

T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
SUŞLARINDAN ELDE EDİLEN BAKTERİYOFAJLARDA BULUNAN SCIN, CHIPS,  
SEI, SEK TOKSİN GENLERİNİN VARLIĞININ PZR VE SOUTHERN BLOT  
YÖNTEMİ İLE KIYASLANMASI

Zeynep Burçin ÇAVUŞOĞLU

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Fikret ŞAHİN

ANKARA  
2012

# **Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarından Elde Edilen Bakteriyofajlarda Bulunan SCIN, CHIPS, SEI, SEK Toksin Genlerinin Varlığının PZR ve Southern Blot Yöntemi İle Kıyaslanması**

## **ÖZET**

Bakteriyofajlar, taşıdıkları toksin genleri sayesinde bakterilere farklı fenotipik özellikler kazandırır. Bu özelliklerin tespit edilmesi ve araştırılması, mikrobiyal biyoteknoloji çalışmaları açısından önemlidir. Bu amaçla çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiştir. *Staphylococcus aureus*, hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan en önemli patojenlerden biridir. Bu çalışmada, *S. aureus* suşlarından elde edilen fajlarda bulunan SCIN, CHIPS, SEI, SEK toksin genlerinin varlığı PZR ile tespit edilmiştir. Southern Blot hibridizasyon yöntemi ile bu toksin genlerinin varlığı doğrulanmıştır. Bu iki yöntem duyarlılık ve özgüllük açısından karşılaştırılmıştır. Son yıllarda bulunan bu toksin genleri ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Analizler sonucunda; PZR yönteminde daha az konsantrasyonda DNA'ya ihtiyaç duyulurken, Southern Blot hibridizasyon yönteminde daha fazla konsantrasyonda DNA'ya ihtiyaç olduğu görülmüştür. PZR ve Southern Blot Hibridizasyon yöntemlerinin özgüllük açısından benzer olduğu tespit edilmiştir.

*Anahtar kelimeler: Stafilokokal Kompleman İnhibitör Protein (SCIN), Stafilokokal Kemotaksis İnhibitör Protein (CHIPS), Stafilokokal Enterotoksin I (SEI), Stafilokokal Enterotoksin K (SEK), Lizojenik faj, Virulans faktörleri*

**Comparison of PCR and Southern Blot methods for detection of the presence of toxin genes including SCIN, CHIPS, SEI, SEK in bacteriophages obtained from *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples**

**ABSTRACT**

Bacteriophages provide different phenotypic features for bacteria with toxin genes. The detection and investigation of these features are important for studies of microbial biotechnology. For these purpose, several molecular methods have been developed. *Staphylococcus aureus* is one of the most important pathogen which is caused infection by community and nasocomial. In this study, presence of toxin genes including SCIN, CHIPS, SEI, SEK in bacteriophages obtained from *S. aureus* strains were detected by PCR. Presence of this toxin genes were confirmed by Southern Blot hybridization method. This methods were compared for sensitivity and specificity. There are few studies about these toxin genes. According to our results, while PCR method need less concentration of DNA, Southern Blot hybridization method needs more concentration of DNA. Southern Blot hybridization and PCR analysis have similar specificities.

*Key words; Staphylococcal Complement Inhibitory Protein (SCIN), Staphylococcal Chemotaxis Inhibitory Protein (CHIPS), Staphylococcal Enterotoxin I (SEI), Staphylococcal Enterotoksin K (SEK), Lysogenic phage, Virulence factors*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü araştırma olanağı sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren değerli tez danışmanım Sayın Doç Dr. Fikret ŞAHİN'e, tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarım sırasında bana her türlü imkân ve olanak sağlayan başta hocam Sayın Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN olmak üzere Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ve tüm çalışanlarına, yüksek lisans çalışmam boyunca benden bilgisini, tecrübelerini ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Dr. Djursun KARASARTOVA'ya, ayrıca benim bugünlere gelmemde her türlü destek ve teşviklerini esirgemeyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim değerli aileme ve özellikle halam Zehra SOYDAN ve ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep Burçin ÇAVUŞOĞLU

Ankara, Şubat 2012

## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| ÖZET.....  | i    |
| ABSTRACT.....  | ii   |
| TEŞEKKÜR.....  | iii  |
| İÇİNDEKİLER.....   | iv   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | vi   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....   | vii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....   | viii |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ.....  | 1    |
| 2. KURAMSAL TEMELLER.....  | 3    |
| 2.1. Tarihçe.....  | 3    |
| 2.2. Morfoloji.....  | 3    |
| 2.3. Üreme ve Kültür Özellikleri.....                                  | 3    |
| 2.4. Genom Yapısı.....   | 4    |
| 2.4.1. Virulans Faktörleri ve Patojeniteleri.....                      | 4    |
| 2.4.1.1. Kapsül.....   | 4    |
| 2.4.1.2. Hücre Duvarı.....   | 4    |
| 2.4.1.2.1. Pektidoglikan Yapı.....                                     | 4    |
| 2.4.1.2.2. Teikoik Asit.....   | 5    |
| 2.4.1.2.3. Yüzey Proteinleri.....                                      | 5    |
| 2.4.1.3. Toksinler.....  | 5    |
| 2.4.1.3.1. Sitolitik Toksinler.....                                    | 5    |
| 2.4.1.3.1.1. Hemolizinler.....   | 5    |
| 2.4.1.3.1.2. Panton Valentin Lökosidi.....                             | 6    |
| 2.4.1.3.2. Stafilokokal Enterotoksinler.....                           | 6    |
| 2.4.1.3.3. Eksfoliyatif Toksin.....                                    | 7    |
| 2.4.1.3.4. Toksik Şok Sendromu Toksini.....                            | 7    |
| 2.4.1.4. Enzimler.....   | 7    |
| 2.4.1.4.1. Katalaz.....  | 7    |
| 2.4.1.4.2. Koagülaz.....   | 7    |
| 2.4.1.4.3. Lipaz.....  | 8    |
| 2.4.1.4.4. Hiyalüronidaz.....  | 8    |
| 2.4.1.4.5. Stafilokinaz.....   | 8    |
| 2.4.1.4.6. Fosfotidilinozitol-Spesifik Fosfolipaz C.....               | 8    |
| 2.4.1.4.7. Deoksiribonükleaz.....                                      | 8    |
| 2.4.1.4.8. Beta- laktamaz.....   | 9    |
| 2.4.1.5. İmmün Sistemi Modüle Edici Proteinler.....                    | 9    |
| 2.4.1.5.1. Stafilokokal Kompleman İnhibitör Protein.....               | 9    |
| 2.4.1.5.2. Stafilokokal Kemotaksis İnhibitör Protein.....              | 9    |
| 2.5. Epidemiyolojisi.....  | 9    |
| 2.6. Tanı.....   | 10   |
| 2.6.1. Stafilokokların Tespitinde Kullanılan Biyokimyasal Testler..... | 10   |
| 2.6.2. Stafilokokların Tespitinde Kullanılan Moleküler Yöntemler.....  | 10   |
| 2.6.2.1. DNA probları ve Hibridizasyon Yöntemleri.....                 | 11   |
| 2.6.2.1.1. İn situ Hibridizasyon Yöntemleri.....                       | 11   |
| 2.6.2.1.2. Katı Faz Hibridizasyon Yöntemleri.....                      | 11   |
| 2.6.2.1.2.1. Slot ve Dot Blot Yöntemleri.....                          | 11   |
| 2.6.2.1.2.2. Southern Blot Yöntemi.....                                | 12   |
| 2.6.2.1.3. Sıvı Faz Hibridizasyon Yöntemleri.....                      | 12   |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.6.2.2. Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemleri.....   | 13        |
| 2.6.2.2.1. DNA Amplifikasyon Yöntemleri.....  | 13        |
| 2.6.2.2.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....   | 13        |
| 2.6.3. Bakteriyofajlar.....   | 15        |
| 2.6.3.1. Bakteriyofajların Yapısı.....  | 16        |
| 2.6.3.2. Bakteriyofajlarda Enfeksiyon Tipleri.....  | 16        |
| 2.6.3.2.1. Litik Enfeksiyon.....  | 16        |
| 2.6.3.2.2. Lizojenik Enfeksiyon.....  | 17        |
| 2.6.3.2.2.1. Transdüksiyon.....   | 18        |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>   | <b>19</b> |
| 3.1. Materyal.....  | 19        |
| 3.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> Suşları.....  | 19        |
| 3.2. Yöntem.....  | 19        |
| 3.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> Suşlarının Üretilmesi.....                                  | 19        |
| 3.2.2. Lizojenik Fajların Eldesi.....   | 19        |
| 3.2.3. Lizojenik Fajlardan DNA Ekstraksiyonu.....   | 20        |
| 3.2.4. Lizojenik Faj DNA'larının Konsantre Edilmesi ve Temizlenmesi.....                        | 20        |
| 3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....   | 21        |
| 3.2.5.1. Örneklerin Hazırlanması.....   | 21        |
| 3.2.5.2. Primerlerin Seçimi.....  | 21        |
| 3.2.5.3. DNA Amplifikasyonu.....  | 21        |
| 3.2.5.4. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi.....  | 22        |
| 3.2.6. Southern Blot Yöntemi.....   | 22        |
| 3.2.6.1. Prob İşaretleme İşlemi.....  | 22        |
| 3.2.6.2. DNA Transferi.....   | 23        |
| 3.2.6.3. Naylon Membranı Bloklama ve Yıkama İşlemleri.....                                      | 23        |
| 3.2.6.4. Naylon Membranın Kemilüminiscent Solüsyonlarla İşlemi ve Sonucunun Görüntülenmesi..... | 24        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>  | <b>25</b> |
| 4.1. Lizojenik Faj Genomik DNA'sının PZR Yöntemi ile Test Edilmesi.....                         | 25        |
| 4.2. Lizojenik Faj Genomlarının Southern Blot Yöntemi ile Test Edilmesi.....                    | 31        |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>6. KAYNAKLAR.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>EK.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>  | <b>52</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### **Sekil No:**

### **Sayfa No:**

|  |    |
|--|----|
| Şekil 2.1. PZR döngüsü.....  | 14 |
| Şekil 2.2. Bir bakteriyofajın elektron mikroskobu ile görüntüsü.....                     | 16 |
| Şekil 2.3. Bakteriyofajlarda litik ve lizojenik enfeksiyon.....                          | 17 |
| Şekil 4.1. Lizojenik fajlarda CHIPS primeri ile PZR ürünü.....                           | 26 |
| Şekil 4.2. Lizojenik fajlarda SCIN primeri ile PZR ürünü.....                            | 27 |
| Şekil 4.3. Lizojenik fajlarda SEI primeri ile PZR ürünü.....                             | 28 |
| Şekil 4.4. Lizojenik fajlarda SEK primeri ile PZR ürünü.....                             | 29 |
| Şekil 4.5. Lizojenik fajlarda CHIPS geninin Southern Blot yöntemi ile araştırılması..... | 31 |
| Şekil 4.6. Lizojenik fajlarda SCIN geninin Southern Blot yöntemi ile araştırılması.....  | 32 |
| Şekil 4.7. Lizojenik fajlarda SEI geninin Southern Blot yöntemi ile araştırılması.....   | 33 |
| Şekil 4.8. Lizojenik fajlarda SEK geninin Southern Blot yöntemi ile araştırılması.....   | 34 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

**Çizelge No:**

**Sayfa No:**

|   |    |
|---|----|
| Çizelge 2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ' da lizojenik fajlar tarafından kodlanan virulans faktörler..... | 18 |
| Çizelge 3.1. PZR'da kullanılan primerler.....   | 21 |



## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                     |  |
|---------------------|--|
| °C                  | : Santigrat derece                           |
| bç                  | : Baz çifti                                  |
| BHB                 | : Brain Heart Broth                          |
| cAMP                | : Cyclic adenosine monophosphate             |
| CHIPS               | : Stafilokokal Kemotaksis İnhibitör Proteini |
| dd H <sub>2</sub> O | : Deiyonize distile su                       |
| DNA                 | : Deoksiribonükleik Asit                     |
| DNase               | : Deoksiribonükleaz                          |
| dNTP                | : Deoksiribonükleozid trifosfat              |
| dsDNA               | : Çift sarmallı Deoksiribonükleik Asit       |
| Dsg1                | : Desmoglein 1                               |
| dsRNA               | : Çift sarmallı Rübönükleik Asit             |
| EDTA                | : Etilendiamintetraasetik asit               |
| ET                  | : Eksfoliatin Toksin                         |
| ETA                 | : Eksfoliatin Toksin A                       |
| ETB                 | : Eksfoliatin Toksin B                       |
| gr                  | : Gram                                       |
| Gr (+)              | : Gram pozitif                               |
| IL-1                | : Interleukin-1                              |
| IL-2                | : Interleukin-2                              |
| kDa                 | : Kilo Dalton                                |
| MHA                 | : Mueller Hinton Agar                        |
| mg                  | : Miligram                                   |
| MgCl <sub>2</sub>   | : Magenzyum klorür                           |
| µl                  | : Mikrolitre                                 |
| ml                  | : Mililitre                                  |
| µm                  | : Mikrometre                                 |
| NaCl                | : Sodyum klorür                              |
| Orf                 | : Açık okuma bölgesi                         |
| Nuc                 | : Deoksiribonükleaz enzimini kodlayan gen    |
| PBP                 | : Penisilin bağlayan gen                     |
| PEG                 | : Polietilenglikol                           |

|       |  |
|-------|--|
| pmol  | : Pikomol                                    |
| PVL   | : Panton-Valentin Lökosidi                   |
| PZR   | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu                |
| RE    | : Restriksiyon enzimleri                     |
| RNA   | : Ribonükleik asit                           |
| rpm   | : round per minute                           |
| SCIN  | : Stafilokoksik Kompleman İnhibitör Proteini |
| SDS   | : Sodyum Dodesil Sülfat                      |
| SE    | : Stafilokokal Enterotoksin                  |
| SEI   | : Stafilokokal Enterotoksin A                |
| SEK   | : Stafilokokal Enterotoksin K                |
| ssDNA | : Tek sarmallı Deoksiribonükleik Asit        |
| ssRNA | : Tek sarmallı Ribonükleik Asit              |
| SSSS  | : Stafilokoksik Haşlanmış Deri Sendromu      |
| Taq   | : <i>Thermus aquaticus</i>                   |
| TBE   | : Tris-Borik asit-EDTA                       |
| TE    | : Tris-EDTA                                  |
| TRİS  | : Tris amino metan                           |
| TSST  | : Toksik Şok Sendromu Toksini                |
| UV    | : Ultraviolet                                |

## 1. GİRİŞ

Türkiye’de ve tüm dünyada stafilokoklar en yaygın hastane enfeksiyon etkenlerindedir. *Staphylococcus aureus* çok yönlü, insan ve hayvan sağlığında önemli Gr (+) bir patojendir (McCarthy 2010). Sağlıklı insanların %20’sinde burunda kolonize olduğu tespit edilmiştir.

*Staphylococcus aureus* birçok virulans faktörü taşıdığı için çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Yumuşak doku enfeksiyonlarının %70’e yakınından sorumludur (Meislin ve ark 1977). Kemik ve eklem enfeksiyonlarında da çok sık rastlanır (Livermore ve ark 2000). Hastane dışında gelişen tüm bakteriyel pnömonilerin % 5’inden sorumludurlar. Hastane kaynaklı pnömoni enfeksiyonlarda ise bu oran % 19 olarak tespit edilmiştir.

Günümüzde bilinçsizce kullanılan antibiyotikler sebebi ile birçok bakteri, tedavilere karşı direnç mekanizması geliştirmiştir. *Staphylococcus aureus* suşları da antibiyotiklere karşı kazandığı direnç mekanizmaları yüzünden hastane enfeksiyonlarında büyük sorunlar yaratmaktadır (Ishiyama ve ark. 1991). Bu yüzden patojen etkenli bakterilerin kaynağının tespiti ve ortadan kaldırılmasının önemi büyüktür.

Bakteri enfeksiyonlarında; yüzey proteinleri, kapsüler polisakkaritler, sitotoksinler, süperantijenler ve enzimler gibi virulans faktörlerinin rolü vardır. İmmün sistemi modüle edici çeşitli proteinler sentezlenir (McCarthy 2010). Bu faktörlerin tespiti ve kaynaklarını belirlemek, bakteri enfeksiyonları ile mücadelede atılacak önemli bir adımdır.

*Staphylococcus aureus*’un virulans faktörleri; plazmidler, bakteriyofajlar, patojenite adacıkları, transpozanlar, insersiyon sekansları ve kromozomal kaset tarafından kodlanır. Bunlardan özellikle bakteriyofajlar ve patojenite adacıkları önemli bir kısmını kapsar (Novick 2003). Bakteriyofajlardan lizojenik fajlar, bulunduğu bakterinin DNA’sı ile entegre olurlar ve bakteriye çeşitli virulans özellikleri kazandırır. Bu özellikler günümüzde çeşitli yöntemler ile tespit edilebilmektedir. Bu çalışmada, *S. aureus*’un virulans faktörlerinden süperantijenler ve immün sistemi modüle edici protein ailesinden seçilen SEK (Stafilokokal Enterotoksin K), SEI (Stafilokokal Enterotoksin I) enterotoksinleri ve SCIN (Stafilokokal Kompleman İnhibitör Protein), CHIPS (Stafilokokal Kemotaksis İnhibitör Protein) inhibitör proteinlerinin PZR ve Southern Blot hibridizasyon yöntemleri ile bakteriyofajlarda araştırılması ve hangi yöntemin daha etkin

olduğunun tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu virulans faktörlerinin bakteriyofajlarda taşınma oranı, fajın bakteriyel patojenitesindeki rolünü araştırmada önemlidir.

## 2. KURAMSAL YÖNTEMLER

*Micrococcaceae* ailesinin üyesi olan stafilokoklar, deri ve mukozada kolonize olabilen, değişik türleri olan, hastalık yapıcı Gram pozitif bir bakteri cinsidir. *Staphylococcus aureus*, çeşitli doku ve organlarda ağır enfeksiyonlara sebep olan en önemli türüdür.

### 2.1. Tarihçe

Stafilokokları ilk kez Robert Koch, 1878'de ışık mikroskobu ile tanımlamıştır. 1880'de Pasteur, sıvı besiyerinde üretmiş ve 1881'de Alexander Ogston fare ve kobaylar için patojen olduğunu göstermiştir. Bu organizmalara; üremeleri sırasında birbirlerinden ayrılmayıp, üzüm salkımı şeklini aldıkları için ''*Staphylococcus*'' adını vermiştir (Staphyle; üzüm salkımı). 1884'de ilk kez insandan izole eden bilim adamı ise; Rosenbach olmuştur. Von Daranyi, 1925 yılında *Staphylococcus aureus*'un koagüle edici özelliğini tespit etmiş ve bu testin *S. aureus*'un identifikasyonunda önemli olduğunu göstermiştir. Alexander Fleming'in 1928'de penisilini bulması ve 1940'da Florey ve Chain tarafından penisilin üretiminin başlaması ile stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. *S. aureus* suşlarında penisilin direnci 1944'de Kirby tarafından tanımlanmıştır.

### 2.2. Morfoloji

*Staphylococcus aureus*; 0,5-1,5 µm çapında, Gram pozitif, yuvarlak, hareketsiz, sporsuz, fakültatif mikroorganizmalardır ( Bannerman 2003).

### 2.3. Üreme ve Kültür Özellikleri

Kanlı agar, nutrient agar, triptik soy agar veya beyin kalp infüzyon agar gibi besiyerlerinden izole edilen stafilokok türlerinin çoğunluğu 30-37<sup>0</sup>C'de 18-24 saat içinde 1-3 mm çapında koloni oluştururlar. *Staphylococcus aureus* 18-24 saatte pigmente (krem rengi, sarı-portakal rengi), S tipi, yuvarlak, hafif kabarık ve çoğunluğu kanlı agarda beta hemoliz oluşturur. Ancak kanlı besiyerinde küçük, pigmentsiz, hemoliz oluşturmeyan varyantları da tanımlanmıştır.

## **2.4. Genom Yapısı**

Genomu yaklaşık 2000-3000 kbp bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşur. Stafilocokların DNA'larındaki G+C oranı %30-39 mol'dür. *Staphylococcus aureus* genomu ise, 2500'e yakın geni kodladığı düşünülen 2800 kbp uzunluğunda tek bir kromozomdan oluşur.

### **2.4.1. Virulans Faktörleri ve Patojeniteleri**

Bakterilerin hastalık yapıcı özelliklerine patojenite faktörü veya virulans faktörü denir. *Staphylococcus aureus*'da enfeksiyon etkenleri; bakterinin yüzey proteinleri, kapsüller polisakkarit, sitotoksinler, süperantijenler ve enzimler gibi bir çok virulans faktörü belirlenmiştir ( Bohach ve Foster 2000, Novick 2000, van Wamel ve ark. 2006). Ayrıca immün sistemi modüle eden proteinler de sentezlenir.

Virulans faktörleri plazmidler, bakteriyofajlar, patojenite adacıkları, transpozanlar, insersiyon sekansları ve kromozomal kaset tarafından kodlanır (Baba ve ark. 2002). Özellikle bakteriyofajların birçok virulans faktörlerini kodladığı bilinmektedir ( Novick 2003).

#### **2.4.1.1. Kapsül**

*S. aureus*'un özellikle mukoid türlerinde polisakkarid yapıda bir mikrokapsül bulunmaktadır. Bu yapı bakteriyi fagositozdan korur ( Tünger 2004).

#### **2.4.1.2. Hücre Duvarı**

##### **2.4.1.2.1. Peptidoglikan Yapı**

Stafilocoklarda kuru ağırlığın yaklaşık %50-60 'ını oluşturur. Bu yapı çapraz bağlar ile bağlanmış ve bakterinin lizozim enzimlerine karşı korunmasını sağlar.

#### 2.4.1.2.2. Teikoik Asit

Sadece Gram pozitif bakterilerinin hücre duvarında bulunur ve hücre yüzeyine negatif yük vererek, çeşitli metal iyonlarının, katyonlarının lokalizasyonunda ve otolitik enzimlerinin aktivasyonunda rol alır.

#### 2.4.1.2.3. Yüzey Proteinleri

Protein A, fibronektin bağlayan proteinler, kümeleşme faktörü (clumping faktörü); kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşim yerleri bakımından birbirine benzeyen stafilokokal proteinlerdir. Bu proteinler, bakterinin konak hücreye lokalize olmasına yardımcıdır. Protein A, bakteriyi fagositoza karşı korumada, kompleman aktivasyonunda, opsanizasyon inhibisyonunda rol oynar (Forsgren ve Gnetie 1983).

#### 2.4.1.3. Toksinler

##### 2.4.1.3.1. Sitolitik Toksinler

Stafilokoklar, konak hücre morfolojisini ve fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstrasellüler toksin üretirler. Bu toksinler sayesinde stafilokoklar yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde üremelerini sürdürebilirler.

##### 2.4.1.3.1.1. Hemolizinler

Çeşitli hayvan eritrositleri üzerinde hemolitik etki yapıp yapmamalarına, hemoliz için gerekli ısı derecesi ve zamana, toksisite derecelerine göre farklılıklar gösterir.

1. **Alfa-Hemolizin;** En güçlü membran hasar proteini olup, 33 kDa ağırlığındadır. Ökaryotik hücreleri eritebilme yeteneğindedir (Gouaux ve ark. 1994). İnsan makrofaj ve trombosit hücreleri üzerinde litik etkiye sahiptir. Kromozomda **hla** geni tarafından kodlanır (Gray ve Kehoe 1984).
2. **Beta-Hemolizin;** Beta-Hemolizin, 35 kDa ağırlığındadır. Eritrositleri lizise uğratar. Kromozomda **h1b** geni tarafından kodlanır (Projan 1989).

3. **Gama-Hemolizin;** Eritrositlere ve lökositlere stolitik etki yapar (Fackrell ve ark. 1976). Kromozomlardaki **hlgA** ve **hlgB** genleri tarafından kodlanır (Cooney 1988).
4. **Delta-Hemolizin;** Hücre membran bütünlüğünü bozar ve adenilat siklazı aktive ederek cAMP salınımına neden olur. Özellikle eritrositler üzerinde etkilidir. Kromozomda **hld** geni tarafından kodlanır (Peng ve ark. 1988).

#### 2.4.1.3.1.2. Panton-Valentin Lökosidi (PVL)

Bir ekzotoksindir. Birbirlerini sinerjik olarak etkileyen F (fast) ve S (slow) adında iki protein komponentinden oluşur. Her birinden ayrı toksoid oluşturulur. Toksin aktivitesi için bu iki alt birim de gereklidir. Toksin, hücre zarında potasyum ve diğer katyonlara karşı geçirgenliği artırıcı gözeneklerin açılmasını sağlayarak etkili olur. PVL, lizojenik fajlar tarafından kodlanır (Kaneko ve ark. 1998).

#### 2.4.1.3.2. Stafilokokal Enterotoksinler ( SE)

Isıya dirençli, polipeptid yapıda toksinlerdir. Özellikle besin zehirlenmesine neden olurlar. Ayrıca toksik şok benzeri sendrom, alerjik reaksiyonlarına ve otoimmün hastalıklara neden olurlar. SEA, SEB, SEC, SED, SEE gibi klasik tiplerinin yanı sıra son yıllarda tespit edilen SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU gibi tipleri de mevcuttur. *S.aureus* suşlarının %35-50'sinin bu toksinleri oluşturabildiği saptanmıştır (Moreillon 2005).

Stafilokokal enterotoksinlerinin oluşturulmasında, bakteri hücresinin bulunduğu gelişme fazı önemlidir. SEA, hücrenin logaritmik fazında, SEB, SEC, SED ise geç logaritmik faz ya da erken duraklama fazında oluşturulur (Bergdoll 1989). *S. aureus*'un virulans faktörlerinin düzenlenmesinde **agr** geninin rolü büyüktür. SE'ler, makrofaj ve yardımcı T hücrelerinden sırası ile IL-1 VE IL-2 salınımını uyararak sindirim kanalında bir süper antijen olarak davranırlar. Bakteriyel kromozom, plazmidler ve bakteriyofajlar tarafından kodlanırlar (Ren ve ark. 1994).



#### **2.4.1.3.3. Eksfoliyatif Toksin (Eksfoliyatin-ET)**

Epidermolitik bir toksindir. Serolojik olarak iki tipi mevcuttur. ETA; ısıya duyarlı ve plazmid orjinli, ETB; ısıya dirençli ve yapısal geni kromozomaldır (Yamaguchi ve ark. 2000, Lee ve ark. 1987). Her ikisi de yapısal olarak farklılık gösterir ancak benzer aktivite gösterirler. Stafilocoksik haşlanmış deri sendromundan (SSSS) sorumludurlar. ET, serin proteaz aktivitesine sahiptir ve desmoglein 1'i (Dsg1) parçalayarak eksfoliasyon etki gösterir. Dsg1 üst epidermisdeki hücre-hücre adezyon molekülüdür.

#### **2.4.1.3.4. Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST)**

Bir yardımcı T-hücresini etkinleştiren klasik antijenin aksine, TSST antijeni çok sayıda yardımcı T-hücresini etkinleştirir (Choi 1989). Bol miktarda monokininler ve lenfokinler salgılanır (Murray ve ark. 1996). TSST, kromozomdaki stafilocoksik patojenik adacıklar tarafından kodlanır (Blomster-Hautamaa ve ark. 1986).

#### **2.4.1.4. Enzimler**

##### **2.4.1.4.1. Katalaz**

Tüm stafilokoklar (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus* subsp. *anaerobius* hariç) tarafından üretilen toksik hidrojen peroksidi, toksik olmayan oksijen ve hidrojene ayırıştırıcı enzimdir. Bakteriler bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanırlar (Alden 2006).

##### **2.4.1.4.2. Koagülaz**

Stafilokoklar tarafından üretilen bir plazma pıhtılaşma proteindir. Koagülaz pozitif bakteriler üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositlerden koruyarak patojenitesini arttırdığı düşünülmektedir (Tunger 2004). Koagülaz enzimi, kromozomun *coa* geni tarafından kodlanır (Phonimdaeng 1990).

#### **2.4.1.4.3. Lipaz**

Lipitleri hidrolize ederek, bakterinin deri ve deri altı dokulara girmesini ve yayılmasını sağlar (Alen 2006). Lipaz enzimi, kromozomun **geh** geni tarafından kodlanır (Götz ve ark. 1985). *S. aureus* suşlarının tümünde salgılanır.

#### **2.4.1.4.4. Hiyalüronidaz**

Konak hücrenin bağ dokusunda bulunan hiyalüronik asidi parçalayarak mikroorganizmanın kolayca yayılmasını sağlar. Antijenik özelliğe sahip bir enzimdir. Kromozomda **hysA** geni tarafından kodlanır (Farell ve ark. 1995).

#### **2.4.1.4.5. Stafilokinaz**

Stafilokinaz, plazminojene bağlanarak aktif plazmin oluşmasına yol açar. Plazmin, proteolitik enzim özelliğine sahip olduğu için bakteriyel enfeksiyonun dokulara yayılmasına neden olur (Christner ve ark. 1996). Stafilokinazlar insan nötrofil peptitlerine bağlanarak bakteriyi fagositoza karşı korur. Lizojenik fajlar tarafından kodlanırlar (Novick 2000).

#### **2.4.1.4.6. Fosfatidilinozitol- Spesifik Fosfolipaz C**

Özellikle erişkin tip solunum zorluğu sendromu ve dissemine intravasküler koagülasyon bulunan hastalardan izole edilen suşlarda saptanan bir enzimdir. Bu suşlar antimikrobiyal ajanlara özellikle de penisiline karşı dirençlidir (Alen 2006).

#### **2.4.1.4.7. Deoksiribonükleaz**

Endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'- fosfomononükleotidlere parçalayan enzimdir. *S. aureus* suşlarının %90'dan fazlasında bulunur. Isıya dirençlidir (Alen 2006). Bakteriyel kromozomun **nuc** geni tarafından kodlanır (Shortle 1983).

#### **2.4.1.4.8. Beta-laktamaz**

Stafilokoklar salgıladıkları beta-laktamaz enzimi ile penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisizleştirir. Genetik taşınma genelde plazmid ve transpozanlarla olur (Bannerman 2003).

#### **2.4.1.5. İmmün Sistemi Modüle Edici Proteinler**

##### **2.4.1.5.1. Stafilokokal Kompleman İnhibitör Protein (SCIN)**

Stafilokokal kompleman inhibitör proteini, C3 konvertazı inhibe ederek bakteri yüzeyinde C3b oluşumunu engeller. Böylece bakteri, nötrofillerin fagositozundan korunur (Rooijackers ve ark. 2005b). SCIN proteini, 9,8 kDa ağırlığındadır ve insana özgü üç tane homolog proteini vardır; SCIN-B, SCIN-C ve SCIN-D. Bunlardan B ve C formları inhibisyonunda rol oynarken D formunun inhibe edici rolü henüz tespit edilememiştir (Rooijackers ve ark. 2010). SCIN, lizojenik bakteriyofajlar tarafından kodlanır (van Wamel ve ark. 2006). Klinik örneklerin %90'ında bulunur. İnsan immün sistemine karşı önemli bir proteindir.

##### **2.4.1.5.2. Stafilokokal Kemotaksis İnhibitör Protein (CHIPS)**

Stafilokokal kemotaksis inhibitör proteini, nötrofillerin iyileştirilmesini sağlayan özellikle C5a reseptörlerini inhibe ederek bakteriyi insan immün sistemine karşı korur (Rooijackers ve ark. 2005). CHIPS, 14 kDa ağırlığında ve klinik örneklerin %60'ında tespit edilmiştir (De Hass 2004). Lizojenik bakteriyofajlar tarafından kodlanır (van Wamel ve ark. 2006).

#### **2.5. Epidemiyolojisi**

*Staphylococcus aureus*'lar doğumdan itibaren göbük, perine ve deriye kolonize olurlar. Çocukluk döneminde genelde nazofarenkslere yerleşirken, yetişkinlerde daha çok burunda tespit edilir. Erişkinlerde burun taşıyıcılığı oranının %20-40 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Doğurgan yaştaki kadınlarda ise; vajinaya yerleştiği de tespit edilmiştir (Dundar 2008, Klytmas 1997). Bazı gruplar *Staphylococcus aureus* ile kolonize olmaya

eğilimlidir. Örneğin doktorlar %50 ve hemşireler %70 oranı ile %33 orana sahip olan genel populusyona göre daha fazla risk altındadırlar.

## **2.6. Tanı**

Stafilokokların laboratuvar tanısında koloni morfolojisi, boyanma, pigment üretimi, hemoliz, mannitol fermantasyonu, yüksek tuz konsantrasyonunda üreme gibi özelliklerinde yararlanılır. En tipik üredikleri besiyeri; kanlı agardır. Kolonileri yuvarlak, düzgün, kabarık S tipinde, çoğunda sarı pigment ve  $\beta$  hemoliz görülür. 37<sup>0</sup>C’de ve ph 7,4’de iyi ürerler. Aerob ve fakültatif aeropturlar.

### **2.6.1. Stafilokokların Tespitinde Kullanılan Biyokimyasal Testler**

- 1) Katalaz Testi
- 2) Koagülaz Testi
- 3) Novobiosine Dirençlilik Testi
- 4) Mannitol Hidroliz Testi
- 5) Mannoz Hidroliz Testi
- 6) Maltoz Hidroliz Testi
- 7) Sükroz Testi
- 8) Pigment Testi
- 9) Termonükleaz Testi

### **2.6.2. Stafilokokların Tespitinde Kullanılan Moleküler Yöntemler**

Stafilokokların moleküler epidemiyolojileri, DNA temelli yöntemlerin de kullanılarak, etkenin biyokimyasal ve moleküler seviyede de tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Enfeksiyon hastalıklarının tanısı ve patogenezen sorumlu genlerin saptanması, moleküler epidemiyoloji çalışmalarına büyük ölçüde kolaylık sağlamıştır (Tompkins 1998).

Moleküler tekniklerin esas avantajlarından birisi de hastalığın fenotipini değerlendirmeksizin doku analizine ve tanıya ulaşmayı sağlar. Çünkü DNA ve RNA üzerindeki anormallikleri tespit ettiği için hassas ve özeldir (Ergin 2004).

Bakterilerin tanımlanmasında birçok moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bazıları şunlardır;

### **2.6.2.1. DNA Probları ve Hibridizasyon Yöntemleri**

Prob spesifik DNA baz çiftlerine bağlanan ve tipik olarak 6-18 baz çifti uzunlukta olan küçük bir DNA parçasıdır. Problar, radyoaktif izotop veya bir boya ile etiketlenerek direkt olarak spesifik baz dizilerinin tespitinde kullanılmaktadır (Ozerol 1997).

DNA problemleri; insitu hibridizasyon, katı faz ve sıvı faz olarak üç kategoride kullanılırlar.

#### **2.6.2.1.1. İn situ Hibridizasyon Yöntemleri**

Genellikle parafine gömülü formalinle fikse edilmiş doku kesitleri kullanılır. Bu yöntemde proba reaksiyona girebilmesi için doku kesitlerindeki hedef DNA, denatüre edilmeli ancak hücre yapıları korunmalıdır. Hassasiyeti düşük bir yöntemdir.

#### **2.6.2.1.2. Katı Faz Hibridizasyon Yöntemleri**

Başlıca kullanılan katı faz hibridizasyon yöntemleri; Slot Blot, Dot Blot, Southern Blot, Northern Blot olarak sınıflandırılır.

##### **2.6.2.1.2.1. Slot ve Dot Blot Yöntemleri**

Slot ve Dot Blot yöntemleri, sadece araştırma amaçlı bazı laboratuvarlarda kullanılır. Bu yöntemlerde önce sağlam hücre parçalanır, DNA denatüre edilir, dot veya slot formunda vakum altında naylon membrandan geçirilerek tespit edilir. Bu membran DNA'yı gösteren prob kapsayan hibridizasyon solusyonuna daldırılır. Bağlanmayan problemler yıkanır ve bağlanan problemler tespit edilir. Bu iki yöntemin avantajları; multipl örneklerin bir defada çalışılarak bir tek filtrede tanınabilmesidir.

#### **2.6.2.1.2.2. Southern Blot Yöntemi**

Southern Blot yöntemi, ilk olarak Southern tarafından 1975 yılında kullanılmaya başlanmış ve ilk yıllar jel transferi olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki yıllarda da RNA'nın tespitinde kullanılan Northern Blot yöntemi geliştirilmiştir.

Southern veya Northern Blot yöntemleri, raportör problara bağlanan DNA fragmanlarının çapının tespit edilmesini sağlayan katı faz hibridizasyon yöntemleridir. Northern Blot, Southern Blot yönteminin bir varyasyonu olup, DNA yerine RNA'yı tespit etmektedir. Bu yöntemler için DNA ve RNA'yı saflaştırmak gerekir (Ozerol 1997).

Southern Blot yöntemi için öncelikle, çalışılacak DNA'nın izolasyonu ve restriksiyon enzimleri (RE) tarafından kesimi gerçekleştirilmelidir. Bu işlemi takiben, oluşan DNA parçaları, elektriksel ortamda agaroz jel üzerinde uzunluklarına göre göç ettirilirlir. Daha sonra jeldeki DNA'lar nitroselüloz membran gibi bir destek membrana aktarılmakta ve en son olarak özgül DNA dizilimlerinin yeri işaretli DNA probları kullanılarak belirlenmektedir.

#### **2.6.2.1.3. Sıvı Faz Hibridizasyon Yöntemleri**

Nükleik asit ve probların, sıvı ortamda hibridizasyonu sağlanır. Sıvı fazda hibridizasyon hızı artmaktadır. Kullanılan prob tek zincirli DNA'dır (ssDNA). Solusyonda oluşan hibritlerin miktarı, ssDNA'nın S1 nükleaz ile sindirilmesi ve arta kalan çift zincirli raportör prob hibridlerin triklorasetik asitle presipitasyondan veya direkt olarak çift zincirli hibritlerin hidroksiapatid kolonlarına spesifik olarak bağlanmasından sonra belirlenir.

Prob temelli yöntemlerin avantajları; kültürü veya tanımlanması zor olan mikroorganizmaların genomlarını tespit edebilmesi ve tanımlayabilmesidir. Bunun yanı sıra bazı dezavantajları da vardır; bir defada test edilen mikroorganizma sayısının az olması, test süresinin uzun olması ve nadir patojenler ile çalışılmasıdır.

## 2.6.2.2. Nükleik asit Amplifikasyon Yöntemleri

### 2.6.2.2.1. DNA Amplifikasyon Yöntemleri

#### 2.6.2.2.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

1985 yılında, Mullis ve ark. tarafından ortaya atılmış ve avantajları nedeniyle moleküler biyoloji, tıp, arkeoloji gibi değişik alanlarda kullanılabilen bir yöntem olmuştur.

Özellikle fenotipik tanı yöntemlerinde karşılaşılan zorluklara karşı polimeraz zincir reaksiyonu çok sık kullanılan bir yöntemdir. Nükleik asit hibridizasyonu, nükleik asitlerin son derece özgün olmaları ve son derece stabil moleküller oluşturabilmeleri gibi avantajlara sahiptir (Walker 1989, Wolcott 1992). Çok az miktardaki materyalden bile 24 saat gibi kısa sürede güvenilir sonuçlar almayı sağlamıştır.

PZR bakteri, virus, mantar, parazit, protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq) kullanarak in vitro olarak çoğaltılmasını sağlar (Saiki ve ark. 1988, Schochetman 1988).

PZR'ın temel bileşenleri; kalıp DNA, primerler, polimeraz enzimi, Deoksinükleotid-Trifosfat ve tampon solüsyonlar şeklinde açıklanabilir.

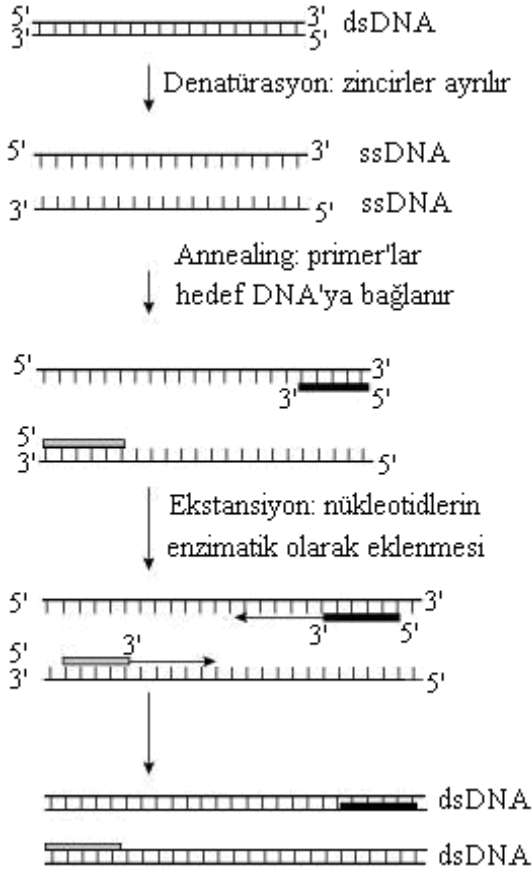
PZR, 3 temel aşamada gerçekleşir;

- 1) **Ayrışma (Denatürasyon)** : Çoğaltılması istenen çift sarmal DNA'nın, hidrojen bağlarının ayrılması sağlanır. Ortamda tampon, dNTPs, hedef DNA'ya spesifik olan primerler ve ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimi bulunur. Bu aşamada ısı, 91-94 °C olup 1-2 dakika sürer.
- 2) **Bağlanma (Annealing)** : Birinci aşama sonucu tek iplikçikli hale dönüşen DNA sekanslarının her birinin 3'- uçlarındaki nükleotidlere uygun sıcaklıkta primerlerin bağlanması gerçekleşir. Deney ortamının ısısı 40-60 °C olup, reaksiyon 3-4 dakika sürer.

**3) Uzama (Extension) :** Bağlanma aşamasından sonra, primer hibritleştiği DNA'nın karşılığını sentezler. Bu sentez için, *Thermus aqueaticus* bakterisinden elde edilen Taq polimeraz enzimi, nükleotidleri orijinal DNA ipliğine komplementer olacak biçimde primere ekler ve uzatır. Bu aşamada ortam ısısı 70-72 °C'dir.

Bahsettiğimiz üç aşama bir döngü olarak kabul edilir. 3-5 dakika sürer. Bu olay 20-40 kez tekrarlanır. Bu sürecin sonunda 1 milyon DNA kopyası elde edilir.

PZR'ın uygulanabilmesi için, kesin olarak doğru bir baz dizisi bilgisine ihtiyacımız vardır. Son derece duyarlı olması nedeniyle çok küçük miktarlardaki kontaminasyonlar bile yanlış sonuçlara neden olur.



**Şekil 2.1.** PZR Döngüsü



### 2.6.3. Bakteriyofajlar

Virulans faktörleri plazmidler, bakteriyofajlar, patojenite adacıkları, transpozanlar, insersiyon sekansları ve kromozomal kaset tarafından kodlanır (Baba ve ark. 2002). Özellikle bakteriyofajlar önemli bir kısmını kapsar (Novick 2003). Bakteriyofajlar, faj tiplendirmesinde hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojisini izlemek için kullanılan önemli bir araçtır.

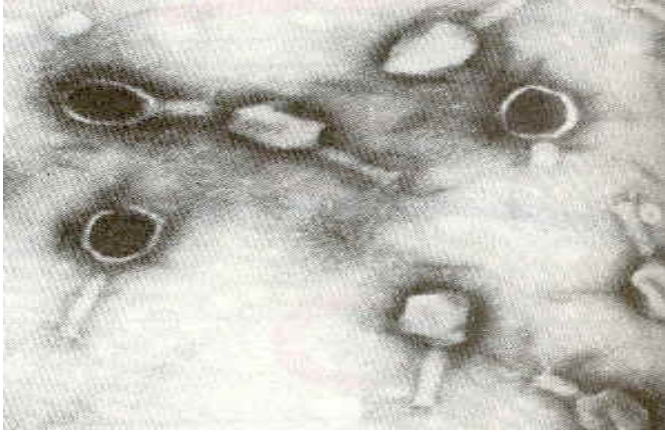
Bakteri virüsleri olarak da bilinen bakteriyofajlar, bakterilerin zorunlu parazitleri olup, yalnızca canlı bakteri hücreleri içinde çoğalabilirler. Bakteri ve Yunanca yeme anlamına gelen 'Phagein' kelimelerinden oluşan bakteri enfekte eden anlamına gelir

Bakteriyofajlarla ilgili ilk gözlemler, 1896 yılında Ernest Hankin tarafından Hindistan'da yapılmıştır. *Vibrio cholerae*'ye karşı antibakteriyel etkili olduğunu gözlemiş ve etkenin filtreden geçebildiğini, kaynatıldıktan sonra harab olduğunu belirtmiş.

Frederik Twort (1915) ve Felix d' Herelle (1917), birbirinden bağımsız olarak, bakteri hücrelerini enfekte eden virüsü tanımlamışlardır. d'Herelle bu etkeni bakteriyofaj olarak adlandırmıştır.

### 2.6.3.1. Bakteriyofajların Yapısı

Çeşitli tipte ve görünümde fajlar bulunmakta olup, kompleks bir fajda; baş, boyun, kuyruk fibrilleri bulunmaktadır.



**Şekil 2.2.** Bir Bakteriyofajın Elektron Mikroskobu İle Görüntüsü

Fajların büyük bir kısmı dsDNA içermektedir. Az kısmı ise; ssDNA, ssRNA veya dsRNA içerir. Baş kısmının ortasında genellikle dsDNA'dan oluşan faj genomu bulunur. Genomun etrafında ise yine viruslerde olduğu gibi kapsit protein kılıfı bulunur. Nükleik asit ve kapsitten oluşan bu yapıya nükleokapsid adı verilir. Fajlarda baş kısmını kuyruk kısmına bağlayan kısa bir boyun yapısı vardır. Bu yapı bakteriyofaj çeşitlerine göre farklılık gösterir (Ackermann 2003, Bilgehan 2005).

### 2.6.3.2. Bakteriyofajlarda Enfeksiyon Tipleri

Fajlar, duyarlı bakterilerde genellikle 2 tip enfeksiyona sebep olurlar.

#### 2.6.3.2.1. Litik Enfeksiyon

Bu tür çoğalmada bakteri hücresi genellikle erir yani lize olur. Litik enfeksiyonlarda bakteri hücrelerinin erimesi ve fajların serbest hale geçmesinde faj genomunda kodlanan spesifik litik enzimlerinin önemli fonksiyonları vardır. Bu enzim sayesinde fajlar belirli sayıya ulaştıktan sonra hücre duvarını eriterek serbest hale gelirler. Her bir litik döngüde 300-400 yeni faj oluşur.

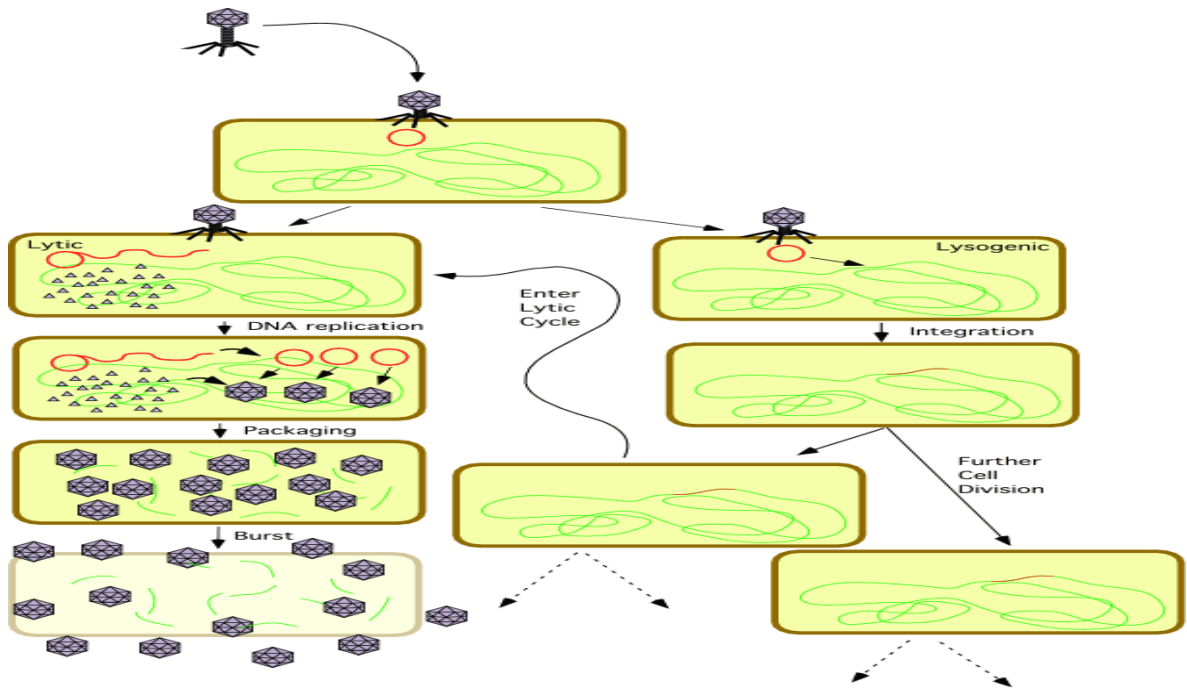
### 2.6.3.2.2. Lizojenik Enfeksiyon

Lizojenik enfeksiyonlarda bakteriler lizis olmaz. Bakteri canlılığını kaybetmez. Bu yüzden bu tür fajlara ılımlı fajlar da denir. Faj bakteri hücresi içine girdikten sonra bakteri DNA'sına entegre olur ve bu şekildeki bakteriye lizojen bakteri denir. Bağlanan faja da profaj denir. Olgun fajlar hücre içinde gelişimini tamamladıktan sonra hücre duvarından dışarı çıkarlar. Lizojenik durum, fajlardaki repressör genler sayesinde kontrol edilir.

Lizojenik fajlar, nokta mutasyon, konjugasyon, transformasyon mekanizmaları ile mikroorganizma patojenitesinde önemli rol oynar. Özellikle lateral gen transferinin patojenik mikroorganizmaların gelişmesinde büyük rolü vardır (Morschhauser ve ark. 2000).

Bakteriyofajlar, lateral gen transferinde önemli araç olarak kabul edilmektedir. Sekans analizlerine göre bakteriyel genomun %20'si faj DNA'sı taşıyabilmektedir (Casjens 2003).

*S. aureus* suşlarında, bakteriyel genomun %17'sinin profaj genomundan oluştuğu gösterilmiştir (Fitzgerald ve ark. 2001).



Şekil 2.3. Bakteriyofajlarda Litik ve Lizojenik Enfeksiyon

### 2.6.3.2.2.1. Transdüksiyon

Bir hücreden diğer hücreye faj vektör aracılığı ile oluşan, hücre-hücre ilişkisi gerektirmeyen gen aktarımıdır. Viral DNA, konak hücre kromozomu ile birleşmektedir. Viral nükleik asid bu birleşik hali ile fonksiyon görmeye devam etmektedir. Bu enfeksiyonlardan en önemlilerinden biri çeşitli ekzotoksinlerin bakteri içerisinde sentezlenmesidir. Birleşen viral DNA, hücre DNA'sı ile birlikte çoğalacağı için, yavru hücreler de yeni özelliği kazanacaktır.

Fajlar transdüksiyon ile gen aktarımı sonucunda, bakteriye çeşitli virulans özellikler kazandırır. Fajlar, ekzotoksin gibi önemli virulans faktörlerin kodlamakla beraber, bakteriyel adezyon, kolonizasyon ve invazyonu etkilemekte; immün modülatör moleküllerini taşıyarak bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençlerini artırmaktadır (Wagner ve ark. 2002).

| Faj tarafından kodlanan virulans faktörler | Referans               |
|--|------------------------|
| SAK  | Novick ve ark. 2000    |
| SEA  | Betley ve ark. 1985    |
| SEP  | Kuroda ve ark. 2001    |
| SEG  | Baba ve ark. 2002      |
| SEK  | Baba ve ark. 2002      |
| SEI  | Omeoe ve ark. 2001     |
| PVL  | Kaneko ve ark. 1998    |
| SCIN                                       | van Wamel ve ark. 2006 |
| CHIPS                                      | van Wamel ve ark. 2006 |

**Çizelge 2.1.** *S. aureus*'ta Lizojenik Fajlar Tarafından Kodlanan Virulans Faktörler

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. *Staphylococcus aureus* Suşları**

*Staphylococcus aureus* suşlarından 36 adet örnek İstanbul'daki bir hastaneden, 9 adet örnek de aynı hastanenin polikliniklerinin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarından toplanmıştır. Örnekler; trakeal aspirat, apse, kan, periton sıvısı, balgam, idrar, üretral akıntı, BOS, eklem sıvısı kültürlerinden izole edilmiştir. Bu kültürlerin hepsi biyokimyasal özelliklerine göre *S.aureus* olarak saptanmıştır (Bannerman 2003).

#### **3.2. Yöntem**

##### **3.2.1. *Staphylococcus aureus* Suşlarının Üretilmesi**

Mikroorganizmalar, -20°C'de mikrobank tüpleri içerisinde saklanmaktadır. Her bir örnek için 3ml BHB sıvı besiyeri içeren tüplere 1'er boncuk alınarak ekim yapıldı ve 37°C'lik etüvde inkübe edildi. 24 saat sonra her örnekten kanlı besiyerine öze yardımı ile tek koloni düşecek şekilde tekrar ekim yapıldı. 37°C etüvde 18-20 saat inkübe edildi.

##### **3.2.2. Lizojenik Fajların Eldesi**

Kaneko yöntemi bazı değişiklikler yapılarak, bu çalışmamızda lizojenik fajların eldesinde kullanıldı.

1. Kanlı besiyerinde üreyen mikroorganizma kolonilerinden en iyi olanlarından 1 tanesi alındı. Cam balon içerisindeki 50 ml BHB besiyerine ekildi. 3-4 saat 37°C'de çalkalayıcı etüvde bakteriler logaritmik faza ulaşıncaya kadar üretildi.
2. Bakteriler logaritmik üreme fazına geldiğinde 20 µl mitomisin C eklendi.
3. Bakteriler sabaha kadar bu şekilde üremeye bırakıldı.
4. Ertesi sabah indüklenen bakteriler 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 5000 rpm'de 40 dakika çevrildi. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.
5. Süpernatant üzerine 1/10 oranında sulandırılmış DNase I'den 10 µl eklendi.

6. Oda sıcaklığında 1 saat kadar inkübe edildi.
7. Süpernatant 0,2 µm'lik filtrelerden 2 defa filtre edildi.
8. 40 ml süpernatant üzerine 10 ml PEG solusyonu eklendi ve +4<sup>0</sup>'de tekrar sabaha kadar bekletildi.
9. Ertesi gün süpernatant ve PEG karışımı olan tüpleri 5000 rpm'de 1 saat santrifüj edildi.
10. Bu çevirmenin sonunda bakteriyofaj tüpün dibinde pelet olarak çöktü.

### **3.2.3. Lizojenik Fajlardan DNA Ekstraksiyonu**

Proteinaz K DNA ekstrasyon yöntemi kullanıldı.

1. Pelet üzerine 500 µl dd H<sub>2</sub>O konuldu, birkaç defa pipetaj yapılarak ependorflara aktarıldı.
2. Çözülen pelet üzerine 100 µl 1 M TRİS (pH 8,0) ; 100 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) ; 60 µl % 10 SDS ve 4 µl Proteinaz K eklendi. 55<sup>0</sup>C'de ısıtıcı blokta 4-5 saat süre ile inkübe edildi.
3. Sürenin sonunda, üzerine 700 µl fenol/kloroform solüsyonu eklendi. 10000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant yeni ependorf tüpüne aktarıldı.

### **3.2.4. Lizojenik Faj DNA'larının Konsantre Edilmesi ve Temizlenmesi**

GENEMARK DNA Purifikation Kit protokolüne göre DNA temizleme işlemi yapıldı.

1. Elde edilen 400-500 µl DNA üzerine eşit miktarda bağlayıcı solusyon konuldu, iyice vortekslendi.
2. Kolektör tüpün içine spin kolon yerleştirildi.
3. DNA ve bağlayıcı solusyon içeren karışım, spin kolona aktarıldı ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. Kolektör tüp içindeki sıvı atıldı. Üzerine 700 µl yıkama solusyonu konuldu ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolektör tüpteki sıvı atıldı. ( 2 defa tekrar edildi)
5. Boşaltılan kolektör tüp, spin kolon ile birlikte 12000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
6. Spin kolon kolektör tüpten çıkarılarak, ependorf içine konuldu ve üzerine 100 µl elüsyon solusyonu eklendi. 2-3 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra 12000 rpm'de 1 dakika çevrildi.

7. Spin kolon, eependorftan çıkarıldı ve atıldı. Ependorf tüpünde saf DNA kaldı.

### 3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

#### 3.2.5.1. Örneklerin Hazırlanması

Elde edilen lizojenik faj DNA'ları 1/10 oranında sulandırıldı. PZR reaksiyonunda kullanıldı.

#### 3.2.5.2. Primerlerin Seçimi

Bu çalışmada kullanılan primerler <http://www.ebi.ac.uk/clustalw> sekans programı kullanılarak tasarlandı.

| Virülans Faktörü | Primer Sekansı  | PZR ürününün büyüklüğü (bp) |
|------------------|---|-----------------------------|
| SEK              | 5'CTC CTA TAG CTA ATC AAC TAC-3'<br>5'TGT ATT CTT CTT GAA GGT AC-3'   | 315                         |
| SEI              | 5'CTG ATA TCC ATA TTC CTG AC-3'<br>5'TCT ACT TCT CAT CAA TTA GAG-3'   | 335                         |
| SCIN             | 5'AGC ACA AGC TTG CCA ACA TGC-3'<br>5'TTA ATA TTT ACT TTT TAG TGC-3'  | 225                         |
| CHIPS            | 5'TCA GCA AGT GGT GTA TTC AG-3'<br>5'ACA CAC CAT CAT TCA GCG AAA G-3' | 250                         |

**Çizelge 3.1.** PZR'da Kullanılan Primerler

#### 3.2.5.3. DNA Amplifikasyonu

Lizojenik fajların virulans faktörlerini taşıyıp taşımadıklarını araştırmak için, elde edilen faj DNA'larından PZR yapıldı. Bunun için PZR karışımı hazırlandı: 10X PZR tamponu (1 X 10 mM TRİS-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; % 0,1 TRİTON X-100); 2,5 U Tag DNA Polimeraz; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; her bir dNTP'den 200 µM; her bir primerden 25 pmol

kullanarak son hacim 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Örnekler; ısı döngü cihazında (thermalcycler); ilk denatürasyon için 94°C’de 2 dakika, daha sonra 40 siklus (94°C’de 0,45 saniye, 58°C’de 0,45 saniye, 72°C’de 0,45 saniye) olacak şekilde çalıştırıldı. Son olarak, 72°C’de 7 dakika bekletilerek PZR sonlandırıldı. Negatif kontrol olarak steril dd H<sub>2</sub>O kullanıldı.

#### **3.2.5.4. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi**

PZR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla 10 µl PZR ürününün TBE tampon ile hazırlanan %1,5’lik agarozda jel elektroforezi yapıldı. Agaroz jelde yürütülen DNA’lar etidyum bromür ile işaretlendi ve UV translüminatör ile incelendi. PZR ürünlerinin büyüklükleri DNA moleküler belirtecinin bantları ile karşılaştırılarak doğrulandı ve jel görüntüleri dijital fotoğraf makinesi ile görüntülendi ve bilgisayar ortamına aktarıldı.

#### **3.2.6. Southern Blot Yöntemi**

Southern blot yönteminin Doç. Dr. Fikret Şahin tarafından modifiye edilmiş şekli kullanıldı (hibridizasyon işlemi DNA’nın agaroz jelden membrana transfer edilmeden önce yapıldı).

##### **3.2.6.1. Prob İşaretleme İşlemi**

Prob işaretleme işlemi PIERCE protokolüne göre yapıldı.

- |                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| 1. TdT reaksiyon buffer         | 10 µl |
| Biotin-N4-CTR                   | 5 µl  |
| Oligo Primer                    | 5 µl  |
| Sulandırılmış TdT stok solüsyon | 5 µl  |
| ddH <sub>2</sub> O              | 25 µl |
2. Bu hazırlanan prob karışım 37°C’de 35 dakika ısıtıcı blokta bekletildi, sonra +4°C’ye kaldırıldı.



3. Fajlar Hinf I enzimi ile kesildi (toplam volüm 25 µl).

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Bakteriyofaj DNA    | 15 µl |
| dd H <sub>2</sub> O | 5 µl  |
| Buffer              | 3 µl  |
| Hinf I enzim        | 2 µl  |

Hind III, EcoRI, EcoRV, BamHI ve Hinf I enzimleri ile yapılan denemeler sonucunda en iyi kesimin Hinf I enzimi ile tek bant verecek şekilde elde edildiği görüldü.

4. Hinf I enzimi ile kesilen fajlara, 3 µl işaretlenmiş prob karışımı eklendi ve 94°C’de 3-4 dakika bekletildi, sonra 48°C’ye kadar soğutuldu (Isıtıcı bloğun üstüne buz koyuldu).
5. Isıtıcı blok 48°C’ye gelince, faj ile prob karışımı içeren eppendorf tüpü buza koyuldu.
6. Önceden hazırlanmış %1 agaroz jele, hazırlanan karışım hemen yüklendi ve 170 Voltta 1,5 saat yürütüldü (agaroz jele etidyum bromür koyulmadı).

### 3.2.6.2. DNA Transferi

PIERCE protokolüne göre uygulandı:

1. Transfer blokun üzerine, sırasıyla 1 X TBE ıslatılmış western blot kâğıdı, onun üzerine naylon membranı, membranın üzerine yürütülmüş agaroz jel koyuldu, son olarak da western blot kâğıdı ile kapatıldı. Transfer bloğun kapağı yerleştirildi ve 120 amper’de 2 saat transfer işlemi yapıldı.
2. Transfer işleminden sonra naylon membran 10 dakika UV altında tutularak, DNA’nın immobilizasyonu sağlandı.

### 3.2.6.3. Naylon Membranın Bloklama ve Yıkama İşlemleri

Naylon membranın bloklama ve yıkama işlemleri PIERCE protokolüne göre yapıldı:

1. Naylon membran üzerine 20 ml bloke edici buffer konuldu ve 15 dakika karıştırıcıda yavaşça çalkalandı.
2. Bloke edici buffer döküldükten sonra, membran üzerine 20 ml konjugat/bloke edici buffer konuldu ve aynı şekilde 15 dakika yavaşça çalkalandı.
3. Konjugat/bloke edici buffer döküldü, membran üzerine 20 ml 1 X yıkama solüsyonu koyuldu ve 5 dakika çalkalandı, bu işlem 3 defa tekrarlandı.

4. Yıkama işlemi bittikten sonra, membran üzerine 10 ml substrat ekilibrasyon buffer koyuldu, 5 dakika çalkalandı.

#### **3.2.6.4. Naylon Membranın Kemilüminiscent Solüsyonlarla İşlemi ve Sonucunun Görüntülenmesi**

PIERCE Protokolüne göre uygulandı:

1. Membranın üzerine, 1:1 oranında hazırlanmış lüminol/enhanser ve stabilize peroksid solüsyonların karışımı döküldü, 5 dakika oda ısısında bekletildi.
2. Membran film kaseti içine yerleştirildi. Sonraki işlemler karanlık odada gerçekleştirildi.
3. Karanlık odada film kaseti açıldı, membranın üzerine CL-X film konuldu, film kaseti kapatıldı ve bu şekilde 30 dakika bekletildi.
4. Film alındı ve hemen developer solüsyon içinde 20-30 saniye bekletildi, sonra 20-30 saniye suda yıkandı ve fikser solüsyona 20-30 saniye konuldu. Son aşamada iyice su içinde yıkandı.
5. Böylece Southern blot sonucu filme geçirildi, fotoğrafı çekildi ve bilgisayara aktarıldı.

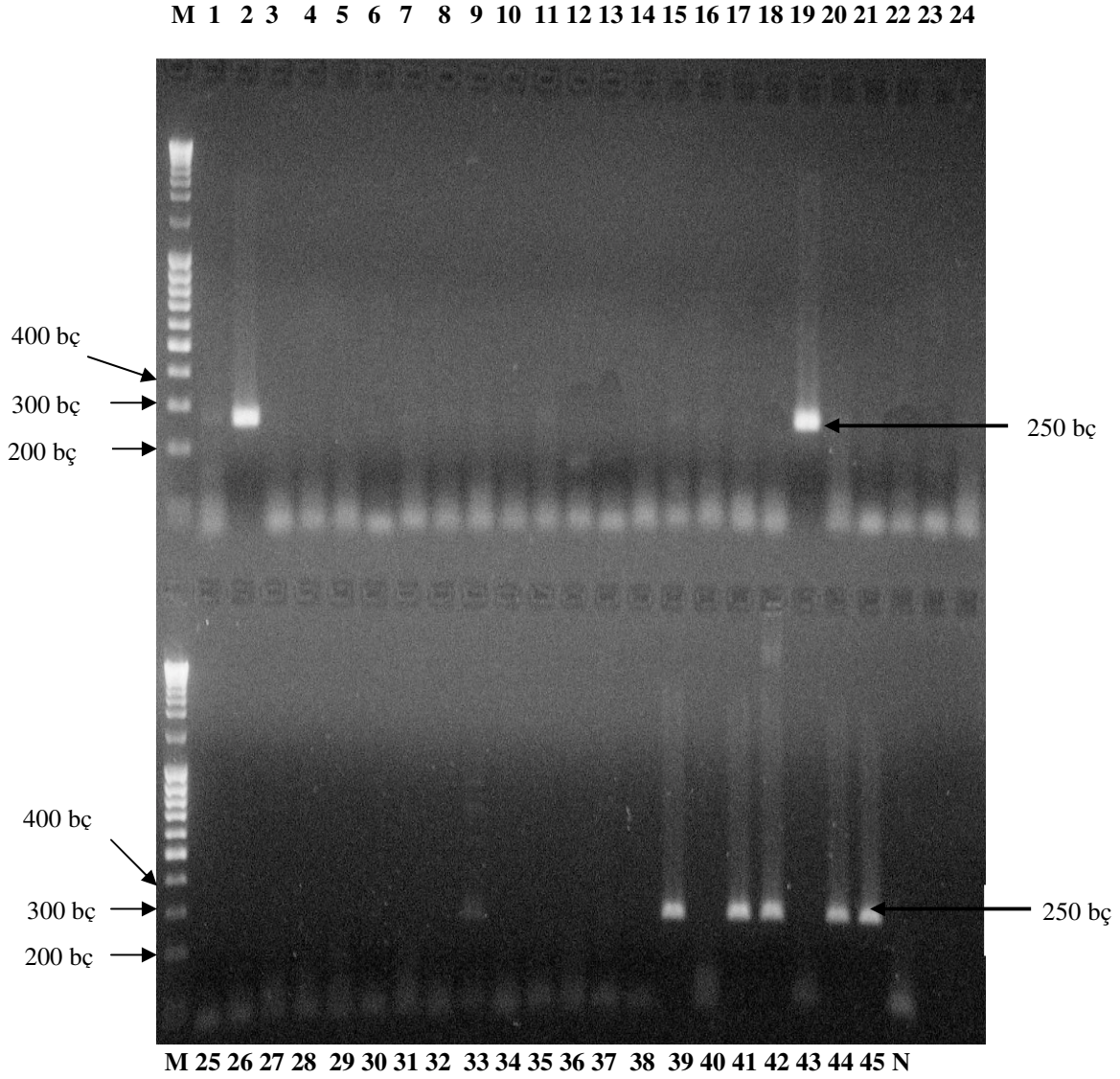
#### **4. ARAŞTIRMA BULGULARI**

Bu çalışmada toplam 45 klinik suŐ kullanıldı. rnekerin 36'sı (%80) hastane kaynaklı, 9'u (%20) polikliniklere baŐvuran hastalardan alınan rneklendir.

42 rnekte (%93) virulans faktör saptanmıştır, 3 örnekte (%7) ise virulans faktör saptanamamıŐtır.

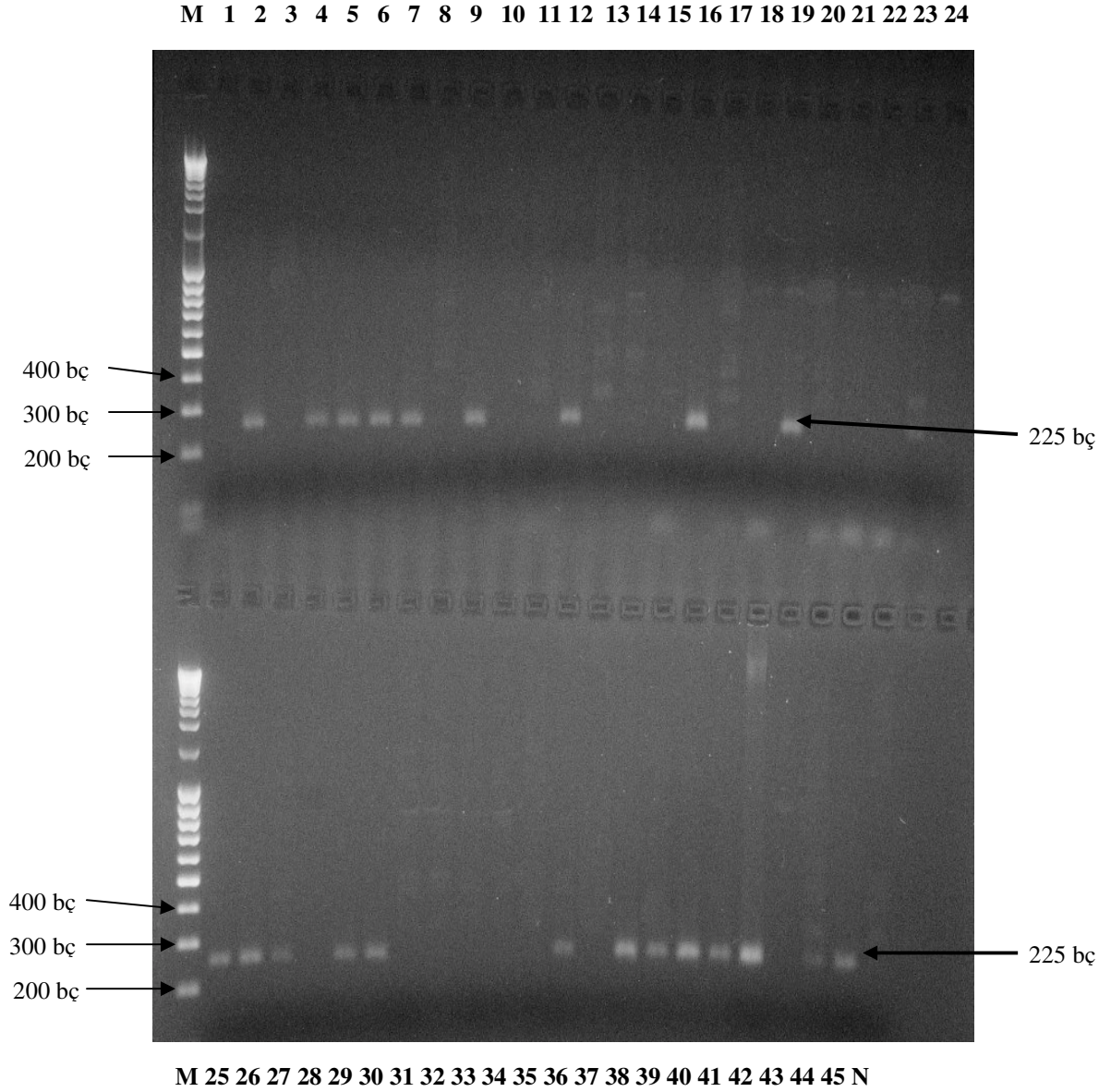
##### **4.1. Lizojenik Faj Genomik DNA'sının PZR Yöntemi ile Test Edilmesi**

Elde edilen lizojenik faj DNA'sı ile materyal ve metotta belirtildiği gibi PZR yapıldı. AraŐtırılan virulans faktör genlerine spesifik primerler kullanıldı.



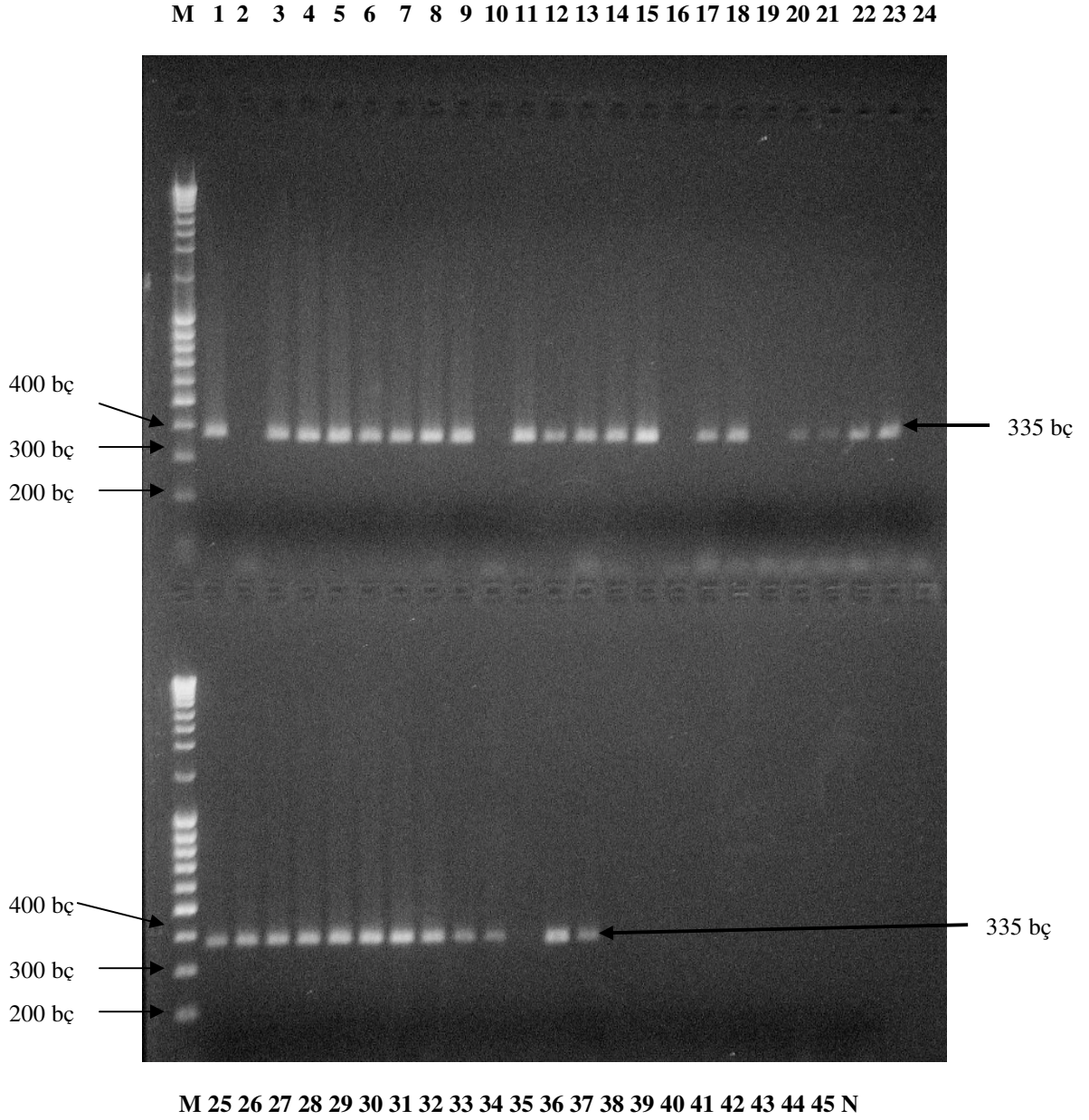
**Şekil 4.1. Lizojenik Fajlarda CHIPS primeri ile PZR ürünü (%1.5 agaroz jelde yürütülmüş ve UV altında görüntülenmiştir.)**

M- Marker, 1-3, 2-31, 3-143, 4-201, 5-302, 6-318, 7-328, 8-345, 9-350, 10-368, 11-370, 12-376, 13-385, 14-389, 15-391, 16-410, 17-412, 18-413, 19-416, 20-421, 21-437, 22-444, 23-459, 24-464, 25-475, 26-477, 27-479, 28-481, 29-487, 30-715, 31-807, 32-895, 33-971, 34-1003, 35-1046, 36-1057, 37-P3, 38-P9, 39-P15, 40-P33, 41-P46, 42-P54, 43-P66, 44-P90, 45-P91, N- Negatif Kontrol



**Şekil 4.2. Lizojenik Fajlarda SCIN primeri ile PZR ürünü (%1.5 agaroz jelde yürütülmüş ve UV altında görüntülenmiştir.)**

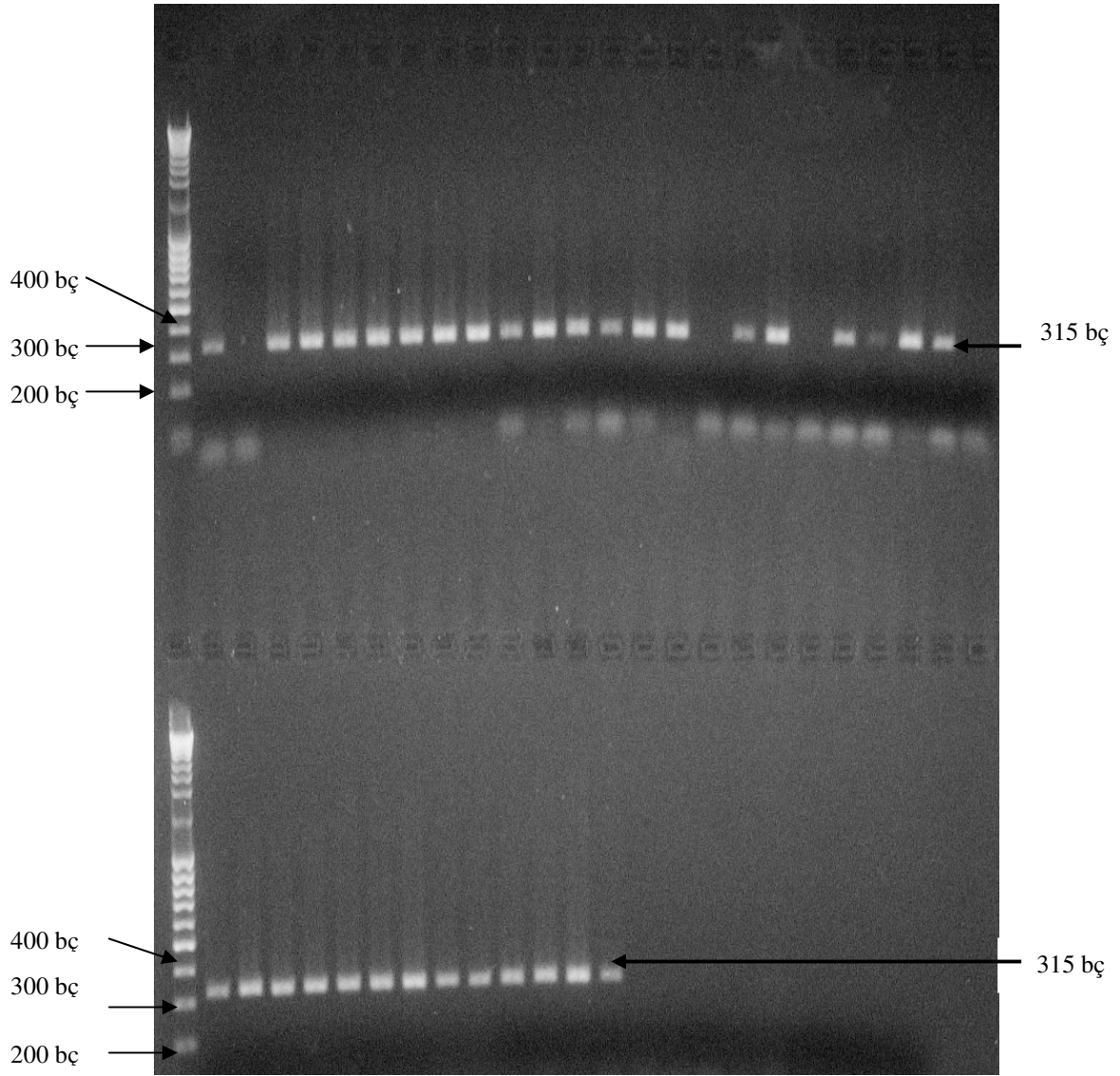
M- Marker, 1-3, 2-31, 3-143, 4-201, 5-302, 6-318, 7-328, 8-345, 9-350, 10-368, 11-370, 12-376, 13-385, 14-389, 15-391, 16-410, 17-412, 18-413, 19-416, 20-421, 21-437, 22-444, 23-459, 24-464, 25-475, 26-477, 27-479, 28-481, 29-487, 30-715, 31-807, 32-895, 33-971, 34-1003, 35-1046, 36-1057, 37-P3, 38-P9, 39-P15, 40-P33, 41-P46, 42-P54, 43-P66, 44-P90, 45-P91, N-Negatif Kontrol



**Şekil 4.3. Lizojenik Fajlarda SEI primeri ile PZR ürünü (%1.5 agaroz jelde yürütülmüş ve UV altında görüntülenmiştir.)**

M- Marker, 1-3, 2-31, 3-143, 4-201, 5-302, 6-318, 7-328, 8-345, 9-350, 10-368, 11-370, 12-376, 13-385, 14-389, 15-391, 16-410, 17-412, 18-413, 19-416, 20-421, 21-437, 22-444, 23-459, 24-464, 25-475, 26-477, 27-479, 28-481, 29-487, 30-715, 31-807, 32-895, 33-971, 34-1003, 35-1046, 36-1057, 37-P3, 38-P9, 39-P15, 40-P33, 41-P46, 42-P54, 43-P66, 44-P90, 45-P91, N-Negatif Kontrol

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



M 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 N

**Şekil 4.4. Lizojenik Fajlarda SEK primeri ile PZR ürünü (%1.5 agaroz jelde yürütülmüş ve UV altında görüntülenmiştir.)**

M- Marker, 1-3, 2-31, 3-143, 4-201, 5-302, 6-318, 7-328, 8-345, 9-350, 10-368, 11-370, 12-376, 13-385, 14-389, 15-391, 16-410, 17-412, 18-413, 19-416, 20-421, 21-437, 22-444, 23-459, 24-464, 25-475, 26-477, 27-479, 28-481, 29-487, 30-715, 31-807, 32-895, 33-971, 34-1003, 35-1046, 36-1057, 37-P3, 38-P9, 39-P15, 40-P33, 41-P46, 42-P54, 43-P66, 44-P90, 45-P91, N-Negatif Kontrol

Lizojenik fajlardan elde edilen genomik DNA ile yapılan PZR sonuçları, her bir virulans faktör için görüntülenmiştir.

CHIPS faktörü için yapılan PZR testine göre; 2 tane hastane kaynaklı, 5 tane poliklinik kaynaklı olmak üzere toplam 7 örnekte (%15) pozitif sonuç alınmıştır (Şekil 4.1).

SCIN faktörü için yapılan PZR testine göre; 15 tane hastane kaynaklı, 6 tane poliklinik kaynaklı olmak üzere toplam 21 örnekte (%46) pozitif sonuç alınmıştır (Şekil 4.2.).

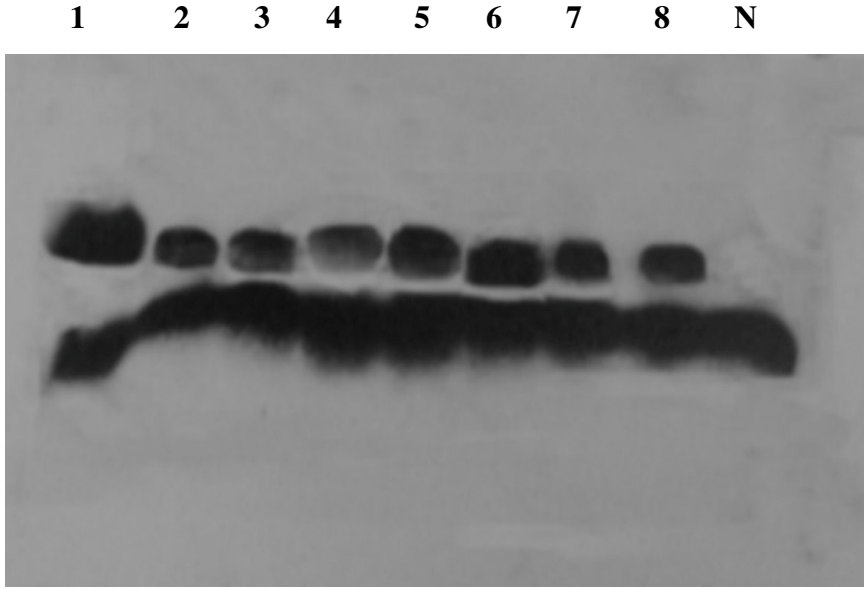
SEI faktörü için yapılan PZR testine göre; 29 tane hastane kaynaklı, 1 tane poliklinik kaynaklı olmak üzere toplam 30 örnekte (%67) pozitif sonuç alınmıştır (Şekil 4.3.).

SEK faktörü için yapılan PZR testine göre; hepsi hastane kaynaklı olmak üzere toplam 32 tane (%71) pozitif sonuç alınmıştır (Şekil 4.4.).



## 4.2. Lizojenik Faj Genomlarının Southern Blot Yöntemi İle Test Edilmesi

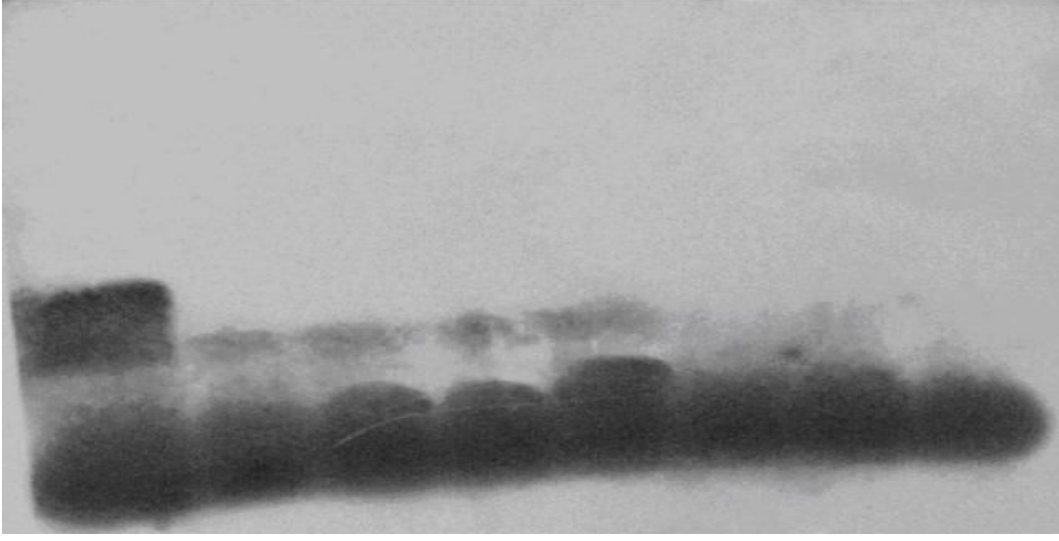
Southern Blot yöntemi için; PZR'da kullanılan sens primerlerini biotin ile işaretleyerek ve bunu hibridizasyon probu olarak kullanıp faj genomlarındaki virulans faktörlerinin varlığı araştırılmıştır.



**Şekil 4.5. Lizojenik Fajlarda CHIPS geninin Southern Blot Yöntemi ile Araştırılması**

1- Lizojenik fajda PZR yöntemi ile CHIPS (+) örnek, 2- 31, 3-416, 4-P15, 5-P46, 6-P54, 7-P90, 8-P91, N-1046 (PZR negatif örnek alınmıştır).

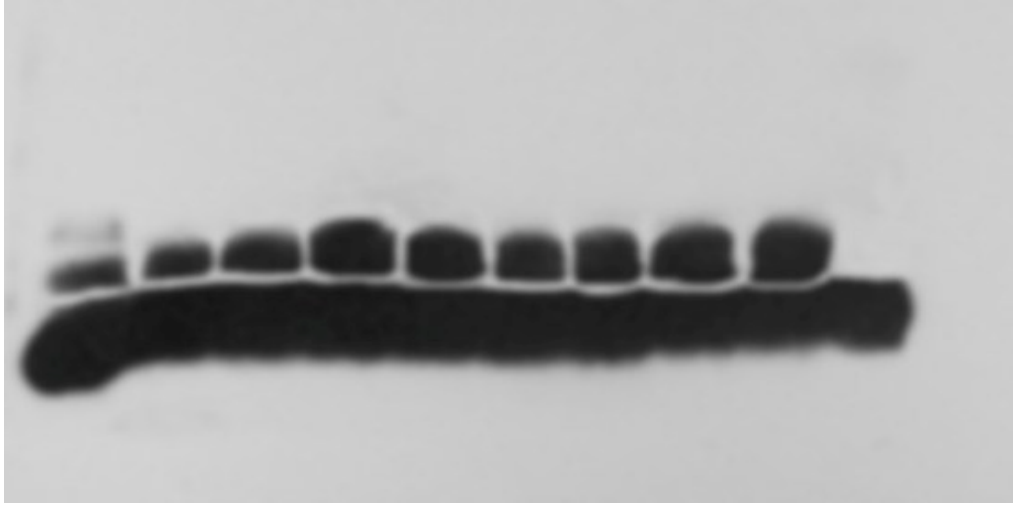
1 2 3 4 5 6 7 N



**Şekil 4.6. Lizojenik Fajlarda SCIN geninin Southern Blot Yöntemi ile Araştırılması**

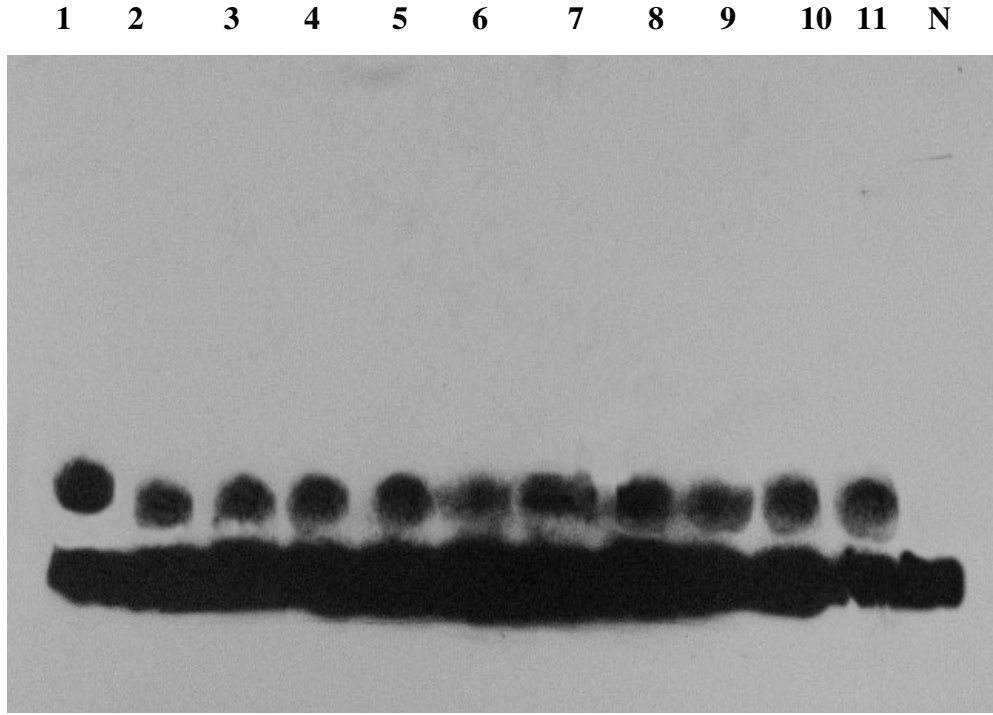
1- Lizojenik fajlarda PZR yöntemi ile SCIN (+) örnek, 2-31, 3-201, 4-302, 5-328, 6-376, 7-P9, N-437 (PZR negatif örnek alınmıştır).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 N



**Şekil 4.7. Lizojenik fajlarda SEI geninin Southern Blot Yöntemi ile Araştırılması**

1- Lizojenik fajlarda PZR yöntemi ile SEI (+) örnek, 2-318, 3-477, 4-479, 5-715, 6-807, 7-895, 8-1057, 9-P3, N-P46 (PZR negatif örnek alınmıştır).



**Şekil 4.8. Lizojenik fajlarda SEK geninin Southern Blot Yöntemi İle Araştırılması**

1- Lizojenik fajlarda PZR yöntemi ile SEK (+) örnek, 2-3, 3-143, 4-345, 5-368, 6-370, 7-385, 8-389, 9-391, 10-412, 11-413, N-410 (PZR negatif örnek alınmıştır).

Lizojenik fajlardan elde edilen DNA ile yapılan Southern Blot sonuçları, her bir virulans faktör için görüntülenmiştir.

CHIPS faktörü için yapılan testte; PZR sonuçlarına göre pozitif olan örneklerin (7 tane) tamamı Southern Blot yöntemine alınmıştır. PZR (+) olan örneklerde, Southern Blot (+) sonuç alınmıştır. PZR (-) örnekte ise sonuç negatiftir (Şekil 4.5).

SCIN faktörü için yapılan testte; PZR sonuçlarına göre pozitif olan 6 örnek seçilmiş ve Southern Blot yöntemi uygulanmıştır. PZR (+) olan örneklerde, Southern Blot (+) sonuç alınmıştır. PZR (-) örnekte ise sonuç negatiftir (Şekil 4.6.).

SEI faktörü için yapılan testte; PZR sonuçlarına göre pozitif olan 8 örnek seçilmiş ve Southern Blot yöntemi uygulanmıştır. PZR (+) olan örneklerde, Southern Blot (+) sonuç alınmıştır. PZR (-) örnekte ise sonuç negatiftir (Şekil 4.7.).

SEK faktörü için yapılan testte; PZR sonuçlarına göre pozitif olan 10 örnek seçilmiş ve Southern Blot yöntemi uygulanmıştır. PZR (+) olan örneklerde, Southern Blot (+) sonuç alınmıştır. PZR (-) örnekte ise sonuç negatiftir (Şekil 4.8.).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bilinçsizce kullanılan antibiyotikler sebebi ile birçok bakteri, tedavilere karşı direnç göstermektedir. Patojenitesi yüksek bakterilerin ortamdaki izolasyonu ve moleküler tekniklere dayalı tespitinin önemi büyüktür. *Staphylococcus aureus*, hastane enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biridir. Virulans faktör olarak adlandırılan birçok hastalık etkeni taşımaktadırlar. Virulans faktörleri ve taşınma oranlarının tespiti ise klinik mikrobiyoloji ve mikrobiyal biyoteknoloji çalışmalarında önem arz etmektedir.

Çalışmamızda *Staphylococcus aureus* örneklerinden izole edilen bakteriyofajlarda; CHIPS, SCIN, SEK, SEI toksin genlerinin varlığının PZR ve Southern Blot yöntemleri ile tespiti ve kıyaslanması amaçlanmıştır. *S. aureus*'un virulans faktörleri, plazmidler, transpozonlar, patojenite adacıkları ve bakteriyofajlar tarafından kodlanmaktadır. Bu çalışmamızda lizojenik fajlar kullanılmıştır.

Öncelikle, mitomicin C ile indüklenen *S. aureus*'lardan bakteriyofajlar izole edilmiş, daha sonra elde edilen bakteriyofaj DNA'sı ile PZR yapılmıştır.

Stafilokokal Kemotaksis İnhibitor Protein (CHIPS) için, 45 örnekte toplam 7 örnekten (%15) pozitif sonuç alınmıştır. Bu oran yapılan diğer çalışmalarda %60 oranında tespit edilmiştir (De Hass ve ark. 2004).

Stafilokokal Kompleman İnhibitor Protein (SCIN) için, 45 örnekte toplam 21 örnekten (%46) pozitif sonuç alınmıştır. Bu oran diğer çalışmalarda % 90 oranlarında tespit edildiği görülmüştür (Dong-Liang 2008).

Stafilokokal Enterotoksin İ (SEİ) için, 45 örnekte toplam 30 örnekten (%67) pozitif sonuç alınmıştır. Bu oran yapılan diğer çalışmalarda % 22 olarak tespit edilmiştir (Peacock ve ark. 2002).

Stafilokokal Enterotoksin K (SEK) için, 45 örnekte toplam 32 örnekten (%71) pozitif sonuç alınmıştır. Bu oran yapılan diğer çalışmalarda % 38 olarak görülmüştür (Orwin ve ark. 2001).

PZR'da pozitif çıkan sonuçları doğrulamak amacı ile Southern Blot hibridizasyonu yapılmıştır. PZR yönteminde ortamdaki kontaminant DNA'dan dolayı yalancı pozitif sonuçların elde edilmesi söz konusu olabilir.

İlk olarak CHIPS faktörü ile başlanarak Southern Blot yönteminin duyarlılığına bakılmıştır. PZR sonucu pozitif olarak elde edilen 7 örneğin tamamı ve PZR negatif olan 1 örnek ile Southern Blot yapılmıştır. PZR'da pozitif çıkan örneklerin tamamı Southern Blot'da da pozitif olarak elde edilmiştir. Marker olarak da PZR pozitif ürün kullanılmıştır.

SCIN faktörü için de PZR pozitif olan örneklerden 6 tanesi ve PZR negatif örneklerden 1 tanesi ile Southern Blot yapılmıştır. PZR'da pozitif olan örneklerin tamamı Southern Blot'da da pozitif olarak elde edilmiştir. Marker olarak da PZR pozitif ürün kullanılmıştır.

SEI faktörü için de PZR pozitif olan örneklerden 8 tanesi ve PZR negatif örneklerden 1 tanesi ile Southern Blot yapılmıştır. PZR'da pozitif olan örneklerin tamamı Southern Blot'da da pozitif olarak elde edilmiştir. Marker olarak da PZR pozitif ürün kullanılmıştır.

SEK faktörü için de PZR pozitif olan örneklerden 10 tanesi ve PZR negatif örneklerden 1 tanesi ile Southern Blot yöntemi yapılmıştır. PZR'da pozitif olan örneklerin tamamı Southern Blot'da da pozitif olarak elde edilmiştir. Marker olarak da PZR pozitif ürün kullanılmıştır.

Çalışmamızda, PZR ve Southern Blot yöntemleri karşılaştırıldığında sonuçların uyumlu çıktığı görülmüştür. Elde edilen lizojenik faj DNA'sı her iki yöntemde de benzer sonuçlar vermiştir.

PZR yöntemi, hızlı ve oldukça spesifik çalışır, toksin oluşturan etkenlerin ve bakteri alt tiplerinin teşhisinde kolaylık sağlar. Canlı örnekler ile çalışılabilindiği gibi, cansız örnekler de kullanılır.

PZR yönteminin, birçok avantajı olduğu gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Ortamdaki kontaminant DNA ile kullanılan primerler arasında ortak baz dizisi bulunması halinde; yalancı pozitif sonuç oluşacaktır. Bu durumu önlemek için laboratuvar ortamında çeşitli önlemler alınmalıdır.

Southern Blot yönteminde ise, PZR'ın aksine yüksek konsantrasyonda DNA'ya ihtiyaç vardır. Maliyeti yüksek ve zaman açısından uzun sürer. Ancak kültürü ve tanımlanması zor olan mikroorganizmaların genomlarını tespit edebilmesi veya bu organizmaları tanıyabilmesi açısından araştırmalarda önem taşır.

Sonuç olarak bu çalışmada, hastane enfeksiyonları açısından önemli etkenlerden *Staphylococcus aureus*'un lizojenik fajları tarafından taşınan virulans faktörleri, PZR ve Southern Blot yöntemleri ile tespit edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Her iki yöntemin benzer özgüllüklere sahip olduğu görülmüştür. PZR yönteminin daha hassas olduğu belirlenmiştir. Klinik mikrobiyoloji ve mikrobiyal biyoteknoloji çalışmalarında bu iki yönteme ek olarak farklı moleküler yöntemler de çalışılarak karşılaştırılmalı, elde edilen sonuçlar özgüllük ve duyarlılık açısından değerlendirilmelidir. Böylece en etkin yöntem tespit edilmelidir.



## 6. KAYNAKLAR

- Acermann, H.W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. Res. Mikrobiol. (154); 245-251.
- Alen, S., Koneman, E., Janda, W., Schreckenberger, P., Winn, W., Woods, G., Procop, G. 2006. Eds. Color atlas and tesxtbook of diagnoctic microbiology. (5); 539-576.
- Arda, M. 1995. Biyoteknoloji (Bazı Temel Kavramlar). Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, (12); 376-384.
- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchii, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., Hiramatsu, K. 2002. Gemome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lanset, (359); 1819-1827.
- Backman, K. 1992. Ligase chain reaction Diagnoctic tecnology for fort he 1990s. Clinical Chemistry, (38); 8-457.
- Bannerman, T.L. 2003. Staphylococcus, Micrococcus and catalase-positive cocci that grow aerobically. Manual of Clinical Microbiology, (8); 384-404.
- Bergdoll, M.S. 1989. *Staphylococcus aureus*. Foodborne Bacterial Pathogens, MP Doyle, (13); 463-523.
- Bilgehan, H. 2005. Mikroorganizma genetiği. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, (11); 122-152.
- Blomster- Hautamaa, D.A., Kreiswirth, B.N., Kornblum, J.S., Novick, R.P., Schlievert, P.M. 1986. The nücleotid and partial amino acid sequence of toxic shock syndrome toxin-1. J, Biol. Chem., (261); 15783-15786.
- Bohach, G.A., Foster, T.J. 2000. Staphylococcus aureus exotoxins. Gram-Positive Pathogenes, ASM Press Washington, (52); 367-278.
- Casjens, A.L., Lambert, P.A., Elliott, T.S.J. 2007. Prophages and bacterial genomics. What have we Mol. Microbiology, (49); 277-300.
- Chambers, H.F. 1997. Methicillin resistans in staphylococci: Moleculer and biochemical basis and clinical implications. Clinical Microbiology Rev., (10); 91-781.
- Cakir, I., Cakmakçı M.L. 2005. Gıdalarda Patojen Mikroorganizma Aranmasında Kullanılan Moleküler Genetik Yöntemler. Mikrobiyoloji Dergisi, 3(12); 1-7.
- Choi, Y.W., Kotzin. B., Herroni L., Callahan, J., Marrack, P., Kappler, J. 1989. Intreaction of *Staphylococcus aureus* toxin superantiganns with human T cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (86); 8941-8945.

- Christer, R.B., Boyle, M.D. 1996. Role of staphylokinase in the acquisition of plasminogen- dependent enzymatic activity by staphylococci. *J. Infect. Dis.*, (173); 104-112.
- CLSI. 2008. Performans standards of antimicrobial susceptibility testing. 19. Informational Supplement CLSI Document Pennsylvania, (28); 110-114.
- Cooney, J., Mulvey, M., Arbuthnott, J.P., Foster, T.J. 1988. Molecular cloning and genetic analysis of the determinant for gamma-lysin, a two-component toxin of staphylococcus aureus. *J. Gen. Microbiology*, (134); 2179-2188.
- De Hass, C.J.C., Veldkamp, K.E., Peschela, A., Weerkamp, F., van Wamel, W.J.B., Heezius, E.C.J.M., Popelier, M.J.J.G., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G. 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J. Exp. Medical*, (199); 687-695.
- Dong-Liang, H., Katsuhiko, O., Fumio, I., Takesi, K., Minoru, Y., Kunihiro, S., Akio, N. 2008. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, (57); 1106-1112.
- Dundar, V., Dundar D.O. Stafilokok infeksiyonları. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, (28); 2065-2077.
- Ergin, M. 2004. Moleküler Patoloji. Aegean Pathology Journal, (1); 103-107.
- Fackrell, H.B., Wiseman, G.M. 1976. Properties of the gamma haemolysin of *Staphylococcus aureus*. *Journal Gen. Microbiology*, (92); 11-24.
- Fahrlander, P.D., Klausner, A. 1988. Amplifying DNA probe signals. A christmas tree approach. *Bio/Tecnology*. (6); 1165.
- Farrell, A.M., Taylor, D., Holland, K.T., 1995. Cloning, sequencing and expression of the hyaluronate lyase gene of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Lett.*, (130); 81-85.
- Fitzgerald, J.R., Sturdevant, D.E., Mackie, S.M., Gill, S.R., Musser, J.M. 2001. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* insights in to the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (98); 8821-8826.
- Froussard, P. 1993. r PCR: a powerful tool for random amplification of whole RNA sequence. *PCR Meth. Applic.*, (2); 185.
- Forsgren, A., Ghetie, V. 1983. Protein A and its exploitation- Staphylococcal infection. Academic Press London, (12); 429-480.
- Gotz, F., Poopp, F., Korn, E., Schleifer, K.H. 1985. Complete nucleotide sequence of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* cloned in *Staphylococcus carnosus*. *Nucleic Acids. Res.*, (13); 5895-5906.

- Gouaux, J.E., Braha, M.R., Hobaugh, L., Song, S., Cheley, C., Shustak, C., Bayley, H. 1994. Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (91); 12828-12831.
- Gray, G.S. Kehoe, M. 1984. Primary sequence of the  $\alpha$ - toxin gene from *Staphylococcus aureus*. *Wood Infection Immun.*, (46); 615-618.
- Guerrero, E., Daniel, R.W., Bosch, F.X., Castellsague, X., Munoz, N., Gılı, M., Viladiu, P., Navarro, C., Zubiri, M.L., Ascunce, N., Gonzalez, L.C., Tafur, L., Izarzugaza, I., Shah, K.V. 1992. Comparison of ViraPap, Southern Blot hybridization, and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer, *Journal of Clinical Microbiology*, (30); 2951-2959.
- Gur, D. 2008. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. Enfeksiyon hastalıkları ve Mikrobiyolojisi- İstanbul; 227-243.
- Hanssen, A.M., Ericson S.J.U. 2006. SCCmec in staphylococci genes on the move. *FEMS Immunol Med. Microbiology*, 46(1); 8-20.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., Ito, T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiology*, (9); 93-486.
- Hiramatsu, K., Katayama, Y., Yazawa, H. et al. 2002. Molecular genetics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiology*, (292); 67-74.
- Ichiyama, S., Ohta, M., Shimokata, K., Kato N., Akeuchi, J. 1991. Genomics DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal Clinical Microbiology*, (29); 2690-2695.
- Jongorius, I., Puister, M., Wu, J., Ruyken, M., Rooijackers, S.H. 2010. Staphylococcal complement inhibitor modulates phagocyte response by dimerizations of convertases. *The Journal of Immunology*, (184); 420-425.
- Jorgense, J.H., Turnidge, J.D. 2003. Susceptibility testing methods. *Manual of Clinical Microbiology*, (8); 27-1108.
- Kaneko, J., Kimura, T., Narita, S., Tomita, T., Kamio, Y. 1998. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage  $\phi$ PV carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene*, (215); 1055-1067.
- Kluytmants, J., van Belkum, A., Verbrugh, H. 1997. Epidemiology of underlying mechanisms and associated risks. *Clinical Microbiology Rev.*, (10); 505-520.
- Kwoh, D.Y., Davis, G.R., Whitfield, K.M. 1989. Transcription- based amplification system and detection and amplification of human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA*, (86); 7-1173.

- Landergen, U., Kaiser, R., Sanders, J., Hood, L. Aligase mediated gene detection technique. *Science*, (241); 1077.
- Lee, J.C., Schmidt, J.J., Johnson-Winegar, A.D., Spero, L., Iandolo, J.J. 1987. Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and B genes from *Staphylococcus aureus*. *Infections Immun.*, (55); 1853-1858.
- Livermore, D. 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agent.*, (16); 3-10.
- Lizardi, P., Guerra, C., Lomeli, H. 1988. Exponential amplification of recombinant RNA hybridization probes. *Biotechnology*, (6); 202-1197.
- Lovseth, A., Loncarevic, S., Berdal, K.G. 2004. Modified Multiblex PCR Method for Detection of Pyrogenic Exotoxin Genes in Staphylococcal Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, (42); 3869-3872.
- Martins, A., Cunha, M.R.S. 2007. Epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunology*, (9); 787-795.
- Ma XX et al., Ito, T., Okuma, K. 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome. *Drug Resistant Update*, (6); 41-52.
- McCarthy, A.J., Lindsay, J.A. 2010. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC Microbiology*, (10); 173-188.
- Meislin, F.A., Lerner, S.A., Graves, M.H., McGehee, M.D., Kocka, F.E., Morello, J.A., Rosen, R. 1977. Anaerobic and aerobic bacteriology and out patient management. *Ann. Intern. Med.*, (87); 145-149.
- Moreillon, P., Que, Y., Glauser, M.P. 2005. *Principles of Infectious Diseases*, (6); 2321-2351.
- Morschauer, J., Köhler, G., Ziebuhr, W., Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Hacker, J. 2000. Evolution of microbial pathogens. *R.Soc. Lond.*, (355); 695-704.
- Moore, P.C.L., Lindsay, J.A. 2001. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: Evidence for horizontal Transfer of Virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology*, (39); 2760-2767.
- Murray, D.L., Earhart, C.A. Mitchell, D.T. Ohlendorf, D.H. Novick, R.P. Schlievert, P.M. 1996. Localization of biologically important regions on toxic shock syndrome toxin-1. *Infection Immun.*, (64); 371-374.
- Novick, R.P. 2000. Pathogenicity factors and their regulation. *Gram-Positive Pathogens*, 392-407.
- Novick, R.P. 2003. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses. *Plasmid*, (49); 93-105.

- Omeo, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D.L., Ueda, S., Shinagawa, K. 2002. Detection of seg, seh and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *Staphylococcus aureus* isolates harboring seg, seh or sei genes. *Journal of Clinical Microbiology*, (40); 857-862.
- Orwin, P.M., Leung, D.Y.M., Donahue, H.L., Novick, R.P., Schlievert, P.M. 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.*, (69); 360-366.
- Ozerol, H.,I. 1997. İnfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan DNA problaro ve nükleik asid çoğaltma (amplifikasyon) yöntemleri. *Journal of Turgut Özal Medical Center*, (3) 329-342.
- Peacock, S.J., Moore, C.E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., O'Neill, G., Day, N.P.J. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, (70); 4987-4996.
- Peng, H.L., Novick, R.P., Kreiswirth, B., Kornblum, J., Schlievert, P. 1988. Cloning, characterization and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriology*, (170); 4365-4372.
- Phonimdaeng, G., O'Reilly, M., Nowlan, P., Bramley, A.Y., Foster, T.Y. 1990. The coagulase of *Staphylococcus aureus*. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Molecular Microbiology*, (4); 393-404.
- Prichard, C.G., Stefano, J.E., 1990. Amplified detection of viral nucleic acid at subattomole level using Q beta replicase. *Ann Biol Chem*, (48); 7-492.
- Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., Moghazeh, S.L., Eisner, W., Novicki R.P. 1989. Nucleotide sequence: the  $\beta$ -hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.*, (17); 3305.
- Renn, K., Banan, J.D., Pancholi, V., Cheung, A.L., Robbins, J.C. Fischetti, V.A., Zabriskiye, J.B. 1994. Characterization and biological properties of new staphylococcal exotoxin. *J. Exp. Med.*, (180); 1875-1683.
- Rooijackers, S.H., van Wamel, W.J.B., Ruykeni M., van Kessel K.P., van Strijp, J.A. 2005. Anti-opsionic properties of staphylokinase. *Microbes Infectons*, (7); 475-484.
- Rooijackers, S.H., Milder, F.J., Bardoel, B.W., Ruyken, M., van Strijp J.A., Gros, P. 2010. Staphylococcal complement inhibitor: Structure and active sites. *The Journal of Immunology*, (179); 2989-2998.
- Saiki, K.R., Gelfand, H.D., Stoffi, S., Scharf, J.S., Higuchi, R., Horn, T.G. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, (158); 1154-1157.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, (10); 51-70.

- Schochetman G., Jones, K.W. 1988. Polymerase Chain Reaction. *Journal Infectious Dis.*, (120); 1121-1133.
- Shortle, D. 1983. A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. *Gene*, (22); 181-189.
- Taylor, M., Cieslak, M., Gwen, S.R., Oojagger, A., Leith, C., Bristow, C., Tawn, E.J., Winther, J.F., Boice, J.D. 2010. Comparison of germ line minisatellite mutation detection at the CEB1 locus by Southern Blot and PCR amplification, *Advance Access Publication*, (25); 343-349.
- Tunger, A. 2004. Gram-pozitif bakteri enfeksiyonları. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 9-68.
- Turkylmaz, S., Esendal, O.M. 2000. Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanımları. *Kafkas Üni. Vet. Fak. Dergisi*, 8(1); 71-76.
- Turnidge, J.D., Ferraro, M.J., Jorgensen, J.H. 2003. Susceptibility testing methods: General considerations. *Manual of Clinical Microbiology*, (8); 1102-1107.
- Tompkins L.C. 1998. Molecular epidemiology in infectious diseases. *Infectious Diseases*, (2); 28-35.
- Unal, S. 2004. *Staphylococcus aureus* direnç mekanizmaları. Gram-pozitif bakteri enfeksiyonları, Ankara Bilimsel Tıp Yayınevleri, 23-38.
- Urdea, M.S., Fultz, T., Anderson, T.J. 1991. Branched amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Symp Ser.*, (24); 197-200.
- Wagner, A., Martin-Bourgon, C., Saez-Nieto, J.A. 1987. Characterization of nontypable strains of *Staphylococcus aureus* from cases of hospital infections. *Epidemiology Infections*, (99); 191-200.
- Walker, J., Douan, G. 1989. A new role in diagnostic microbiology. *Journal Appl. Microbiology*, (67); 229-230.
- Walker, G.T., Little, M.C., Nadeau J.G., Shank D.D. 1992. Isothermal invitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc Natl Acad Sci USA*, (89); 392.
- Van Wamel, W.J.B., Rooijackers, S.H.M., Ruyken, M., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G. 2006. The innate immune modulators *Staphylococcus aureus* are located on  $\beta$ -hemolysin-converting bacteriophages. *J.Bacteriology*, (188); 1310-1315.
- Wiedbrauk, D.L. 1992. Molecular methods for virus detection. *Lab Med.*, (23); 42-737.
- Wolcott J.M. 1992. Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clinical Microbiology Rev.*, (5); 370-386.

Yamaguchi, J., McCormick, J.M., Paustian, M.L., Orwin, R.M., Kapur, V., Schlievert, P.M. 2002. Characterization and Expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity island. *Journal Biol. Chem.*, (277); 13138-13147.

## **EK**

### **Besiyerleri**

#### **1) Brain Heart Broth Besiyeri (BHB)**

- 1) Toz halindeki besiyerinden 37 gr tartıldı. 1000 ml distile suda çözüldü.
- 2) 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.
- 3) Besiyeri soğuduktan sonra +4 °C'de buzdolabında saklandı.

#### **2) Blood Agar Base (Kanlı Agar ) Besiyeri**

- 1) Toz halindeki besiyerinden 40 gr tartıldı ve 1000 ml distile suda çözüldü.
- 2) 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.
- 3) Besiyeri 40-50 °C'ye kadar soğutuldu.
- 4) 50 ml defibrine koyun kanı besiyeri üzerine konuldu. İyice karıştırıldıktan sonra petri kutularına aktarıldı.
- 5) Besiyeri katılaştıktan sonra +4°C buzdolabında saklandı.

#### **Lizojenik Fajların İndüklenmesinde Kullanılan Madde**

Toz halindeki Mitomicin C 'den 2 mg alınarak, 1 ml su içerisinde eritildi.

#### **Lizojenik Fajların Elde Edilmesinde Kullanılan Solüsyon (PEG)**

- 1) Steril balon içerisinde toz halindeki PEG-6000'den 50 gr tartıldı. 3gr NaCl de tartılarak üzerine eklendi. Toplam hacim 125 ml olacak şekilde distile su konularak karışım hazırlandı.
- 2) 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.
- 3) Solüsyon soğuduktan sonra pH' 7.2 olacak şekilde ayarlandı.
- 4) Oda ısısında saklandı.



## Lizojenik Fajların DNA Ekstraksiyon Solüsyonları

### 1) DNA Lizis Buffer

Hazırlanması

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| 1 M TRİS base (pH 8,0) stok | 100 µl |
| 0,5 M EDTA (pH 8,0) stok    | 100 µl |
| %10 SDS                     | 60 µl  |
| Proteinaz K                 | 4 µl   |
| ddH <sub>2</sub> O          | 500 µl |

### 2) Fenol- Kloroform

Hazırlanması:

|               |       |
|---------------|-------|
| Fenol         | 100 g |
| Kloroform     | 96 ml |
| İzoamil alkol | 4 ml  |
| TE tampon     | 20 ml |

### 3) TE Buffer

Hazırlanması:

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| 1 M TRİS-HCl (pH 7,5) stok | 10 mM |
| 0,5 M EDTA (pH 8,0) stok   | 1mM   |

## Jel Elektropherez İşleminde Kullanılan Solüsyonlar

### 1) Agaroz Jel (%1.7)

Hazırlanması:

|                |        |
|----------------|--------|
| Agar           | 2,22 g |
| TBE X 1        | 130 ml |
| Etidyum bromür | 7,5 µl |

## 2) TBE X 5 Tamponu

Hazırlanması:

|                     |      |        |
|---------------------|------|--------|
| TRIS base           | 54 g |        |
| Borik asid          |      | 27,5 g |
| 0,5 M EDTA (pH 8,0) |      | 20 ml  |
| dd H <sub>2</sub> O |      | 980 ml |

## 3) TBE X 1 Tamponu

Hazırlanması:

|                     |  |        |
|---------------------|--|--------|
| TBE X 5             |  | 200 ml |
| dd H <sub>2</sub> O |  | 800 ml |

## Southern Blot Yönteminde Kullanılan Primerler ve Solüsyonlar

### 1) Oligo Primerler (sens primer kullanıldı)

Hazırlanması:

|                    |  |        |
|--------------------|--|--------|
| 100 mM primer stok |  | 5 µl   |
| ddH <sub>2</sub> O |  | 500 µl |

### 2) TdT Stok Solüsyonu

Hazırlanması:

|                    |  |      |
|--------------------|--|------|
| TdT stok solüsyonu |  | 1 µl |
| TdT buffer         |  | 2 µl |
| ddH <sub>2</sub> O |  | 7 µl |

### 3) Konjugat/Bloke Edici Solüsyonu

Hazırlanması:

|                                     |  |       |
|-------------------------------------|--|-------|
| Bloke edici solüsyon                |  | 10 ml |
| Stabilize streptavidin-HRP konjugat |  | 34 µl |

#### 4) Fikzatif Solüsyonu

Hazırlanması:

|                  |         |
|------------------|---------|
| H <sub>2</sub> O | 2,5 l   |
| A solüsyon       | 1,25 l  |
| B solüsyon       | 125 ml  |
| H <sub>2</sub> O | 1,125 l |

#### 5) Developer Solüsyonu

Hazırlanması:

|                  |        |
|------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O | 2,5 l  |
| A solüsyon       | 1,25 l |
| H <sub>2</sub> O | 1,25 l |

#### Kimyasallar ve Reaktifler

10mM MgCl<sub>2</sub> (FERMENTAS, 37)

10 X PZR buffer (FERMENTAS, 37)

Agaroz (VIVANTIS, AG6330)

Biotin 3' end DNA Labeling Kit (5 X TdT Reaksiyon buffer, Biotin-N4-CTP, TdT stok solüsyon, Biotin-kontrol oligo, İşaretlenmemiş-kontrol oligo) (PIERCE, 89818)

Borik asid (LABKIM, 111000)

Chemiluminescent Nucleic Asid Detection Module (Bloke edici buffer, 4 X Yıkama solüsyon, Substrat ekilibrasyon buffer, Stabilize streptavidin-HRP konjugat, Lüminol/Enhanser solüsyon, Stabilize peroksid solüsyon) (PIERCE, 89880)

CL-X Film (PIERCE, 34089)

DNase (ROCHE, 13314400)

DNA moleküler belirteci (GeneRuler 100 bp DNA Ladder- FERMENTAS)

DNA Purification Kit (Bağlayıcı solüsyon, Yıkama solüsyon, Elüsiyon solüsyon, DNA Spin kolon ve Kollektör tüp) (GENEMARK, F00623)

dNTP (FERMENTAS, 37)

EDTA (MERCK, 70156890)

Etidyum bromür (APPLICHEM, 1239458)

Fenol (MERCK A, 550101 451)

Isoamil alkol (MERCK, K33548279 438)  
Fenol (MERCK A, 550101 451)  
Mitomisin C (GERBU, 1920)  
Naylon Membranı (PIERCE, 77016)  
PEG-6000 (MERCK, S434329153E)  
Primerler (IDT)  
Proteinaz K (FYNNZYMES, 90)  
Röntgen Filmi Elbanyosu Developeri (A solüsyon) (DEFİKS, D202)  
Röntgen Filmi Elbanyosu Fikseri (A ve B solüsyon) (DEFİKS, F202)  
SDS (RIEDEL-de HAEN, 03150)  
Sodyum Hidroksit (Merck, 050700)  
Sodyum Klorür (MERCK K, 28713500104)  
Tag DNA Polimeraz (FERMENTAS, 37)  
TRİS base (AMRESCO, 2266B020)  
TRİS-Cl (AMRESCO, 0015B033)  
Western Blot Kağıdı (PIERCE, 88600)

### **Sarf Malzeme**

20 ml'lik Enjektör (AYSET, Türkiye)  
Enjektörlü filtre (por çapı 0,2 µm) (ORANGE SCIENTIFIC, Belçika)  
Film Kaseti (AMERSHAM, İngiltere)  
Mikrobank mikroorganizma saklama tüpü (ABTEK, İngiltere)  
Steril 1,5'lik eppendorf (ORANGE SCIENTIFIC, Belçika)  
Steril PZR tüpü (ORANGE SCIENTIFIC, Belçika)

### **Cihazlar**

Çalkalayıcı (HVD, Avusturya)  
Çalkalayıcı İnkübatör (SHEL LAB, ABD)  
Elektroforez Tankı (SUNRISE, ABD)  
Fotoğraf Makinası (CANON POWER SHOT G5, Kanada)  
Güç Kaynağı (BIO-RAD, ABD)  
İnkübatör (HERAEUS, Almanya)

Kuru Isıtıcı Blok (HVD, Avusturya)

Otoklav (NÜVE, Türkiye)

Otomatik Pipetler (EPPENDORF, Almanya)

Santrifüj büyük (HEROLAB, Almanya)

Santrifüj küçük (EPPENDORF, Almanya)

Transfer Blok (BIOMETRA, Almanya)

UV translüminatör (VIBER-LOURMAT TFX- 20 M, Fransa)

Vorteks (HVD, Avusturya)

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynep Burçin ÇAVUŞOĞLU

Doğum Yeri : Niğde

Doğum Tarihi : 13.09.1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Niğde Anadolu Lisesi (1999-2003)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2004-2008)