 50-80 arasında olduğunu ve üreme olduğunda, olguların % 80'inde etkenin ancak 48 saat sonunda saptanabildiğini bildirmiştir. Ayrıca kültürde üreme olmaması da etken tanısını yok saymamaktadır. Hastanın antibiyotik kullanması, örneğin miktarca azlığı, bölgesel enfeksiyonlar veya bakteri yoğunluğunun yetersizliği gibi nedenlerle, etken kültürde üretilmeyebilir. Tüm bu veriler mevcut yöntemin tanı için yetersiz olduğunu göstermektedir [21].

1.1.3.1.2 Mikroskopi Temelli Yöntemler

Rutin klinik laboratuvarlarda bazı mikroorganizmaların mikrobiyolojik tanısı için halen mikroskopi temelli yöntemler uygulanmaktadır. Ancak bu yöntemi kullanan klinik laboratuvar sayısı, yoğun iş yükü getirmesi ve nitelikli işgücü gerektirmesi nedeniyle, giderek azalmaktadır [22].

1.1.3.2 Hızlı Yöntemler

1.1.3.2.1 İmmünolojik Yöntemler

Mikroorganizmaların tanısında yıllardır uygulan yöntemlerden biri antikor-antijen reaksiyonudur. Antikorlar, yabancı moleküllere karşı organizma tarafından üretilen

immün yanıt molekülleridir. İmmunolojik yöntemlerde, tanının başarısı büyük ölçüde kullanılan antikorun özgünlüğüne bağlıdır [19]. Antijen-antikor reaksiyonu birçok patojenin hızlı bir şekilde belirlenmesi için kullanılan güçlü sistemlerdir. Bugün kullanılan bazı sistemler yüksek oranda otomatize edilmiş sistemler iken, bazı sistemler ise daha basit kullanıma sahiptir [18][18], [19], [23].

1.1.3.2.2 Biyosensör Temelli Yöntemler

Biyosensörler, biyolojik reaksiyonları veya molekülleri algılayan bir sensör ve fizikokimyasal çeviriciyle çalışan cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Biyosensörün amacı biyolojik bir olayı elektriksel sinyale dönüştürerek, elektronik bir arayüz ile görüntülenmesini sağlamaktır. Biyolojik duyargaç olarak genellikle enzimler ve antikorlar kullanılır. Antikor – antijen veya enzim – substrat arasındaki etkileşimin oluşturduğu fizikokimyasal etki elektrik sinyallerine dönüştürülebilir. Biyosensörler bugün, süreç denetleme, kalite kontrol, ilaç üretimi, endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda kullanıldığı gibi mikrobiyolojik tanıda da kullanılabilir [19], [24].

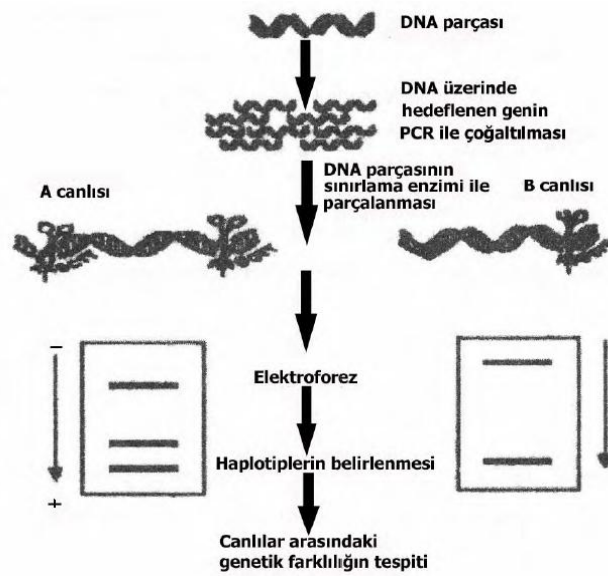
1.1.3.2.3 Nükleik Asit Temelli Yöntemler (Klasik Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Mikroorganizmaların üreme koşulları, fenotipik özelliklerini etkileyebilir. Bu üreme koşullarına örnek olarak, besin ihtiyacı, pH, ısı, çevresel ve kimyasal stresler, toksinler vb. gösterilebilir [19]. Canlı organizmaların genotipik özellikleri ise oldukça stabildir. Son yıllardaki gelişmeler, genetik testlerin de klinik mikrobiyolojide tanı amaçlı kullanılabileceğini göstermiştir [23].

Amplifikasyon sonrasında çoğaltılan DNA parçacıkları boyanma işlemini takiben elektroforez sistemleri kullanılarak elektrik akımı ile yürütülür. Patojen DNA'sına spesifik primerlerin sınırladığı dizinin uzunluğu bilindiğinden, PZR ürününün hangi uzunlukta bant oluşturduğu kullanılan DNA büyüklük standardı ile karşılaştırarak belirlenir [18].

Moleküler biyolojideki gelişmeler ile PZR temelli birçok mikrobiyolojik tanı yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında en çok kullanılanlardan biri, sınırlama parçası uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism) tekniğidir.

Sınırlama parçası uzunluk polimorfizmi tekniği, geleneksel PZR ile uygulanabilen ve türlerin genetik yapılarının belirlenmesinde en çok kullanılan tekniklerden biridir. DNA'nın kaynak olarak kullanıldığı çalışmalarda sıkça kullanılan bu teknik, DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesilerek parçalara ayrılması esasına dayanır [25].



Şekil 1. 3 RFLP Tekniği İle Mikrobiyolojik Tanı Konması [25]

Restriksiyon enzimleri, DNA üzerinde kendisiyle aynı yapıda olan bölgeyi tanır ve bu spesifik zinciri, “tanınma bölgesi” olarak adlandırılmaktadır. Enzim muamelesi sonucu oluşan parçalar, jel elektroforezi kullanılarak uzunluklarına göre ayrılır (Şekil 1.1). Bu parçalar arasında oluşan farklar, yer değiştirme veya mutasyon sonucu oluşan değişimleri gösterir [25].

1.1.3.3 Bakteriyel Tanılamaya Yönelik Geliştirilen Yeni Yaklaşımlar

1.1.3.3.1 Yeni Nesil Dizileme ve Filogenetik Olarak Korunmuş Gen Bölgeleri

Genom dizisinin belirlenmesinde kullanılan temel yöntemler, Sanger (dideoksi) metodu ve shotgun tekniğidir. Sanger metodu zincir sonlandırma tekniğine dayanır. Bir kerede

dizi analizi yapılamayacak kadar uzun olan DNA dizileri önce küçük parçalara bölünerek elde edilen parçalar bir plazmite klonlanır ve klonlanan plazmitler tek tek dizilenir. Biyoinformatik analizlerle bu dizilerin bir araya getirilmesi sonucunda hedef DNA dizisi elde edilir [26], [27].

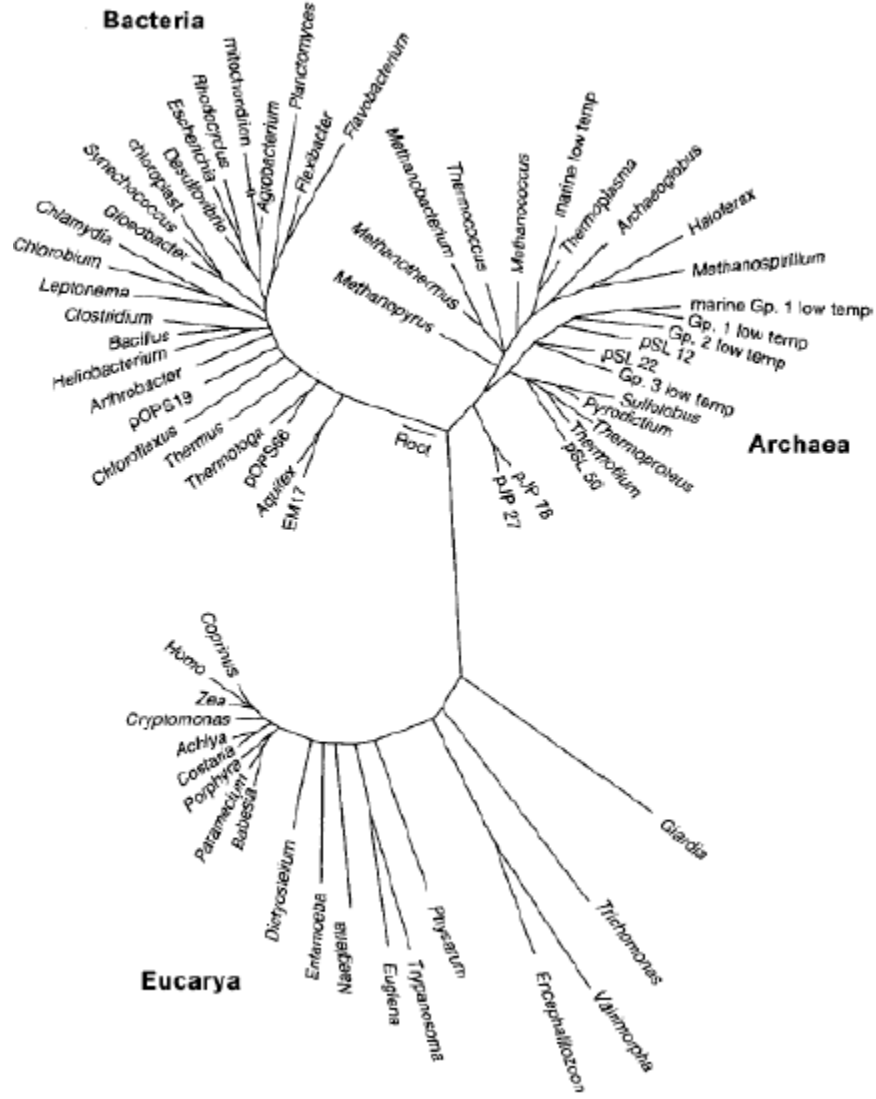
Sanger metodunun çok uzun süre alan zahmetli işlemlerden oluşması bilim adamlarını alternatif dizileme yöntemleri arayışına sokmuştur. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar sonucunda Sanger metodundan yola çıkılarak geliştirilen pirodizileme (pyrosequencing), geleneksel Sanger metodunun yerini almıştır [28].

Geliştirilen yeni nesil DNA dizileme teknolojisi, ultra hızlı olarak ve yüksek doğruluklarla dizileme yapılabilmektedir. Bu yöntemler kullanılarak elde edilen mikrobiyal genom dizileri araştırmacılara oldukça zengin ve özgün bilgiler sağlamaktadır. Örneğin yapılan bir çalışmada *E. coli* genomu, her bir reaksiyonda 400.000 okuma yapılarak, toplam 4 reaksiyonda *de novo* dizilenmiş ve okumaların yaklaşık %99.99 doğrulukta olduğu bildirilmiştir [29].

Şu an kullanılmakta olan yeni nesil dizileme sistemlerinden bazıları, Illumina Genome Analyzer, Roche 454 genome analyzer, Complete Genomics, Applied BioSystem SOLiD, Helios ve IonTorrent'dir [26].

Bir florada var olan tüm mikrobiyolojik canlılara ait genomların tamamının dizilenmesi ile ortamın mikrobiyolojik türlerin listelenmesini hedefleyen ve metagenomik olarak bilinen bir yaklaşım geliştirilmiştir. Gelişmiş dizileme teknikleri ile ortaya çıkan bu yaklaşım, insanlar ile bakteriler arasındaki ilişkilerin açığa çıkarılmasında da sıkça kullanılmaktadır. Bu alanda yapılmış olan ilk çalışma, 2006 yılında yapılmış ve obezite ile mide florası bakterileri arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur [30].

Genom üzerindeki değişmeyen bir bölgenin kıyaslanması ile canlıların filogenetik ilişkisinin saptanabileceği ilk kez 1985 yılında yapılan bir çalışma ile ortaya atılmıştır [31]. Bakteriler için bu bölgeler 5S, 16S ve 23S ribozomal DNA olarak adlandırılan gen bölgeleridir. Bu bölgeler içinde bakteri sınıflandırmada en sık kullanılan gen bölgesi 16S *rDNA*'dır. Ayrıca 16S *rDNA* geni, arkeler ile ve ökaryotlarda bulunan 18S *rDNA* geni ile de karşılaştırılabilir (Şekil 1. 5) [32], [33], [34].



Şekil 1. 4 16S rDNA gen dizilimi karşılaştırmasına dayanan evrensel filogenetik ağaç [32]

1.1.3.3.2 SNP Analizi Uygulamaları

SNP analiz yöntemleri iki ana başlıkta değerlendirilmektedir. Bu yöntemler daha öncede bilinen SNP'lerin allellerinin tespit edilmesinde ve yeni SNP'lerin keşfi veya taranmasında kullanılan teknikler olarak değerlendirilmektedir. Sürekli gelişen teknolojiler ile pahalı, emek ve zamanı çok alan sistemlerin yerine daha ucuz, yüksek verimli ve tam otomatize sistemler geliştirilmiştir. SNP analizlerinde yapı özellikleri, allel tespit mekanizmaları, reaksiyon formatı ve allellik ayrımları düşünüldüğünde pratikte onlarca yöntemin kullanıldığı görülmektedir [35], [36].

SNP'lerin tanımlanmasında yapısal özellikleri düşünülecek olursa heterodubleks analizi, tek zincir yapısal polimorfizm analizi (SSCPs), varyant tespit çipleri ve direkt DNA dizileme yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Allellerin ayırımında ise allele spesifik 4 farklı yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu mekanizmalar nükleotid bağlanması, oligonükleotid bağlanması, hibridizasyon ve enzimatik kesimdir [35], [36].

Bu tez çalışmasında MassArray Platformu ve iPLEX SNP genotipleme yöntemi kullanılmıştır (Sequenom Inc.). Bu yöntemin düşük maliyetli olması, multipleks reaksiyonlara olanak sağlaması, aynı anda yüzlerce örnekte çok sayıda SNP'nin analizine imkân vermesi, verilerin kısa sürede %99.7'den daha yüksek bir kesinlikte elde edilmesi ve ülkemizde ulaşılabilir olması tercih sebebi olmuştur.

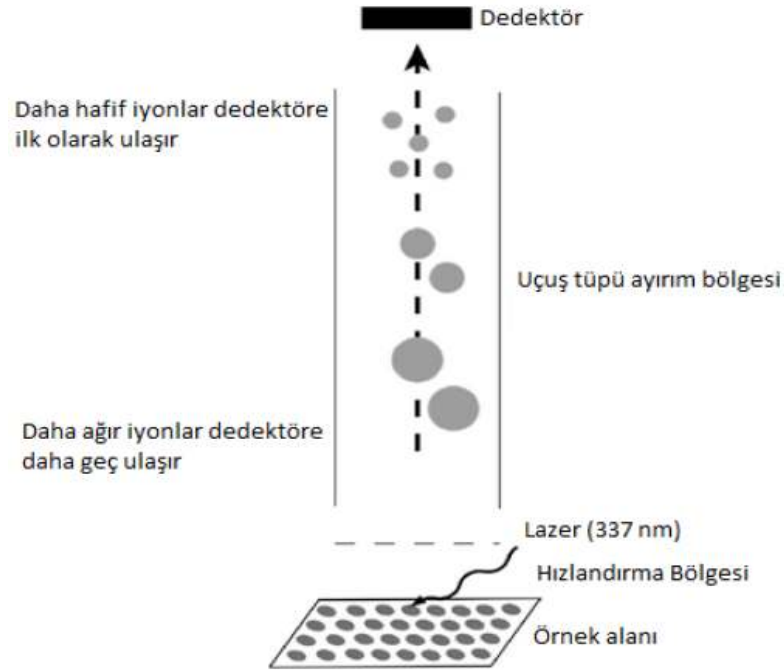
Bu yöntem ile SNP'leri içeren genom bölgeleri spesifik primerler kullanılarak Multiplex PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılmaktadır. Ürünler kalıp olarak kullanılır ve tek baz uzama reaksiyonu gerçekleştirilir. Tek baz uzama reaksiyonu ile elde edilen ürünler MALDI-TOF MS (Matriks destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometrisi) ile analiz edilir ve allellerin tespiti gerçekleştirilir (Şekil 1.5) [35], [37], [38].



Şekil 1. 5 Sequenom MassArray platformu deney akış şeması [38]

Bu yöntemin temelinde MALDI-TOF MS ve multiplex PCR analitik yöntemin entegrasyonu bulunmaktadır. Allel ayırımı için farklı yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen pratikte araştırmacılar rutin olarak primer uzatma temelindeki yaklaşımları kullanmaktadırlar. MALDI-TOF MS ile aynı zamanda birçok farklı örnek ile çok sayıda genetik belirtecin aynı anda analizi yapılmaktadır. Yöntemin en önemli avantajlarından bir tanesi de tüm genom üzerinde SNP taranmasının gerçekleştirilmesine olanak sağlamasıdır. MALDI-TOF platformu, allel spesifik ürünlerin ve bir matriks bileşeninin

metal plaka üzerindeki karışımını içermektedir. Bu karışım kısa süreli olarak lazer atışı ile ısıtılarak güçlü bir potansiyel farkın oluşturulması sağlanır. Oluşan bu potansiyel fark, iyonizasyonun gerçekleştiği gaz fazına geçişi sağlamaktadır (Şekil 1.6) [35], [37], [38].



Şekil 1. 6 MALDI-TOF MS platformunun okuma prensibi [39]

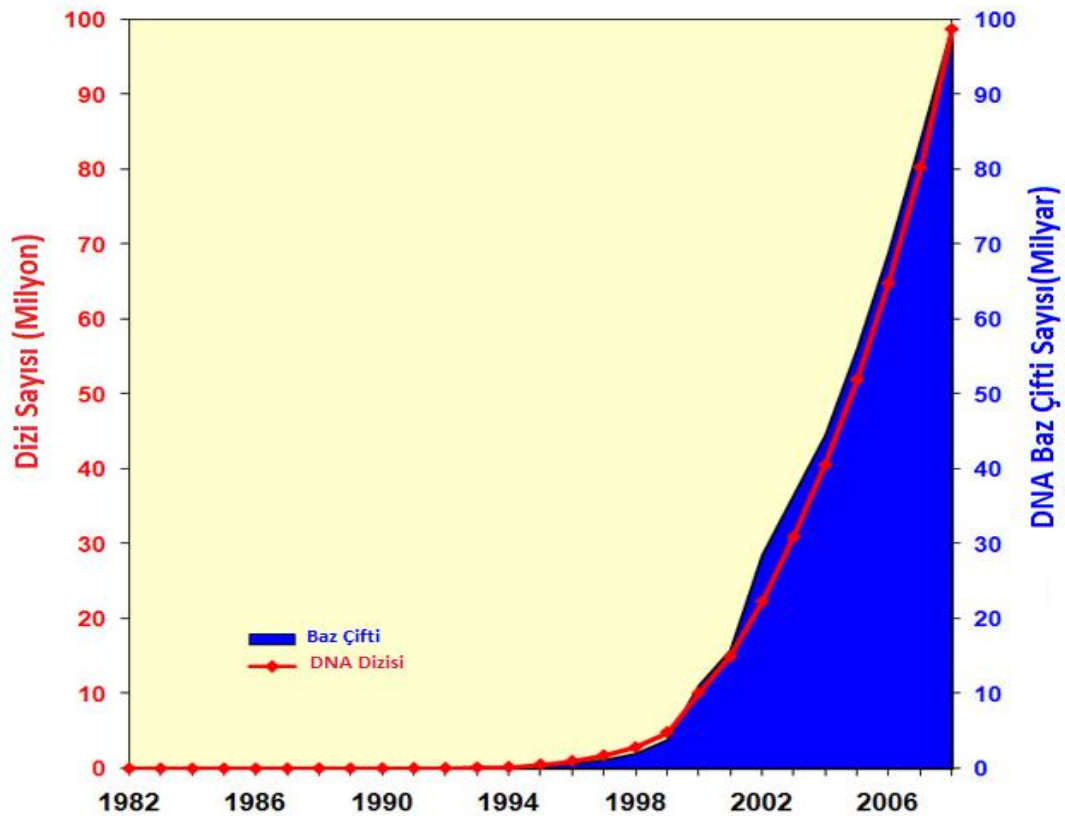
1.1.4 Mikrobiyolojik Tanılarda Biyoinformatik Araçların Rolü

İstatistik, bilgisayar mühendisliği ve uygulamalı matematik alanlarındaki yaklaşımların, biyolojik verilerin analizi için uygulanması biyoinformatik (Bioinformatics, Computational biology, Biocomputing) olarak tanımlanmaktadır [40]. Biyoinformatik için, biyolojik bilgiyi yönetme ve analiz etme bilimi denilebilir [41].

Biyolojik sistemlerden açığa çıkan veriler oldukça karmaşıktır. Hücresel aktivite, transkripsiyon regülasyonu, genom bilgisi veya hücresel iletişim gibi karmaşık biyolojik sistemlerdeki sinyallerin ve yolların karşılıklı etkileşimi insan beyninin nicel olarak kavrayamayacağı kadar karmaşık ve hassastır [42], [43]. Ayrıca son yıllardaki biyolojik bilimlerdeki baş döndüren gelişimin sonucunda, yapılan araştırma ve uygulamalar ile çok miktarda veri birikimi oluşmuştur. Tüm dünyada, pek çok laboratuarda yapılan çalışmalar sonucunda açığa çıkan bilgilerdeki artış çok yüksek rakamlara ulaşmıştır. Bilimdeki bu hızlı ilerleyiş araştırmacılar üzerine önemli bir bilgi yükü getirmiştir. Bu

anlamda biyoinformatik, yaşam ve bilgisayar bilimleri arasında bir köprü kurmaktadır. Verilerin son derece etkin bir şekilde toplaması ve işlenmesi adımlarını hızlandırması nedeniyle son derece önemlidir [44].

Bu yapılan araştırmalar ve çalışmalar neticesinde ortaya çıkan verilerin çoğunu genomik bilgiler oluşturmaktadır (Şekil 1.7) [45]. Milyonlarca nükleotidin dizisinin depolanması ve işlenmesi için oluşturulan veritabanları, araştırmacıların bu bilgilere ulaşabilmesini ve yeni verileri rahatça girebilmelerini kolaylaştırmıştır [44].



Şekil 1. 7 Yıllara göre GenBank'da depolanan DNA dizisi ve baz sayısındaki artış [45]

Dünya çapında nükleotid dizi bilgilerinin organizasyonu ve depolanması görevini üstlenmiş 3 temel kuruluş vardır. Bu kuruluşlar, GenBank (Gen Bankası; ABD-Maryland), DDBJ (DNA Japonya Veritabanı; JaponyaMishima) ve EMBL (Avrupa Moleküler Biyoloji laboratuvarı; İngiltere-Hinxton)'dir [44].

Biyoinformatikte en çok kullanılan analiz yöntemleri DNA ve protein dizilerinin hizalanması ve karşılaştırılmasıdır. DNA, RNA ve protein dizilerini analiz ederek, birden fazla dizinin benzer bölgelerin tespit edilmesine dizi çakıştırma (alignment); var olan bir

nükleotid dizisine benzer dizilerin veri tabanında araştırılarak tespit edilmesine dizi karşılaştırma denir [44].

Biyoinformatik çalışmalarında önemli bir yer tutan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ile eldeki DNA dizisi, ayrıntılı olarak analiz edilebilir. BLAST, aranan diziyi tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizileri ile karşılaştıran ve referans diziyi en yakın olan diziyi, ait olduğu mikroorganizmayı, % benzerlikle veren web tabanlı, açık erişimli bir bilgisayar programıdır. Hızlı veri analizi amacıyla tasarlanmıştır. Genellikle yüksek duyarlılık aranan durumlarda kullanılmaz [44], [46].

DNA, RNA ve protein dizilerinde bulunan benzer bölgeler olması, bu diziler arasında işlevsel veya yapısal bir ilişki olabileceğini gösterir. Belirli iki veya daha fazla diziyi karşılaştırmak için EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite) adlı web tabanlı ve açık erişimli bir program mevcuttur. Bu paket geliştirilerek Cluster Omega adlı bir web servisi EBI altında başlatılmıştır. Açık erişimli bu site yardımıyla, iki veya daha fazla dizi belirli formatlarda sisteme girilerek dizi karşılaştırması yapılabilir [44], [47].

Nükleik asit temelli tanı yöntemlerinin işleyişi ve gelişimi biyoinformatik araçlara bağlıdır. Nükleik asit dizilerinin gerek karşılaştırma gerekse karşılaştırmalarının yapılarak özgünlüğünün ve duyarlılığının belirlenmesi, son yıllarda geliştirilen biyoinformatik araçlar ile yüksek maliyetli laboratuvar çalışmalarına gerek kalmadan sağlanabilmektedir. Son zamanlarda yapılan ve çeşitli hastalıkların tanısına imkan veren nükleik asit temelli yöntemlerin başarısı, ister mutasyonlara bağlı olarak canlı genomundaki insersiyon, delesyon, metilasyon veya tek nokta polimorfizmini (SNP) tespit etmek için olsun, ister bir patojenin veya bir parazitin DNA'sını tanımak için olsun, yapılan biyoinformatik çalışmanın doğruluğuna bağlıdır.

1.1.5 Büyükbaş Hayvancılıkta Karşılaşılan Bazı Önemli Hastalıklar ve Etkenleri

Günümüzde gıda güvenliği, hızla artan dünya nüfusunun ihtiyaçlarının gerekli karşılanamaması nedeniyle önem kazanmıştır. 2011 yılında Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) tarafından yayınlanan hayvan sayısı verilerine göre dünya toplam sığır varlığı bir önceki yıla göre azalmış ve yaklaşık 1,4 milyar baş olarak hesaplanmıştır (Çizelge 1.1) [48].

Çizelge 1. 1 Yıllara göre Dünya büyükbaş ve küçükbaş hayvan varlığı (milyon baş) [48]

	SIĞIR	KOYUN	KEÇİ	MANDA
2007	1.389	1.108	855	184
2008	1.407	1.096	877	187
2009	1.416	1.076	899	190
2010	1.427	1.078	909	192
2011	1.399	1.043	875	195

Günümüzde bireylerin beslenme konusunda daha bilinçli hale gelerek, hayvansal ürünlerin yeterli ve dengeli beslenmede hayati öneme sahip olmasının bilinmesi ile, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de hayvancılık önemli bir yere sahip olmuştur. Dünya çapında büyükbaş ve küçükbaş hayvan sayısı yıllar geçtikçe azalmakta iken ülkemizde bu sayılar artmaktadır (Çizelge 1.2) [49] .

Çizelge 1. 2 Yıllara göre Türkiye büyükbaş ve küçükbaş hayvan varlığı [49]

	SIĞIR	KOYUN	KEÇİ	MANDA
2007	11.036.753	25.462.293	6.286.358	84.705
2008	10.859.942	23.974.591	5.593.561	86.297
2009	10.723.958	21.749.508	5.128.285	87.207
2010	11.369.800	23.089.691	6.293.233	84.726
2011	12.386.337	25.031.565	7.277.953	97.632
2012	13.979.152	27.455.878	8.394.037	107.113

Hayvancılık sektörünün sürekliliği için gerekli en önemli olgulardan biri de hayvan sağlığı ve gıda güvenliğidir. Bu kapsamda T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü 2014 yılında yaptığı rutin tarama testleri ile 70 milyon üzerinde hayvanı sağlık taramasından geçirerek, hastalıkların erken teşhis edilmesini amaçlanmıştır [50].

Hayvan hastalıkları, hayvan yaşamını etkilemenin yanında, verim düşüşü ve ölüm ile ekonomik kayıplara yol açmakta, kontrolünün sağlanması ve sağaltımı ile de üretim maliyetini oldukça yükseltmektedir. Bu durum, hastalık kontrolü için yapılan harcamaların en etkin bir şekilde kullanımının gerekliliğini göstermektedir. Yüksek maliyetlerle yapılan bu testlerin sayısı, bu hastalıkların önemini ortaya koymaktadır. Çiftlik hayvanlarında verim kaybına sebep olan ve maliyeti arttıran en önemli hastalıklardan bazıları, solunum sistemi hastalıkları, yavru atımı (abortus) ve mastitistir.

1.1.5.1 Solunum Sistemi Hastalıkları

Çiftlik hayvanlarında karşılaşılan solunum sistemi enfeksiyonları tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de oldukça sık rastlanan hastalıklardır. Bu enfeksiyonlar, tüm cins ve yaş grubundan hayvanları etkilemekte, sıklıkla tekrar ederek ile koruyucu ve tedavi edici yöntemlere karşı yeterli cevap verememekte, böylelikle ağır ekonomik kayıplara neden olmaktadır [51].

Solunum sistemi enfeksiyonları burun akıntısı, yüksek ateş, iştahsızlık, nabız ve solunum artışı ile başlayıp, bazı olgularda kendi kendine iyileşme gösteren, bazı olgularda ise kronikleşerek verim kaybı ve ölümlere neden olabilen bir hastalıktır. Solunum sistemi enfeksiyonları mantarlar, bakteriler, virüsler veya parazitler tarafından oluşturulabilirler. Ayrıca bu etkenlerin kombine olarak izole edildikleri de bildirilmiştir [52]. Bu mikroorganizmaların çoğu sağlıklı hayvanların solunum sisteminde fakültatif olarak yaşayabilmektedir. Nakil, sürüye dışarıdan kontrolsüz hayvan sokulması, sıkışık barındırma, yetersiz beslenme ve havalandırma, tozlu ve amonyaklı havanın solunması, rutubetin fazla olması, ani yem ve iklim değişiklikleri gibi faktörlerinin varlığında patojen hale geçerek enfeksiyona sebep olurlar [53].

Sığır ve koyunlarda solunum sistemi hastalıklarının en önemlilerinden olarak kabul edilen pnömonik pasteurellozis olgularında *Mannheimia haemolytica* (*Pasteurella haemolytica*), birincil patojen olarak bildirilmiştir [54]. *Pasteurellalar* çoğu zaman sağlıklı hayvanların üst solunum yollarında fakültatif patojen olarak yaşarlar. Stres faktörleri vücut direncinin kırılmasına yol açarak, bu mikroorganizmaların üremesine yardımcı olmakta ve bu durum hayvanlarda enzootik pnömonilere sebep olmaktadır [55].

Solunum sistemi enfeksiyonlarının bakteriyel etkenleri arasında sayılan *Mycoplasma* türleri, özellikle viral etkenlerle birlikte ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bazı türlerin ise tek başına da solunum sistemi hastalıklarına yol açtıkları bilinmektedir [56]. *Mycoplasma*lar serbest yaşayan en küçük mikroorganizmalardır. Hücre duvarlarının olmaması nedeniyle *Mollicute* grubu içinde bulunurlar [57]. Hayvanlardan izole edilen yaklaşık 200 kadar *Mollicute* arasından sadece çok azı patojendir. Ancak bu *Mycoplasma* türlerinin enfekte mekanizması ve şiddeti üzerine yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bunun başlıca nedeni *Mycoplasma* türlerinin kültür edilememesi ve sınıflandırmadaki belirsizliklerdir. *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* ve *Mycoplasma arginini* solunum yolu enfeksiyonlarına sebep oldukları bildirilen *Mycoplasma* türlerindendir [51].

Solunum sistemi enfeksiyonları, sığır yetiştiriciliğinin en önemli sorunlarından biridir. Basit üst solunum yolu enfeksiyonlarından daha çok, alt solunum yolu enfeksiyonları ve pnömoniler üretici açısından iş gücü ve verim kaybı ile birlikte, sağaltım masrafları ve ölümler nedeniyle de büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır [58], [59]. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada solunum sistemi enfeksiyonlarına bağlı hastalıkların sağaltım masraflarının, hayvan başına yaklaşık 15,57 \$ ve 2006 yılı itibari ile ekonomik kaybın yıllık 3 milyar \$'ın üzerinde olduğu bildirilmektedir [60]. Ülkemizde bu konuda yapılmış yeterli çalışma bulunmamaktadır.

1.1.5.2 Mastitis

Mastitis meme bezinin yangısı olarak tanımlanır ve sütçü sürülerde süt verimi ve kalitesinde azalma ile sonuçlanan bir hastalıktır. Mastitis klinik veya subklinik karakterde ve akut veya kronik seyirli olabilir [61]. Mastitisli sütlerdeki değişiklikleri

tanılamak için birçok test geliştirilmiştir. Örneğin sütteki somatik hücre sayısı (SHS) artışı subklinik mastitisin tanımlanmasında kullanılan tanı yöntemlerinden biridir [62],[63]. Bununla beraber, bakteriyel sebepli birçok hastalığın tanısında olduğu gibi mastitis vakalarının kesin teşhisinde de kültür yöntemi “altın standart” olarak kabul edilmektedir [64].

Mastitis vakalarına sebep olan, 130’dan fazla farklı etiyolojik ajanın izole edildiği bilinmektedir ve enfeksiyona daha çok bakteriyel etkenlerin neden olduğu tespit edilmiştir [65], [66]. Bu etkenler, bulaşıcı ve çevresel kaynaklı olarak gruplandırılır. Bilinen mastitis patojenleri arasında en çok *stafilokoklar*, *streptokoklar* ve başta *E. coli* olmak üzere enterobakteriler izole edilmektedir. Bununla beraber, maya ve küf izolasyonları da bildirilmiştir [66], [67], [68], [69], [70]. Ayrıca özellikle *Mycoplasma spp.*, *Corynebacterium bovis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus spp.*, *Candida albicans*, *Cryptococcus spp.*, *Nocardia spp.* gibi çeşitli etkenlerin neden olduğu mastitis vakaları da bulunmaktadır [71], [72], [73], [74], [75], [76]. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’nin de farklı bölgelerinden alınan mastitisli süt örneklerinde yapılan çalışmalarda *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* ve *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakteriler sıklıkla tespit edilmiştir [73], [74], [75], [76]. *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus agalactiae*’nin bulaşıcı mastitis etkenleri olduğu, mastitis vakalarında yaygın olarak görüldükleri özellikle de sağıım sırasında, eller ve süt sağıım üniteleri ile bulaştıkları bilinmektedir [76]. Gram negatif bakteriler, *S. agalactiae*’nin dışındaki tüm *streptokoklar* (özellikle *S. uberis*) ve diğer mikroorganizmalar çevresel patojen olarak belirtilmiştir ve çevresel patojenlerin, yukarıda sayılanlara göre daha az yaygın olmasına rağmen, neden olduğu mastitis vakalarının çok önemli olduğu vurgulanmıştır [76], [77]. Mastitis problemlerinde önemli yer tuttuğu vurgulanan ve çevresel patojenler içinde birinci sırada yer alan *S. uberis* hayvanın bulunduğu her yerde özellikle de dışkı, barınaklar, rumen ve memede bulunabilmektedir [76], [77], [78], [79].

Mastitis, süt sığırcılığı işletmelerinin en önemli ekonomik kayıplarının arasında gösterilmektedir [76]. Yüksek verimli hayvanların sürüden ayıklanması, süt veriminde azalma ve tedavi masrafları gibi nedenlerle oldukça büyük ekonomik kayıplar oluşturdukları bilinmektedir [80]. 2010 yılında yapılan bir çalışmada ülkemizde

mastitisten kaynaklanan ekonomik kaybın yılda yaklaşık 57,7 milyon TL olduğu bildirilmiştir [65].

1.1.5.3 Abortus

Ölmüş veya gelişmesini tamamlamamış yavrunun gebelik henüz sona ermeden uterusdan çıkması veya çıkarılması yavru atma (abortus) olarak adlandırılmaktadır [81]. Abortus vakaları ülkemizde hayvan yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen faktörler arasında önemli bir yer tutmaktadır. Evcil hayvanlarda abortus vakaları, non-enfeksiyöz ve enfeksiyöz sebeplere bağlanabilir ancak enfeksiyöz hastalıklar abortus sebepleri arasında başta gelmektedir [82].

Enfeksiyöz abortus vakalarına bakteri, virus, mantar veya protozoon gibi etkenler neden olabilmektedir. Enfeksiyöz abortuslarının enzootik olduğu ve sürüdeki çok sayıda hayvana kısa sürede yayılabildiği bilinmektedir [83], [84]. Bakteriyel abortus etkenlerinin en önemlilerinden bazıları *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Actinomyces pyogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* ve *Staphylococcus* türleri, *Listeria monocytogenes* ve *Coxiella burnetii* olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [83], [85].

Bu türler içinde iki tür, oldukça yüksek kayıplara sebep olması ve zoonoz olması nedeniyle oldukça önemlidir.

Brusellozis, insan ve hayvanlarda *Brucella* cinsine ait bakteriler tarafından oluşturulan bulaşıcı, genellikle subakut ve kronik seyirli bir enfeksiyondur. *B. abortus* ve *B. melitensis* besicilikte karşılaşılan brusellozisinin başlıca etkenleridir. *B. melitensis* ayrıca insanlarda Malta humması olarak bilinen hastalığa sebep olmaktadır [82], [86].

1.2 Tezin Amacı

16S rDNA ve *RpoB* gen bölgelerinin bakteri türlerinin filogenetik yeri hakkında veriler içerdiği bilinmektedir. Bu tez çalışmasının amacı bilgisayar teknolojileri kullanılarak *16S rDNA* ve *RpoB* gen bölgelerinde türler arası ayrımı sağlayacak SNP'ler bulunarak bir panel geliştirilmesi ve ilk kez bu tez çalışmasında bulunan SNP'lerden 17 tanesinin multiplex PCR ve MALDI TOF MS tabanlı bir analiz platformu ile test edilmesidir.

Yapılan tez çalışması ile, istenildiği takdirde tür sayısının genişletilmesi veya panele dahil olan türlerin kullanıcı ihtiyacına göre seçilerek kullanımının sağlanması nedeniyle; kaynaktan bağımsız olarak, yüksek doğrulukta çoklu örnekte tanı yapabilen, kullanıcı kolaylığı sunan, bir panel tasarlanmıştır. Tasarlanan panelin, ticari kullanıma sunulmasından önce optimizasyon ve validasyon çalışmalarının yapılması, bu tez kapsamında çalışılan 26 mikroorganizmanın tek panelde ilk kez türe özgü tanısının gerçekleştirilmesine imkan sunarak, benzer mikroorganizmalarla yapılacak olan araştırmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

1.3 Hipotez

Patojen olduğu bilinen 26 türe ait *16S rDNA* ve *RpoB* gen bölgelerinden türler arası SNP'ler belirlenerek; belirtilen patojenleri erken ve etkili tanısıyla birlikte daha az maliyet ve iş gücü ile katkı sunabilecek biyobelirteçlerin tespit edilebileceği öngörülmektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

2.

2.1 Materyal

2.1.1 Biyoinformatik çalışmalarda kullanılan DNA dizileri

Mycoplasma türlerine ve diğer patojenlere ait SNP markerlarının belirlenmesi için gerekli çalışmalar, Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI)'ye ait GenBank veritabanından indirilen 226 adet gen dizisi kullanılarak tamamlanmıştır.

Çizelge 2.1'de panel tasarımında kullanılacak olan diziye karar vermek amacıyla indirilen dizilere ait tür ve gen isimleri ile veritabanı erişim numaraları verilmiştir.

Çizelge 2.2'de ise panel tasarımında kullanılan *16S rDNA* ve *RpoB* gen bölgelerinin türlere göre erişim numaraları verilmiştir.

Çizelge 2. 1 Biyoinformatik çalışmalarda kullanılan gen dizilerinin isimlerine ve GenBank erişim numaraları

Gen ismi	16S ribosomal DNA	16S-23S ribosomal RNA genler arası bölge	23S ribosomal RNA	RNA polimeraz beta altbirim	Sialidaz Geni	Tuf Geni	FusA Geni	G Uzama Faktörü Geni	DNA Giraz B Geni
<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	NR074703.1	-	-	AM180630.1 AM180631.1 AM180632.1 EF071828.1	-	-	EU077154.1 EU077153.1 EU077152.1 EU077151.1 EU077150.1 EU077149.1 EU077148.1	-	-
<i>Mycoplasma bovis</i>	AJ419905.1 AF332757.1 NR036946.1 NR102850.1 AF332756.1 AY560587.1 AF332755.1 AF332754.1 AF332753.1 AY526883.1 AF332752.1 AF092935.1 AY526882.1 U02968.1 U44767.1 KJ438257.1	AY729934.1 AY765211.1 AY779747.1 AY780798.1 JN644755.1	AY526881.1 AY526875.1 NR103100.1 KJ767191.1	DQ157634.1 FJ765301.1 KF926439.1 DQ157635.1 JN644757.1 KF926443.1 KF926447.1 KF926451.1 KF926455.1 KF926459.1 KJ438236.1 KJ438235.1 KJ438234.1 KJ438233.1 KJ438232.1 KJ438231.1 KJ438230.1 KJ438229.1 KJ438228.1 KJ438227.1 KJ438226.1 KJ438225.1 KJ438224.1 KJ438223.1 KJ438222.1 KJ438221.1 KJ438220.1 KJ438219.1 KJ438218.1 KJ438217.1 KJ438216.1 KF926475.1 KF926471.1 KF926467.1 KF926463.1	-	-	EU077181.1 EU077180.1 EU077179.1 EU077178.1 EU077177.1 EU077176.1 EU077175.1	JQ031393.1 JQ031392.1 JQ031395.1 JQ031394.1 JQ031396.1 KJ438256.1 KJ438255.1 KJ438254.1 KJ438253.1 KJ438252.1 KJ438251.1 KJ438250.1 KJ438249.1 KJ438248.1 KJ438247.1 KJ438246.1 KJ438245.1 KJ438244.1 KJ438243.1 KJ438242.1 KJ438241.1 KJ438240.1 KJ438239.1 KJ438238.1 KJ438237.1	JQ031425.1 JQ031424.1 JQ031423.1 JQ031422.1 JQ031411.1

Çizelge 2. 1 Biyoinformatik çalışmalarda kullanılan gen dizilerinin isimlerive GenBank erişim numaraları (devamı)

Gen ismi	16S rRNA DNA	16S-23S rRNA arası RNA genler arası bölge	23S rRNA	RNA polimeraz beta glikozilasyon	Sialidaz Geni	Tuf Geni	FusA Geni	G Uzama Faktörü Geni	DNA Giraz B Geni
Tür ismi									
<i>Mycoplasma bovis</i>	AY121109.1 AY121098.1 AY121097.1 AY121096.1 AY121095.1 HQ661813.1 JN791093.1 HQ661817.1 HQ661816.1 HQ661814.1 AB680692.1 NR113690.1 NR044668.2 M24291.2 JQ820402.1	AY816346.1 AY973571.1 AY974058.1 AY780797.1 KJ767190.1	EU074140.1 EU074139.1 EU074138.1 EU074137.1 EU074136.1 EU074135.1 EU074134.1 EU074133.1 EU074132.1 EU074131.1 JQ390349.1	DQ112178.2 FJ888598.1 FJ888599.1	-	JQ390389.1	-	-	-
<i>Mycoplasma dispar</i>	AF412979.1 NR025182.1	-	DQ840510.1 JQ390359.1	DQ112172.1	-	JQ390394.1	-	-	-
<i>Mycoplasma canis</i>	U04654.1 AF340023.1 AF412972.1 AB680678.1 JQ294140.1 JQ294313.1 NR113676.1 NR028813.1 JN713481.1	FJ666136.1 FJ876261.1 AY816347.1	AF443605.1 JQ390355.1	FJ876269.1 FJ876265.1 FJ765303.1 DQ234561.1	JQ177148.1 JQ177149.1	FJ896394.1	-	-	-

Çizelge 2. 2 Panel tasarımıında kullanılan gen dizilerinin GenBank erişim numaraları

16S ribosomal DNA Geni	Erişim Numarası	Tür İsmi
	NR025878.1	<i>Ureaplasma diversum</i>
	NR125608.1	<i>Mycoplasma verecundum</i>
	NR118797.1	<i>Mycoplasma leachii</i>
	NR115137.1	<i>Pasteurella multocida</i>
	NR118257.1	<i>Brucella melitensis</i>
	NR114469.1	<i>Brucella abortus</i>
	NR114848.1	<i>Mycoplasma bovis</i>
	NR114448.1	<i>Mannheimia haemolytica</i>
	NR114042.1	<i>Escherichia coli</i>
	NR113690.1	<i>Mycoplasma bovis genitalium</i>
	NR13685.1	<i>Mycoplasma bovirhinis</i>
	NR113676.1	<i>Mycoplasma canis</i>
	NR111993.1	<i>Chlamydomphila abortus</i>
	NR104916.1	<i>Coxiella burnetii</i>
	NR025988.1	<i>Mycoplasma canadense</i>
	NR025984.1	<i>Mycoplasma alkalescens</i>
	NR118997.1	<i>Staphylococcus aureus</i>
	NR027517.1	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
	NR025182.1	<i>Mycoplasma dispar</i>
	AF549387.1	<i>Histophilus somni</i>
	U26039.1	<i>Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides SC</i>
	AB002480.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	U15794.1	<i>Mycoplasma arginini</i>
	U41048.1	<i>Streptococcus uberis</i>
	U14905.1	<i>Acholeplasma laidlawii</i>

Çizelge 2.2 Panel tasarımında kullanılan gen dizilerinin GenBank erişim numaraları
(devamı)

Erişim Numarası	Tür İsmi
EF071828.1	<i>Mycoplasma mycoides subsp. mycoides</i>
FJ765301.1	<i>Mycoplasma bovis</i>
DQ112178.2	<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>
DQ112172.1	<i>Mycoplasma dispar</i>
DQ234661.1	<i>Mycoplasma canis</i>
EU925147.1	<i>Mycoplasma arthritidis</i>
DQ272351.1	<i>Mycoplasma arginini</i>
AP014631.1	<i>Mycoplasma canadense</i>
DQ219485.1	<i>Mycoplasma verecundum</i>
DQ272352.1	<i>Mycoplasma alkalescens</i>
DQ157641.1	<i>Mycoplasma bovoculi</i>
DQ234660.1	<i>Mycoplasma bovirhinis</i>
EF071848.1	<i>Mycoplasma leachii</i>
NC_010163	<i>Acheoplasma laidlawii</i>
CP008918.1	<i>Pasteurella multocida</i>
JN935853.1	<i>Ureaplasma diversum</i>
CP005383.1	<i>Mannheimia haemolytica</i>
KP670788.1	<i>Escherichia coli</i>
KC707790.1	<i>Staphylococcus aureus</i>
JN580230.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>
AEGO01000002.1	<i>Streptococcus dysgalactia</i>
AM946015.1	<i>Streptococcus uberis</i>
CP007707.1	<i>Brucella abortus</i>
CP000911.1	<i>Brucella suis</i>
AY540342.1	<i>Brucella melitensis</i>
DQ514614.1	<i>Mycoplasma pirum</i>
DQ530429.1	<i>Mycoplasma orale</i>
DQ530430.1	<i>Mycoplasma hominis</i>

RNA polimeraz beta altbirim Geni

2.1.2 Deneyisel çalışmalarda kullanılan referans suşlar

Bu tez çalışmasının deneyisel aşamalarında kullanılan referans suşlar; *M.bovis* NCTC 10131, *M. mycoides subsp. mycoides* V5, *M.bovigenitalium* NCTC 10122, *M.arginini* G 230, *M.alkalescens* D12, *M.canadense* 275C ve *Acholeplasma laidlawii* NCTC 10116 soylarıdır.

2.1.3 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler, Enzimler ve Kitler

Yapılan kültürlerden genomik DNA izolasyonu için gerekli olan fosfat tamponu Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan HotStarTaq Plus 28 DNA polimeraz (5 U/μL) enzimi, MgCl₂ (25 mM) ve 10 x PCR tampon çözeltisi QIAGEN firmasından, dNTP'ler (100 mM) Applied Biosystems firmasından ve tüm deneyisel çalışmalarda gerekli olan ultrasaf distile su Invitrogen firmasından temin edilerek kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonlarında ve genotipleme aşamalarında kullanılan primer ve problemler Sequenom firmasına sentezlettirilmiştir. PZR sonrasında yapılan temizleme reaksiyonunda shrimp alkaline fosfataz enzimi (1.7 U/μL) ve tampon çözeltisi; tek baz spesifik uzama reaksiyonunda iPLEX enzim, 10 x iPLEX tampon çözeltisi, iPLEX Extension Mix ve rezin ile muamele aşamasında SpectroCLEAN rezin kullanılmış ve bu ürünlerin tamamı Sequenom firmasından ticari olarak temin edilmiştir.

2.1.4 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Yapılan deneyisel çalışmalarda; Mikrosantrifüj-Beckman Coulter, Santrifüj-Beckman Coulter, Termal çalkalayıcı-BIOSAN, Mini santrifüj/vorteks-BIOSAN, Emniyet kabini-Nüve, Mikro-hacim UV-Vis spektrofotometre-Thermo, Termal cycler-BIO-RAD, Döner çalkalayıcı-Scientific Industries, MassArray nanodispenser-Sequenom, MassArray analyser- Sequenom Inc.

2.2 Yöntem

2.2.1 Biyoinformatik Analizler

Biyoinformatik analizlerde kullanılan 226 adet gen dizisinin kullanımını kolaylaştırmak amacıyla bu çalışmaya özel bir veritabanı oluşturulmuştur. Oluşturulan veritabanını kolay kullanılması için JAVA® platformunda bir program yazılmıştır.

Bu çalışmada tespit edilen SNP'lerden, referans alınan 5 türe (*M. mycoides subsp. Mycoides SC*, *M. bovis*, *M. bovigentalium* *M. dispar*, *M. canis*) ait 16S rDNA gen bölgesinde bulunanlar, Yrd. Doç. Dr. Oğuz ATA tarafından, .NET platformunda yazılan ve MS SQL ile kurulan bir veritabanını kullanarak girilen dizilerde belirtilen türler arasındaki tek nokta poliformizmlerini tespit eden bir program yazılmıştır. Bu çalışma henüz yayınlanmamıştır.

Bu tez çalışmasının büyük bir kısmını oluşturan biyoinformatik analizlerde, birçok araç ve platform kullanılmıştır. Bu araç ve platformlar Çizelge 2.3 'de verilmiştir.

Çizelge 2. 3 Biyoinformatik Analizlerde Kullanılan Yazılım ve Araçlar

Yapılan İşlem	Araç
Veritabanı Kurulumu	MySQL® [87] MS SQL® [88]
Veritabanı Arayüzü	JAVA® [89]
Dizi Çakıştırma	MUSCLE [90]
Görüntüleme	Jalview Desktop [91]
Dizi Karşılaştırma	BLAST [92]
SNP Tayini	.NET [93]
Primer ve Prob Tasarımı	Sequenom Assay Designer™ [37]

Tez kapsamında tanısı hedeflenen 26 türün her biri, çalışmalarda kolaylık sağlaması açısından numarlandırılmıştır (Çizelge 2.4).

Çizelge 2. 4 Tez çalışmasında kullanılan tür-numara listesi

No	Tür Adı	No	Tür Adı
1	<i>Mycoplasma mycoides SC</i>	14	<i>Acheoplasma laidlawii</i>
2	<i>Mycoplasma bovis</i>	15	<i>Pasteurella multocida</i>
3	<i>Mycoplasma bovis genitalium</i>	16	<i>Ureaplasma diversum</i>
4	<i>Mycoplasma dispar</i>	17	<i>Mannheimia haemolytica</i>
5	<i>Mycoplasma canis</i>	18	<i>Hamophilus somnus</i>
6	<i>Mycoplasma arthritis</i>	19	<i>Escherichia coli</i>
7	<i>Mycoplasma arginini</i>	20	<i>Staphylococcus aureus</i>
8	<i>Mycoplasma canadense</i>	21	<i>Streptococcus agalactiae</i>
9	<i>Mycoplasma verecundum</i>	22	<i>Streptococcus dysgalactia</i>
10	<i>Mycoplasma alkalescens</i>	23	<i>Streptococcus uberis</i>
11	<i>Mycoplasma bovoculi</i>	24	<i>Brucella abortus</i>
12	<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	25	<i>Brucella suis</i>
13	<i>Mycoplasma leachii</i>	26	<i>Brucella melitensis</i>

İlk kez bu çalışmada tespit edilmiş olan SNP'lerden, deneysel çalışma içerisinde kullanılanlar tür ismine ve gen bölgesindeki yerine göre numaralandırılmıştır. Buna göre T1, *M. mycoides subsp. mycoides SC*'yi, T2, *M. bovis*'i, T3 *M. bovis genitalium*'u, T4 *M. dispar*'ı ve T5 *M. canis*'i ifade eder. SNP'ler ise bulundukları 16S rDNA gen bölgesinde, 5' ucuna yakınlıklarına göre 1'den başlayarak numaralandırılmıştır. Örneğin; T3_SNP2 *M. bovis genitalium*'a ait 16S rDNA gen bölgesindeki 5' ucuna en yakın 2. SNP'yi belirtmektedir.

2.2.2 Deneysel Çalışmalar

2.2.2.1 Genomik DNA İzolasyonu

Kültür edilen hücrelerin genomik DNA izolasyonu kaynatma yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntemle göre hücre kültüründen 1.5 ml alınır ve 600 g'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülür. Pelletler 100 µl fosfat tamponunda çözündürüldükten sonra 95°C 15 dakika bekletilir. Daha sonra 10.000 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Üstte kalan süpernatant alınarak - 20°C' de saklanır [94].

2.2.2.2 Genomik DNA Örneklerinin Miktar ve Saflık Tayini

Kütle spektroskopisi temelli genotipleme analizine geçmeden önce, elde edilen genomik DNA'nın miktarının belirlenmesi ve saflık tayini yapılması gerekli bir işlemdir. Bu çalışmada kullanılan DNA'ların miktarı ve saflıklarının belirlenmesi için, UV-VIS spektrofotometre cihazına 1'er µl DNA örneği konulmuş ve 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapılarak gerçekleştirilmiştir.

260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorpsiyon değeri oranının 1.7 ile 2.0 arasında olması, kullanılacak DNA'ların saf olarak kabul edilmesi için yeterlidir ($A_{260}/A_{280}=1.7-2.0$) [94].

260 nm'deki bir optik dansite (OD) ünitesinin 50 µg/ml çift iplikli DNA'ya eşit kabul edilerek de DNA miktarı hesaplanabilir. Buna göre: DNA miktarı= OD ünitesi x sulandırma faktörü x 50 µg/ml. Sulandırma faktörü, Toplam Hacim / DNA oranı olarak alınır; örneğin, DNA'nın 1:10 oranında sulandırılması durumunda sulandırma faktörü 10'dur.

İzole edilen genomik DNA örneklerinin miktarı ve saflıkları, Thermo NanoDrop Mikro-Hacim UV-VIS Spektrofotometre cihazı kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.2.3 Kütle Spektroskopisi Temelli Deney Tasarımı

Bu tez çalışmasında uygulanmış olan deneysel yöntemler iPLEX® Gold Application Guide (2009) [37] ve iPLEX® Gold SNP Genotyping Training Protocol (2009) [38] kaynaklarından yararlanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.3.1 Deney Tasarımı

Sequenom Assay Designer™ yazılımı kullanılarak yapılacak olan deneylerin tasarımı gerçekleştirilmiştir.

Plex terimi tek bir kuyuda çalışılabilecek olan SNP sayısı olarak tanımlanmıştır. Analizlerde kullanılan SNP bölgeleri için tasarlanan primerlerde oluşabilecek dimerler ve SNP'lerdeki hedef bölgelerde birbiri ile çakışan diziler hesaplanarak analiz edilecek 17 SNP'nin, 4 plexte çalışılması planlanmıştır.

2.2.2.3.2 Primer ve Prob Tasarımı

MALDI TOF genotipleme çalışmalarında, doğru sonuçların alınabilmesi için polimorfik bölgeyi içeren optimum ampikon boyutunun 80 ile 120 baz çifti arasında olması tercih edilmektedir. Okuma hatalarının minimum olması için 400 baz çiftinden daha uzun fragment boyutundan kaçınılmalıdır. Genotipleme uygulamalarında sonuç alınabilmek için primerlerin 5' ucuna 5'-ACGTTGGATG-3' dizisini içeren genel bir 10-mer etiketi eklenmektedir. Ayrıca Sequenom Assay Designer™ yazılımı kullanılarak, primerlerin reaksiyon sırasında dimer oluşturup oluşturmayacağı da kontrol edilmektedir.

Amplifikasyondan sonra elde edilen PCR ürününe spesifik hibridizasyon gerçekleştirecek olan proplar ile allelin belirlenmesi için tek bazlık bir uzama gerçekleştirilmekte ve kalıp diziye göre uzamaktadır. Oluşan ürünler arasında nükleik asit bazına özgü kütle farklılıkları (Çizelge 2.5) meydana gelmektedir ve bu farklılıklar MassARRAY® Typer 4.0 yazılımı ile analiz edilmektedir.

Çizelge 2. 5 SNP allelleri arasındaki kütle farklılıkları [37] .

Terminatör	A	C	G	T
A	0	-24	16	55.9
C	24	0	40	79.9
G	-16	-40	0	39.9
T	-55.9	-79.9	-39.9	0

Uzama probunun 3' ucu polimorfik bölgeye bitişik ve 15-30 nükleotid uzunluğunda olacak şekilde tasarlanmıştır. Probların erime sıcaklığı değerleri yaklaşık olarak $\geq 60^{\circ}\text{C}$ olacak şekilde sentezlenmiştir. Uzama problemleri kullanılarak yapılacak amplifikasyonların verimli sonuçlar vermesi için uzama primerleri ve reaksiyon ürünlerinin kütleleri arasında minimum 30 Da'luk fark bulunmalıdır ve analit kütlelerinin 4500-9000 Da arasında olması tercih edilmiştir.

Tek nükleotit spesifik uzama problemlerinin tasarımı Sequenom'un Assay Designer™ yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında genotiplenmesi amaçlanan 20 SNP'ye ait, multipleks PCR'da kullanılan forward ve reverse primerler Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2. 6 SNP'ler ve genotipleme primerleri

SNP Numarası	Forward Primerler	Reverse Primerler
T1_SNP 1	ACGTTGGATGGGAAACGAAAGATAATACCGC	ACGTTGGATGTCCTCCCATCTCATAGTGAACC
T1_SNP 2	ACGTTGGATGGCCTTCGGGTGTAAATCTC	ACGTTGGATGGGCTTCTGGTAAGGTACTG
T1_SNP 3	ACGTTGGATGCCGTAAGGTGTGGTTAAG	ACGTTGGATGCACACTAGCAGTCTCGTTAGAG
T1_SNP 4	ACGTTGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC	ACGTTGGATGCCCTTACAGGATTGCAACTC
T2_SNP 1	ACGTTGGATGTTGGGATAGCGGATGGAAC	ACGTTGGATGTTAGCGAAGCAAACGCTTCC
T2_SNP 2	ACGTTGGATGAGGCCCTATGGGTGTAAAC	ACGTTGGATGATCAGGTACCGTCAAGGTAG
T2_SNP 3	ACGTTGGATGGATGTTCCGGTTAAGTCCTGC	ACGTTGGATGGTCTCCTTAGAGTGCTCAAC
T2_SNP 4	ACGTTGGATGCGACGTCAAATCATCATGCC	ACGTTGGATGCACCACTTCGCTTCTCTTG
T3_SNP 1	ACGTTGGATGTCAGTTTGGCATAGCGGTTG	ACGTTGGATGGCGTCTTTCCGTAAATGCC
T3_SNP 2	ACGTTGGATGACACAGCGTGCAGGATGAAG	ACGTTGGATGGGTACATTCAATATAGTGGC
T3_SNP 3	ACGTTGGATGGATGTTCCGGTTAAGTCCTGC	ACGTTGGATGGTCTCCCTAGAGTGCTCAAC
T3_SNP 4	ACGTTGGATGCGACGTCAAATCATCATGCC	ACGTTGGATGCACCAAGTTGCTTCACTTTG
T4_SNP 1	ACGTTGGATGGAAACAGTGGCTAATACCAG	ACGTTGGATGACCCCCCATTTTTGGTGAG
T4_SNP 2	ACGTTGGATGGTAAACTGCTGTTGAAGGG	ACGTTGGATGGCCGTCGCTTCTAATAAGG
T4_SNP 3	ACGTTGGATGAGGTTAAGTCCCTGCAACGAG	ACGTTGGATGGCAGTATCTCTAGGGTTCTC
T4_SNP 4	ACGTTGGATGTGACGTCAAATCATCATGCC	ACGTTGGATGTGCTGCTCTTTGTAGTAGCC
T5_SNP 1	ACGTTGGATGTTATCGCTAATACCGGATAC	ACGTTGGATGGCACCCCAATCTTTTAGTG
T5_SNP 2	ACGTTGGATGCTTCGGGTGTAAACTGCTG	ACGTTGGATGTCTGACAAGGTACCGTCAAG
T5_SNP 3	ACGTTGGATGGATGTTCCGGTTAAGTCCTGC	ACGTTGGATGACCTTCTCCCAATTACTCG
T5_SNP 4	ACGTTGGATGCGACGTCAAATCATCATGCC	ACGTTGGATGCGCCGTTTGTGCTTCTCTTG

2.2.2.3.3 Multiplex PCR Uygulaması

İzole edilen genomik DNA'lardaki hedef bölgeler, tasarlanan primer çiftleri ile multipleks polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edilmiştir. PCR bileşenleri Çizelge 2.7'de verilmiştir. Reaksiyon 95°C'de 2 dakika ön denatürasyon, 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 56°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama basamakları ile 44 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. 7 Multiplex PCR karışımı

Bileşenler	Son Konsantrasyon	Reaksiyonda Kullanılan Bileşen Hacmi (µL)
dH ₂ O	N/A	1,800
10X PCR Tamponu (20 mM MgCl ₂)	1x (2 mM MgCl ₂)	0,500
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	0,400
dNTP karışımı (her birinden 25 mM)	500 µM	0,100
Primer karışımı (0,5 µM)	0,1 µM	1,00
Roche PCR Enzimi (5 U/µL)	1.0 U/reaksiyon	0,200
DNA (10 ng/µL)	2 ng/µL	1,00
Toplam Hacim		5,00

2.2.2.3.4 dNTP Nötralizasyonu (SAP Uygulaması)

Multiplex PZR işleminden sonra, ürünlerde bulunan bağlanmamış dNTP'ler shrimp alkalen fosfotaz (Shrimp alkaline phosphotase: SAP) kullanılarak nötralize edilmiştir. SAP enzimi, serbest halde bulunan dNTP'den bir fosfat grubunu keserek dNDP'ye çevirmektedir. SAP reaksiyonu için gerekli bileşenler Çizelge 2.8'de verilmiştir.

Çizelge 2. 8 SAP reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	7 µL reaksiyondaki son hacim (PCR + SAP)	2µL SAP karışımı içerisindeki bileşen miktarı [µL]
dH2O	N/A	1,53
TS Tamponu (10X)	0,24 X	0,17
SAP Enzimi (1,7 U/µL)	0,5 U	0,30
Toplam Hacim (µL)	N/A	2 µL

Her bir kuyudaki PCR ürününün üzerine 2 µl SAP enzimi ve tampon çözelti karışımından eklenerek, plaka hafifçe karıştırıldıktan sonra 1000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. SAP reaksiyonu 37°C’ de 40 dakika ve 85°C’de 5 dakika (enzimin inaktif hale gelmesi için) inkübe edilmiştir

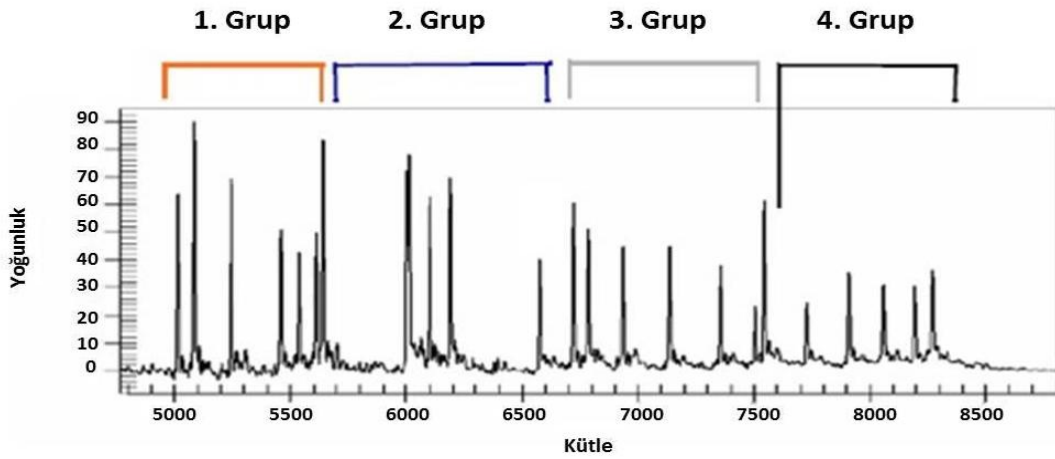
2.2.2.3.5 Tek Baz Spesifik Uzama Reaksiyonu

Pik yoğunluğu ve analit kütlesi arasındaki ters orantı nedeniyle, tek baz spesifik uzama reaksiyonunda kullanılacak uzama probu konsantrasyonlarının ayarlanması önemlidir. Yüksek kütleli primerin (~8500 Da) pik yoğunluğu, düşük kütleli primerlere göre % 25’ten daha azdır. Primer kütlesi arttıkça sinyal-gürültü oranı azalma eğilimi gösterir. Konsantrasyonların ayarlanmaması halinde gürültüden dolayı sinyaller ayırt edilemeyebilir. Bu şekilde başlatılan genotipleme reaksiyonlarında, analit pikleri kaçırılır ve genotipleme hataları ortaya çıkabilir.

Analit kütlesi ve sinyal-gürültü oranı arasındaki ters orantıdan kaynaklanan farklılıkların yanında, pik uzunluklarında da beklenmeyen değişimler görülebilir. Bu değişimler oligonükleotid kalitesindeki tutarsızlıklardan veya MALDI’deki düşük desorpsiyon/iyonizasyon özelliğinden kaynaklanabilmektedir.

Belirtilen sorunların giderilmesi için tek baz spesifik uzama reaksiyonunun hazırlık aşamasında dört farklı yöntem belirlenmiştir. İlk üç yöntemde, primer kütlesine göre 2,

3 ve 4 aşamalı olarak gruplara ayrılarak konsantrasyonlarının ayarlanmasını gerektirmekte, dördüncü yöntemde ise bütün primerlerin kütlesine spesifik bir konsantrasyonda karıştırılarak ve bu konsantrasyonların spektrumunda her bir primerin dengelenmesini gerektirmektedir (Şekil 2.1). Bu çalışmada, uzama primeri konsantrasyonları düşük kütleli primerlerden yüksek kütleli primerlere doğru dört aşamalı olarak ayarlanmıştır.



Şekil 2. 1 Primerlerin dört aşamalı uzama probu ayarlama metoduna göre gruplandırılması [37]

Uzama problemlerinin konsantrasyonları, belirlenen değerlere ayarlandıktan sonra uzama problemlerini içeren bir stok karışım hazırlanır. Shrimp alkaline fosfatase enzimi ile yapılan PZR sonrası temizleme işlemi sonucunda elde edilen ürünlerin ve tasarlanan problemlerin hedef bölge ile hibridizasyonu ile tek kütle-modifiye nükleotid uzaması gerçekleştirilir.

Tek baz spesifik uzama reaksiyonunu başlamadan önce; uzama problemleri, kütle modifikasyonlu ddNTP'leri enzim ve tampon çözelti içeren bir bileşenler (Çizelge 2.9) hazırlanarak amplifikasyon ürünlerine ilave edilir. Bu reaksiyon belirtilen koşullar altında (Çizelge 2.10) ile primerin, deneyin tasarımına ve allele bağlı olarak, tek kütle modifikasyonlu nükleotid ile sonlanması sağlanır (Şekil 2.2).

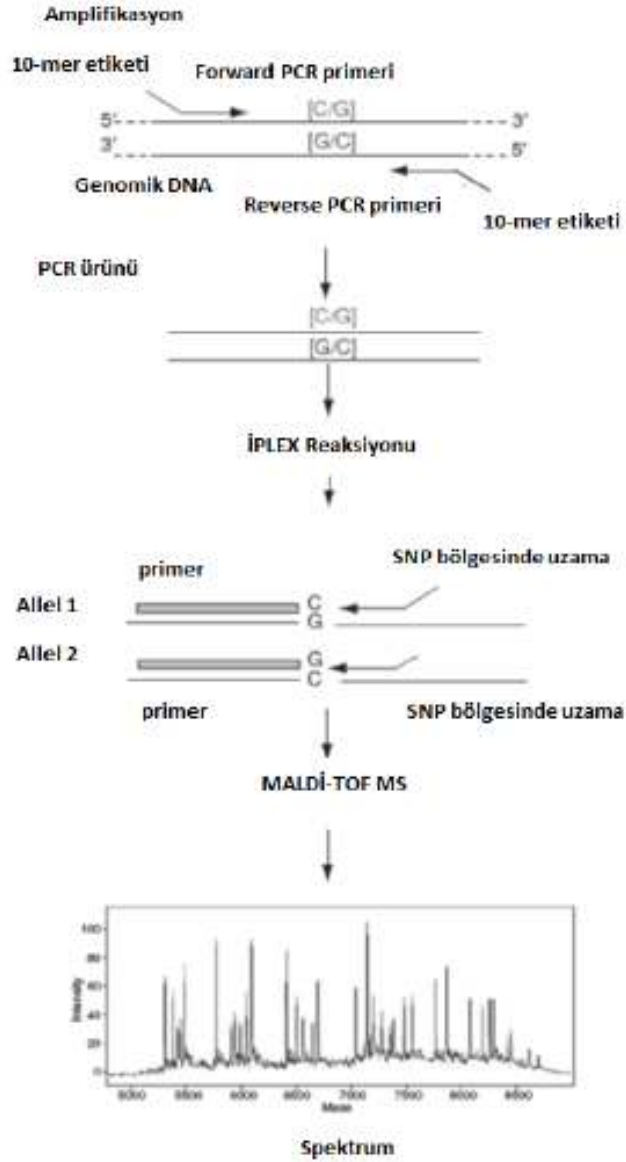
Çizelge 2. 9 Tek baz spesifik uzama reaksiyonu bileşimi

Bileşen	9µL reaksiyon hacmindeki son konsantrasyon	2 µL karışım içersindeki bileşen miktarı (µL)
dH2O	N/A	0.619
iPLEX Tamponu (10X)	0.222X	0.200
iPLEX Terminasyon karışımı	1X	0.200
iPLEX Uzama Primeri	N/A ^a	0.940
Karışımı µM		
iPLEX Enzim	1X	0.041
Hacim (µL)	N/A ^a	2
SAP+PCR	N/A ^a	7
Toplam Hacim (µL)	N/A ^a	9

(^a reaksiyona göre optimize edilir)

Çizelge 2. 10 Tek baz spesifik uzama reaksiyonu koşulları

Basamaklar	İşlem	Sıcaklık ve Süre
1	Ön denatürasyon	94 °C'de 30 saniye
2 ^a	Denatürasyon	94 °C'de 5 saniye
3 ^b	Bağlanma	52 °C'de 5 saniye
4	Uzama	80 °C'de 5 saniye
5	Son uzama	72 °C'de 3 dakika
a: 3.-4. basamaklar 5 döngü; b: 2.-4. basamaklar 40 döngü		



Şekil 2. 2 Baz spesifik uzama reaksiyonunun şematik gösterimi [37]

2.2.2.3.6 Rezin Uygulaması

Spektrometrik analiz optimizasyonu ve Na^+ , K^+ ve Mg^{+2} gibi arka plan kirliliğine sebep olan iyonları uzaklaştırmak için tek baz spesifik uzama reaksiyonu ürünleri katyonik değişim sağlayan rezin ile muamele edilmiştir. Rezin ince bir spatül yardımı ile çukur plaka üzerine aktararak kuyucuklara yayılması sağlanmıştır. Rezin uygulaması en az 20 dakika olacak şekilde gerçekleştirildikten sonra fazla rezin plakadan sıyrılarak uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklarda bulunan hava kabarcıklarından kurtulmak amacıyla plaka kısa bir süre santrifüj edilmiştir. Daha sonra, örnek plakası döner-çalkalayıcıda

oda sıcaklığında 35 dakika döndürülmüş ve 3200 x *g*'de 5 dakika santrifüj edilerek ipe aktarılmaya hazır hale getirilmiştir.

2.2.2.3.7 Ürünlerin Çipe Aktarılması

Rezin ile gerekli işlemler yapıldıktan sonra, modifiye PCR ürününden 15nl alınmış ve nanodispenser kullanılarak 384-element SpectroCHIP® II üzerine dağıtılmıştır. Bu dağıtım işlemi, vakum altında delikli iğnelerin kapiler etkisi kullanılarak yapılmıştır. Silika çip üzerindeki matriks spotlarına aktarılan oligonükleotidler MALDI-TOF matriksine (3- hidroksipikolinik asit) dahil edilmiştir.

2.2.2.3.8 MALDI-TOF ile Genotipleme

Analiz için PCR ürünleri, 384-element SpectroCHIP® II üzerinde kütle spektroskopisi (MassARRAY® Analyser 4) cihazına yüklenmiştir. MassARRAY® TYPER 4.0 genotipleme yazılımı kullanılarak, lazer atımı sonrası elde edilen spektro görüntüsü ve allel spesifik pikler analiz edilmiştir. Deney tasarımı aşamasında elde edilen veriler, cihaz arayüzüne girilerek, spektrumda doğru analitin beklenen pozisyonunun hesaplanması sağlanmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.

3.1 Biyoinformatik Analizler

3.1.1 DNA dizilerinin Kullanılabilir Hale Getirilmesi

Çalışmada kullanılan nükleik asit dizileri, erişime açık GenBank veritabanından indirilmiştir. Milyonlarca nükleotidin dizisini depolamakta olan bu veritabanı, dizilerin işlenmesi için bir takım zorlukları da barındırmaktadır. Araştırma sırasında bu bilgilere daha kolay ulaşabilmek ve yeni verileri rahatça girebilmek için, bu çalışmaya özel olarak bir veritabanı kurulmuştur. Bu veritabanında organizma tür ismi, alttür ismi, gen bölgesi sırasıyla kodlanmış ve nükleik asit dizilerinin karşılığı olarak kaydedilmiştir. Aynı zamanda girdilerin ve çıktıların kolay kontrol edilmesi amacıyla bir de kullanıcı arayüzü oluşturulmuştur. Şekil 3.1’de yazılmış olan programın kullanıcı arayüzü görülmektedir.



Şekil 3. 1 Programın kullanıcı arayüzü

Veritabanı girdi olarak GenBank veritabanından alınan “.gb” formatındaki verileri çalıştırmakta ve Excel formatında bir listeye dönüştürmektedir. Şekil 3.2’de veritabanından alınmış bir Excel tablosuna ait ekran görüntüsü verilmiştir.

Biyoinformatik analiz araçlarında kullanılmak üzere istenilen türe, alttüre veya gen bölgesine ait kod çıktı kısmına yazılarak verilen kodlara ait dizilerin fasta formatındaki çıktıları alınabilmektedir.

Ayrıca programa eklenen bir modül ile de, fasta formatındaki verileri veritabanına işlemeden haricen Excel çıktısına dönüştürülmesi sağlanmıştır. Böylelikle veritabanına kaydedilmemesi gereken çalışmaların da yapılabilmesi amaçlanmıştır.

ID'sOutput (3) - Microsoft Excel																
	A	B	C	Veri	Gözetim Geçir	Gözetim	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
	Accession	Type	ID	Type	Subtype	ID	Subtype	Gene ID	Gene Name	Sequence						
1	NR_07470	1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC	1	PG1	1	PG1	1	16S ribosomal	TAAATGAGAGTTTGATCTCGCTCAGGATAAACGCTGGCGGATGC						
2	EF071828	1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC	2	740-Rita	2	740-Rita	2	RpoB	TAGTTTCACGTTTAAATGCTGATGACTATATGGCTAAAGTTGAAGAAA						
3	EU077154	1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC	3	AFSSA 636	3	AFSSA 636	3	FusA	AAAGGTGTTAAATTAATTTAGATGCTGTTGTTGATTATTTACCATCAC						
4	EU077153	1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC	4	AFSSA 780	4	AFSSA 780	3	FusA	AAAGGTGTTAAATTAATTTAGATGCTGTTGTTGATTATTTACCATCAC						
5	EU077152	1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC	5	AFSSA 487	5	AFSSA 487	3	FusA	AAAGGTGTTAAATTAATTTAGATGCTGTTGTTGATTATTTACCATCAC						
6	EU077151	1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC	6	AFSSA 121	6	AFSSA 121	3	FusA	AAAGGTGTTAAATTAATTTAGATGCTGTTGTTGATTATTTACCATCAC						
7	EU077150	1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC	7	AFSSA 117	7	AFSSA 117	3	FusA	AAAGGTGTTAAATTAATTTAGATGCTGTTGTTGATTATTTACCATCAC						
8	EU077149	1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC	8	AFSSA 490	8	AFSSA 490	3	FusA	AAAGGTGTTAAATTAATTTAGATGCTGTTGTTGATTATTTACCATCAC						
9	EU077148	1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC	9	AFSSA 202	9	AFSSA 202	3	FusA	AAAGGTGTTAAATTAATTTAGATGCTGTTGTTGATTATTTACCATCAC						
10	AM180632	1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC	10	T1/44	10	T1/44	4	DNA-directed	TAATCCATTATCAGAAATTAACATAAATAACGTAAGATTAAACGCTTAGG						
11	AM180631	1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC	11	L2	11	L2	4	DNA-directed	TAATCCATTATCAGAAATTAACATAAATAACGTAAGATTAAACGCTTAGG						
12	AM180630	1	Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC	12	AFade	12	AFade	4	DNA-directed	TAATCCATTATCAGAAATTAACATAAATAACGTAAGATTAAACGCTTAGG						
13	KJ767191	2	Mycoplasma bovis	13	BRA/UEL2	13	BRA/UEL2	5		AAAAAGACTTATAACCAAAATTAATAGACCTATATTTATTTATAAACG						
14	NR_11484	2	Mycoplasma bovis	14	PG45	14	PG45	1	16S ribosomal	TAGAGTTTGATCATGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTCCTAATAC						
15	KJ438257	2	Mycoplasma bovis	15	MYC79	15	MYC79	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
16	KJ438256	2	Mycoplasma bovis	16	MYC77	16	MYC77	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
17	KJ438255	2	Mycoplasma bovis	17	MYC76	17	MYC76	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
18	KJ438254	2	Mycoplasma bovis	18	MYC75	18	MYC75	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
19	KJ438253	2	Mycoplasma bovis	19	MYC73	19	MYC73	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
20	KJ438252	2	Mycoplasma bovis	20	MYC72	20	MYC72	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
21	KJ438251	2	Mycoplasma bovis	21	MYC71	21	MYC71	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
22	KJ438250	2	Mycoplasma bovis	22	MYC70	22	MYC70	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
23	KJ438249	2	Mycoplasma bovis	23	MYC69	23	MYC69	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
24	KJ438248	2	Mycoplasma bovis	24	MYC68	24	MYC68	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
25	KJ438247	2	Mycoplasma bovis	25	MYC66	25	MYC66	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
26	KJ438246	2	Mycoplasma bovis	26	MYC65	26	MYC65	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
27	KJ438245	2	Mycoplasma bovis	27	MYC52	27	MYC52	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
28	KJ438244	2	Mycoplasma bovis	28	MYC51	28	MYC51	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
29	KJ438243	2	Mycoplasma bovis	29	MYC50	29	MYC50	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
30	KJ438242	2	Mycoplasma bovis	30	MYC48	30	MYC48	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
31	KJ438241	2	Mycoplasma bovis	31	MYC47	31	MYC47	6	elongation fac	TTTTCCCTGCAGTTTGTGGAACTAGTTTAAAAACAAAGGTGTTAAG						
32	KJ438240	2	Mycoplasma bovis													
33	KJ438239	2	Mycoplasma bovis													
34	KJ438238	2	Mycoplasma bovis													
35	KJ438237	2	Mycoplasma bovis													
36	KJ438236	2	Mycoplasma bovis													
37	KJ438235	2	Mycoplasma bovis													
38	KJ438234	2	Mycoplasma bovis													
39	KJ438233	2	Mycoplasma bovis													
40	KJ438232	2	Mycoplasma bovis													
41	KJ438231	2	Mycoplasma bovis													
42	KJ438230	2	Mycoplasma bovis													
43	KJ438229	2	Mycoplasma bovis													
44	KJ438228	2	Mycoplasma bovis													
45	KJ438227	2	Mycoplasma bovis													
46	KJ438226	2	Mycoplasma bovis													
47	KJ438225	2	Mycoplasma bovis													
48	KJ438224	2	Mycoplasma bovis													
49	KJ438223	2	Mycoplasma bovis													
50	KJ438222	2	Mycoplasma bovis													
51	KJ438221	2	Mycoplasma bovis													
52	KJ438220	2	Mycoplasma bovis													
53	KJ438219	2	Mycoplasma bovis													
54	KJ438218	2	Mycoplasma bovis													
55	KJ438217	2	Mycoplasma bovis													
56	KJ438216	2	Mycoplasma bovis													
57	KJ438215	2	Mycoplasma bovis													
58	KJ438214	2	Mycoplasma bovis													
59	KJ438213	2	Mycoplasma bovis													
60	KJ438212	2	Mycoplasma bovis													
61	KJ438211	2	Mycoplasma bovis													
62	KJ438210	2	Mycoplasma bovis													
63	KJ438209	2	Mycoplasma bovis													
64	KJ438208	2	Mycoplasma bovis													
65	KJ438207	2	Mycoplasma bovis													
66	KJ438206	2	Mycoplasma bovis													
67	KJ438205	2	Mycoplasma bovis													
68	KJ438204	2	Mycoplasma bovis													
69	KJ438203	2	Mycoplasma bovis													
70	KJ438202	2	Mycoplasma bovis													
71	KJ438201	2	Mycoplasma bovis													
72	KJ438200	2	Mycoplasma bovis													
73	KJ438199	2	Mycoplasma bovis													
74	KJ438198	2	Mycoplasma bovis													
75	KJ438197	2	Mycoplasma bovis													
76	KJ438196	2	Mycoplasma bovis													
77	KJ438195	2	Mycoplasma bovis													
78	KJ438194	2	Mycoplasma bovis													
79	KJ438193	2	Mycoplasma bovis													
80	KJ438192	2	Mycoplasma bovis													
81	KJ438191	2	Mycoplasma bovis													
82	KJ438190	2	Mycoplasma bovis													
83	KJ438189	2	Mycoplasma bovis													
84	KJ438188	2	Mycoplasma bovis													
85	KJ438187	2	Mycoplasma bovis													
86	KJ438186	2	Mycoplasma bovis													
87	KJ438185	2	Mycoplasma bovis													
88	KJ438184	2	Mycoplasma bovis													
89	KJ438183	2	Mycoplasma bovis													
90	KJ438182	2	Mycoplasma bovis													
91	KJ438181	2	Mycoplasma bovis													
92	KJ438180	2	Mycoplasma bovis													
93	KJ438179	2	Mycoplasma bovis													
94	KJ438178	2	Mycoplasma bovis													
95	KJ438177	2	Mycoplasma bovis													
96	KJ438176	2	Mycoplasma bovis													
97	KJ438175	2	Mycoplasma bovis													
98	KJ438174	2	Mycoplasma bovis													
99	KJ438173	2	Mycoplasma bovis													
100	KJ438172	2	Mycoplasma bovis													
101	KJ438171	2	Mycoplasma bovis													
102	KJ438170	2	Mycoplasma bovis													
103	KJ438169	2	Mycoplasma bovis													
104	KJ438168	2	Mycoplasma bovis													
105	KJ438167	2	Mycoplasma bovis													
106	KJ438166	2	Mycoplasma bovis													
107	KJ438165	2	Mycoplasma bovis													
108	KJ438164	2	Mycoplasma bovis													
109	KJ438163	2	Mycoplasma bovis													
110	KJ438162	2	Mycoplasma bovis													
111	KJ438161	2	Mycoplasma bovis													
112	KJ438160	2	Mycoplasma bovis													
113	KJ438159	2	Mycoplasma bovis</													

3.1.2 SNP Analizi

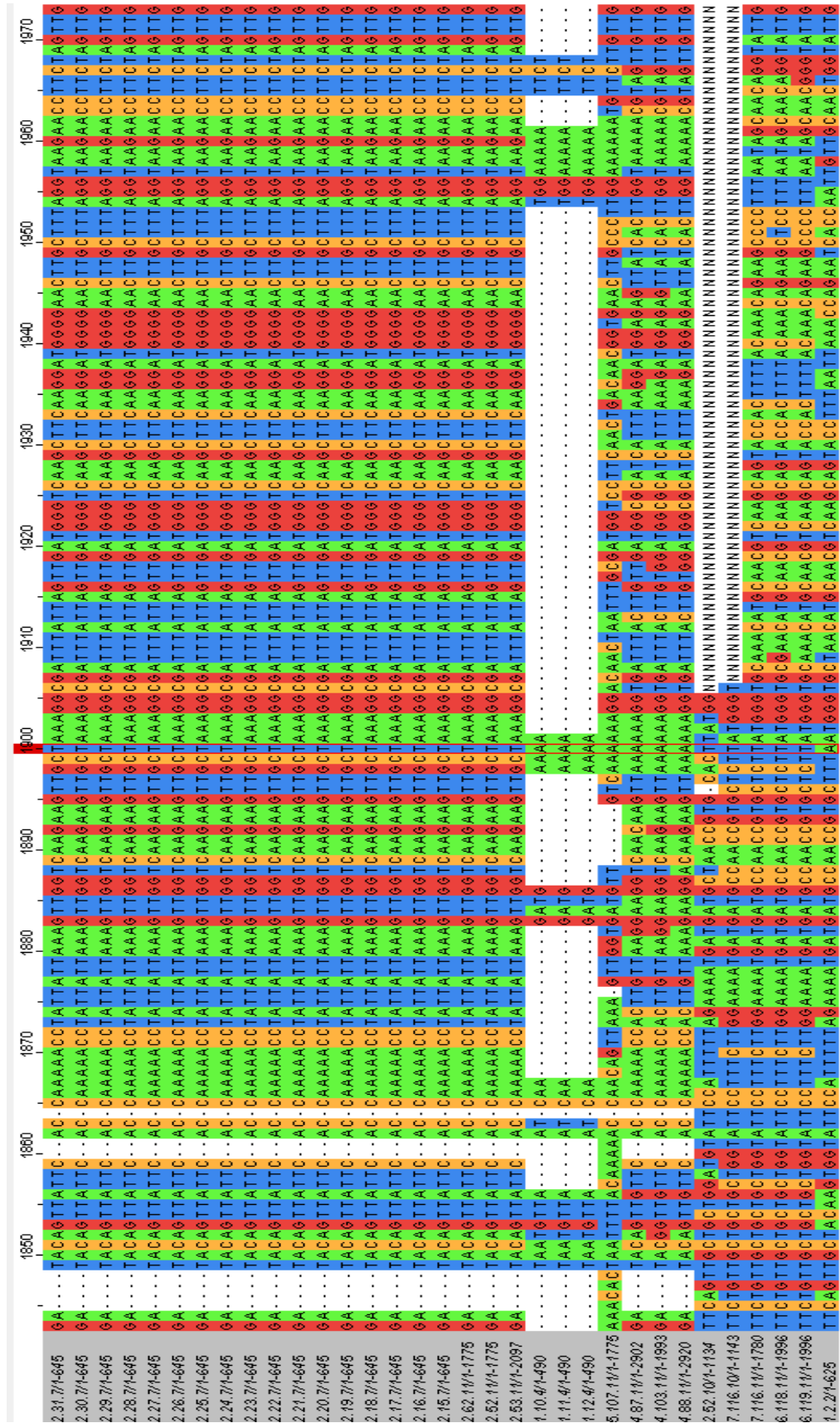
Tez kapsamında tanısı hedeflenen 26 türün 16S rDNA ve RpoB gen bölgelerinde bulunan 208 SNP ilk kez bu çalışmada tespit edilmiş, bu SNP'lerden 17 tanesi Sequenom MassArray sisteminde test edilmiştir.

İstanbul Aydın Üniversitesi Mekatronik Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Oğuz ATA tarafından, SNP tayini amacıyla MS SQL'de yeni bir veritabanı kurulmuş ve .NET platformunda girilen dizilerde belirtilen türler arasındaki tek nokta poliformizmlerini tespit eden bir program yazılmıştır. Bu çalışmada tespit edilen SNP'lerden, referans alınan 5 türe (*M. mycoides subsp. Mycoides SC*, *M. bovis*, *M. bovigentialium*, *M. dispar*, *M. canis*) ait 16S rDNA gen bölgesinde bulunan SNP'ler, henüz yayınlanmamış olan bu programda tespit edilerek, bu tez çalışmasında deneysel olarak test edilmiştir.

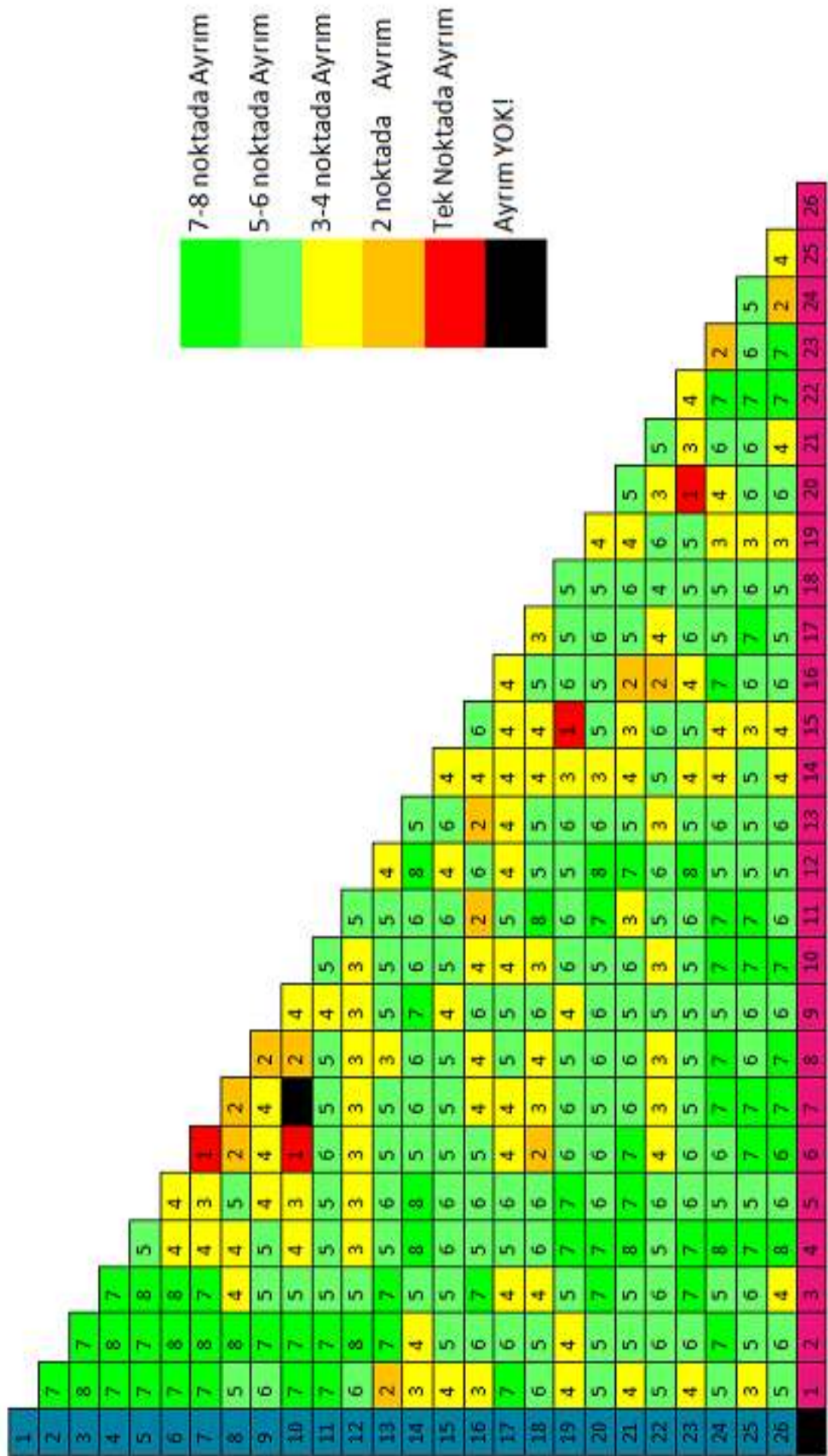
Bu 5 tür için tespit edilen noktalar referans alınarak, diğer 21 tür, açık erişimli ve web tabanlı MUSCLE [90] programı kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca yine MUSCLE programı ile RpoB gen bölgesinde, 26 türde karşılaşılan 104 SNP tanımlanmıştır. MUSCLE'in kullanımına ilişkin ekran görüntüsü Şekil 3.3'de verilmiştir.

26 türde ayrımın gerçekleştirilebilmesi için tespit edilen SNP'lerin, tür bazında kaç ayrım noktası olduğu, çalışılan her gen bölgesi için ve tüm noktalar için belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında 26 türün her biri için 2 gen bölgesinde, 8 SNP noktası belirlenmiştir. Belirlenen SNP noktaları türler arasında genotip farkı oluşturmaktadır. Aşağıda verilmiş olan türler arası ayrım profillerinde türler, Çizelge 2.4'te verilen numaralandırmalarla verilmiştir. Her bir tür numarası karşısındaki türden ayrıldığı SNP sayısını ifade eder. Şekil 3.4'te çalışılan tüm SNP'ler ile yapılan genotip farkları trafik ışıkları modeli ile verilmiştir. Buna göre iki tür arası ayrımın, 7 veya 8 olduğu durumlarda koyu yeşil, 5 veya 6 olduğu durumlarda açık yeşil, 4 veya 3 olduğu durumlarda turuncu, 1 veya 2 olduğu durumlarda kırmızı renklerde verilmiş, ayrım olmayan türler ise siyah renk ile gösterilmiştir.

Geliştirilen panelin, düşük maliyet ile kullanıcı dostu olması için minimum nokta ile türler arasındaki genotip farkını ortaya koyması amaçlanmaktadır.



Şekil 3. 3 MUSCLE programında yapılan dizi hizalama işleminin Jalview görüntüsü



Şekil 3. 4 Türler arasında 8 SNP ile yapılan genotip farkları

3.2 Deneysel Çalışmalar

3.2.1 DNA'ların Saflık ve Miktar Analizi

Genomik DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA örneklerinin nükleik asit konsantrasyonları (ng/μL) ve absorbans değerleri, NanoDrop Mikro-Hacim UV-VIS Spektrofotometre kullanılarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3. 1 Örneklerin DNA konsantrasyonu ve saflık tayini

	DNA Konsantrasyonu (ng/μL)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
<i>M. mycoides SC</i>	13,7	0,274	0,133	2,06
<i>M.bovis</i>	9,6	0,191	0,108	1,77
<i>M.bovigenitalium</i>	5,2	0,105	0,045	2,31
<i>M.alkalescens</i>	23	0,297	0,181	1,64
<i>M.canadense</i>	14,8	0,46	0,247	1,86
<i>M.arginini</i>	-0,6	-0,011	-0,02	0,57
<i>A. laidlawii</i>	24,5	0,489	0,227	2,16

3.2.2 Çalışılan Örneklerin Gruplandırılması

Sequenom Mass Array platformunda genotipleme analizi için ideal DNA konsantrasyonu 10 ng/μL olarak bildirilmiştir [37]. Bu sebeple kültürü yapılan 8 referans soydan 6 tanesinin (*M. mycoides SC*, *M.bovis*, *M.bovigenitalium*, *A. Laidlawii*, *M.alkalescens* ve *M.canadense*) DNA konsantrasyonları çalışmaya uygun bulunmuştur.

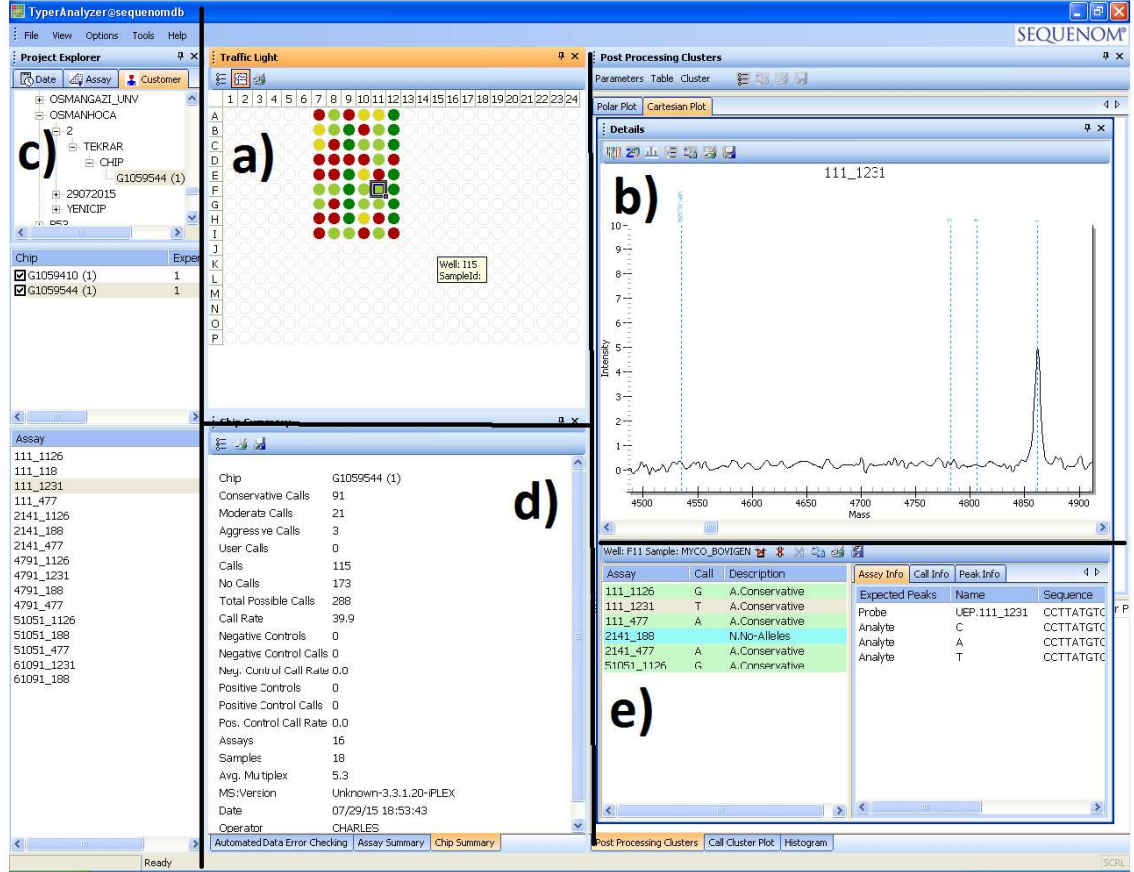
6 tür, 3 pozitif örnek ve 3 neaktif örnek olarak gruplandırılmış, pozitif örneklerden *M. mycoides subsp. mycoides SC* seçilerek 1/2, 1/5 ve 1/10 olacak şekilde sulandırılarak duyarlılıkları ölçülmüştür. Pozitif örnekler kendi aralarında ikiyeşerli ve üçlü olarak enfeksiyon karışımı oluşturulmuştur. Oluşturulan örnek grupları DNA konmayan 2 adet boş örnekle birlikte çipe yüklenmiştir.

Çizelge 3. 2 Deneysel çalışmalarda kullanılan örnekler

Örnek No	Hedef DNA
1	<i>M. mycoides</i> SC 1/1
2	<i>M. mycoides</i> SC (1/2 seyreltme)
3	<i>M. mycoides</i> SC (1/5seyreltme)
4	<i>M. mycoides</i> SC (1/10seyreltme)
5	<i>M.bovis</i>
6	<i>M.bovigenitalium</i>
7	<i>M.alkalescens</i>
8	<i>M.canadense</i>
9	<i>A. laidlawii</i>
10	<i>M. mycoides</i> SC - <i>M.bovigenitalium</i>
11	<i>M. mycoides</i> SC - <i>M.bovis</i>
12	<i>M.bovis</i> - <i>M.bovigenitalium</i>
13	<i>M. mycoides</i> SC - <i>M.bovis</i> - <i>M.bovigenitalium</i>
14	<i>M. mycoides</i> SC - <i>A. laidlawii</i>
15	Kontrol 1
16	Kontrol 2

3.2.3 Genotipleme Sonuçları

MassArray Typer™ 4.0 Analyzer yazılımına ait kullanıcı arayüzüne ait bir görsel Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Görselde referans bakteri türleri, negatif örnekler ve bakteri karışımlarından oluşan 16 örneğin, toplam 60 kuyuda çalışıldığı bir deney setinde *M. mycoides subsp. mycoides SC*'nin 4 nolu SNP'sine ait genotipleme sonuçları örnek olarak verilmiştir.



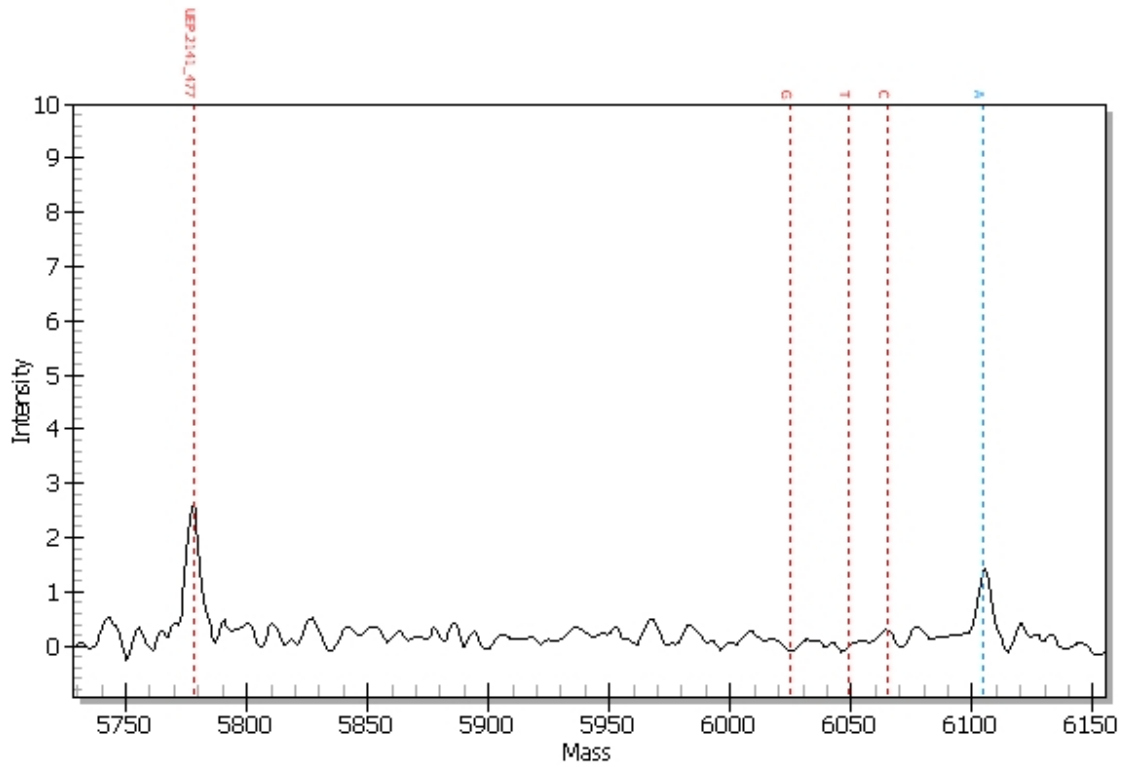
Şekil 3. 5 MassArray Typer 4.0 Analyzer yazılımına ait kullanıcı arayüzü görüntüsü

- a) Analiz sonuçlarının trafik ışıkları modeli ile gösterimi b) Spektrum c) Proje arşiv menüsü d) Kullanıcı, yazılım ve çip bilgileri e) Genotipleme sonucu

Traffic Lights olarak belirtilen a bölgesi, her bir nokta çip üzerinde bir kuyuyu temsil eder ve renkleri, örneğin analizi sonucu elde edilen başarıyı göstermektedir. Koyu yeşil renk verinin iyi kalitede olduğunu, açık yeşil renk orta kalitede veri olduğunu ve kırmızı renk ise aktarım yapılan örnekte veri elde edilemediğini belirtir. Şekilde b ile gösterilen bölge, örneğe ait spektrum analiz sinyalleri ile genotip ve kütle dağılımını

gösterir. Şekil 3.7’de c ile gösterilen alanda yapılan tüm analizlere ait veritabanındaki verilere ve assay’lere erişim için gereken menüler, d bölgesinde ise kullanıcı, çip ve yazılım bilgileri yer almaktadır. Her bir kuyuda bulunan SNP’ler için beklenen pikler, genotipler, uzama reaksiyonu ürünlerinin dizileri de e ile işaretlenen bölgede verilmektedir.

Genotipleme sonucu, spectrum analiz sinyallerinin yorumlanması ile belirlenir. Buna göre yoğunluk-kütle grafiğinde gözlemlenen ilk pik uzama probunu göstermektedir. Daha sonra görünen piklerin baza göre değişir ve bu değişiklik genotipleme sonucunu verir (Şekil 3.6).



Şekil 3. 6 *M. mycoides subsp. mycoides* SC kültüründen izole edilen örneğe ait T1_SNP2 nolu SNP’nini genotipleme sonuçları

3.3 Sonuçların Değerlendirilmesi ve Öneriler

Yapılan genotipleme sonucunda alınan sonuçlar beklenen genotip, beklenmeyen genotip veya bağlanmama şeklinde 3 grup altında incelenmiştir. Çizelge 3.2’de numaralandırılan örnekler için genotipleme analizi sonuçları Çizelge 3.3’de verilmiştir. Çizelgede beklenen genotip + işareti ile, beklenmeyen genotip – işareti ile veya prob bağlanmaması durumu # işareti ile belirtilmiştir. Trafik ışıkları modeli ile renklendirilen çizelge de beklenen genotipleme sonuçları yeşil ile, sistemden kaynaklı olarak çalışmayan veya spektrum analizleri okunamayan sonuçlar sarı ile, hatalı ve beklenmeyen sonuçlar ise kırmızı ile gösterilmiştir.

M. mycoides subsp. mycoides SC referans soyu kullanılarak yapılan denemelerde, bu türe özgü tasarlanan T1_SNP1, T1_SNP2, T1_SNP3 ve T1_SNP4 noktalarındaki genotipleme sonuçları beklendiği şekilde gerçekleşmiş ve tanı koymaya yeter görülmüştür. Duyarlılığın belirlenmesi amacı ile DNA örneği 1/2, 1/5 ve 1/10 seyreltilerek hazırlanan örneklerin tamamında aynı sonuçlar alınmıştır. Bu durum da sistemin 1,3 ng/μL DNA konsantrasyonunda doğru okuma yaptığını göstermiştir.

M. bovis referans soyu kültüründen izole edilen DNA örnekleri ile yapılan denemelerde, bu türe özgü olarak tasarlanan T2_SNP1, T2_SNP2, T2_SNP3 ve T2_SNP4 noktalarından T2_SNP1 noktasının hedef DNA’ya bağlanmadığı tespit edilmiş, diğer noktalarda doğru genotipleme sonuçları alınmıştır. Kontrol amaçlı olarak eklenen T3_SNP4 ve T5_SNP4 noktalarına ait problemlerinde T2_SNP4 ile aynı yere bağlanarak aynı sonucu verdiği belirlenmiştir.

M. bovis genitalium referans soyu ile yapılan çalışmalarda da tasarımı bu türe özgü yapılmış olan T3_SNP1, T3_SNP2, T3_SNP3 ve T3_SNP4 noktaları ile birlikte T1_SNP3, T2_SNP4, T5_SNP3 ve T5_SNP4 noktalarından da doğru sonuçlar alınırken, T1_SNP2 ve T2_SNP3 noktalarından hatalı sonuçlar alınmış, bu durum yukarıda bahsedilen katlanmadan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Kullanılan primer, prob veya dene koşullarında yapılacak olan optimizasyon ile bu sorunun gidirebileceği düşünülmektedir.

Pozitif örneklerle yapılan karışımlar ile yapılan denemelerde de karıştırılan türlere ait genotipleme sonuçları da doğru bir şekilde alınmıştır. Negatif örneklerde yapılan çalışmalarda T1_SNP3, T2_SNP4, T3_SNP3, T3_SNP4, T5_SNP3 ve T5_SNP4 noktaları için tasarlanan problemlerin özgün olmadığı belirlenmiş ancak türe ait doğru genotipleme sonuçları alınmıştır. İçinde DNA bulundurmeyen kontrol örnekleri hazırlanarak, uzama reaksiyonlarında kullanılan problemlerin dimer oluşturup, oluşturmadığı kontrol edilmiştir. T1_SNP2 ve T2_SNP3 kodlu problemlerin DNA örneği olmadığı halde genotipleme sonucu verdiği gözlemlenmiştir. Bu problemlerden alınan G genotipinin katlanmadan kaynaklandığı belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında panele dahil edilen patojenlerin, insanlarda hayati enfeksiyonlara, gıda ve su kaynaklarında da ciddi bulaşlara sebep oldukları bilinmektedir. Ancak tasarlanan bu panelde yer alan türler, büyükbaş hayvancılıkta en sık karşılaşılan ve sağaltımı ile üretim maliyetini oldukça yükseltmenin yanında, verim düşüşü ve ölüm gibi sebeplerle ekonomik kayıplara yol açmakta olan hastalıkların temel etkenlerinden en sık karşılaşılanlarıdır. Türkiye'deki çiftlik hayvanı sayısının yaklaşık 50 milyon olduğu bilinmektedir. Hayvancılık sektörünün sürekliliği için oldukça önemli olgulardan biri olan hayvan sağlığı ve gıda güvenliğinin sağlanması için, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü 2014 yılında çiftlik hayvanlarına 70 milyonun üzerinde rutin hastalık testi uygulamış ve hastalıkların erken teşhis edilmesini amaçlamıştır. Yapılan bu testlerin canlı hayvan sayısından fazla olması, bazı testlerin her bir hayvan için en az iki kez tekrarlandığını göstermekte ve bu durum ülkemiz hayvancılık sektörü için ekonomik kayıpları da beraberinde getirmektedir.

Sonuç olarak yapılan tez çalışması ile, istenildiği takdirde tür sayısının genişletilmesi veya panele dahil olan türlerin kullanıcı ihtiyacına göre seçilerek kullanımının sağlanması nedeniyle; kaynaktan bağımsız olarak, yüksek doğrulukta çoklu örnekte tanı yapabilen, kullanıcı kolaylığı sunan, bir panel tasarlanmıştır. Tasarlanan panelin, ticari kullanıma sunulmasından önce optimizasyon ve validasyon çalışmalarının yapılması, bu tez kapsamında çalışılan 26 mikroorganizmanın tek panelde ilk kez türe özgü tanısının gerçekleştirilmesine imkan sunarak, benzer mikroorganizmalarla yapılacak olan araştırmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışması ile elde edilen veriler ışığında, aşağıda sıralanan konuların sonraki çalışmalar ile;

- Antibiyotik direnci ile ilişkilendirilen gen bölgelerinde de SNP tespiti çalışmalarının yapılarak ve panel içeriğindeki tür sayısının genişletilerek detaylandırılması,
- Biyoinformatik analizler sonucunda, ayırım noktaları belirlenen türlerin tamamına ait referans soylar kullanılarak bütün SNP belirteçlerinin test edilerek, referans soylarda başarıyla test edilerek SNP belirteçlerin, saha örneklerinde karşılaşılan enfeksiyonlara karşı duyarlılıklarının belirlenerek ve SNP genotipleme çalışmalarında kullanılan problemlerin özgünlük ve duyarlılıklarının arttırılarak optimize edilmesi ve validasyonunun yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

-
- [1] Conlan, S. Kong, H.H. Ve Segre, J.A., (2012). "Species-Level Analysis Of DNA Sequence Data From The NIH Human Microbiome Project", PLoS One,7(10): e47075: 1932-6203.
 - [2] Rajilić-Stojanović, M. Ve De Vos, W.M., (2014). "The First 1000 Cultured Species Of The Human Gastrointestinal Microbiota", FEMS Microbiology Reviews, 38: 996-1047.
 - [3] Turnbaugh, P.J. Ve Gordon, J.I., (2008). "An invitation To The Marriage Of Metagenomics And Metabolomics", Cell, 134: 708-713.
 - [4] Savage, D.C., (1977). "Microbial Ecology Of The Gastrointestinal Tract", Annual Reviews In Microbiology, 31: 107-133.
 - [5] Rosenwald, A.G. Arora, G.S. Madupu, R. Roecklein-Canfield, J. Ve Russell, J.S., (2012). "The Human Microbiome Project: An Opportunity To Engage Undergraduates In Research", Procedia Computer Science, 9: 540-549.
 - [6] Di Bella, J.M. Bao, Y. Gloor, G.B. Burton, J.P. Ve Reid, G., (2013). "High Throughput Sequencing Methods And Analysis For Microbiome Research", Journal Of Microbiological Methods, 95: 401-414.
 - [7] Douglas, A.E., (1994). Symbiotic Interactions: Oxford University Press Oxford.
 - [8] White Jr, J.F. Ve Torres, M.S., (2009). Defensive Mutualism In Microbial Symbiosis: CRC Press.
 - [9] Göçmen, B., (2008). Genel Parazitoloji Ders Kitabı, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi.
 - [10] Dethlefsen, L. Mcfall-Ngai, M. Ve Relman, D.A., (2007). "An Ecological And Evolutionary Perspective On Human-Microbe Mutualism And Disease", Nature, 449: 811-818.
 - [11] Hooper, L.V. Ve Gordon, J.I., (2001). "Commensal Host-Bacterial Relationships In The Gut", Science, 292: 1115-1118.
 - [12] Özkuyumcu, C., "Bakteri Enfeksiyonlarının Patogenezi", Available At. "<http://Hacettepemikrobiyoloji.Com/Ogrenici/Cumhur/Patogenez.Pdf>", Accessed 22.07.2015.
 - [13] Ersöz, F., (2008). "Türkiye İle OECD Ülkelerinin Sağlık Düzeyleri Ve Sağlık Harcamalarının Analizi", İstatistikçiler Dergisi: İstatistik Ve Aktüerya, 1: 27-34.

- [14] EIA (Energy Information Administration) State Energy Data 2001: Prices And Expenditures Report. Washington, D.E.
- [15] Çiftdoğan, D.Y. Ve Vardar, F., (2009). "Enfeksiyon Hastalıklarında Hızlı Tanı Testleri", Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Dergisi, 52: 159.
- [16] Sağlık Bakanlığı, "Akıllı İlaç", Available At. "<http://www.akilciilac.gov.tr/>", Accessed 22.07.2015.
- [17] Johnston SA. Presymptomatic Diagnosis. Paper Presented At The Institute Of Medicine Forum On Microbial Threats;, (December 12–13.2006.) Washington, DC.
- [18] Aras, Z., (2010). "Mikrobiyolojide Kullanılan Hızlı Tanı Yöntemleri", TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ: 97.
- [19] Fung, D.Y., (2006). "Rapid Methods And Automation In Microbiology: 25 Years Of Development And Predictions", Bull Tech U Ist, 54: 45-55.
- [20] Haşçelik, G., (2013). "Mikrobiyolojik Tanıda Yeni Yöntemler". Ankem Dergisi: 27(Ek 2):154-156
- [21] Meral, C. KarademiR, F. Süleymanoğlu, S. Aydınöz, S. Tunç, T. Kul, M. Güngör, O. Ve GöçMen, I., (2009). "The Retrospective Analysis Of Neonatal Sepsis Cases And Causes", Türk Silahlı Kuvvetleri, Koruyucu Hekimlik Bülteni, 8: 329-332.
- [22] Yazar, S. Kuru, Ö. Hamamcı, B. Çetinkaya, Ü. Karaman, Ü. Ve Kuk, S., (2013). "Mikrosporidialar Ve Mikrosporidyozis", Türkiye Parazitoloj Derg, 37: 123-134.
- [23] Von Blankenfeld-Enkvist, G. ve Brännback, M., (2002). Technological Trends And Needs In Food Diagnostics: Tekes Helsinki.
- [24] Woodward, J. Ve Spokane, R., (1998). "Commercial Biosensors: Applications To Clinical, Bioprocess, And Environmental Samples", John Wiley & Sons, Inc., New York, 227.
- [25] Turan, C., (2002). "Genetik", Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Ders Kitabı, Yayın.
- [26] Üstek, D. Abacı, N. Sırma, S. Ve Çakiris, A., (2011). "Yeni Nesil DNA Dizileme (New Generation DNA Sequencing)", Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1: 11-18.
- [27] Sanger, F. Nicklen, S. Ve Coulson, A.R., (1977). "DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors", Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 74: 5463-5467.
- [28] Ronaghi, M. Nygren, M. Lundeberg, J. Ve Nyrén, P., (1999). "Analyses Of Secondary Structures In DNA By Pyrosequencing", Analytical Biochemistry, 267: 65-71.
- [29] Margulies, M. Egholm, M. Altman, W.E. Attiya, S. Bader, J.S. Bemben, L.A. Berka, J. Braverman, M.S. Chen, Y.-J. Ve Chen, Z., (2005). "Genome

- Sequencing In Microfabricated High-Density Picolitre Reactors", *Nature*, 437: 376-380.
- [30] Turnbaugh, P.J. Ley, R.E. Mahowald, M.A. Magrini, V. Mardis, E.R. Ve Gordon, J.I., (2006). "An Obesity-Associated Gut Microbiome With Increased Capacity For Energy Harvest", *Nature*, 444: 1027-1131.
 - [31] Woese, C. Stackebrandt, E. Macke, T. Ve Fox, G., (1985). "A Phylogenetic Definition Of The Major Eubacterial Taxa", *Systematic And Applied Microbiology*, 6: 143-151.
 - [32] Böttger, E.C., (1989). "Rapid Determination Of Bacterial Ribosomal RNA Sequences By Direct Sequencing Of Enzymatically Amplified DNA", *FEMS Microbiology Letters*, 65: 171-176.
 - [33] Kolbert, C.P. Ve Persing, D.H., (1999). "Ribosomal DNA Sequencing As A Tool For Identification Of Bacterial Pathogens", *Current Opinion In Microbiology*, 2: 299-305.
 - [34] Pace, N.R., (1997). "A Molecular View Of Microbial Diversity And The Biosphere", *Science*, 276: 734-740.
 - [35] Bouakaze, C. Keyser, C. Gonzalez, A. Sougakoff, W. Veziris, N. Dabernat, H. Jaulhac, B. Ve Ludes, B., (2011). "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry-Based Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Assay Using iPLEX Gold Technology For Identification Of Mycobacterium Tuberculosis Complex Species And Lineages", *Journal Of Clinical Microbiology*, 49: 3292-3299.
 - [36] Piles, U. Zürcher, W. Schär, M. Ve Moser, H., (1993). "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry: A Powerful Tool For The Mass And Sequence Analysis Of Natural And Modified Oligonucleotides", *Nucleic Acids Research*, 21: 3191-3196.
 - [37] Sequenom, (2009). "iPLEX Gold Application Guide, Sequenom.
 - [38] Sequenom, (2009). "PLEX® Gold SNP Genotyping Training Protocol, Sequenom.
 - [39] Edwards, J.R. Ruparel, H. Ve Ju, J., (2005). "Mass-Spectrometry DNA Sequencing", *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 573: 3-12.
 - [40] Miman, Ö., (2013). "YM01. 4.Moleküler Çalışmalarda Biyoinformatik: Veri Tabanları", 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül - 5 Ekim 2013, Denizli.
 - [41] Kaikabo, A. Ve Kalshingi, H., (2008). "Concepts Of Bioinformatics And Its Application In Veterinary Research And Vaccines Development", *Nigerian Veterinary Journal*, 28: 39-46.
 - [42] Polat, M. Ve Karahan, A.G., (2009). "Multidisipliner Yeni Bir Bilim Dalı: Biyoinformatik Ve Tıpta Uygulamaları", *SD Ü Tıp Fak Derg*, 16: 41-50.
 - [43] Bayat, A., (2002). "Science, Medicine, And The Future: Bioinformatics", *BMJ: British Medical Journal*, 324: 1018.

- [44] Yazağan, A., "Biyolojik Veritabanları Ve Biyoinformatik Analiz Araçları", Available At. [Http://Ab.Org.Tr/Ab14/Bildiri/90-Uzun.Pdf](http://Ab.Org.Tr/Ab14/Bildiri/90-Uzun.Pdf) Accessed 22.07.2015.
- [45] Genbank, (2008). "2008 Genbank Stats" Available At [Http://www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Genbank/Genbankstats-2008/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/genbankstats-2008/), Accessed 20.07.2015.
- [46] McGinnis, S. Ve Madden, T.L., (2004). "BLAST: At The Core Of A Powerful And Diverse Set Of Sequence Analysis Tools", Nucleic Acids Research, 32: W20-W25.
- [47] Li, W. Cowley, A. Uludag, M. Gur, T. McWilliam, H. Squizzato, S. Park, Y.M. Buso, N. Ve Lopez, R., (2015). "The EMBL-EBI Bioinformatics Web And Programmatic Tools Framework", Nucleic Acids Research: Gkv279.
- [48] FAO, (2013). "World Data" Available At. [Http://www.Fao.Org/Docrep/018/i3107e/i3107e00.Htm](http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm) Accessed 22.07.2015.
- [49] TÜİK, (2013). "Türkiye Büyükbaş ve Küçükbaş Hayvan Varlığı", Available At. [Http://www.Tuik.Gov.Tr/PrehaberBultenleri.Do?id=16183](http://www.tuik.gov.tr/PrehaberBultenleri.do?id=16183), Accessed 22.07.2015.
- [50] TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, (2014). "Gıda Ve Kontrol Genel Müdürlüğü Faaliyet Raporu." .
- [51] Özen, H. Karaman, M. Şahin, M. Ve Özcan, K., (2009). "Pnömonili Sığırlarda Mycoplasma Bovis, M. Dispar, M. Bovirhinis Ve M. Mycoides Subsp. Mycoides (Küçük Koloni Tipi)'in PZR İle Belirlenerek Patolojik Bulguların İncelenmesi", Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15: 125.
- [52] Öztürk, D.M., (2006). "Pnömonili Kovun Akciğerlerinden İzole Edilen Bakteriler Ve Antibiyotik Duyarlılıklar ", Vet. Bil. Derg., 22: 59-63.
- [53] Arda, M. Minbay, A. Leloğlu, N. Aydın, N. Ve Akay, Ö., (1992). "Özel Mikrobiyoloji", Atatürk Üniversitesi Yayınları: 197-223.
- [54] Kaya, O. Ve Erganiş, O., (1991). "Koyun Ve Kuzu Pnömonileri Üzerinde Etiyolojik Survey", Veterinarium, 32: 27-29.
- [55] Gündüz, K. Ve Erganiş, O., (1998). "Pnömonili Sığır Akciğerlerinden İzole Edilen Pasteurella Haemolytica Suşlarının Biyotiplendirilmesi Ve Serotiplendirilmesi", Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- [56] Egwu, G. Nicholas, R. Ameh, J. Ve Bashiruddin, J., (1996). "Contagious Bovine Pleuropneumonia: An Update", Veterinary Bulletin, 66: 875-888.
- [57] Razin, S. Ve Freundt, E., (1984). "The Mycoplasmas", Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, 1: 740-793.
- [58] GÜRELİ, H., (2009). "Sığırlarda Solunum Sistemi Hastalıklarının Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler", Vet Hekim Der Derg, 80: 29-33.
- [59] Friton, G. Cajal, C. Ve Ramirez-Romero, R., (2005). "Long-Term Effects Of Meloxicam In The Treatment Of Respiratory Disease In Fattening Cattle", The Veterinary Record, 156: 809-811.

- [60] Snowden, G. Van Vleck, L.D. Cundiff, L. Ve Bennett, G., (2006). "Bovine Respiratory Disease İn Feedlot Cattle: Environmental, Genetic, And Economic Factors", Journal Of Animal Science, 84: 1999-2008.
- [61] Seker, E. Ozenc, E. Ve (2010). "Mastitisli İnek Sütlerinden İzole Edilen Koagulaz Negatif Stafilokokların Antibiyotik Dirençlilikleri", YYU Veteriner Fakultesi Dergisi, 2: 107 - 111
- [62] Gürbulak K, C.E., Abay M, Atabay Ö, Bekyürek T., (2009). "İneklerde Subklinik Mastitisin Farklı Yöntemlerle Saptanması", Kafkas Univ Vet Fak Derg, 15: 765-770.
- [63] Baştan A, K.M., Fındık M, Erüenal N. , (1997). "İneklerde Subklinik Mastitislerin Elektriksel İletkenlik, Somatik Hücre Sayısı Ve California Mastitis Testi İle Saptanması.", Ankara Üniv Vet Fak Derg., 44: 1-6
- [64] İlhan Z, T.İ., Sağcan S, Solmaz H. , (2011). "Subklinik Mastitisli Keçi Sütlerinden Aerobik Bakterilerin İzolasyonu.", YYU Vet Fak Derg, 22: 89-91.
- [65] Akan M., (2010). "Mastitis Patojenlerinde Antimikrobiyal Direnç", Türkiye Klinikleri J Vet Sci., 1: 44-49.
- [66] Bradley A., (2002). "Bovine Mastitis: An Evolving Disease", The Vet J., 164: 116-128.
- [67] Boynukara B, G.T., Alisarli M, Gurturk K, Solmaz H. , (2008;). "Classical Enterotoxigenic Characteristics Of Staphylococcus Aureus Strains İsolated From Bovine Subclinical Mastitis İn Van, Turkey. ", Int J Food Microbiol., 125: 209-211.
- [68] Türkylmaz S, Y.Ö., Oryaşın E, Kaynarca S, Bozdoğan B., (2010). " Molecular Identification Of Bacteria İsolated From Dairy Herds With Mastitis.", Kafkas Univ Vet Fak Derg, 16: 1025-1032.
- [69] Ünal N, Y.M., (2010). "İneklerin Süt, Meme Başı Derisi Ve Burun Mukozalarından İzole Edilen Stafilokok Türlerinin Antibiyotik Direnç Profilleri. ", Kafkas Univ Vet Fak Derg., 16: 389-396.
- [70] Çokal, Y. (2012). "Subklinik Mastitisli İneklerin Sütlerinden Aerobik Bakterilerin İzolasyonu", Balıkesir Sağlık Bil Derg, 1: 65-69.
- [71] Arda, M. Ve İstanbulluoglu, E., (1979). "Mastitislere Neden Olan Aerob, Anaerob Ve Mantarların İzolasyonu, İdentifikasyonu, Bunlara Karsı Etkili Olan Antibiyotik Ve Fungisitlerin Saptanması", Ankara Üniversitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 26: 14-29.
- [72] Ateş, M. Erganiş, O. Ve Çorlu, M., (1991). "Konya Yöresindeki Mastitisli İneklerden Elde Edilen Süt Örneklerinin Mikrobiyal Florası", Doğa-Tr-J. Veterinary And Animal Sci, 16: 19-29.
- [73] Şahin, M. Çolak, A. Otlı, S. Aydın, F. Genç, O. Güler, M. Ve Oral, H., (1997). "Kars Yöresi İthal Simental İneklerde Subklinik Ve Klinik Mastitislerin Görülme Oranı Ve Etkili Antibiyotiklerin Belirlenmesi", Kafkas Univ Vet Fak Derg, 3: 49-55.

- [74] Tekeli, T. Baysal, T. Ve Gökçay, Y., (1985). "İneklerde Subklinik Mastitislerin Kuru Dönemde Penisilin-Streptomisin Kombinasyonuyla Sağıtımı Üzerine Araştırmalar", Selçuk Üniv Vet Fak Derg, 1: 71-79.
- [75] Kuyucuoğlu, Y. Ve Uçar, M., (2001). "Afyon Bölgesi Süt İneklerinde Subklinik Ve Klinik Mastitislerin Görülme Oranları Ve Etkili Antibiyotiklerin Tespiti", Vet Hek Mikrobiyol Derg, 1: 19-24.
- [76] Acar, G. Yılmaz, E. Solmaz, H. Ve Cantekin, Z., (2012). "Hatay Bölgesinde Klinik Ve Subklinik Mastitisli İneklerden Streptococcus Spp. Etkenlerinin İzolasyonu Ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi", Avkae Derg., 2 (2):1-5.
- [77] Costa, E. Ribeiro, A. Watanabe, E. Ve Melville, P., (1998). "Infectious Bovine Mastitis Caused By Environmental Organisms", Journal Of Veterinary Medicine, Series B, 45: 65-71.
- [78] Abdella, M., (1996). "Bacterial Causes Of Bovine Mastitis İn Wondogenet, Ethiopia", Journal Of Veterinary Medicine, Series B, 43: 379-384.
- [79] Shpigel, N. Winkler, M. Ziv, G. Ve Saran, A., (1998). "Clinical, Bacteriological And Epidemiological Aspects Of Clinical Mastitis İn Israeli Dairy Herds", Preventive Veterinary Medicine, 35: 1-9.
- [80] Halasa, T. Huijps, K. Østerås, O. Ve Hogeveen, H., (2007). "Economic Effects Of Bovine Mastitis And Mastitis Management: A Review", Veterinary Quarterly, 29: 18-31.
- [81] Kılıçoğlu, Ç. Ve Alaçam, E., (1985). "Veteriner Doğum Bilgisi Ve Üreme Organlarının Hastalıkları", Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 403: 28-38.
- [82] Sözmen, M. Tunca, R. Beytut, E. Ve Gürbüz, A., (2010). "Brucella Melitensis İle Doğal Enfekte Koyun Abortuslarında CD3 Ve Lambda Hafif Zincir İmmunglobulin Ekspresyonu", Kafkas Univ Vet Fak Derg, 16 (3): 353-363.
- [83] Cengiz, F., (2001). "Abort Yapan İnekte Kan Değerlerinin İncelenmesi", J Fac Vet Med, 20: 127-132.
- [84] Helman, R. Russell, W. Jenny, A. Miller, J. Ve Payeur, J., (1998). "Journal Of Veterinary Diagnostic", J Vet Diagn Invest, 10: 292-295.
- [85] Küçükkalem, Ö.F. Cengiz, S. Altun, S.K. Ve Yıldırım, M., (2013). "Erzurum İlinde Sığır Abortlarında Coxiella Burnetii'nin Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Belirlenmesi", Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 8: 92-95..
- [86] Enright, F. Walker, J. Jeffers, G. Ve Deyoe, B., (1984). "Cellular And Humoral Responses Of Brucella Abortus-Infected Bovine Fetuses", American Journal Of Veterinary Research, 45: 424-430.
- [87] Mysql, Available At: <https://www.mysql.com/>. Accessed 22.07.2015.
- [88] MS-SQL, (2014). Available At: <http://www.microsoft.com/en-us/server-cloud/products/sql-server/>. Accessed 02.08.2015.
- [89] JAVA, Available At: <https://www.java.com/tr/>. Accessed 22.07.2015.

- [90] EMBL-EBI, " Multiple Sequence Comparison By Log- Expectation", Available At: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/Msa/Muscle/>. Accessed.
- [91] Jalview, Available At: <http://www.jalview.org/>. Accessed 22.07.2015.
- [92] BLAST, Available At: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Accessed 22.07.2015.
- [93] .NET, (2015). Available At: <https://msdn.microsoft.com/en-us/vstudio/a496123>. Accessed 02.08.2015.
- [94] Sambrook, J. Fritsch, E.F. Ve Maniatis, T., (1989). Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Osman Mutluhan UĞUREL
Doğum Tarihi ve Yeri : 04.08.1990 TOKAT
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : osmanugurel@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2013
Lise	Fen	Tokat Milli Piyango İhya Balak Fen Lisesi	2008

YAYINLAR

Bildiri

1. Uğurel O., Turgut–Balık D. “A Java Program for Analysis of Nucleic Acid Sequences Towards Designing Microbial Diagnosis Kits”, International Symposium On Molecular Chemistry , İstanbul, 18-19 Aralık 2014.

Proje

1. “*Mycoplasma* türlerinin tanısını gerçekleştirmek üzere biyoinformatik analizlerin yapılması ve kütle spektroskopisine dayalı bir panelin geliştirilmesi” Yıldız Teknik Üniversitesi BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri) Projesi, Proje No: 2014-07-04-YL04, Araştırmacı, 2014-.
2. “Yeni doğan sepsisinin bakteriyel etmenlerinin tanısına yönelik gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (realtimePCR) tabanlı multiplex bir tanı kiti geliştirilmesi” Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Teknogirişim Sermaye Desteği Projesi, Proje No: 1166.TGSD.2015, Yürütücü, 2015-.