

**KLİNİK İZOLATLARDAN ELDE EDİLEN  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARININ FENOTİPİK VE  
GENOTİPİK YÖNTEMLER İLE TANIMLANMASI VE  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**IDENTIFICATION AND COMPARISON OF CLINICAL  
ISOLATE STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS BY  
PHENOTYPING AND GENOTYPING METHODS**

**ESRA DENİZ ÜSLÜ**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
Olarak Hazırlanmıştır

2007

# KLİNİK İZOLATLARDAN ELDE EDİLEN STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARININ FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLER İLE TANIMLANMASI VE KARŞILAŞTIRILMASI

Esra Deniz Üslü

## ÖZ

Nozokomikal enfeksiyon etkeni olarak Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA) görülme sıklığındaki artış ve vankomisine dirençliliğin oluşması izolat karakterizasyonunun hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılmasını ve hastanelerde klonal yayılımın tanımlanmasını gerektirmektedir.

Bu çalışmanın amacı, klinik izolatlardan elde edilen *Staphylococcus aureus* suşlarına ait RAPD bant modellerindeki varyasyonu ve bunlar arasındaki sistematik ilişkiyi ortaya çıkarmaktır. Klinik izolatlara disk difüzyon metodu kullanılarak antibiyotik duyarlılıklarına bakıldı. Bütün izolatlar vankomisine duyarlı bulundu. Bu çalışmada; MSSA için 6 (iki baskın tip-%29.4) ve MRSA için 8 (bir baskın tip-%26.6) farklı antibiyotip paterni belirlendi. 47 *S.aureus* ve kontrol olarak *S.aures* ATCC 29213, *S.epidermidis* ve *S.saprophyticus* 25 farklı primer ile rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) PCR tekniği kullanılarak analiz edildi. Tüm veriler ile UPGMA metodu kullanılarak dendogram çizildi. Rastgele seçilmiş 25 primerden 15'i informatif bulundu. Buna ek olarak; RAPD PCR metodu ile izolatlar MRSA ve MSSA olmak üzere ayrılmıştır. İzolatlardaki genetik uzaklık 0.1142'den 0.9565'ye değişen aralıktadır. Çalışmadan elde edilen veriler bize izolatların antibiyotip paternleri ile RAPD paternlerinin birbiri ile benzer olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Staphylococcus aureus*, RAPD-PCR, UPGMA.

Danışman: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ, Hacettepe Üniversitesi. Fen Fakültesi. Biyoloji Bölümü. Biyoteknoloji Anabilim Dalı

# IDENTIFICATION AND COMPARISON OF CLINICAL ISOLATE STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS BY PHENOTYPING AND GENOTYPING METHODS

Esra Deniz Üslü

## ABSTRACT

The increase in the frequency of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as the causal agent of nosocomial infection and the possibility of emergence of resistance to vancomycin demands a quick and trustworthy characterization of isolates and identification of clonal spread within hospitals.

The objective of this study is to establish variations of RAPD band patterns in *Staphylococcus aureus* strains which are collected from clinical isolates and its systematic relationship between them. Antimicrobial susceptibility tests of clinical isolates were performed by the disc diffusion method. All the isolates were susceptible to vancomycin. In this study different antibiotype patterns were determined; 6 for MSSA (with two dominant patterns-%29.4) and 8 for MRSA (with one dominant pattern-%26.6). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR method with 25 different primers was analysed on 47 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *S.aures* ATCC 29213, *S.epidermidis* and *S.saprophyticus* as controls. All the data were employed to construct dendrograms using the UPGMA. Randomly selected 15 primers were informative out of 25. In addition, RAPD PCR method differentiated between MRSA and non-MRSA based on the clustering. The overall genetic distances ranged from 0.1142 to 0.9565 among the isolates. These data suggested that the antibiotype patterns of the isolates were identical to RAPD patterns.

**Key Words:** *Staphylococcus aureus*, RAPD-PCR, UPGMA.

Advisor: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ, Hacettepe University, Faculty Of Science, Biology Department, Biotechnology Section

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam sırasında, ihtiyacım olan her an bilgisi, tecrübeleri ve tüm içtenliğiyle devamlı yanımda olan değerli hocam Prof.Dr. Nilüfer Aksöz'e;

Bu çalışmamın bir proje olarak kabul edilmesinde ve gereken maddi desteğin Tübitak tarafından sağlanmasında büyük emeği olan, lisans ve yüksek lisans öğrenim hayatım boyunca beni yüreklendiren hocam Dr. Işıl Seyis'e;

Çalışmam sırasında bana laboratuvarlarını açan hocam Prof.Dr. Afife İzbirak'a, yine çalışmamın deneysel aşamalarında laboratuvarlarından ve engin tecrübelerinden yararlandığım, sorularımı hiçbir zaman cevapsız bırakmayan hocam Dr. Mehmet Karcicio'ya;

Çalışmamın deney aşamalarında aynı ortamda bulunmasak da telefonun diğer ucundan benden yardımlarını esirgemeyen Uzman Gonca Aykut'a;

Bilgisayar programlarının kullanılmasında yardımcı olan ve katkılarda bulunan Dr. Sibel Ünlü'ye;

Deneyletimde bana bıkmadan usanmadan yardımlarını esirgemeyen Güneş Kimyon ve Elif Böcügözlü'ye;

Yüksek lisans hayatım boyunca her zaman yanımda olan, desteğini her an hissettiğim, her zorlukta yardımına koşan değerli dostum Neslihan Sürücü'ye;

Tüm çalışmalarım boyunca maddi manevi her an yanımda olan ve beni akademik yolda destekleyen aileme, desteklerine ihtiyaç duyduğum her an yanı başımda olan ağabeyim Murat Üslü ve ablam Nevin Ata'ya;

Çalışmalarım boyunca sıkıntılarımı paylaşan, neşe kaynağım olan kardeşim, oğlum, biricik yeğenim Onur Ata'ya;

Çalışmam sırasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmamda çektiği resimlerle tezimi renklendiren, sonsuz sevgisi ile her zaman desteğim olan Onur Candan'a;  
Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	3
2.1.Genel Mikrobiyolojik Özellikleri .....	3
2.1.1.Antijen Yapıları .....	4
2.1.1.1.Peptidoglikan .....	4
2.1.1.2.Teikoik Asit .....	4
2.1.1.3.Protein A.....	5
2.1.1.4.Kümeleştirici Faktör .....	5
2.1.2.Patojenik Faktörler.....	5
2.1.2.1.Toksinler .....	5
2.1.2.1.1.Sitolitik Toksinler.....	5
2.1.2.1.2.Lökosidin .....	6
2.1.2.1.3.Enterotoksinler.....	6
2.1.2.1.4.Eksfoliatif Toksin.....	7
2.1.2.1.5.Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1).....	7
2.1.2.2.Enzimler.....	7
2.1.2.2.1.Koagülaz.....	7
2.1.2.2.2.Katalaz.....	7
2.1.2.2.3.Deoksiribonükleaz .....	8
2.1.2.2.4.Hiyalüronidaz (yayıma faktörü) .....	8
2.1.2.2.5.Lipaz .....	8
2.1.2.2.6.Fibrinolizin (Sitafilokinaz) .....	8
2.1.2.2.7.β-Laktamazlar .....	8
2.2.Yaptığı Hastalıklar .....	8
2.2.1.İnvaziv Hastalıklar .....	9
2.2.1.1.Deri Enfeksiyonları.....	9

2.2.1.2.Sistemik Enfeksiyonlar.....	10
2.2.2.Toksijenik Hastalıklar.....	10
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta Antibiyotik Direnç Mekanizması .....	13
2.3.1.Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	13
2.3.1.1.Homojen Direnç.....	14
2.3.1.2.Heterojen Direnç.....	14
2.3.2.Modified Resistant <i>S.aureus</i> (MODSA) .....	14
2.3.3.Borderline methicilline susceptible [BSSA] veya Borderline oxacilline resistant <i>S.aureus</i> [BORSA].....	14
2.4.Tanı .....	15
2.4.1.Fenotipik Yöntemler.....	15
2.4.2.Genotipik Yöntemler .....	16
2.4.2.1.RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) .....	16
2.4.2.2.Diğer Yöntemler.....	17
2.5.Filogeni.....	18
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1.Çalışmada Kullanılan Bakteriler.....	19
3.3.İzolatların Teşhisi.....	20
3.3.1.Kanlı Agar $\beta$ - Hemoliz.....	20
3.3.2.Gram Boyama .....	20
3.3.3.Mannitol Tuzlu Agar (MSA) Besiyeri'nde Mannitol Fermentasyonu .....	21
3.3.4.DNaz Agar Besiyeri'nde Deoksiribonükleaz (DNase) Üretimi.....	21
3.3.5.Koagülaz Varlığının Saptanması .....	22
3.3.6.Katalaz Varlığının Saptanması .....	22
3.4.Antibiyotipleme .....	23
3.4.1.Antibiyotiplerin Belirlenmesi.....	23
3.4.2.Antibiyotiplerin Oranının Belirlenmesi.....	24
3.4.3.MRSA ve MSSA'ların Kullanılan Antibiyotiklere Direnç Oranlarının Saptanması .....	24
3.5.DNA İzolasyonu.....	24
3.6.RAPD-PCR.....	26
3.6.1.RAPD- PCR Reaksiyonu .....	26
3.6.2.Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezisi İle Kontrolü .....	29
4.SONUÇLAR.....	32

4.1.Çalışmada Kullanılan Bakteriler:.....	32
4.2.İzolatların Teşhis Sonuçları .....	33
4.3.Antibiyotiplerin Belirlenmesi.....	37
4.3.1.Antibiyotiplerin Oranının Belirlenmesi.....	40
4.3.2.MRSA ve MSSA'ların Kullanılan Antibiyotiklere Direnç Oranlarının Saptanması .....	41
4.4.RAPD PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi.....	42
4.5.Kümeleme Analizi Sonuçları.....	57
5.TARTIŞMA .....	59
6.KAYNAKLAR: .....	65
ÖZGEÇMİŞ .....	73

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. <i>S.aureus</i> 'un neden olduğu bazı hastalıklar. ....	12
Şekil 3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un koloni morfolojisi.....	19
Şekil 3.2. <i>Staphylococcus aureus</i> (a) ve <i>Staphylococcus epidermidis</i> (b) suşlarının hemoliz tipi.....	20
Şekil 3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un ışık mikroskopunun x100'lük objektifteki görüntüsü.....	20
Şekil 3.4. <i>Staphylococcus aureus</i> (a-pozitif) ve <i>Staphylococcus epidermidis</i> (b-negatif) izolatlarının Mannitol Tuzlu Agar Besiyeri'ndeki gelişimi. ....	21
Şekil 3.5. <i>Staphylococcus aureus</i> (a-pozitif) ve <i>Staphylococcus epidermidis</i> (b-negatif) izolatlarının DNaz Besiyeri'ndeki gelişimi. ....	21
Şekil 3.6. <i>Staphylococcus aureus</i> (a-pozitif) ve <i>Staphylococcus epidermidis</i> (b-negatif) izolatlarında koagülaz testi. ....	22
Şekil 3.7. <i>Staphylococcus aureus</i> (a-pozitif) ve <i>Staphylococcus epidermidis</i> (b-negatif) izolatlarında katalaz testi. ....	22
Şekil 3.8. Santrifüj işlemi. ....	25
Şekil 3.9. Karışımın uygulanacağı spin kolon. ....	25
Şekil 3.10. RAPD PCR reaksiyon karışımının hazırlanması. ....	26
Şekil 3.11. PCR cihazı.....	27
Şekil 3.12. Agarozun hassas terazide tartımı ve mikrodalga fırında eritilmesi.....	29
Şekil 3.13. Boyanın agaroz jele eklenmesi. ....	29
Şekil 3.14. Agaroz jelin dökülmesi. ....	30
Şekil 3.15. Örneklerin agaroz jele yüklenmesi.....	30
Şekil 3.16. Yatay agaroz jel elektroforezi düzeneği. ....	31
Şekil 4.1. MSSA suşlarının hastalara ait klinik örneklerle göre yüzde dağılımı.....	32
Şekil 4.2. MRSA suşlarının hastalara ait klinik örneklerle göre yüzde dağılımı. ....	33
Şekil 4. 3. MSSA ve MRSA'larda direnç oranı. ....	41
Şekil 4. 4. B0043-1 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	42
Şekil 4.5. B0043-2 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	43
Şekil 4.6. B0043-4 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	43



Şekil 4.7. B0043-6 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	44
Şekil 4.8. B0043-7 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	44
Şekil 4.9. B0043-9 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	45
Şekil 4.10. B0043-10 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	45
Şekil 4.11. B0043-11 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	46
Şekil 4.12. B0043-12 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	46
Şekil 4.13. B0043-13 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	47
Şekil 4.14. B0043-14 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	47
Şekil 4.15. B0043-16 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	48
Şekil 4.16. S19 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	48
Şekil 4.17. S21 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	49
Şekil 4.18. S24 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	49
Şekil 4.19. S31 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	50
Şekil 4.20. S33 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	50
Şekil 4. 21. S112 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	51
Şekil 4.22. S144 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	51
Şekil 4.23. S224 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	52

Şekil 4.24. S252 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	52
Şekil 4.25. S312 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	53
Şekil 4.26. S1112 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	53
Şekil 4.27. S1452 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	54
Şekil 4. 28. UPGMA metoduyla oluşturulan ve <i>Staphylococcus aureus</i> örnekleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendogram. ....	58

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1: Klinik önemi olan üç türün ayırımında kullanılan testler (Kaiser, 2005)...	4
Çizelge 2.2: Klinik olgularda sık rastlanan stafilokok türleri ve oluşturdukları enfeksiyonlar (Foster, 1996; Özerol, 2001; Zinsser, 2005).....	11
Çizelge 3.1: CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından önerilen zon tablosu (CLSI, 2005).....	23
Çizelge 3.2: RAPD-PCR reaksiyon karışımı.....	27
Çizelge 3.3: RAPD PCR döngüsü.....	27
Çizelge 3.4: RAPD PCR reaksiyonunda kullanılan primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve % GC oranları.....	28
Çizelge 4.1: Stafilokok suşlarının toplu test sonuçları.....	34
Çizelge 4.2: Metisilin hassas <i>Staphylococcus aureus</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	37
Çizelge 4.3 : Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	38
Çizelge 4.4 : MSSA'ların antibiyotik duyarlılık profilleri ve antibiyotip dağılımları.....	40
Çizelge 4.5 : MRSA'ların antibiyotik duyarlılık profilleri ve antibiyotip dağılımları. ...	40
Çizelge 4.6 : Rastgele primerlerin oluşturduğu monomorfik ve polimorfik bant sayıları.....	56

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
AMC	Amoksisilin-Klavulonik Asit
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bronko Alveolar Lavaj
bç	Baz çifti
BHI	Brain Heart İnfusion
BSSA	Borderline methicilline susceptible <i>S.aureus</i>
BORSA	Borderline oxacilline resistant <i>S.aureus</i>
C	Sitozin
CRF	Coagulase-reacting factor
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institue
CN	Gentamisin
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DTA	Derin Trekeal Aspirasyon
E	Eritromisin
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ERIC	Enterobacterial repeat intergenic consensus
G	Guanin
IgG	İmmünoglobulin G
kb	Kilobaz
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokoklar
M	Molar
MHA	Mueller-Hinton Agar
mM	Milimolar
MODSA	Modified (Intermediate) resistant <i>S.aureus</i>
MSSA	Metisilin Hassas <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSA	Mannitol salt agar (Mannitol tuzlu agar)
NTSYS-PC	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
OX	Oksasilin
P	Penisilin

PBP	Penisilin bağlayan protein
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RA	Rifampin
RAPD	Random amplified polymorphic DNA (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
REP	Repetitive Extragenic Palindromic
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
S	Streptomisin
SAHN	Sequential, agglomerative, hierarchical and nested clustering
SAM	Sulbaktam-ampisillin
SIMQUAL	Similarity for Qualitative Data
SSS	Scalded skin syndrome (Haşlanmış deri sendromu)
T	Timin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tetrasiklin
TM	Torasentez Mayi
TSS	Toxic shock syndrome (Toksik şok sendromu)
TSST-1	Toksik şok sendromu toksini-1
UPGMA	Unweighted pair group method using arithmetic averages/ aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu
VA	Vankomisin
µl	Mikrolitre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta

## 1. GİRİŞ

*Staphylococcus* türleri 100 yıldan uzun bir süredir insanlarda tehlikeli bir patojen olarak karşımıza çıkmaktadır (Lowy, 1998). Hastane gibi insanların toplu halde bulunduğu ortamlarda sıklıkla rastlanması ve fazla dirençlilik göstermesinden dolayı prevalansının artması ile bazı önemli sağlık problemlerini de beraberinde getirmektedir (van Leeuwen et al., 1999; Günaydın et al., 2002). *Staphylococcus aureus* insanlarda deri ve subkutanöz doku enfeksiyonları, yüksek mortalite oranı ile seyreden bakteriyemi ve endokardit, ürettiği enterotoksin ile besin zehirlenmesi ve toksik şok sendromu (TSS) gibi klinik olarak önemli çok sayıda enfeksiyonlara neden olmaktadır (Kluytmans et al., 1995; Lowy, 1998; Onasanya et al., 2003). Bu türlere et, süt, peynir gibi hayvansal ürünlerde rastlanabildiği gibi, stafilokokların toprak, su, toz ve hava gibi kaynaklardan da izole edilmesi mümkündür (Wieser and Busse, 2000).

Penisilin ile *Staphylococcus* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiş olmasına rağmen 1942 yılında penisilinaza dayanıklı *Staphylococcus* suşlarının saptanması antibiyotiklere dirençlilik problemini gündeme getirmiştir (Smith and Jarvis, 1999). Ayrıca 1959 yılında semisentetik bir penisilin olan metisilin kullanıma girmesi ile birlikte 1961 yılında metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA – Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus*) suşları Avrupa'da saptanmış olup bu bakterilerin insidansının ülkeden ülkeye farklılık gösterdiği görülmüştür (Kluytmans et al., 1995; Smith and Jarvis, 1999). MRSA, 1980'li yıllardan sonra tüm dünyada hastane enfeksiyonu etkenleri arasında çok önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır (van Leeuwen et al., 1996; Tambic et al., 1997).

*Staphylococcus aureus*'un yayılmasını önleme, enfeksiyon kaynağını saptama ve ortadan kaldırılmasına ilişkin çalışmalar, kökenlerinin doğru tanımlanmasını ve tiplendirmelerini gerektirmektedir (Tenover et al., 1994). Son yıllarda bakterilerin tanımlanması fenotipik ve genotipik olarak iki tipte yapılmaktadır. Genetik tiplendirme patojen mikroorganizmaların tanımlanmasında tercih edilmekte ve biyolojik çeşitliliğin tanımlanması, hastalıkların temelini aydınlatılması, mikroorganizma (patojen ve

patojen olmayan) konak (insan, hayvan, bitki) ilişkisindeki konakçı yatkınlığının belirlenmesi, bireyin genotipine göre ilaç geliştirilmesi ve adli konuların aydınlatılması gibi işlemlerde de oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR - Polymerase Chain Reaction)'na dayalı yöntemler; mikroorganizmalarda çeşitliliğin saptanmasında ve teşhiste büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Dendogram ve filogenetik ağaçlar şeklinde ifade edilen çeşitlilik haritaları bakteri popülasyonunu farklı taksonomik seviyelere ayırarak, doğal bir popülasyonu sınıflandırmamızı sağlamaktadır. Teşhis ise doğrudan doğruya hastalık tanısı ile ilişkilidir, mümkün olduğunca hızlı ve oldukça özgül olmalıdır. Bu özgülük ancak ilgili organizmaya özel primerlerin tasarlanması ve uygun PCR koşullarının oluşturulması ile sağlanabilmektedir (van Belkum et al., 1993).

Bu çalışmanın amacı, PCR temeline dayanan tiplendirme yöntemlerinde biri olan RAPD PCR (Random Amplified Polymorphic DNA – Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) kullanılarak, geniş bir yayılım ve yüksek dirençlilik gösteren *Staphylococcus aureus* suşlarındaki genetik çeşitlenmeye moleküler düzeyde açıklık getirmektir.

Bu çalışmada, kullanılan örnekler Ekim 2003 ve Kasım 2005 tarihlerinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yatan hastalardan izole edilmiştir. *Staphylococcus aureus* izolatları, laboratuarlarda sıklıkla kullanılan fenotipik bir tiplendirme yöntemi olan antibiyotik duyarlılık testleri ve geniş alanda hızlı bir şekilde yayılıp kabul gören, ekonomik, basit, duyarlı ve oldukça hızlı genotipik bir tiplendirme yöntemi olan RAPD-PCR analizi yöntemleri ile tiplendirilmiştir.

Çalışmada, izolatların çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıkları incelenmiş, çoklu direnç gösteren ve tedavi seçeneklerinin oldukça kısıtlı olduğu MRSA suşlarının önemi bir kez daha bu çalışma ile ön plana çıkarılmıştır. Bu çalışmada izolatlarımızın analizi için kullanılacak primerlerin tayini amacıyla yurt içi ve yurt dışı benzer çalışmalar taranmış ve anlamlı sonuçlar verdiği belirlenen primerler RAPD PCR yöntemi uygulanarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların ülkemizde yapılacak olan çalışmalara büyük katkısı olacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

"*Staphylococcus*" adı Yunanca "üzüm salkımı" anlamına gelen "staphylé" teriminden gelmektedir (Bauer et al., 1974). *Staphylococcus*, ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından irinde görülmüş, 1881 yılında İskoçyalı cerrah Alexander Ogston tarafından yaralarda saptanmış ve 1884 yılında ilk kez Rosenbach tarafından izole edilmiş olup insan sağlığı açısından son derece tehlikeli enfeksiyonlara neden olan *Micrococcaceae* ailesi üyesi sporsuz bakterilerdir (Zinsser, 2005).

### 2.1. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri

Stafilokoklar Gram pozitif, 0.5-1.5 µm çapında, yuvarlak, çoğunlukla düzensiz üzüm salkımı şeklinde kümeler, bazen de dördü ve kısa zincirler şeklinde görülen, hareketsiz, sporsuz, optimal olarak 37°C'de ve pH 7,4'te üreyen, fakültatif anaerop mikroorganizmalardır (Sneath et al., 1986). Yuvarlak, düzgün, opak, 1-3 µm çapında hafif konveks kolonilere sahiptir. *Staphylococcus aureus* kolonileri daha büyüktür ve parlaktır, altın sarısı renginde pigment oluştururlar. *S.epidermidis* kolonileri ise daha küçüktür ve pigment oluşturmazlar (Bauer et al., 1974; Sneath et al., 1986).

Micrococcaceae ailesinin üyesi olan stafilokokların patojen olmayan diğer Micrococcaceae üyelerinden ayırımı bazı testlerle yapılmaktadır. Bu testler insanda patojen olan stafilokoklar için pozitif olmalıdır.

- Glukozdan anaerop ortamda asit oluşumu
- 200 µg/ml lizostafine duyarlı olmaları
- 0.4 µg/ml eritromisin varlığında gliserolden asit oluşumu

Stafilokokların *S.aureus*, *S.epidermidis* ve *S.saprophyticus* olmak üzere üç türü insan patojenidir. Bunlardan *S.aureus* en önemlisidir. *S.aureus* diğerlerinden esas olarak koagülaz üretmesi ile ayırt edilmektedir. Koagülaz üretmeyen diğer stafilokoklar Koagülaz Negatif Stafilokoklar (KNS) olarak adlandırılmaktadır (Foster, 1996).

Klinik önemi olan bu üç türün ayırımında koagülaz enzimi oluşturma özelliğinin yanı sıra; Hemoliz özelliği, Mannitol fermentasyonu ile asit oluşumu, DNaz varlığı,



Novobiosine dirençlilik, Anaerobik ortamda üreme ve Pigment oluşumu gibi bazı biyokimyasal testler yapılmaktadır (Kaiser, 2005) (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1: Klinik önemi olan üç türün ayırımında kullanılan testler (Kaiser, 2005).

Testler	<i>S.aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>
Koagülaz	+	-	-
Mannitol fermentasyonu ile asit oluşumu	+	-	+
DNaz	+	-	-
Novobiosine dirençlilik	-	-	+
Anaerobik ortamda üreme	+	+	-
Hemoliz	+	-	-
Pigment oluşumu	Altın sarısı	Beyaz	Limon sarısı

### 2.1.1. Antijen Yapıları

#### 2.1.1.1. Peptidoglikan

*Staphylococcus aureus* hücre duvarının temel bileşeni olan peptidoglikan hücre duvar ağırlığının %50'sini oluşturur. Organizmaya dayanıklılık ve şekil veren bu yapı peptid çapraz bağlı glikan zincirlerinden oluşmuştur (Kingsbury and Wagner, 1992).

#### 2.1.1.2. Teikoik Asit

Hücre duvar ağırlığının %40'ını oluşturan ve ribitol fosfat polimeri olan bu antijenik yapı sitafilokokların mukoza hücrelerine yapışmasına aracılık ederler. Teikoik asitlerin bazısı peptidoglikana kovalent bağlıdır ve "hücre duvar teikoik asitleri" adını alırlar, diğerleri bakteriyel hücre membranının lipidlerine bağlıdır ve "membran teikoik asitleri" adını alırlar. Stafilocokların türe özgü antijenleri teikoik asitlerdir (Kingsbury and Wagner, 1992).

### **2.1.1.3. Protein A**

*Staphylococcus aureus*'ta bulunan bu antijenik yapı hücre duvarının ana proteindir. Moleküler ağırlığı 42 dalton olan gruba özel bir antijendir. Komplemanın bağlanmasını önlemek üzere IgG'nin Fc parçasına bağlandığından önemli bir virülans faktördür. Bunun sonucunda C3b oluşmaz ve organizmanın opsonizasyonu ve fagositoza uğraması büyük ölçüde azalır. Protein A IgG'ye bağlanması ve antijen-antikor karmaları ile "koagültinasyona uğraması" nedeniyle bazı laboratuvar testlerinde kullanılır (Foster, 1996; Tünger vd., 2003).

### **2.1.1.4. Kümeleştirici Faktör**

Hücre duvarında bulunan bu madde plazma varlığında sitafilokok hücrelerinin kümeleşmesini sağlamaktadır, bağlı koagülaz olarak bilinen "clumping faktör", Stafilokokların hücre yüzeyinde meydana gelir ve serbest kalmaz (Moreillon et al., 1995).

## **2.1.2. Patojenik Faktörler**

Stafilokoklar hem toksin üretimi hem de dokularda üreyip yangıya neden olarak hastalığa neden olurlar. Stafilokok tarafından bir çok önemli toksin ve enzim oluşturulur. Bunlar sırasıyla aşağıda özetlenmiştir.

### **2.1.2.1. Toksinler**

*Staphylococcus aureus*'un sitolitik toksin, lökosidin, enterotoksin, eksfoliatif toksin, toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1) gibi çeşitli toksinleri bulunmaktadır.

#### **2.1.2.1.1. Sitolitik Toksinler**

Membrana hasar veren toksinlerdir. Bu toksinler  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Foster, 1996; Özerol, 2001; Zinsser, 2005).

$\alpha$  toksin ( $\alpha$  hemolizin) : Bakteriyel kromozomlarda ve plazmidlerde kodlanır. Etki alanı geniş olup güçlü membran hasar proteinidir. Hücre membranları üzerinde litik etkiye sahiptir.

$\beta$  toksin : İnsan eritrositleri üzerinde toksik etki gösterir. Stafilokok sfingomiyelinazı olarak da adlandırılır.

$\gamma$  toksin :  $\beta$  toksin gibi insan eritrositleri üzerinde toksik etki gösterir. İki komponentli bir yapıya sahiptir.

$\delta$  toksin : Yapı olarak deterjana benzemektedir. Termostabil ve litik ve sitotoksik aktivite spektrumu geniştir.

#### **2.1.2.1.2. Lökositidin**

S ve F olmak üzere iki parçadan oluşan bu toksin parçaların sinerjik etkisiyle sitoplazmanın degranülasyonuna, hücre şişmesine ve erimesine neden olmaktadır (Vandenesch et al., 2003).

#### **2.1.2.1.3. Enterotoksinler**

Isıya dirençli (kaynamaya 30 dakika dayanıklı) olan bu toksin özel antijen yapısına sahiptir. Özellikle yüksek CO<sub>2</sub>'li, karbonitratlı ve proteinli besin maddeleri içeren ortamlarda üreyen sitafilokoklar tarafından meydana getirilir. Bu besinlerin yenilmesi halinde gastrointestinal bulgularla seyreden besin zehirlenmeleri ortaya çıkar (Bilgehan, 1990).

Toxin A : Besinlerde preforme şekilde oluşur, besin zehirlenmesi yapar.

Toksin B : Stafilokoksik pseudomembranöz enterokolit'e neden olur.

Toksin C ve D : Süt ürünlerini kontamine eder.

Toxin F : Toksik şok sendromu toksinine benzer etkileri vardır (Özerol, 2001).

#### **2.1.2.1.4. Eksfoliatif Toksin**

A ve B olmak üzere iki tipi vardır. Küçük çocuklarda “haşlanmış deri sendromu”na neden olan faj grup II stafilokoklar tarafından üretilen bir proteindir (Kapral, 1971).

#### **2.1.2.1.5. Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1)**

Toksik şok sendromuna neden olan ve bir çok *Staphylococcus aureus* tarafından oluşturulan toksindir. Geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir (Hayes et al., 1984; Foster, 1996).

#### **2.1.2.2. Enzimler**

*Staphylococcus aureus*'un koagülaz, deoksiribonükleaz, hiyalüronidaz, lipaz, fibrinolizin,  $\beta$ -Laktamaz gibi çeşitli enzimleri bulunmaktadır (Foster, 1996; Zinsler, 2005).

##### **2.1.2.2.1. Koagülaz**

*Staphylococcus aureus* tarafından oluşturulan bir plazma pıhtılaştırma proteindir. Serbest ya da bağlı koagülaz (clumping faktör) olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Serbest koagülaz, CRF (coagulase-reacting factor) ile reaksiyona girerek trombine benzer yapıda “stafilotrombin”i oluşturur ve stafilotrombin de fibrinojeni fibrine dönüştürmeyi katalizler. Bağlı koagülaz doğrudan fibrinojeni fibrine dönüştürebilir ve stafilokokların kümeleşmesine neden olur. Bakteri bu olayın sonucunda etrafı fibrin ile sarıldığından opsonizasyon ve fagositoza karşı dirençli hale gelir (Foster, 1996).

##### **2.1.2.2.2. Katalaz**

Tüm Stafilokoklarda bulunan bu enzim, etkisini fagositlerin solunum siklusları için gerekli olan  $H_2O_2$ 'yi inaktive edip bakterisidal etkilerini ortadan kaldırarak gösterir (Özerol, 2001).

### **2.1.2.2.3. Deoksiribonükleaz**

DNA'yı hidrolize eden bu enzim Stafilokokların çoğunda bulunmaktadır (Zinsser, 2005).

### **2.1.2.2.4. Hiyalüronidaz (yayılma faktörü)**

Bağ dokusunun yapısında bulunan hiyalüronik asitin hidrolizine neden olan bu enzim *Staphylococcus aureus*'un dokularda yayılımını kolaylaştırarak enfeksiyonun yayılmasına yardımcı olur (Rollof and Normark, 1992; Zinsser, 2005).

### **2.1.2.2.5. Lipaz**

Bu enzim, dokuda bulunan lipid yapıyı parçalayarak kutanöz (deri) ve subkutanöz (deri altı) dokuda organizmanın yayılmasına yardım eder (Zinsser, 2005).

### **2.1.2.2.6. Fibrinolizin (Stafilokinaz)**

Fibrin pıhtısını parçayarak enfeksiyonun komşu dokulara yayılmasına yardım eder (Foster, 1996).

### **2.1.2.2.7. $\beta$ -Laktamazlar**

$\beta$ -Laktamazlar, bakterilerin  $\beta$ -Laktam antibiyotiklere karşı direnç kazanmasında rol oynar. Stafilokoklar, 1941'de penisilinin kullanılmasından sonra çok hızla direnç geliştirmiş ve  $\beta$ -Laktamaz (penisilnaz) üretme yeteneği plazmid aracılığıyla bakteriler arasında hızla yayılmıştır (Smith and Jarvis, 1999).

## **2.2. Yaptığı Hastalıklar**

*Staphylococcus aureus*, hastalandırıcı özellikteki çeşitli maddeleri salgılayarak, konağın biyolojik durumuna bağlı olarak, bir çok klinik tablonun ortaya çıkmasına neden olur. *Staphylococcus aureus*'un yaptığı hastalıkları invaziv ve toksijenik olarak ikiye ayırabiliriz :

### 2.2.1. İnvaziv Hastalıklar

Bu tip enfeksiyonlara abse oluşumu ile karakterize edilir. Sağlıklı bireylerde deri dokusunda çıkan abseler bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde herhangi bir organ sisteminde derin abseler şeklinde olabilir.

#### 2.2.1.1. Deri Enfeksiyonları

**Piyoderma** : Kaşınma, travma, tahriş, ısırık yarası gibi bir nedenle oluşan deri yaralarının enfekte olmasıdır. Genellikle ılık veya nemli iklimlerde yaşayan çocuklarda rastlanır (Wagner, 1990).

**Follükülit** : Kıl diplerinde oluşan deri enfeksiyonudur (Şekil 2.1-a). Tek kıl folikülünün ve çevre dokunun iltihaplanmasıyla oluşur (Özerol, 2001).

**Karbonkül** : Deri ve deri altı dokuda yerleşen birbiri ile bağlantılı birden fazla fronkül gruplarında oluşur (Şekil 2.1-b). Ağrılıdır ve biriken irinin boşaltılması için cerrahi girişim gerekir (Kaiser, 2005).

**Fronkül** : Başlangıçta follükülite benzer daha sonra deri altı dokuya yayılarak daha geniş bir alanı kaplar (Şekil 2.1-c). Geniş, ağrılı, kabarık nodüllerin etrafında ölü ve nekrotik doku oluşur (Özerol, 2001; Kaiser, 2005).

**İmpetigo** : Genellikle küçük çocuklarda görülen öncelikle yüz, kol ve bacaklarda gelişen yüzeysel enfeksiyondur (Özerol, 2001) (Şekil 2.1-d).

**Mastit (Meme inflamasyonu)** : Emziren annelerde görülen meme iltihabıdır (Haznedaroğlu, 2007).

**Yara Enfeksiyonları** : Travma ve ya cerrahi uygulama sonrası oluşabilir. *Staphylococcus aureus* ile kolonize deriden yara içerisine girebilir. Bu sayede deri enfeksiyonları hızla yayılarak sistemik enfeksiyonlara dönüşebilir (Foster, 1996; Kaiser, 2005).

**Süpüratif hidradenit** : Apokrin ter bezlerinin enfeksiyonudur (Dündar ve Dündar, 2002).

### 2.2.1.2. Sistemik Enfeksiyonlar

**Pnömoni** : *Staphylococcus aureus*'un solunum yolu ile alınması ya da kan yolu ile akciğerlere yerleşmesi sonucu oluşmaktadır. Akciğerlerde geniş abseler oluşturabilir ya da etken diğer organlara yayılır (Şekil 2.1-e). Çocuklarda kan yolu ile primer nitelikte, yaşlılarda viral pnömoniler ya da üst solunum yolu hastalıklarından sonra sekonder olarak ortaya çıkmaktadır. Hastanelerde yeni doğanlar arasında gruplar halinde salgınlar görülebilir. Mortalitesi yüksektir (Bilgehan, 1990; Özerol, 2001).

**Ampiyem** : Vücut boşluklarına özellikle göğüs boşluğuna irin içeren sıvı sızması durumudur. Belirtileri; ateş yüksekliği, öksürük, göğüs ağrısı ve nefes darlığıdır (Kalaycı, 2000).

**Bakteriyemi ve endokarditler** : *Staphylococcus aureus*'a bağlı gelişen bakteriyemilerde klinik tablo oldukça ağırdır. Ateş ve birçok organda gelişen metastatik abselere bağlı olan semptom ve bulgularla seyreder. *Staphylococcus aureus* bakteriyemisinin ana komplikasyonlarından birisi endokardittir (Bilgehan, 1990).

**Osteomyelit** : *Staphylococcus aureus*'un kemik dokusunda meydana getirdikleri enfeksiyondur (Şekil 2.1-f). Yüksek ateş ve ani başlayan lokalize kemik ağrıları görülmektedir (Özerol, 2001).

**Parotitis** : Parotis bezi ve stemon kanallarının enfeksiyonudur (Özerol, 2001).

### 2.2.2. Toksikjenik Hastalıklar

**Besin Zehirlenmesi** : Stafilokokların pasta, süt, krema, et ve benzeri besin maddeleri içerisinde üreyerek oluşturdukları enterotoksinlerin, ağız yolu ile alınması sonucu ortaya çıkmaktadır. Hastalık 1-6 saatlik kuluçka döneminden sonra bulantı, kusma ve ishal ile seyreder (Bilgehan, 1990; Kaiser, 2005)

**Haşlanmış Deri Sendromu (Scalded Skin Syndrome SSS):** Faj II grubu *Staphylococcus aureus*'lar tarafından oluşturulan eksfoliatin toksini nedeniyle gelişen bir hastalıktır. En çok çocuklarda ve yeni doğanlarda görülür. Vücutta, özellikle ağız çevresinde güneş yanığına benzer parlak kırmızı pül (çevresi belirgin, büyük vezikül) oluşumu ve deride geniş alanları kaplayan soyulma ile karakterizedir (Şekil 2.1-g). Bu sendroma soyulmuş derinin görünümü nedeniyle "haşlanmış deri sendromu" denir (Özerol, 2001; Kaiser, 2005; Zinsser, 2005).

**Toksik Şok Sendromu (Toxic Shock Syndrome TSS) :** Menstrüasyon esnasında tampon kullanan kadınlarda (vakaların %46-80'i) ve yara enfeksiyonu bulunan olgularda kolonizasyon TSS'ye neden olmaktadır. Ani başlayan yüksek ateş, şiddetli sulu ishal ve kas ağrılarını takiben hipotansiyon ve ciddi olgularda şok ile karakterize olan hastalıktır (Özerol, 2001).

Yukarıda söz konusu edilen hastalıkların patojen stafilokok türleri arasındaki dağılımı Çizelge 2.2.'de görülmektedir.

Çizelge 2.2: Klinik olgularda sık rastlanan stafilokok türleri ve oluşturdukları enfeksiyonlar (Foster, 1996; Özerol, 2001; Zinsser, 2005).

Enfeksiyon	<i>S.aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>
Septisemi	+	+	-
Endokardit	+	+	-
Pnömoni	+	+	-
Ampiyem	+	+	-
Artrit	+	+	-
İmpetigo	+	+	-
Üriner sistem enfeksiyonu	+	+	+
Abse	+	-	-
Osteomyelit	+	-	-
Enterit	+	-	-
Toksik şok sendromu	+	-	-
Haşlanmış deri sendromu	+	-	-





a) Follükülit (Beers, 2003).



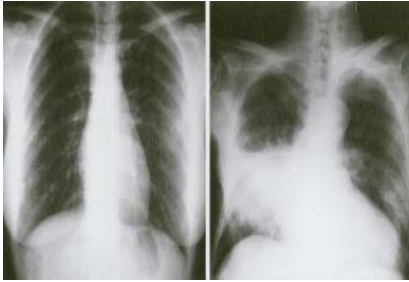
b) Karbonkül (Beers, 2003).



c) Fronkül (Hughey, 2001).



d) İmpetigo (CDC, 2006).



e) Pnömoni (CDC, 2006).



f) Osteomiyelit (Tacher, 2001).



g) Haşlanmış Deri Sendromu (Hussein, 2006).

Şekil 2. 1. *S.aureus*'un neden olduğu bazı hastalıklar.

### **2.3. *Staphylococcus aureus*'ta Antibiyotik Direnç Mekanizması**

*Staphylococcus aureus* insanda hastalık etkeni olarak sık rastlanan, virölansı yüksek bir mikroorganizmadır. Penisilinin kullanıma girmesi ile birlikte *S.aureus* suşlarında  $\beta$ -laktamaza bağlı penisilin direnci 5 yıl içinde %50'ye çıkmıştır bugün ise bu direnç %95'in üzerindedir (Dündar, 2000). 1959 yılında semisentetik penisilinin kullanıma girmesi ile birlikte iki yıl içinde metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları saptanmıştır (Smith and Jarvis, 1999). Bilindiği gibi MRSA suşları  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine dirençli olup  $\beta$ -laktam dışı antibiyotiklerin çoğuna da direnç göstermektedir. Penisilinazlara (beta laktamaz) direnç gösteren *S. aureus* suşlarını temel olarak 3 gruba ayırmak mümkündür:

#### **2.3.1. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

Bu suşlar *mecA* geni tarafından kodlanan yeni ve düşük afiniteli bir penisilin bağlayan protein (PBP2a) yapan suşlardır. Bilindiği gibi penisilin bağlayan protein (PBP) bakteri hücre membranında bulunan  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin bağlandığı hedef proteinlerdir.  $\beta$ -laktam antibiyotikler bu proteinlere bağlanarak bakteri hücre duvarını inhibe ederler (Chambers and Sachdev, 1992). Bu tip direnç bakteri hücre duvarında bulunan farklı bir PBP olan PBP2a ile gerçekleşmektedir. Bu proteinin  $\beta$ -laktam antibiyotiklere olan affinitesi daha düşüktür. Bu nedenle metisiline dirençli bakteri  $\beta$ -laktam antibiyotiklerle karşılaştığı zaman diğer tüm PBP'ler antibiyotik tarafından bloke edileceğinden bu protein düşük affinite sebebiyle  $\beta$ -laktam antibiyotiklere bağlanmaz ve fonksiyonları üzerine alarak bakteri duvar sentezini devam ettirir. PBP2a'nın etkin olabilmesi için ortamda antibiyotik varlığı gereklidir. Bu sebeple bu bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde  $\beta$ -laktam grubu bir antibiyotiğin kullanımı söz konusu değildir (Ünal, 1996).

Moleküler biyolojik çalışmalar sonucunda PBP2a'nın sentezini sağlayan genetik bilginin bakteri kromozomunda ilave lokalize 2kb'lık bir gen olan "mec A" geninde taşıdığı gösterilmiştir. Bu gen metisilin dirençli stafilokoklarda bulunurken duyarlı stafilokoklarda yoktur. Bu genin transpozon aracılığıyla  $\beta$ -laktamaz genini taşıyan plazmide entegre olduğu düşünülmektedir. Böylece bu genetik bilgi dirençli suşlardan, duyarlı suşlara aktarılmaktadır (Smith and Jarvis, 1999; Lowy, 2003).

Bu tip direnç iki şekilde görülebilir:

### **2.3.1.1. Homojen Direnç**

Koloniye oluşturan bakteriler “mec A” genini taşırlar ve hepsinde bu gen eksprese olmuş yani fonksiyoneldir ve yüksek düzeyde dirence neden olmaktadır (Ünal, 1996).

### **2.3.1.2. Heterojen Direnç**

Daha sık görülen ve çevre koşullarından etkilenmesi nedeniyle tespiti güç olan, esas problem teşkil eden direnç türüdür. Koloniye oluşturan tüm bakteriler mec A genini taşımalarına rağmen, direnç ancak  $10^6$  ya da  $10^8$  bakteriden birinde tespit edilebilmektedir. Bunun, mec A geninin fonksiyonunu kontrol ettiği sanılan “factor essential for methicillin resistance – femA” veya “faktör X” gibi kontrol genlerinin fonksiyonları ile meydana geldiği sanılmaktadır. Ancak heterojen direncin neden olduğu tam olarak bilinmemektedir (Ünal, 1996).

### **2.3.2. Modified Resistant *S.aureus* (MODSA)**

“Intermediate” metisilin direnci olarak da adlandırılan bu tip dirence sahip suşlarda  $\beta$ -laktamaz negatif olup, mecA geni taşımazlar. Bu bakterilerde bulunan PBP’lerin  $\beta$ -laktam antibiyotiklere düşük affinite gösterdikleri saptanmıştır. Bu mekanizma sitafilokoklarda modifiye PBP’lere duyarlılık azalması şeklinde gerçekleşmektedir. Bu tip dirençli suşlara MODSA (modified resistant *S.aureus*) adı verilmektedir (Ünal, 1996).

### **2.3.3. Borderline methicilline susceptible [BSSA] veya Borderline oxacilline resistant *S.aureus* [BORSA]**

Bu suşlar aşırı  $\beta$ -laktamaz salgılamasıyla karakterizedir. Metisilin bu enzime dayanıklıdır. Ancak yapılan çalışmalarda bazı suşların aşırı  $\beta$ -laktamaz (penisilinaz) salgılayarak metisilini ve oksasilini yavaşça fakat anlamlı bir ölçüde parçaladığı gösterilmiştir (Ünal, 1996). Bu suşlar metisiline sınırda direnç gösterdikleri için bunlara BORSA (borderline oxacilline resistant *S.aureus*) denilmiştir (Gülay, 2002).

## 2.4. Tanı

İzolatların yakın zamana kadar tiplendirilmesinde, genellikle fenotipik karakterleri esas rolü oynamış ve buna yönelik bazı yararlı metotlar da geliştirilmiştir. Buna karşın; fenotipik metotlar mikroorganizmaların tüm türlerini tanımlamada yetersiz kalabilmektedir. Yapılan bir çalışmada; *Staphylococcus aureus* bakteriyofaj tiplendirmesine göre tanımlandığında bazı *Staphylococcus aureus* izolatlarında bakteriyofaj reseptörlerinin olmadığı görülmüştür (Schlichting et al., 1993). Bir çalışmada, bakteri tiplendirilmesinde geleneksel bir yöntem olarak kabul edilen biyotiplendirmenin özellikle epidemik suşları ayırmada etkisiz olduğu bildirilmiştir. Aynı izolatlar ile yapılan çalışmada kullanılan 12 tiplendirme yönteminin hiçbirinin bakterilerin tiplendirmesi için yeterli olmadığı görülmüştür (Tenover, 1994).

Son yıllarda geliştirilen moleküler metotlar ile, fenotipik değerlendirmelerde rastlanan olumsuzluklar ortadan kalktığı gibi, genotipik yöntemlerin kullanılması da, hem çok zayıf ve güç üreyen mikroorganizmalarda ve hem de bu yöntemin temeli daha kararlı olan genetik karakterlere dayandığı için daha güvenilir sonuçlar vermektedir (Arda, 2000).

### 2.4.1. Fenotipik Yöntemler

*Staphylococcus* suşlarının ön tanısı için diğer *Micrococcaceae* ailesi üyelerinden ayrılması gerekmektedir. Basitrasin ve lizostafin disk difüzyon yöntemleri bu ayrımı sağlayan testler arasında yer almaktadır (Sneath et al., 1986). *Micrococcaceae*'den ayrımı yapılarak *Staphylococcus* türü olarak tanımlanan izolatların *Staphylococcus aureus* olduğunu saptamak için genel olarak Kanlı Agar besiyerinde koloni morfolojisi, ayrıca hemoliz özelliğine ve pigmentasyonuna, Mannitol Tuzlu Agar'da ise üremesine bakılmakta ve mannitol fermentasyonu incelenmektedir. Ayrıca koagülaz, katalaz ve DNaz testleri kullanılmaktadır (Bauer et al., 1974). *Staphylococcus aureus* izolatlarının tanımlanmasında kullanılan diğer fenotipik yöntemler ise, besin gereksinimleri, izoenzim tiplendirme, faj tiplendirme, antibiyotik duyarlılık testleri, yağ asiti analizi, multilokus enzim elektroforezi ve protein içeriklerinin analizi olarak sıralanabilmektedir.

## **2.4.2. Genotipik Yöntemler**

Günümüzde kullanılan fenotipik yöntemlerin, PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve PCR (Polymerase Chain Reaction) gibi nükleik asite dayalı yöntemlerle birlikte kullanılması tercih edilmektedir (Tenover et al., 1994; Marguet-Van Der Mee et al., 1995; Wieser et al., 2000; Onasanya et al., 2003 ).

Fenotipik yöntemler geliştirilmesine karşın zamanla yerine moleküler DNA'nın temel alındığı genotipik yöntemlere bırakmaya başlamıştır (Tenover et al., 1994; van Belkum et al., 1995).

Yapılan bir çok çalışmada, bakterilerin tiplendirilmesinde farklı moleküler uzunluklardaki DNA fragmentlerinin elektroforetik ayırımına dayanan yöntemler kullanılmaktadır (Saulnier et al., 1993; Schlichting et al., 1993; Seppala et al., 1994; Olive and Bean, 1999). Kullanılan moleküler teknikler arasında nükleik asite dayalı PCR tiplendirme yöntemleri daha fazla üstünlüğe sahiptir. Bu tekniklerden RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA – Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), REP (Repetitive Extragenic Palindromic) PCR ve ERIC (Enterobacterial repeat intergenic consensus) PCR son yıllarda bakterilerin tiplendirilmesinde sıklıkla kullanılan yöntemler arasındadır.

### **2.4.2.1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)**

Mikroorganizmaların genetik tiplendirilmelerinde en çok tercih edilen yöntem olan PCR'da, bakteri genomlarında çeşitlilik gösteren belirli DNA kısımları çoğaltılmaktadır. Özellikle patojen mikroorganizmaların tiplendirilmesinde kullanılan PCR tekniklerinden olan RAPD yöntemi, tıpta adli olayların incelenmesinde, kalıtsal hastalıklarla enfeksiyon hastalıklarının tanısında, tarımda tohum saflığının ve seçilmiş genotiplerinin belirlenmesinde, populasyon genetiğinde tür tanısında yine benzer amaçlar için hayvancılıkta, evrim ve arkeoloji gibi çeşitli temel ve uygulamalı çalışma alanlarında her geçen gün artan bir şekilde kullanılmaktadır (Yu and Pauls, 1992; Bardakçı, 2001).

RAPD-PCR, yaklaşık 10 nükleotidlik ve nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş tek çeşit primerlerin kullanımına dayanan bir yöntemidir. Bu yöntem, ilk olarak Williams ve arkadaşları ile Welsh ve McClelland tarafından tanımlanmıştır (Welsh and McClelland, 1990; Williams, 1990).

RAPD tekniğinde, düşük bağlanma sıcaklıklarında kısa rastgele tasarlanmış primerlerin tek veya çift olarak kullanımı ile genom çoğaltılmaktadır. Rastgele olarak seçilen bu primerlerin kullanımıyla DNA tesadüfi olarak çoğaltılmaktadır. Bu primerler tasarlanırken primerlerin GC/AT oranlarının %50 ya da daha büyük olmasına dikkat edilmektedir. Bu primerlerin çoğaltılacak DNA'da kendine uygun bölgelerde bağlanabilmelerini kolaylaştırmak için primer bağlanma sıcaklığını düşürülmesi de bu teknikte önemli bir noktadır. Farklı bireylerde nükleotid dizilimi de farklı olduğundan, bireylerden birinde bir primer bağlanma yerinin kaybı ya da değişmesi çoğalan PCR ürünleri arasında özgün bant ya da bantların kaybolmasına yol açmaktadır. PCR ile elde edilen ürünlerin jel elektroforezi ile analizi sonucu meydana gelen bantların profillerinin benzerlik dereceleri belirlenerek polimorfizm hakkında fikir edinilmektedir (Yu and Pauls, 1992; Bardakçı, 2001).

Literatürde RAPD-PCR tekniğinin; basit oluşu, hızlı sonuç alınması, ekonomik olması ve sekans dizisinin bilinmesine gerek olmaması nedeniyle diğer genotipik yöntemlere oranla daha avantajlı olduğu kabul edilmektedir (Bauer, 1974; Welsh and McClelland, 1990; Yu and Pauls, 1992; van Leeuwen et al., 1996; Bardakçı, 2001; Onasanya, 2003; Trindade et al., 2003).

#### **2.4.2.2. Diğer Yöntemler**

Bilindiği gibi; bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılması için tek yöntemin kullanılması güvenilir bir sonuç vermemektedir. Moleküler tiplendirmede özellikle DNA'ya temel alan yöntemlerde durum böyledir. Bir çok araştırmacı mikroorganizmaların sınıflandırılmasında birçok yöntem kullanarak bu yöntemlerin toplu bir şekilde değerlendirme yoluna gitmiştir (Kluytmans et al., 1995; Marquet-Van Der Mee et al., 1995; Wieser and Busse, 2000). Yukarıda bahsettiğimiz yöntemlerin yanı sıra özellikle *Staphylococcus aureus* izolatlarının tiplendirilmesinde kullanılan diğer yöntemler arasında; plazmid analizi, REP PCR, ERIC PCR, Kromozomal

DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi (RFLP) ve Pulsed Field Jel Elektroforezi sayılabilmektedir (Versalovic et al., 1991; Busch, 1999; Olive and Bean, 1999).

## 2.5. Filogeni

Filogeni moleküler tekniklerin yaygın ve önemli kullanım alanını oluşturmaktadır. Moleküler verilerin filogenetik amaçlı kullanımı sırasında, eldeki verilerin yorumlanabilmesinde filogenetik ağaçların çizimi gerekmektedir. Bunun için de son yıllarda değişik bilgisayar programları geliştirilmiştir.

Filogenetik ağaç oluşturmak amacıyla kullanılan yöntemlerden biri olan kümeleme analizi (cluster analysis), ultrametrik bir ağaç çizimi için benzerlik (similarity) ya da uzaklık (distance) üzerine geliştirilen bir grup yöntemden oluşmaktadır. Yöntem incelenen takson ya da moleküler çiftleri arasındaki ilişkiyi temel almaktadır. İlgilenilen taksonun bütün grupları arasındaki benzerlik ve uzaklıklar bir tablo halinde verilmektedir. Benzerlik değerleri 1'den (tam benzer) 0'a (hiç benzemez) kadar (%100, %0) olan bir skalada gösterilmektedir. Benzerlik katsayısı belirlendikten sonra bu eşitlikten elde edilen matrisler hazırlanarak matrisler üzerinden kümeler çizilmektedir. Benzerlik teriminin karşıtı benzememezlik (dissimilarity) ve değerleri 0-1 (%0-%100) olarak gösterilmektedir. Benzememezlik durumu daha çok uzaklık olarak ifade edilmektedir. Kümeleme analizinde benzerlik ve uzaklık verileri kullanılarak, filogenetik ağaç basamaklı bir şekilde oluşturulmaktadır. UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages/ aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu) filogenetik analizlerde en sık kullanılan kümeleme metodudur (Roderick and Holmes, 1998).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Bu çalışmada; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli servislerinde yatan hastalara ait kan, derin trakeal aspirasyon, püvy, yara, kateter, burun ve idrar içeren klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşları toplandı. Buna ek olarak; şu an yürütülmekte olan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi 0302601008 No'lu Araştırma Projesi'nde PCR-RFLP ve Pulsed Field Gel Elektroforezi ile tiplendirilmesi yapılmış *Staphylococcus aureus* izolatları da çalışma kapsamına dahil edildi.

Bazı örnekler pozitif kontrol için kullanıldı. Bunlar; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, izolatların toplandığı hastaneden izole edilen *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus saprophyticus* örnekleridir. Buna ek olarak; negatif kontrol ise RAPD-PCR karışımında genomik DNA yerine su konularak hazırlanmıştır.

#### 3.2. İzolatların Saklanması

Koyun kanlı agara tek koloni ekim yapılarak kontrol edilen izolatlardan kontaminasyonundan şüphelenilenler, koloni morfolojileri, gram boyasıyla mikroskopik incelemeleri yapılarak, pigmentasyon, Mannitol Tuzlu Agar (MTA) Besiyeri'nde gelişim, katalaz, koagülaz, DNAaz Testi yapılarak değerlendirildi (Şekil 3.1.). Bakteriler %10 gliserollü Brain Heart Infüzyon sıvı besiyerine çekilerek, 2 ayda bir pasajlanarak çalışılan süre içerisinde -20° C'de saklandı.



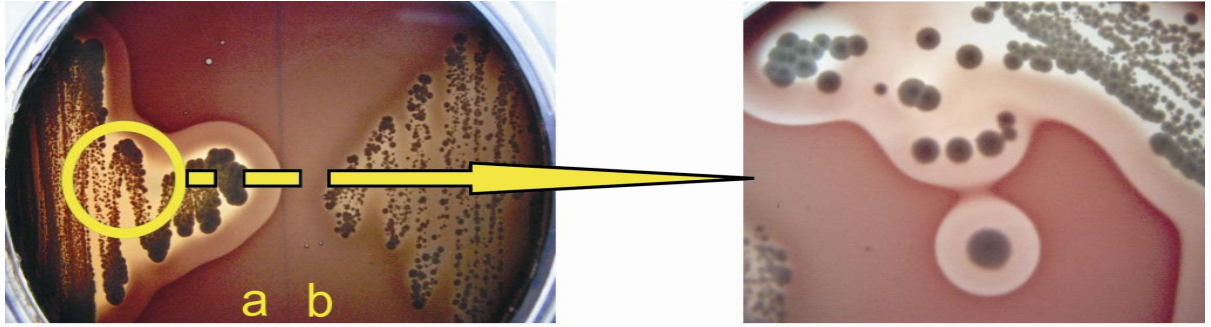
Şekil 3.1. *Staphylococcus aureus*'un koloni morfolojisi.



### 3.3. İzolatların Teşhisi

#### 3.3.1. Kanlı Agar $\beta$ - Hemoliz

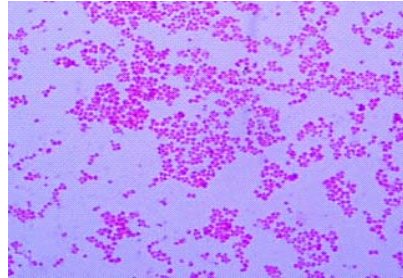
*Staphylococcus aureus* izolatları, %5 koyun Kanlı Besiyeri'ne inoküle edilerek 37°C'de bir gece boyunca inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonrası izolatların koloni morfolojilerine, pigmentasyonuna ve hemoliz tipine bakılarak değerlendirildi (Arda, 2000; Bauer et al., 1974) (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. *Staphylococcus aureus* (a) ve *Staphylococcus epidermidis* (b) suşlarının hemoliz tipi.

#### 3.3.2. Gram Boyama

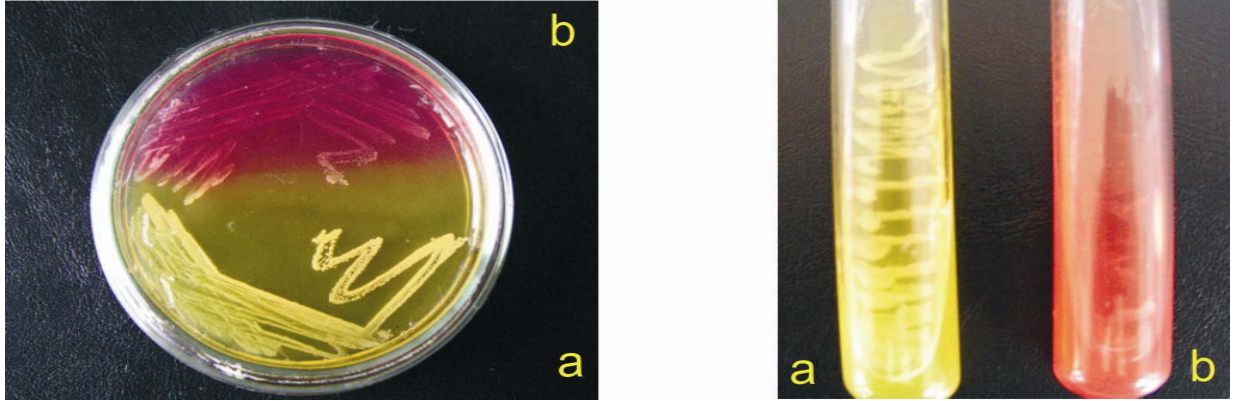
Kolonilerden temiz lam üzerine bir damla serum fizyolojik kullanılarak preparat hazırlandı. Preparatın gram boyama tekniğine göre boyanmasından sonra ışık mikroskopunun x100'lük objektifinde immersiyon yağı ile incelendi (Bilgehan, 1990) (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. *Staphylococcus aureus*'un ışık mikroskopunun x100'lük objektifteki görüntüsü.

### 3.3.3. Mannitol Tuzlu Agar (MSA) Besiyeri'nde Mannitol Fermentasyonu

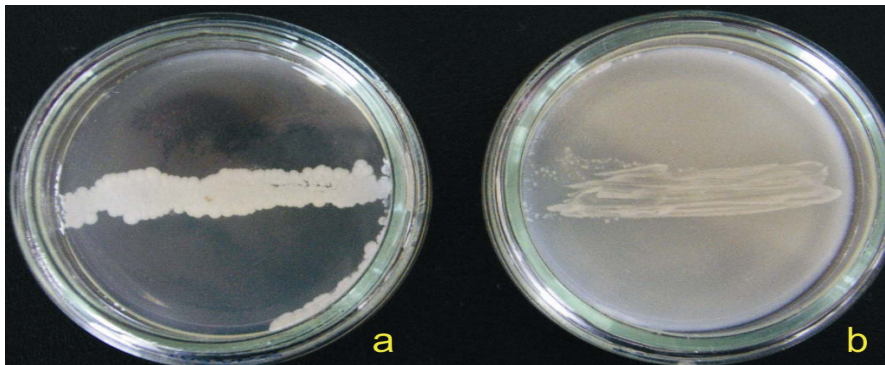
MSA Besiyeri'nde 37°C'de inkübasyon sonucunda; mannitolün fermente edilmesi sonucu oluşan asit besiyerinde bulunan pH indikatörü fenol kırmızısını kırmızıdan sarı renge dönüştürmesi halinde test sonucu pozitif olarak kabul edildi (Bauer et al., 1974; Kaiser, 2005) (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. *Staphylococcus aureus* (a-pozitif) ve *Staphylococcus epidermidis* (b-negatif) izolatlarının Mannitol Tuzlu Agar Besiyeri'ndeki gelişimi.

### 3.3.4. DNaz Agar Besiyeri'nde Deoksiribonükleaz (DNase) Üretimi

DNaz besiyerinde 37°C'de 18 saat inkübasyon sonucunda petriye 1N Hidroklorik Asit (HCl) ilave edilmesi sonucu açık renkli bir bölge oluşması test sonucunun pozitif olduğunu gösterdi (Collins et al., 2001) (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. *Staphylococcus aureus* (a-pozitif) ve *Staphylococcus epidermidis* (b-negatif) izolatlarının DNaz Besiyeri'ndeki gelişimi.

### 3.3.5. Koagülaz Varlığının Saptanması

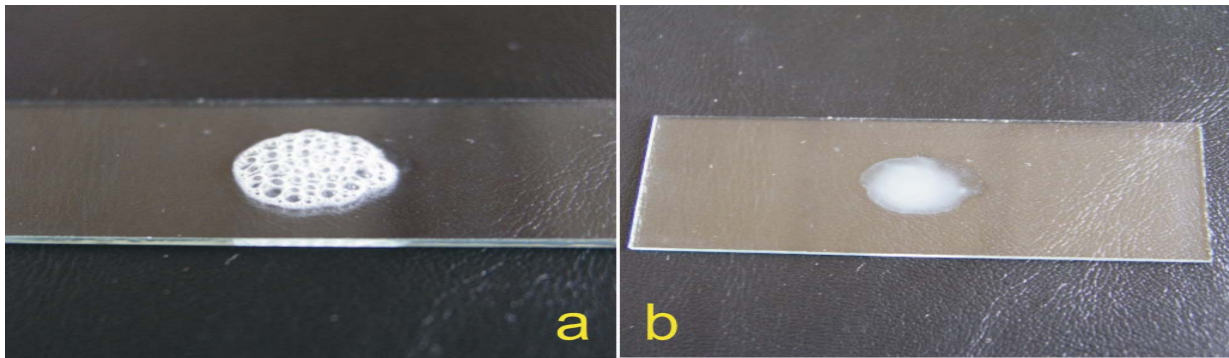
Bir gecelik Mannitol Tuzlu Agar kültüründen 2-3 koloni lam üzerine alınarak ¼ sulandırılmış 0.5 ml plazma içerisine ilave edilmiştir. Pıhtılaşma oluşması halinde test sonucu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Collins et al., 2001) (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. *Staphylococcus aureus* (a-pozitif) ve *Staphylococcus epidermidis* (b-negatif) izolatlarında koagülaz testi.

### 3.3.6. Katalaz Varlığının Saptanması

Nutrient Agar (NA) besiyerinde 24 saat geliştirilen bakteri kültüründen öze yardımıyla küçük miktarda lam üzerine alınarak, üzerine 2-3 ml %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildi. Oksijen çıkışı gösteren hava kabarcıklarının oluşması halinde test sonucu pozitif olarak değerlendirildi (Foster, 1996; Collins et al., 2001) (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. *Staphylococcus aureus* (a-pozitif) ve *Staphylococcus epidermidis* (b-negatif) izolatlarında katalaz testi.

Yukarıda söz konusu edilen sonuçlara ait fotoğraflar (Şekil 3.1. – 3.7. arası) aksi tarafımızdan belirtilmediği takdirde Olympus Camedia C-5050 Zoom kullanılarak tarafımızca çekilmiştir.

### 3.4. Antibiyotipleme

#### 3.4.1. Antibiyotiplerin Belirlenmesi

Antibiyotiplerin belirlenmesinde fenotipik bir özellik olan bakterilerin antibiyotik paternleri esas alındı. Bu kapsamda; örneklerin 10 antibiyotik (Amoksisilin-Klavulonik Asit, Gentamisin, Eritromisin, Oksasillin, Penisilin, Rifampin, Streptomisin, Sulbaktam-ampisillin, Tetrasiklin, Vankomisin) için duyarlılıkları belirlendi.

İzolatların antibiyotiklere duyarlılıkları Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyerinde agar disk difüzyon metodu ile Kirby-Bauer standart yöntemi kullanılarak saptandı. Bir gecelik BHI (Beyin Kalp İnfüzyon) broth kültürü Mc Farland No:0.5 bulanıklığına ayarlanarak MHA besiyeri yüzeyine eküvyon ile inoküle edildi. Yüzey kuruduktan sonra değişik antibiyotik diskleri yerleştirilerek 35°C'de, normal atmosfer koşullarında 16-18 saat (oksasillin ve vankomisin için 24 saat) inkübasyon sonunda çapları ölçüldü (Bauer et al., 1974; Kiehlbauch, 2000; Cekovska et al., 2005; CLSI, 2005). Aynı paterni gösteren izolatlar aynı numarayla belirtilen antibiyotip grubuna dahil edildi. İzolatlar Çizelge 3.1.'de gösterilen CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından önerilen zon tablosu ile karşılaştırılarak hassas ve dirençli olarak değerlendirildi (CLSI, 2005) (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1: CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından önerilen zon tablosu (CLSI, 2005).

Antibiyotik Adı	Kodu	Disk İçeriği	Zon çapı (mm)		
			R	I	S
Amoksisilin-Klavulonik Asit	AMC	20/10 µg	≤19	12-14	≥20
Eritromisin	E	15 µg	≤13	14-22	≥23
Gentamisin	CN	10 µg	≤12	13-14	≥15
Oksasillin	OX	1 µg	≤10	11-12	≥13
Penisilin	P	10 Ünite	≤28	12-14	≥29
Rifampin	RA	5 µg	≤16	17-19	≥20
Streptomisin	S	10 µg	≤11	12-14	≥15
Sulbaktam-ampisillin	SAM	10/10 µg	≤11	12-14	≥15
Tetrasiklin	TE	30 µg	≤14	15-18	≥19
Vankomisin	VA	30 µg	≤9	10-11	≥12

*R; Resistant (dirençli); I; Intermediate (orta derece hassas); S; Sensitive (hassas)*

### 3.4.2. Antibiyotiplerin Oranının Belirlenmesi

Tiplerin belirlenmesinden sonra elde edilen antibiyotiplerin çalışmada izole edilen örnekler içerisindeki oranını saptamak amacıyla aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Antibiyotip oranı} = \frac{\text{Antibiyotip gösteren örnek sayısı}}{\text{Tüm örneklerin sayısı}} \times 100$$

### 3.4.3. MRSA ve MSSA'ların Kullanılan Antibiyotiklere Direnç Oranlarının Saptanması

Çalışma kapsamına alınan örneklerin antibiyotik hassasiyet sonuçları incelenerek kullanılan antibiyotiklere karşı direnç oranları tek tek hesaplandı:

$$\text{Antibiyotiğe direnç oranı} = \frac{\text{Antibiyotiğe dirençli örnek sayısı}}{\text{Toplam örnek sayısı}} \times 100$$

### 3.5. DNA İzolasyonu

Toplanan örnekler 1.5ml'lik ependorf tüplerde hazırlanan Brain Heart İnfüzyon sıvı besiyerine (pH 7.4±0.2) ekildi. 35°C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda kültürler hazırlandı. Bu kültürlerden DNA izolasyonu; EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit (BioBasic) ile gerçekleştirildi.

EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit protokolü :

1.  $10^6 \sim 10^7$  bakteri oda sıcaklığında 8.000 rpm 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 200µl soğuk Tris EDTA tamponu eklendi (Şekil 3.8.).





Şekil 3.8. Santrifüj işlemi.

2. Hazırlanan bakteri kültüründen 200 $\mu$ l'ye 400 $\mu$ l Digestion Solüsyonu eklendi. Daha sonra 4 $\mu$ l Proteinaz K solüsyonu (2mg/150 $\mu$ l) eklenerek 55°C'de 5 dakika inkübasyona tabi tutuldu.
3. 260 $\mu$ l %100 etanol eklenerek iyice karıştırıldı.
4. Karışım 2ml hacimdeki kolonlara uygulandı (Şekil 3.9.).



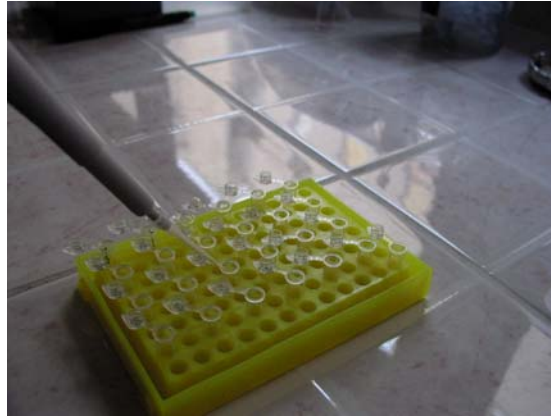
Şekil 3.9. Karışımın uygulanacağı spin kolon.

5. 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra tüpteki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
6. 500 $\mu$ l Yıkama solüsyonu eklenerek 8.000rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Yıkama işlemi 1 kez daha tekrarlandıktan sonra tüpteki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
7. Yıkama solüsyonunun kalıntılarının uzaklaştırmak için 1.000rpm'de birkaç dakika spin edildi.
8. EZ-10 kolonu 1.5ml hacimde temiz santrifüj tüpüne yerleştirilerek 50 $\mu$ l Elution Buffer kolondaki membranın merkezine uygulandı.
9. 50°C'de 2 dakika inkübasyona tabi tutuldu.
10. 10.000rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek saf DNA elde edilmiş oldu.

### 3.6. RAPD-PCR

#### 3.6.1. RAPD- PCR Reaksiyonu

RAPD-PCR (Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA- Polimeraz Zincir Reaksiyonu) koşullarının standardizasyonu için öncelikle kullanılan genomik DNA, primer, tampon, MgSO<sub>4</sub>, Taq Polimeraz'ın farklı konsantrasyonlarını içeren kombinasyonları ön deneylerle optimize edildi. RAPD PCR reaksiyon karışımı; 100mM KCl, 100mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200mM Tris HCl, %1 Triton X-100, 1mg/ml BSA, 2.5mM dNTP (BioBasic), 2.0mM MgSO<sub>4</sub> (BioBasic), 3U Taq Polimeraz (BioBasic) ve 5µM primerden (BioBasic) oluşmaktadır (Çizelge 3.2.) (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. RAPD PCR reaksiyon karışımının hazırlanması.

Bu optimizasyonun ardından, uygun konsantrasyonlardan oluşan reaksiyon karışımı yine uygun PCR (Eppendorf Thermal Cyclers; Hamburg) programına tabii tutuldu (Çizelge 3.2.). RAPD PCR döngüsü; 95°C'de 2 dakika ön denatürasyon, 94°C'de 1 dakika, 30°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika (45 döngü) ve 72°C'de 5 dakika son uzama olacak şekilde uygulandı (Eppendorf Thermal Cyclers, Hamburg) (Çizelge 3.3.) (Şekil 3.10. ve 3.11.). Uygun reaksiyon karışımı ve uygun PCR programının saptanması sonrası RAPD-PCR analizi için kullanılacak olan primerler saptandı. RAPD-PCR için kullanılan bu primerler seçiminde ise daha önceki yurt içi ve yurt dışı çalışmalar temel alınarak seçildi. Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve %GC oranları Çizelge 3.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 3.11. PCR cihazı

Çizelge 3.2: RAPD-PCR reaksiyon karışımı.

Genomik DNA	: 50 ng
Random primer	: 5 µM
20 mM MgSO <sub>4</sub>	: 2 mM
2.5 mM dNTP	: 200 µM
Taq DNA Polimeraz	: 3 U
10×PCR Tamponu	: 1×
Reaksiyon hacmi	: 50 µl

Çizelge 3.3: RAPD PCR döngüsü.

95 °C	2 dakika	ön denatürasyon	} 45 döngü
94°C	1 dakika	denatürasyon	
28-34* °C	1 dakika	annealing	
72 °C	2 dakika	uzama	
72 °C	5 dakika	son uzama	

\* Her bir primere ait bağlanma sıcaklığı Çizelge 3.4'de gösterilmiştir.



Çizelge 3.4: RAPD PCR reaksiyonunda kullanılan primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve % GC oranları.

<b>Primer Sekansları (5'→3')</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>%GC</b>
B0043-1 1 –AAGAGCCCGT	32	60
B0043-1 2 –AGCGTCACTG	32	60
B0043-1 4 –AGCAGCCTGC	34	70
B0043-1 6 –GTGGATGCGA	32	60
B0043-1 7 –GCGATCCCCA	34	70
B0043-1 9 –TCACGATGCA	30	50
B0043-1 10 -TCACGCTGCG	34	70
B0043-1 11 -AAGTCCGCTC	32	60
B0043-1 12 -CAATCGCCCT	32	60
B0043-1 13 -CGGATCGACA	32	60
B0043-1 14 -AATCGGGCAG	32	60
B0043-1 16-AATCGGGCGG	34	70
S19 –ACCCCCGAAG	34	70
S21 –CAGGCCCTTC	34	70
S24 –AATCGGGCTG	32	60
S31 –CAATCGCCGT	32	60
S33 –CAGCACCCAC	34	70
S112 –ACGCGCATGT	32	60
S144 –GTGACATGCC	32	60
S211 –TTCCCCGCGA	34	70
S224 -CCCCTCACGA	34	70
S312 –TCGCCAGCCA	34	70
S252 –TCACCAGCCA	32	60
S1112 –TCTCACCGTC	32	60
S1452 –AAGAGGGCGT	32	60

### 3.6.2. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezü İle Kontrolü

Elektrofrezü tanklarını doldurmak ve agaroz jelin hazırlanması için TBE (Tris-Borat-EDTA; 10×TBE : 0.9M Tris, 0.9M Borik Asit ve 0.02M EDTA) tamponu kullanıldı. Erlenmayer içerisindeki elektroforöz tamponuna, %1.6'lık konsantrasyonda olacak şekilde toz agaroz eklendi. Tampon içindeki agaroz eriyene kadar mikrodalga fırında tutuldu. Agaroz taneciklerinin mümkün olan en kısa sürede erimesi sağlandı (Şekil 3.12.).



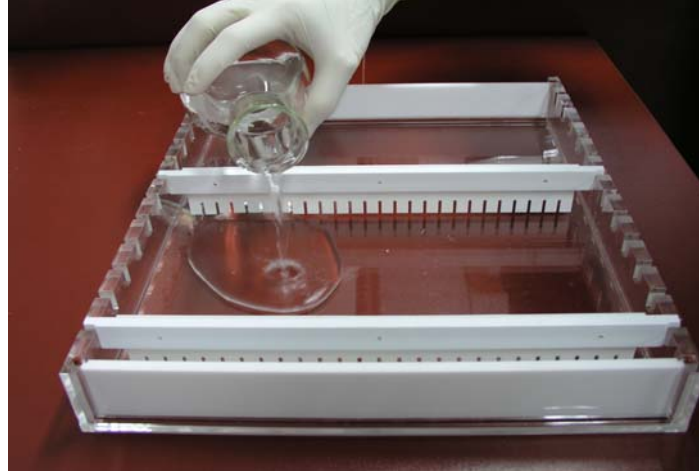
Şekil 3.12. Agarozun hassas terazide tartımı ve mikrodalga fırında eritilmesi.

Erlenmayer düzenli olarak karıştırılarak çepere yapışan taneciklerin çözeltiye katılması sağlandı. Sıcaklık yaklaşık olarak 55°C olunca jele yatay elektroforöz tankına dökülmeden önce 5mg/ml'lik etidium bromür (Sigma) eklendi (Şekil 3.13.).



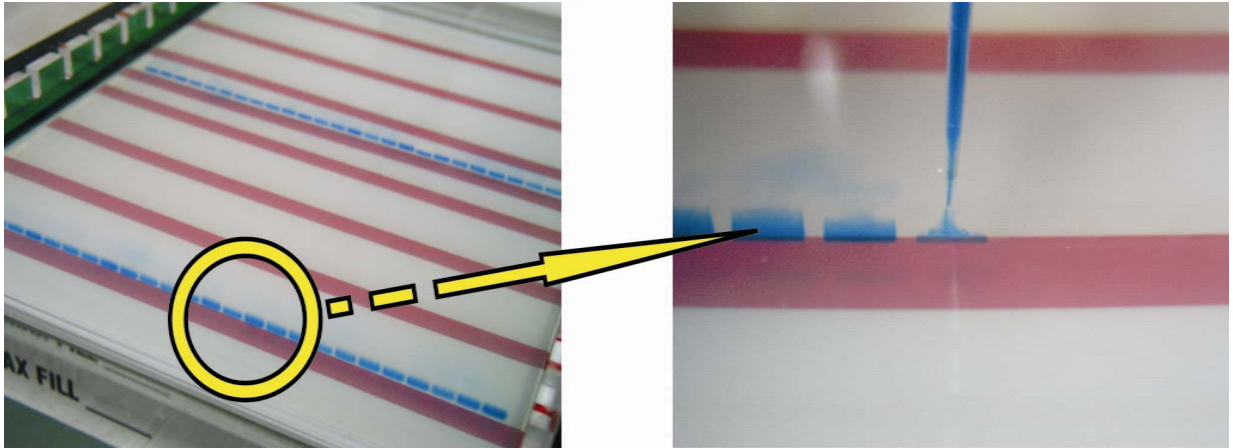
Şekil 3.13. Boyanın agaroz jele eklenmesi.

Elektroforez düzeneği kurulduktan sonra, agaroz çözeltisi tarağın dişleri arasında ya da altında hava kabarcıkları olmamasına dikkat edilerek kalıbın içerisine döküldü (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. Agaroz jelin dökülmesi.

Jel, polimerize olduktan sonra içerisinde 1×TBE (pH 8.3) tamponu olan elektroforez tankına yerleştirildi. 15 µl PCR ürününe 5 µl yükleme boyası (6X; Takara) ilave edilerek örnekler toplam 20 µl hacimde olacak şekilde kuyucuklara yüklendi (Şekil 3.15.).



Şekil 3.15. Örneklerin agaroz jele yüklenmesi

Örnekler 90 Volt sabit voltaj uygulanarak 5 saat yürütüldü (Şekil 3.16.). Boya jelin sonuna geldiğinde elektroforez sonlandırıldı. Daha sonra jel Gel Logic 200 Molecular Imaging System görüntüleme sistemi (Kodak, Rochester) tarafından görüntülendi.



Şekil 3.16. Yatay agaroz jel elektroforezi düzeneği.

Dendogramın elde edilmesi için jellerdeki monomorfik (tüm çeşitlerde bulunan bant) ve polimorfik (bazı çeşitler bulunup bazılarında bulunmayan) bantlar tespit edildi. İlk aşamada NTSYS-PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versiyon 2.1 (Rohlf, 2000) bilgisayar programında NT-Edit versiyon 1.2f alt programı kullanılarak, polimorfik olan bantların bant büyüklükleri bilgisayara var (1) ya da yok (0) şeklinde girildi. Böylece daha sonraki aşamalarda kullanılacak olan bant matriksleri oluşturuldu. Bir sonraki aşamada SIMQUAL (Similarity for Qualitative Data) alt programı kullanılarak çeşitler arasındaki Dice eşitliğini temel alan benzerlik matriksleri (similarity index) yapıldı. En son aşamada SAHN (sequential, agglomerative, hierarchical and nested clustering) kümeleme alt programı ve bu program içinde benzerlik matrikslerini temel alan UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages/ aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu) algoritması kullanılarak çeşitlere ait dendogramlar çizildi.

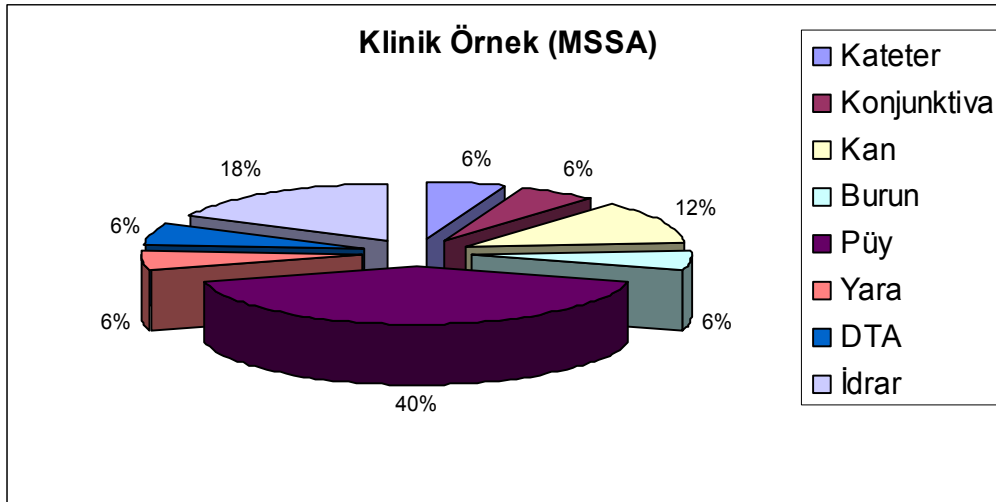
Yukarıda söz konusu edilen uygulamalara ait fotoğraflar (Şekil 3.8.–3.16. arası) aksi tarafımızdan belirtilmediği takdirde Olympus Camedia C-5050 Zoom kullanılarak tarafımızca çekilmiştir.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler:

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli servislerinde yatan hastalardan izole edilen *Staphylococcus aureus* suşları toplandı. Kan, derin trakeal aspirasyon, pü, yara, kateter, burun ve idrar v.b çeşitli klinik örneklerden izole edilen MSSA ve MRSA suşlarının hastalara ait klinik örneklere göre dağılımları belirlendi (Şekil 4.1. ve 4.2.).

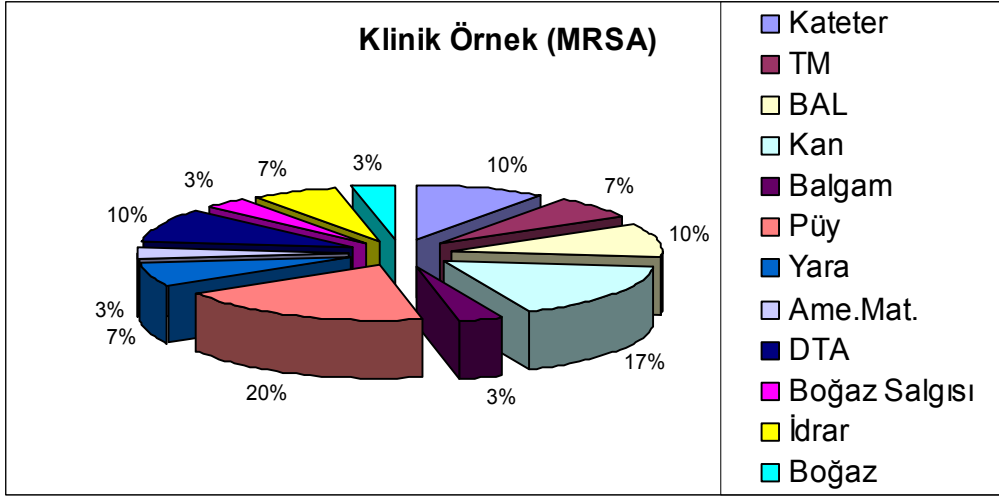
Çalışmamızda izole edilen 17 MSSA suşundan 7'si pü, 3'ü idrar, 2'si kan, 1'i kateter, 1'i konjunktiva, 1'i burun, 1'i yara, 1'i derin trakeal aspirasyon kaynaklıdır (Şekil 4.1.).



MSSA; Metisilin Hassas *Staphylococcus aureus*, DTA; Derin Trakeal Aspirasyon.

Şekil 4.1. MSSA suşlarının hastalara ait klinik örneklere göre yüzde dağılımı.

Çalışmamızda izole edilen 30 MRSA suşundan 6'sı pü, 5'i kan, 3'ü bronş alveolar lavaj, 3'ü derin trakeal aspirasyon, 3'ü kateter, 2'si torasentez mayi, 2'si yara, 2'si idrar, 1'i balgam, 1'i ameliyat materyali, 1'i boğaz salgısı, 1'i boğaz kaynaklıdır (Şekil 4.2.).



MRSA; Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*, Ame. Mat.; Ameliyat Materyali, BAL; Bronko Alveolar Lavaj, DTA; Derin Trekeal Aspirasyon, TM; Torasentez Mayi.  
Şekil 4.2. MRSA suşlarının hastalara ait klinik örneklere göre yüzde dağılımı.

#### 4.2. İzolatların Teşhis Sonuçları

İncelenen izolatlardan; koloni morfolojileri 'üzüm salkımı' şeklinde olan gram pozitif, beta hemoliz tipi gösteren Mannitol fermentasyonu, Katalaz Testi, Koagülaz Testi ve Deoksiribonükleaz (DNAaz) Testi pozitif olan toplam 47 *Staphylococcus aureus* suşu saptandı ve kontrol suşu olarak *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşları da çalışma kapsamına alındı. Bu izolatların sayısı, uygulanan testler ve bu testlerin sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1: Stafilokok suşlarının toplu test sonuçları.

İzolat Numarası	Bölüm	Cinsiyet	Örnek Türü	Hemoliz	Pigmentasyon	Gram özelliği	Mannitol fermentasyonu	Dnaz	Koagülaz	Katalaz	Metisilin Dirençliliği*	Antibiyotip
D1	D.S.85	E	Kateter	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant4
D2	Bölüm 72	K	TM	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant2
D3	B.C.D.B.	E	Kan	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant2
D4	K.B.B.S.43	E	Balgam	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant1
D5	B.C.D.B.	E	Püy	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant5
D6	O.S.52	E	Püy	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant1
D7	Y.S.73	E	Yara	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant1
D8	O.S.52	E	Ame.Mat.	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant1
D9	B.C.S.61	K	DTA	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant5
D10	D.S.85	E	Kan	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant4
D11	B.C.D.B	E	Boğaz Salgısı	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant5
D12	B.C.S.51	K	BAL	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant1
D13	Y.S.73	K	Püy	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant2
D14	Y.S.73	E	Kan	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant2
D15	K.B.B.S.43	E	BAL	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant3
D16	D.S.85	E	Püy	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant2

Çizelge 4.1 devam ediyor

İzolat Numarası	Bölüm	Cinsiyet	Örnek Türü	Hemoliz	Pigmentasyon	Gram özelliği	Mannitol fermentasyonu	Dnaz	Koagülaz	Katalaz	Metisilin Dirençliliği*	Antibiyotip
D17	Y.S.73	E	Püy	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant3
D18	B.C.S.61	E	Yara	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant3
D19	D.S.85	E	BAL	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant1
D20	P.S.32.Ü.	E	İdrar	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant1
D21	B.C.D.B.	K	TM	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant7
D22	B.A.S.	K	DTA	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant2
D23	Ü.S.84	E	İdrar	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant3
D24	G.C.D.B.	K	DTA	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant4
D25	Ü.S.84	K	Kateter	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant6
D26	B.C.S.51	E	Kan	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant6
D27	N.S.74	E	Kateter	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant3
D28	G.C.D.B.	K	Boğaz	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant6
D29	B.C.D.B.	K	Püy	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant1
D30	D.D.B.	E	Kan	+	A	P	+	+	+	+	+	Ant3
H1	Nefroloji	K	Püy	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant1
H2	P.C.S.	E	Püy	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant1
H3	B.A.P.	K	Konjunktiva	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant1



Çizelge 4.1 devam ediyor

İzolasyon Numarası	Bölüm	Cinsiyet	Örnek Türü	Hemoliz	Pigmentasyon	Gram özelliği	Mannitol fermentasyonu	Dnaz	Koagülaz	Katalaz	Metisilin Dirençliliği*	Antibiyotip
H4	B.A.S.	E	Püy	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant1
H5	Dermatoloji	E	Burun	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant1
H6	D.S.52	K	Püy	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant3
H7	Onkoloji	K	Püy	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant4
H8	Ü.S.84	E	İdrar	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant3
H9	B.C.P-D	K	Püy	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant3
H10	B.C.P	E	Yara	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant3
H11	B.A.S.	E	Kan	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant5
H12	B.A.S.	E	Kan	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant2
H13	B.A.S.	E	İdrar	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant2
H14	B.A.S.	E	Kateter	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant2
H15	Onkoloji	K	Püy	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant2
H16	Ü.S.84	E	İdrar	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant3
H17	B.C.D.B.	E	DTA	+	A	P	+	+	+	+	-	Ant2
*S.aureus ATCC 29213				+	A	P	+	+	+	+	+	
* MRSE				-	B	P	-	-	-	-	+	
* MSSS				-	B	P	-	-	-	+	-	

D; Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*, H; Metisilin Hassas *Staphylococcus aureus*, MRSE; Metisilin Dirençli *Staphylococcus epidermidis*, MSSS; Metisilin Hassas *Staphylococcus saprophyticus*. D.S.; Dahiliye Servis, D.D.B.; Dahiliye Devamlı Bakım, B.C.D.B; Beyin Cerrahi Devamlı Bakım, Y.S.; Yanık Servisi, K.B.B.S.; Kulak Burun Boğaz Servisi, B.C.S.; Beyin Cerrahi Servisi, O.S.; Ortopedi Servisi, N.S.; Nöroloji Servisi, P.S.32.U; Pediatri Servis 32 Üroloji, G.C.S.; Genel Cerrahi Servisi, B.A.S.; Büyük Acil Servis, Ü.S.; Üroloji Servisi, G.C.D.B.; Genel Cerrahi Devamlı Bakım, P.C.S.; Plastik Cerrahi Servisi, B.A.P.; Büyük Acil Polikliniği, B.C.P-D; Beyin Cerrahi Plk - D, B.C.P.; Beyin Cerrahi Polikliniği. Ame. Mat.; Ameliyat materyali, TM; Torasentez Mayi, BAL; Bronko Alveolar Lavaj, DTA; Derin Trakeal Asp., A; Altın sarısı, B; Beyaz, P; Gram Özelliği pozitif, +; Pozitif sonuç, -, Negatif sonuç, Ant; MRSA için antibiyotik duyarlılık patern tipi, **Ant**; MSSA için antibiyotik duyarlılık patern tipi, \*; Disk Difüzyon metodu ile metisilin dirençliliği, \*\*; ilgili suşlar toplu değerlendirmeye alınmamıştır.

### 4.3. Antibiyotiplerin Belirlenmesi

Bakterilerin CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından önerilen antibiyotikler içerisinde seçilen 10 antibiyotik (Amoksisilin-Klavulonik Asit, Eritromisin, Gentamisin, Oksasillin, Penisilin, Rifampin, Streptomisin, Sulbaktam-ampisillin, Tetrasiklin ve Vankomisin) için oluşturdukları direnç paternleri Disk Difüzyon (Kirby-Bauer) Yöntemi ile saptandı ve Çizelge 4.2. ve 4.3.'te 47 izolatın antibiyotik duyarlılık sonuçları özetlendi.

Çizelge 4.2: Metisilin hassas *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları.

SUŞ NO	AMC	E	GM	OX	P	RA	S	SAM	TE	VA	Antibiyotipler
H1	D	H	H	H	D	H	H	H	H	H	Ant1
H2	D	H	H	H	D	H	H	H	H	H	Ant1
H3	D	H	H	H	D	H	H	H	H	H	Ant1
H4	D	H	H	H	D	H	H	H	H	H	Ant1
H5	H	H	H	H	D	H	H	H	D	H	Ant6
H6	H	H	H	H	D	H	H	H	H	H	Ant3
H7	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant4
H8	H	H	H	H	D	H	H	H	H	H	Ant3
H9	H	H	H	H	D	H	H	H	H	H	Ant3
H10	H	H	H	H	D	H	H	H	H	H	Ant3

Çizelge 4.2 devam ediyor

SUŞ NO	AMC	E	GM	OX	P	RA	S	SAM	TE	VA	Antibiyotipler
H11	D	H	H	H	D	H	D	H	D	H	Ant5
H12	D	H	H	H	D	H	H	H	D	H	Ant2
H13	D	H	H	H	D	H	H	H	D	H	Ant2
H14	D	H	H	H	D	H	H	H	D	H	Ant2
H15	D	H	H	H	D	H	H	H	D	H	Ant2
H16	H	H	H	H	D	H	H	H	H	H	Ant3
H17	D	H	H	H	D	H	H	H	D	H	Ant2

Çizelge 4. 3 : Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları.

SUŞ NO	AMC	E	GM	OX	P	RA	S	SAM	TE	VA	Antibiyotipler
D1	D	H	D	D	D	D	D	H	D	H	Ant4
D2	D	H	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant2
D3	D	H	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant2
D4	D	D	D	D	D	D	D	H	D	H	Ant1
D5	D	D	D	D	D	H	D	H	D	H	Ant5
D6	D	D	D	D	D	D	D	H	D	H	Ant1
D7	D	D	D	D	D	D	D	H	D	H	Ant1
D8	D	D	D	D	D	D	D	H	D	H	Ant1
D9	D	D	D	D	D	H	D	H	D	H	Ant5
D10	D	H	D	D	D	D	D	H	D	H	Ant4

Çizelge 4.3 devam ediyor

SUŞ NO	AMC	E	GM	OX	P	RA	S	SAM	TE	VA	Antibiyotipler
D11	D	D	D	D	D	H	D	H	D	H	Ant5
D12	D	D	D	D	D	D	D	H	D	H	Ant1
D13	D	H	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant2
D14	D	H	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant2
D15	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant3
D16	D	H	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant2
D17	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant3
D18	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant3
D19	D	D	D	D	D	D	D	H	D	H	Ant1
D20	D	D	D	D	D	D	D	H	D	H	Ant1
D21	D	D	D	D	D	H	D	D	D	H	Ant7
D22	D	H	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant2
D23	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant3
D24	D	H	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant4
D25	D	D	D	D	D	D	D	I	D	H	Ant6
D26	D	D	D	D	D	D	D	I	D	H	Ant6
D27	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant3
D28	D	D	D	D	D	D	H	I	D	H	Ant8
D29	D	D	D	D	D	D	D	H	D	H	Ant1
D30	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant3

D; Dirençli, H; Hassas, Ant; Metisilin Hassas *S.aureus* için antibiyotip tipi, Ant; Metisilin Dirençli *S.aureus* için antibiyotip tipi, AMC; Amoksisilin-Klavulonik Asit, GM; Gentamisin, E; Eritromisin, OX; Oksasillin, P; Penisilin, RA; Rifampin, S; Streptomisin, SAM; Sulbaktam-ampisillin, TE; Tetrasiklin, VA; Vankomisin.

#### 4.3.1. Antibiyotiklerin Oranının Belirlenmesi

Elde edilen paternlerin karşılaştırılarak aynı paterni gösteren izolatlar aynı numara ile belirtildi. Bunun sonucunda MSSA için 6, MRSA için ise 8 ayrı antibiyotik direnç profili Bölüm 3.4.2'deki formül kullanılarak belirlendi (Çizelge 4.4. ve 4.5.).

Çizelge 4. 4 : MSSA'ların antibiyotik duyarlılık profilleri ve antibiyotip dağılımları.

ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİ (MSSA)										Antibiyotip	Oran (%)
AMC	E	CN	OX	P	RA	S	SAM	TE	VA		n=17
D	H	H	H	D	H	H	H	H	H	Ant1	23,5
D	H	H	H	D	H	H	H	D	H	Ant2	29,4
H	H	H	H	D	H	H	H	H	H	Ant3	29,4
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Ant4	5,9
D	H	H	H	D	H	D	H	D	H	Ant5	5,9
H	H	H	H	D	H	H	H	D	H	Ant6	5,9

AMC; Amoksisilin-Klavulonik Asit, E; Eritromisin, G; Gentamisin, O; Oksasilin, P; Penisilin, R; Rifampin, S; Streptomisin, SAM; Sulbaktam-ampisillin, T; Tetrasiklin, V; Vankomisin, D;Dirençli, H;Hassas.

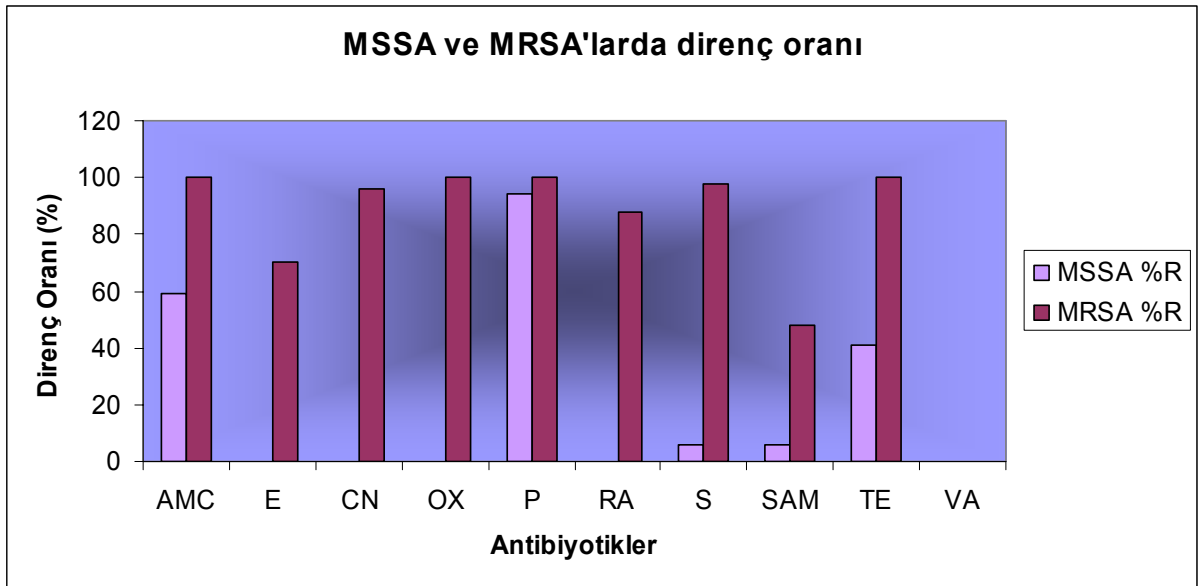
Çizelge 4. 5 : MRSA'ların antibiyotik duyarlılık profilleri ve antibiyotip dağılımları.

ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİ (MRSA)										Antibiyotip	Oran (%)
AMC	E	CN	OX	P	RA	S	SAM	TE	VA		n=30
D	D	D	D	D	D	D	H	D	H	Ant1	26,6
D	H	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant2	20,0
D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	Ant3	20,0
D	H	D	D	D	D	D	H	D	H	Ant4	10,0
D	D	D	D	D	H	D	H	D	H	Ant5	10,0
D	D	D	D	D	D	D	I	D	H	Ant6	6,6
D	D	D	D	D	H	D	D	D	H	Ant7	3,3
D	D	D	D	D	D	H	I	D	H	Ant8	3,3

AMC; Amoksisilin-Klavulonik Asit, E; Eritromisin, G; Gentamisin, O; Oksasilin, P; Penisilin, R; Rifampin, S; Streptomisin, SAM; Sulbaktam-ampisillin, T; Tetrasiklin, V; Vankomisin, D;Dirençli, H;Hassas, I; İlimli.

#### 4.3.2. MRSA ve MSSA'ların Kullanılan Antibiyotiklere Direnç Oranlarının Saptanması

Çalışma kapsamına alınan MSSA örneklerinin test edilen antibiyotiklere karşı direnç oranları sırasıyla; Amoksisilin-Klavulonik Asit için %59, Penisilin için %94, Tetrasiklin için %41, Streptomisin ve Sulbaktam-ampisillin için %6, Eritromisin, Gentamisin, Rifampin ve Vankomisin için %0 olarak belirlenirken; MRSA örneklerinin test edilen antibiyotiklere karşı direnç oranları ise sırasıyla; Amoksisilin-Klavulonik Asit, Gentamisin, Penisilin ve Tetrasiklin için %100, Streptomisin için %97, Sulbaktam-ampisillin için %50, Eritromisin için %70, Rifampin için %86 ve Vankomisin için %0 olarak Bölüm 3.4.3.'teki formül kullanılarak belirlendi. Bu oranlar Şekil 4.3'te özetlenmiştir.

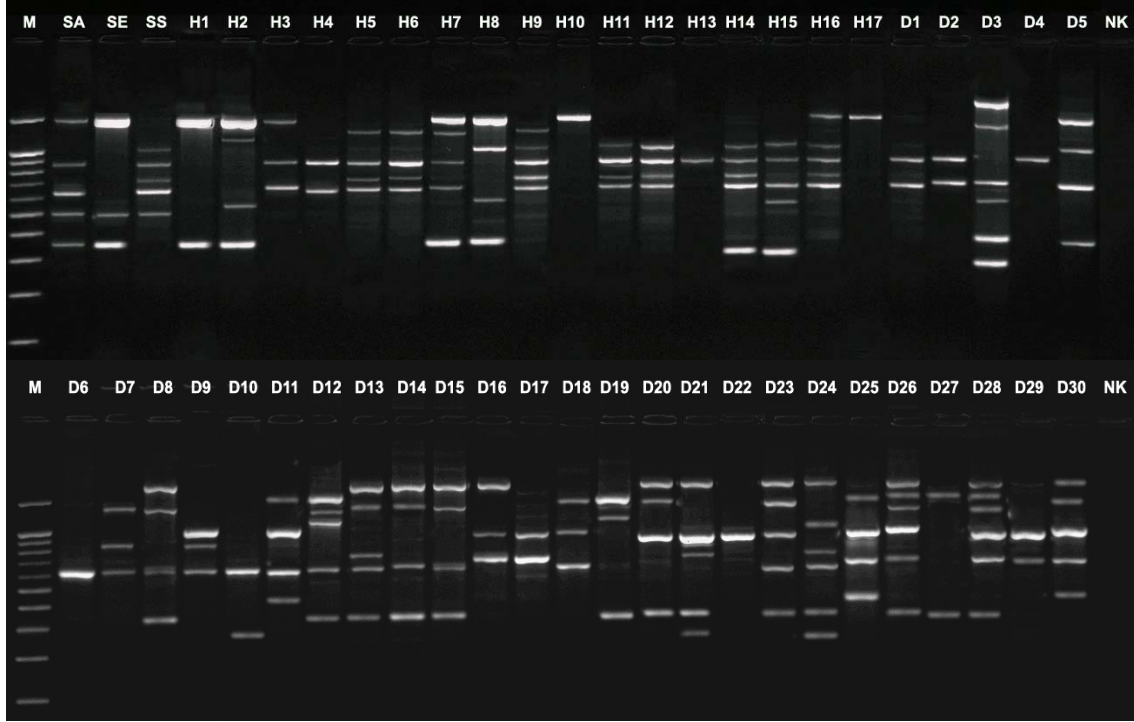


AMC; Amoksisilin-Klavulonik Asit, GM; Gentamisin, E; Eritromisin, OX; Oksasillin, P; Penisilin, RA; Rifampin, S; Streptomisin, SAM; Sulbaktam-ampisillin, TE; Tetrasiklin, VA; Vankomisin.

Şekil 4. 3. MSSA ve MRSA'larda direnç oranı.

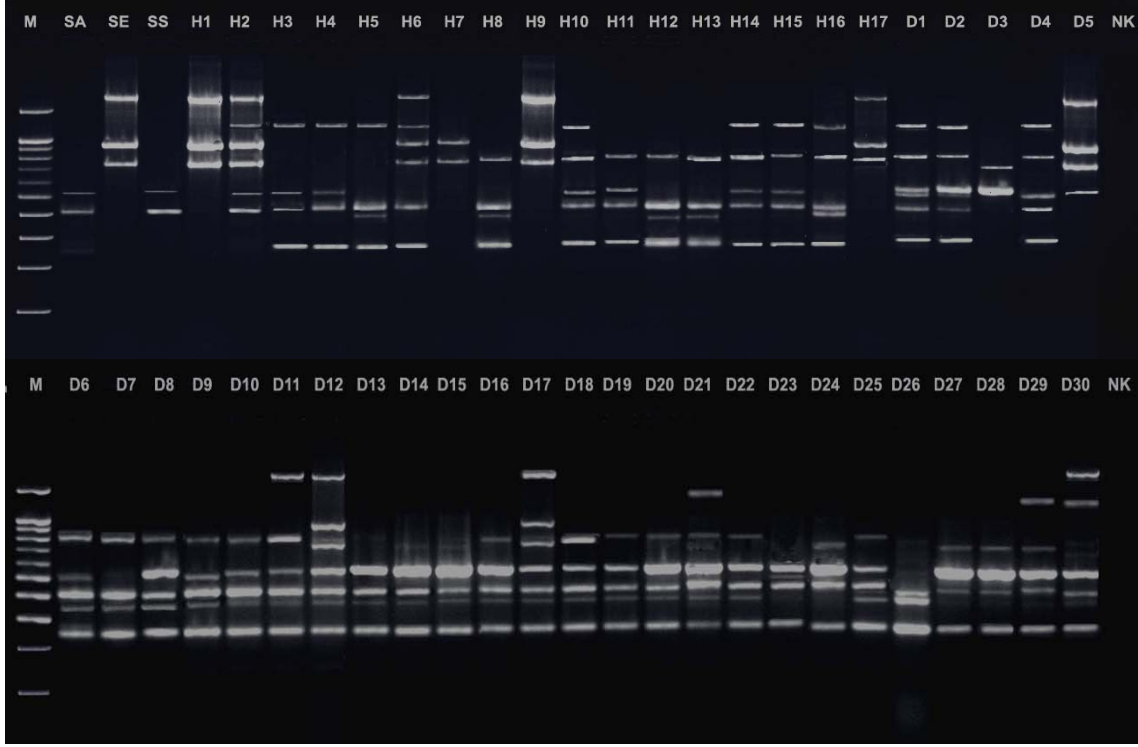
#### 4.4. RAPD PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

Çalışma kapsamında *Staphylococcus aureus* suşları RAPD-PCR analizinde 25 farklı RAPD primeri ile tarandı. RAPD-PCR analizlerinden elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.4. – 4.27. arasında verildi. RAPD-PCR analizleri sonucu rastgele primerlerin oluşturduğu monomorfik ve polimorfik bant sayıları saptandı (Çizelge 4.6.).

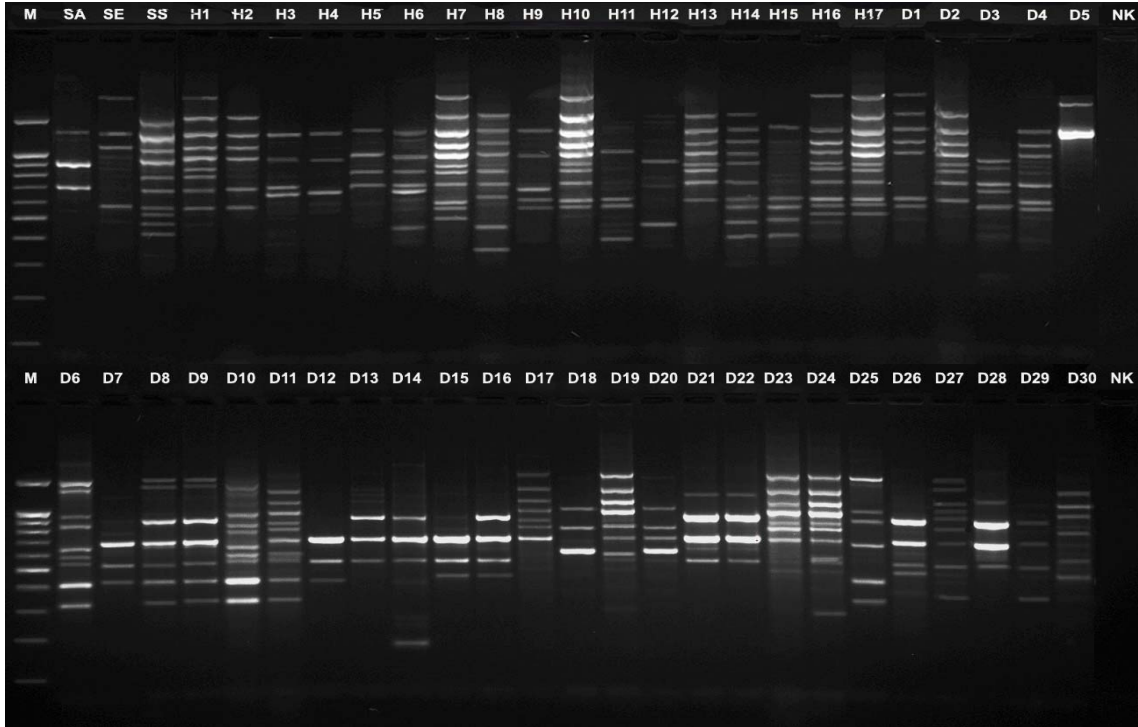


Şekil 4. 4. B0043-1 1 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markerı (BioBasic).



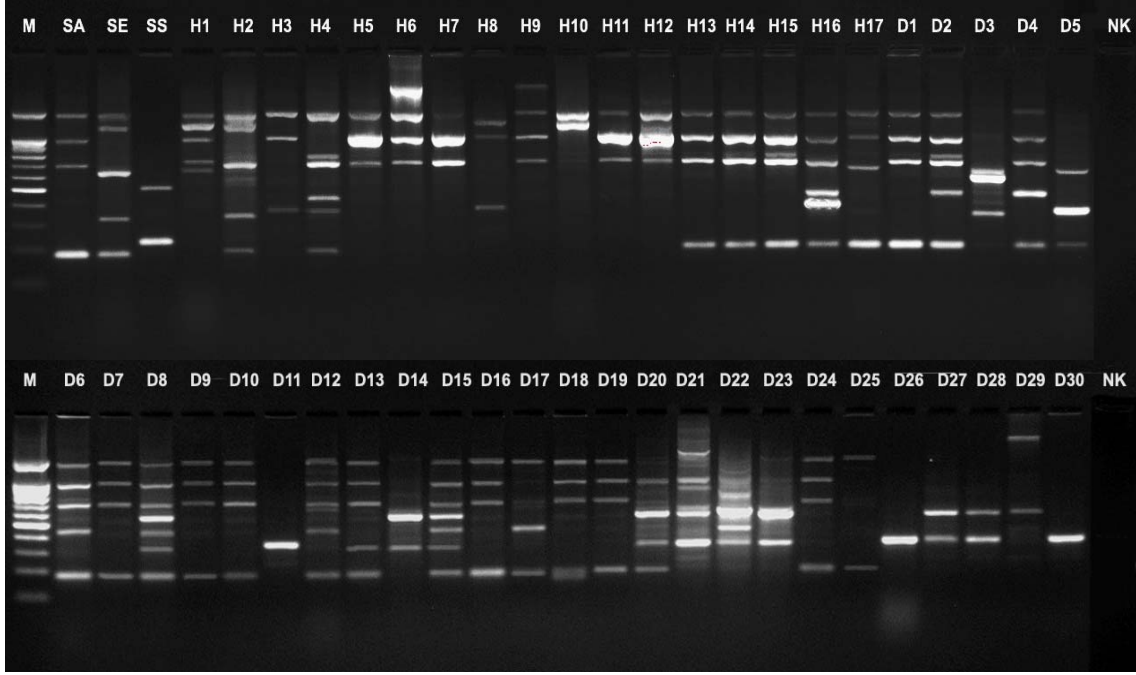
Şekil 4.5. B0043-1 2 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.



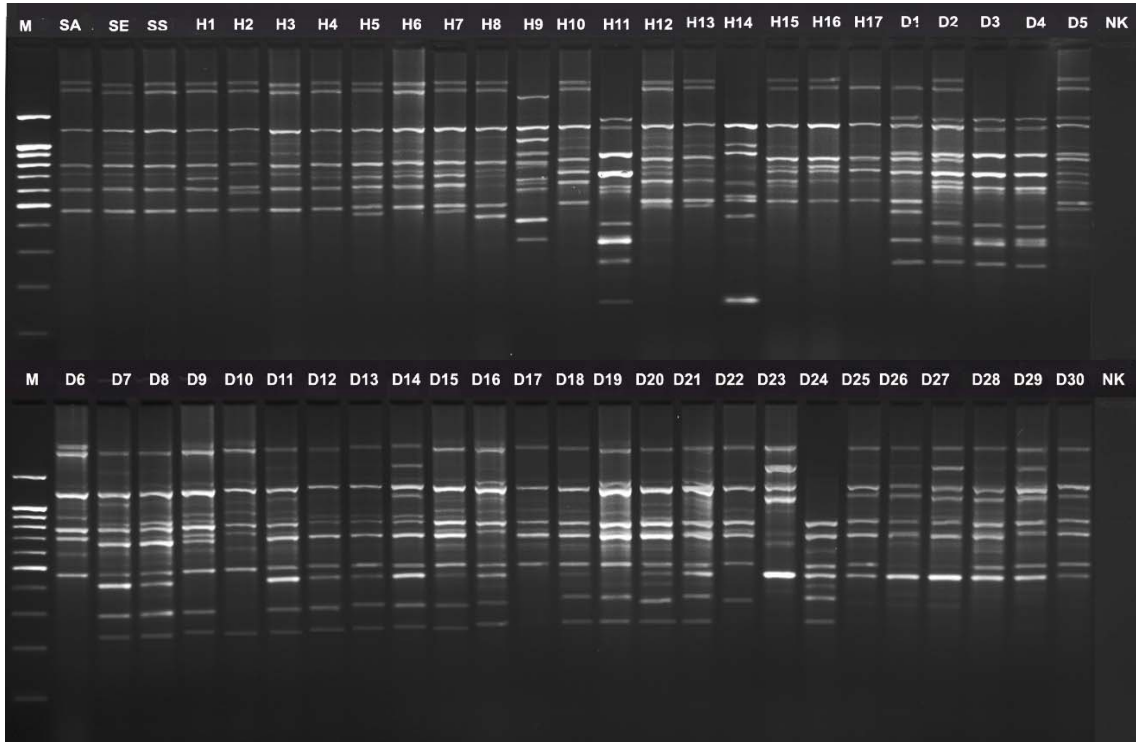
Şekil 4.6. B0043-1 4 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.



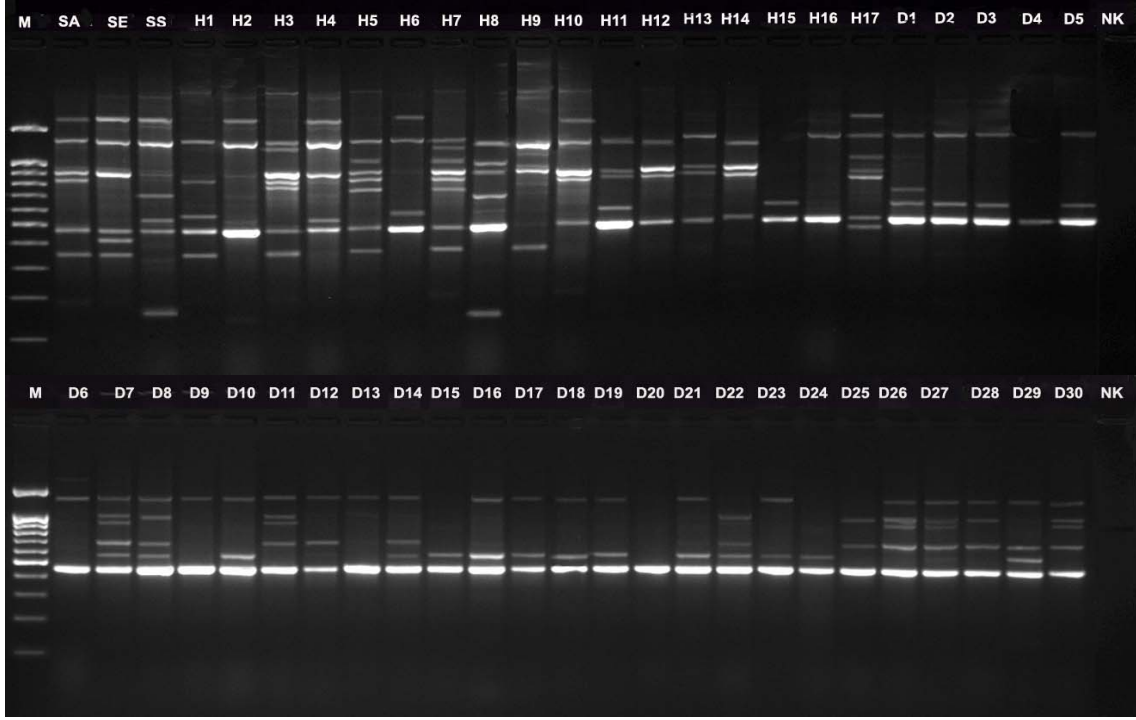


Şekil 4.7. B0043-1 6 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

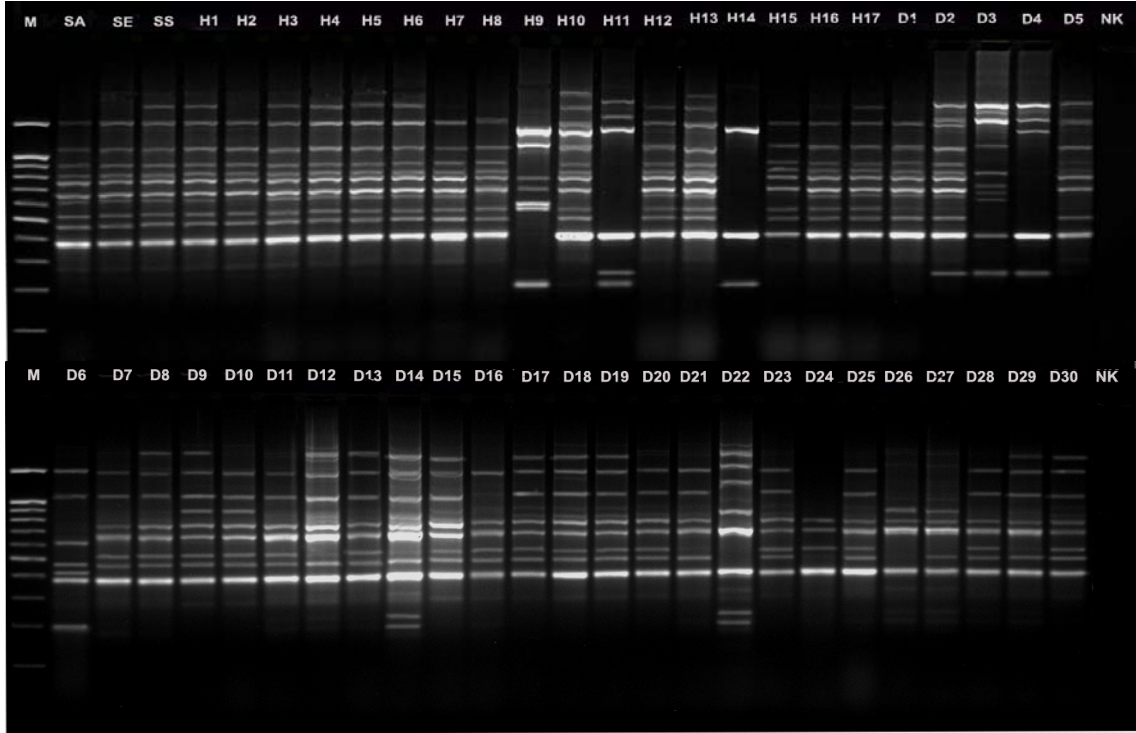


Şekil 4.8. B0043-1 7 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.

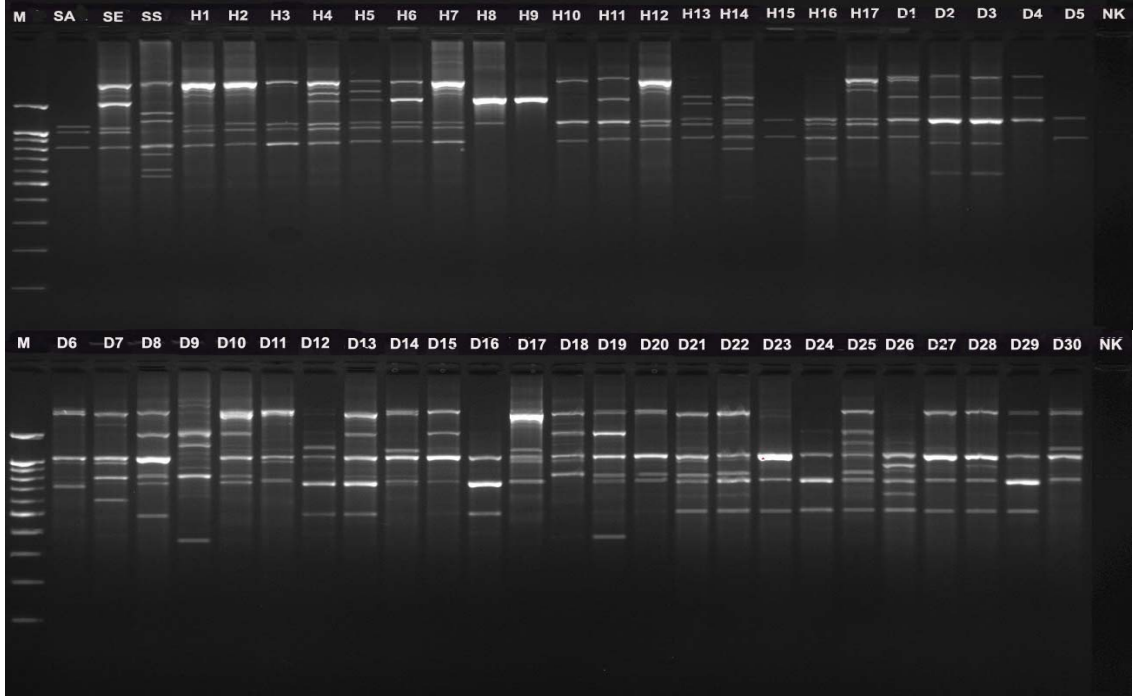


Şekil 4.9. B0043-1 9 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

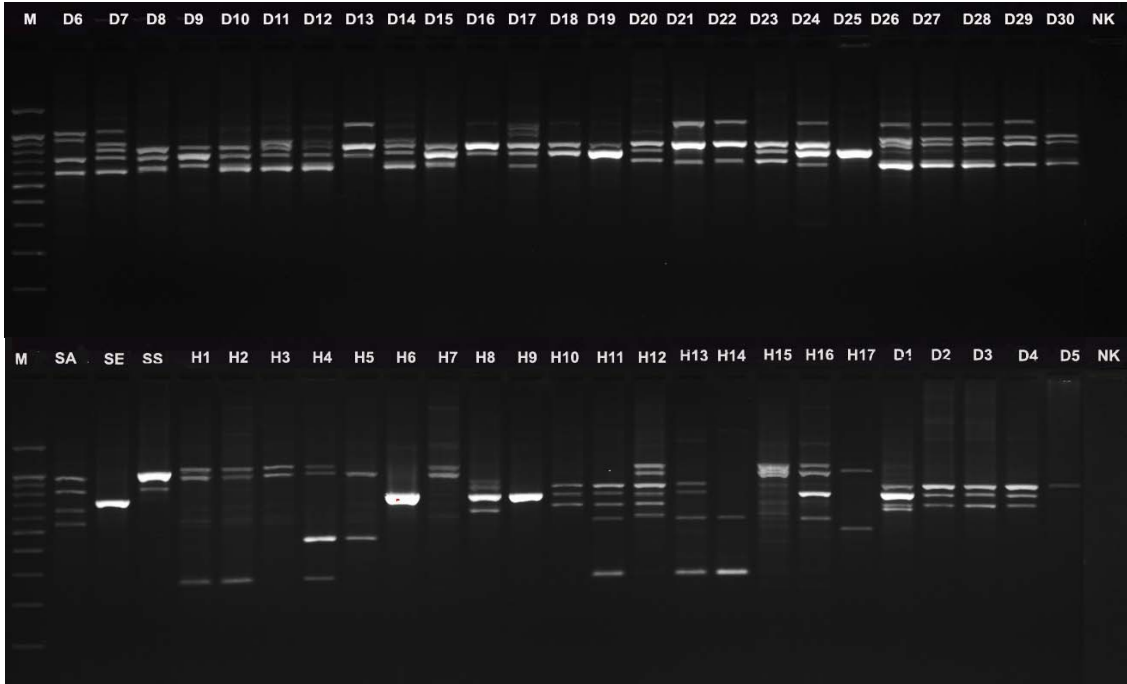


Şekil 4.10. B0043-1 10 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markerı.

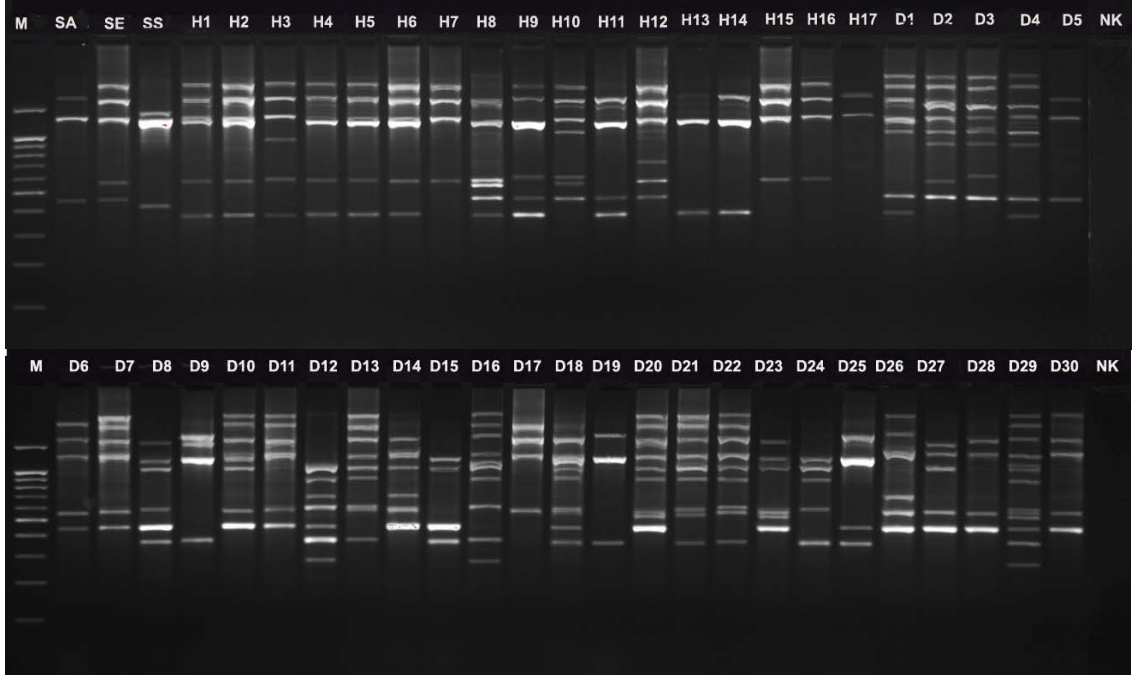


Şekil 4.11. B0043-1 11 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

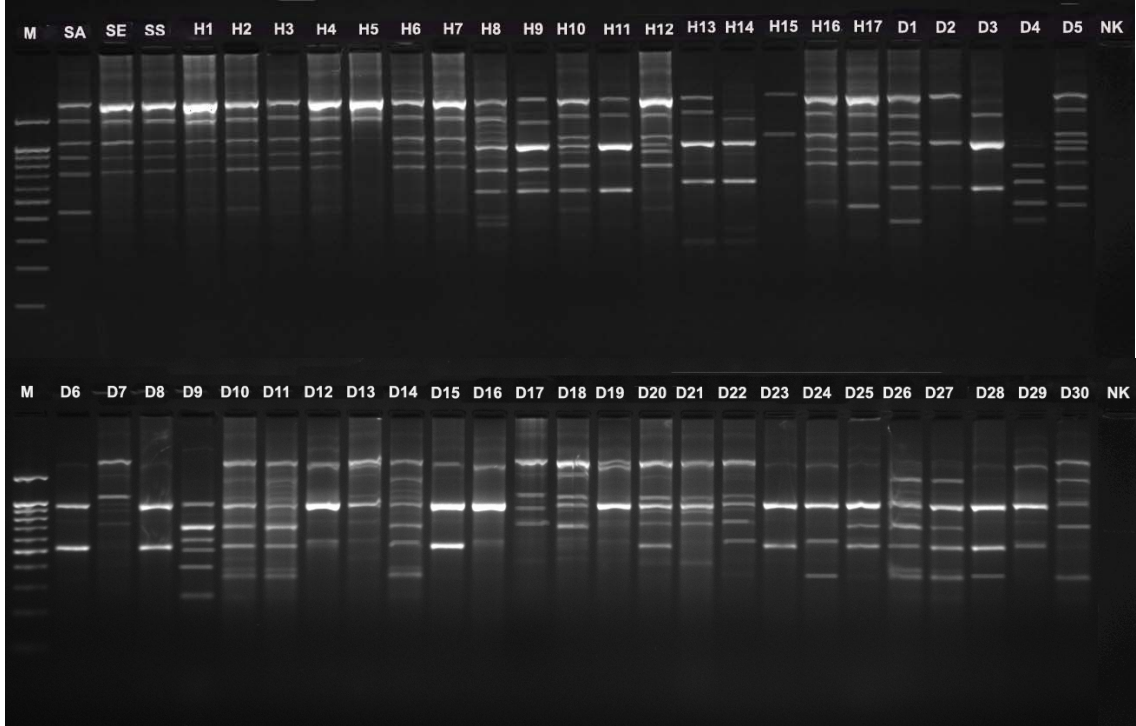


Şekil 4.12. B0043-1 12 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.



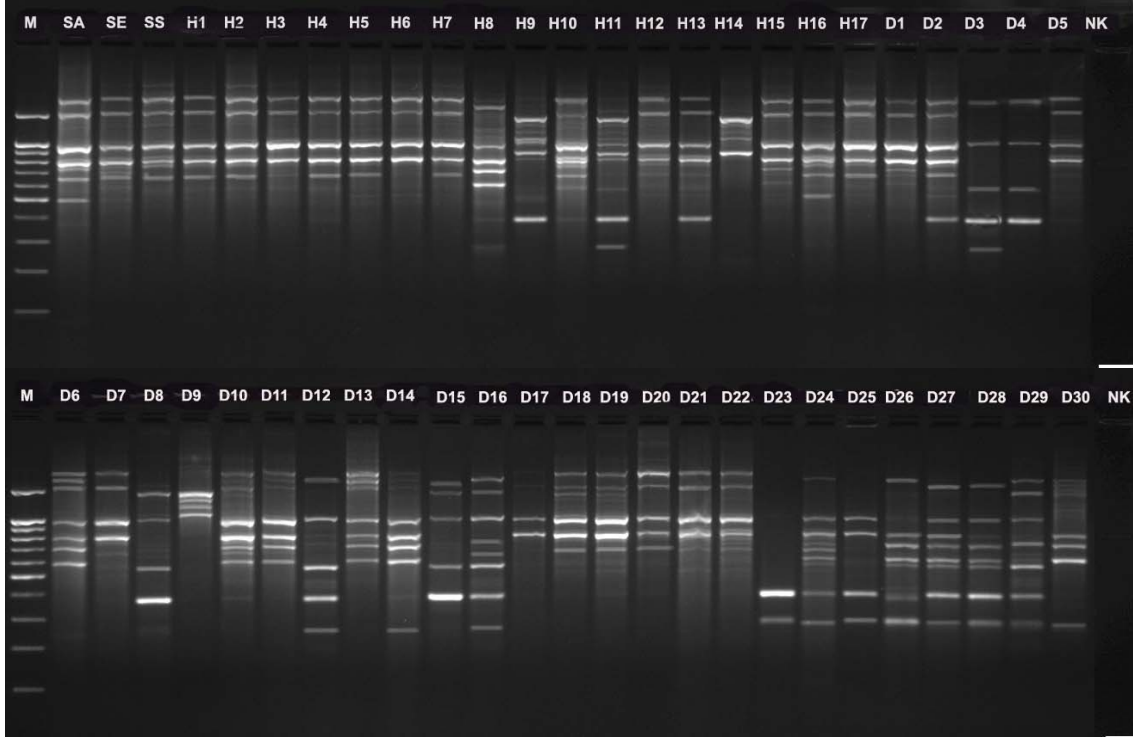
Şekil 4.13. B0043-1 13 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.



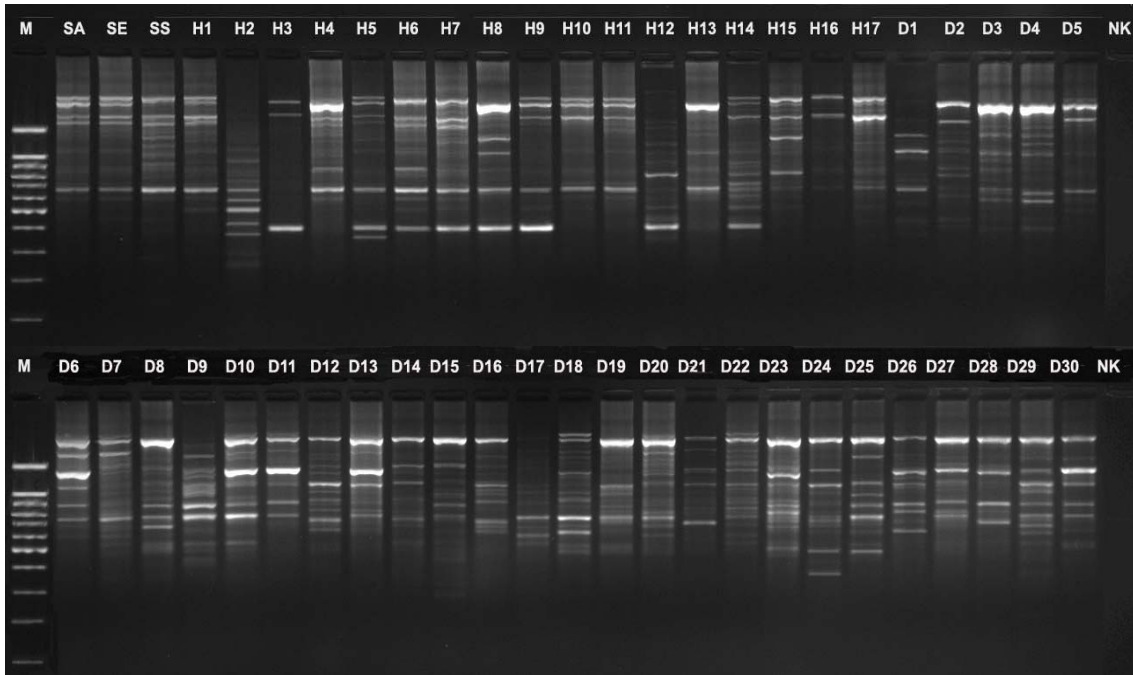
Şekil 4.14. B0043-1 14 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.



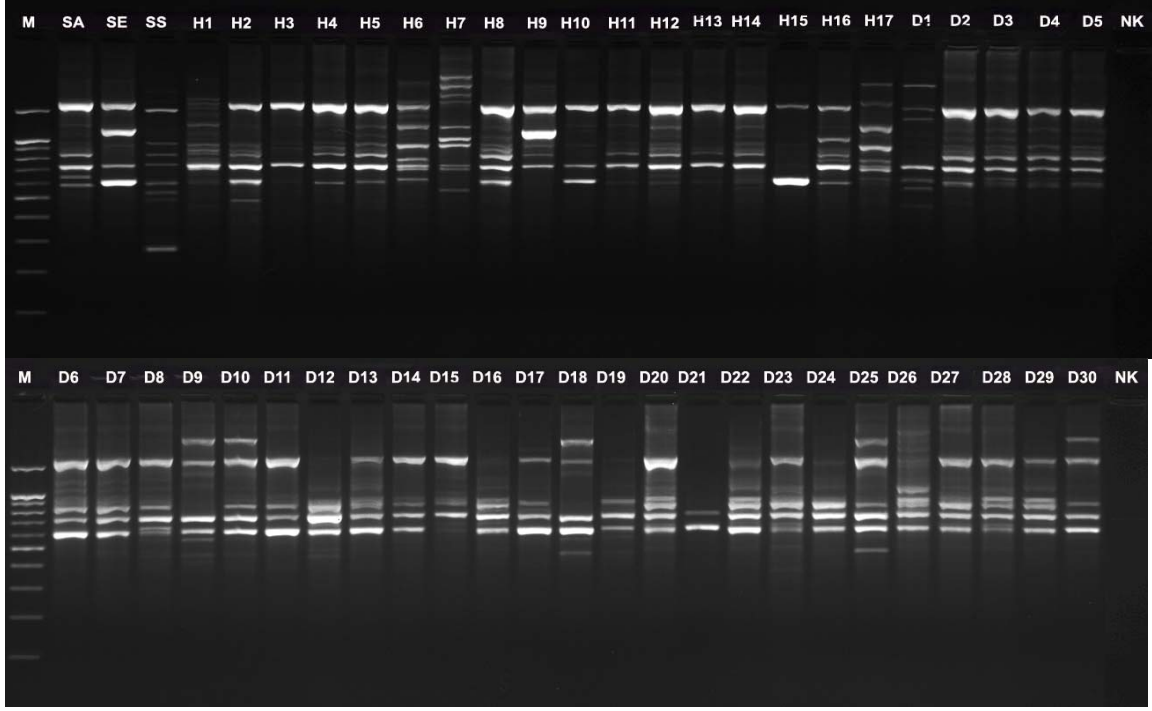


Şekil 4.15. B0043-1 16 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

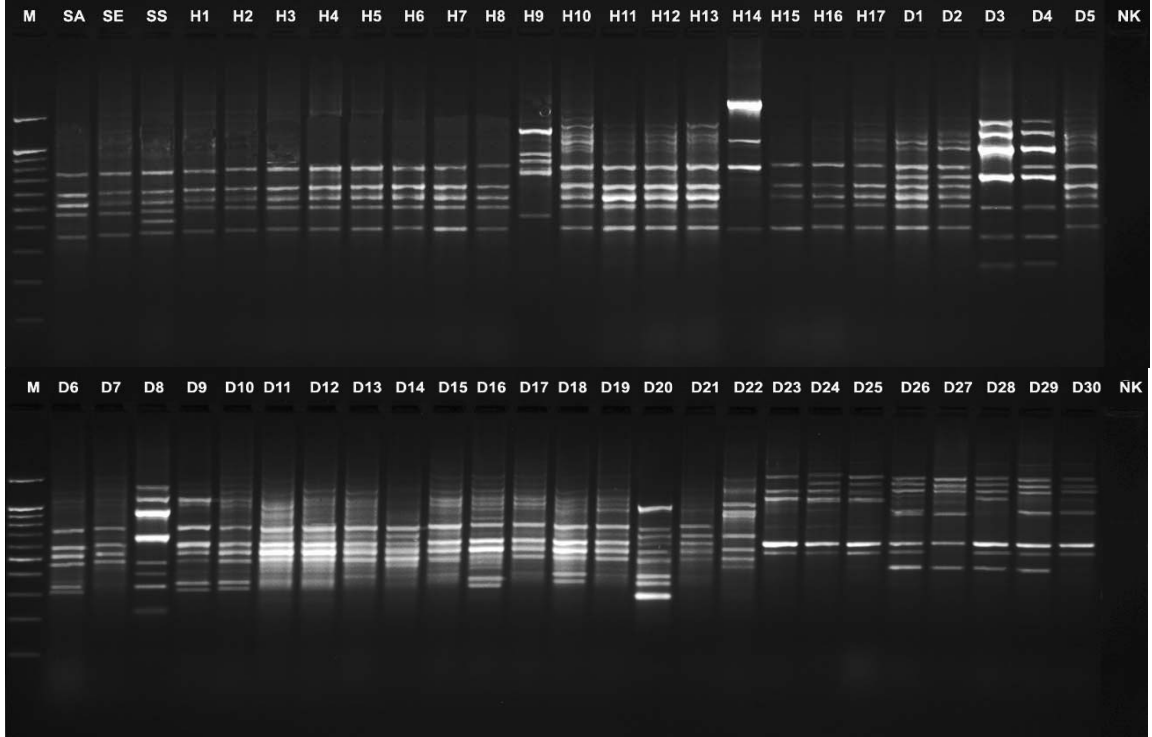


Şekil 4.16. S19 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.

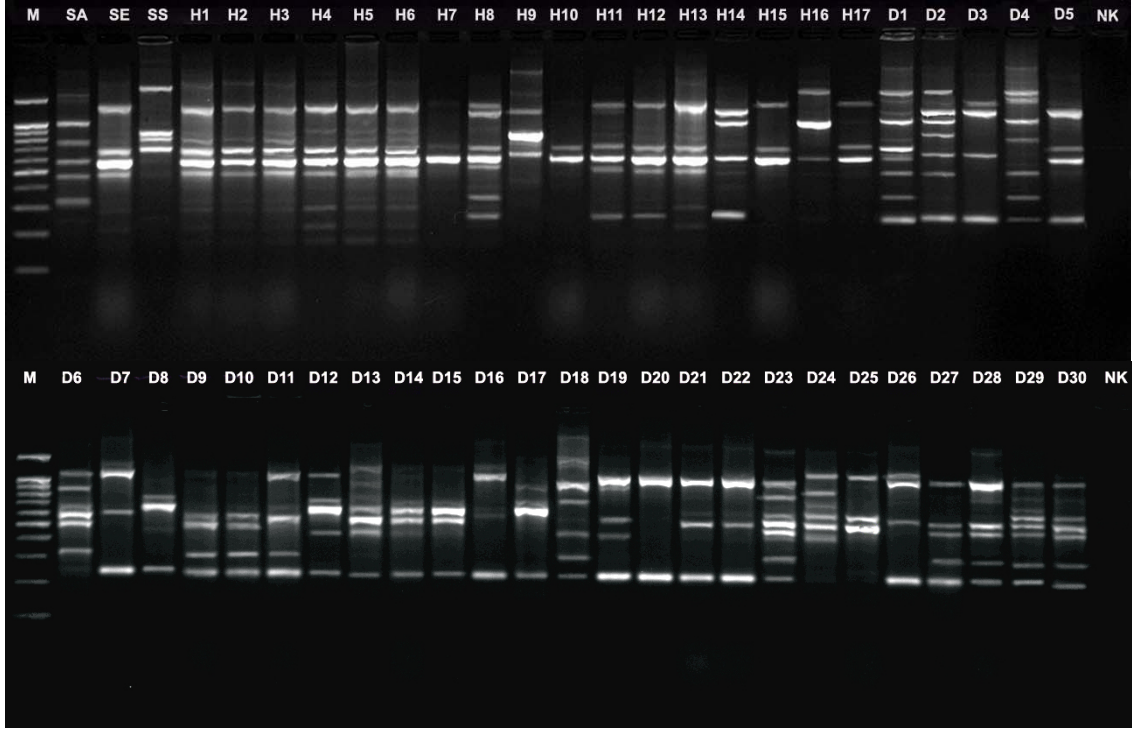


Şekil 4.17. S21 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

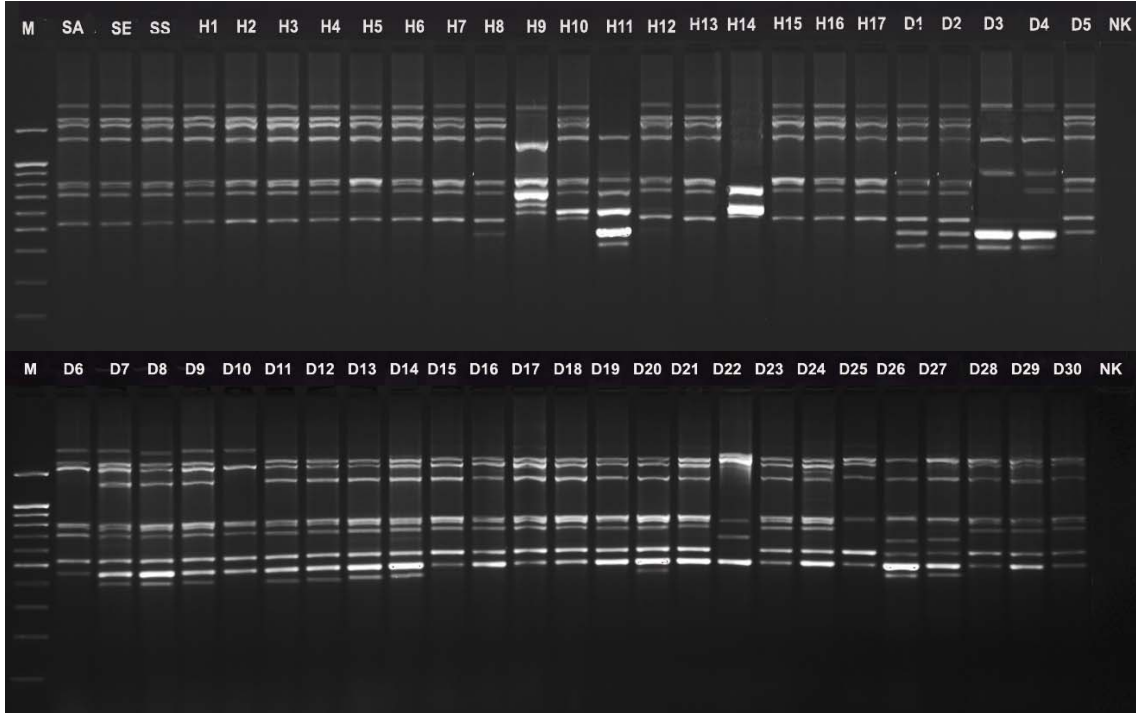


Şekil 4.18. S24 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.

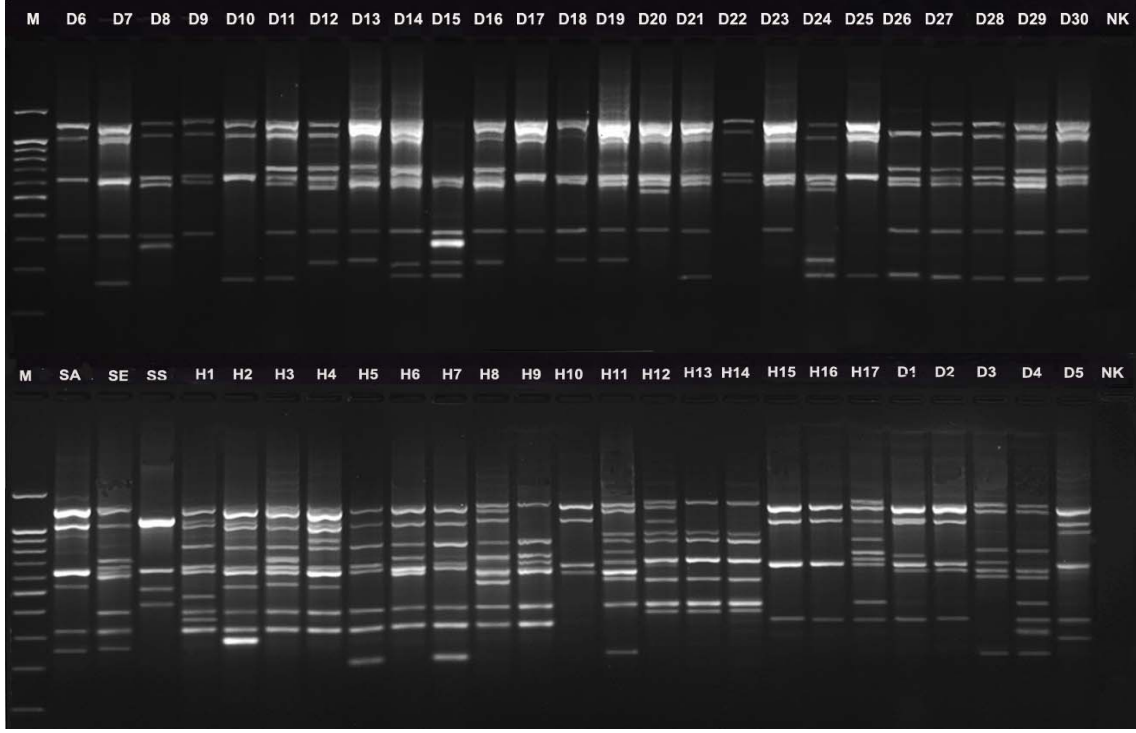


Şekil 4.19. S31 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

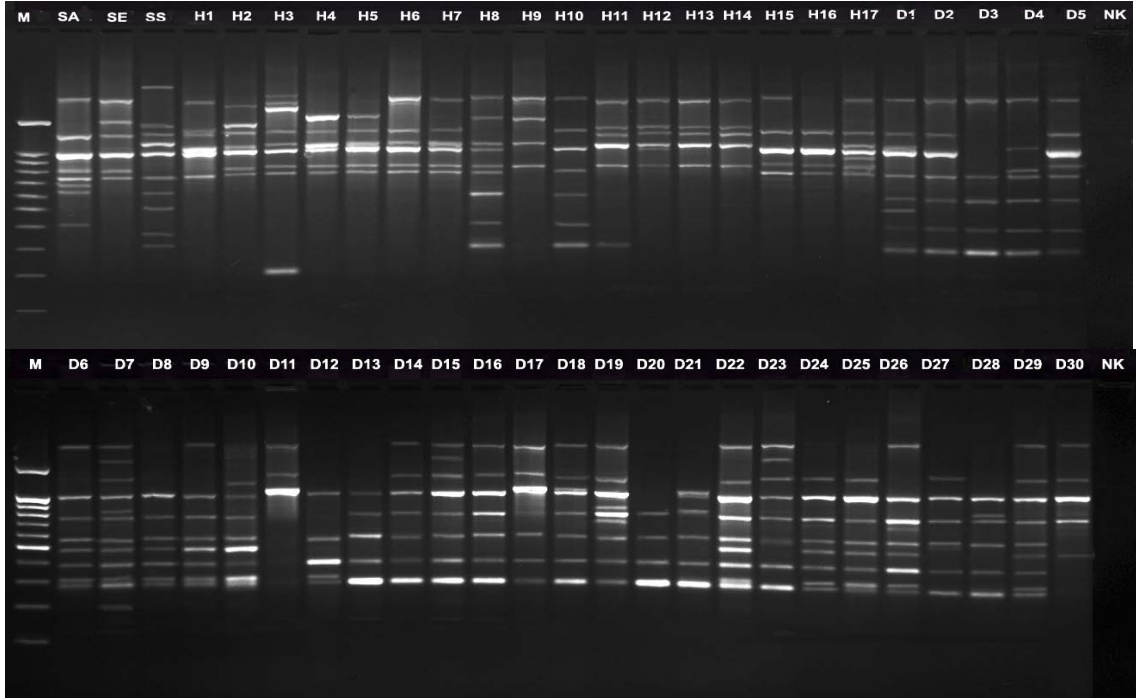


Şekil 4.20. S33 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.



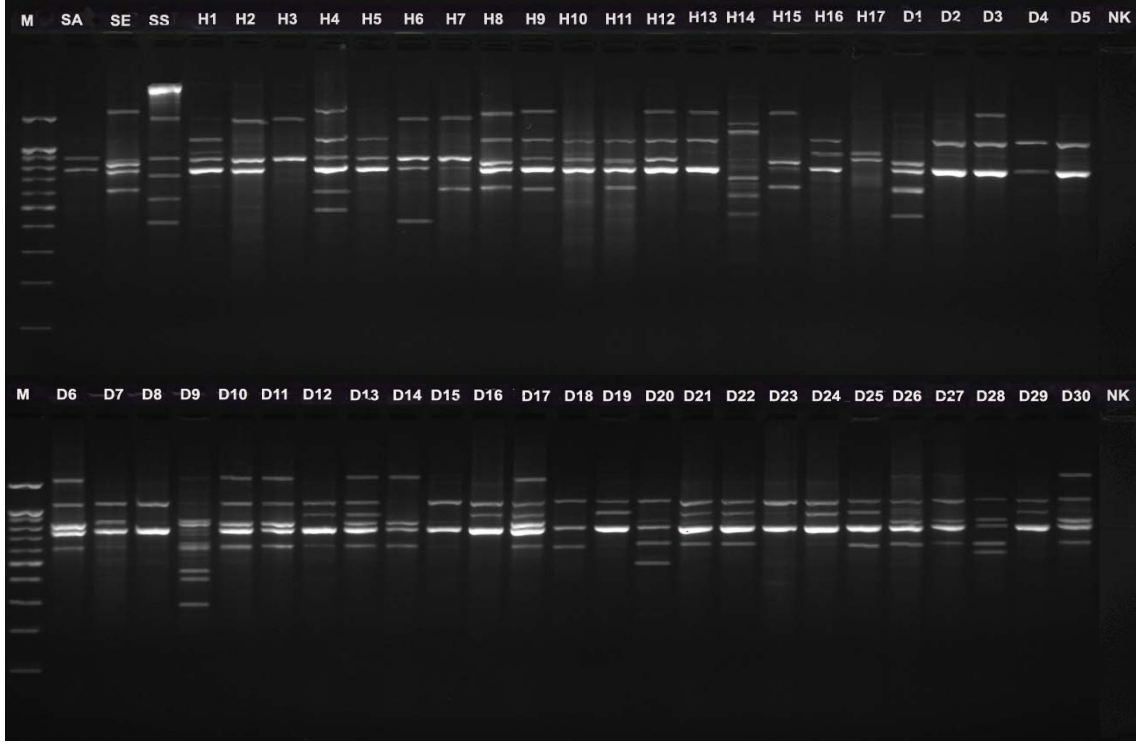
Şekil 4. 21. S112 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.



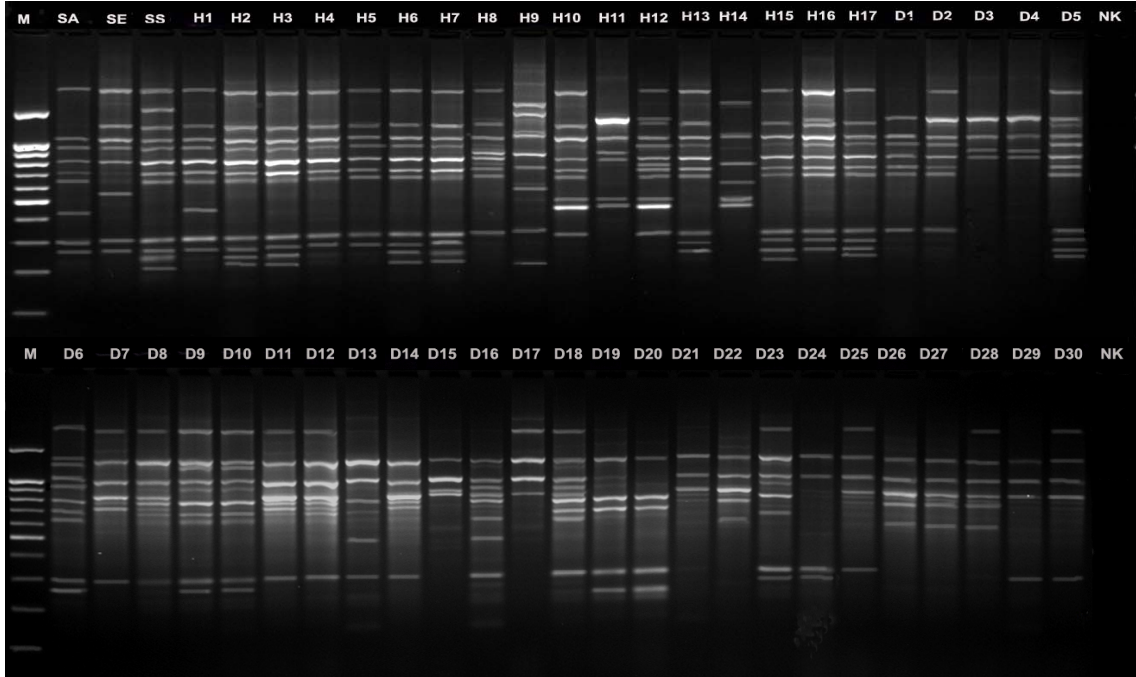
Şekil 4.22. S144 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.



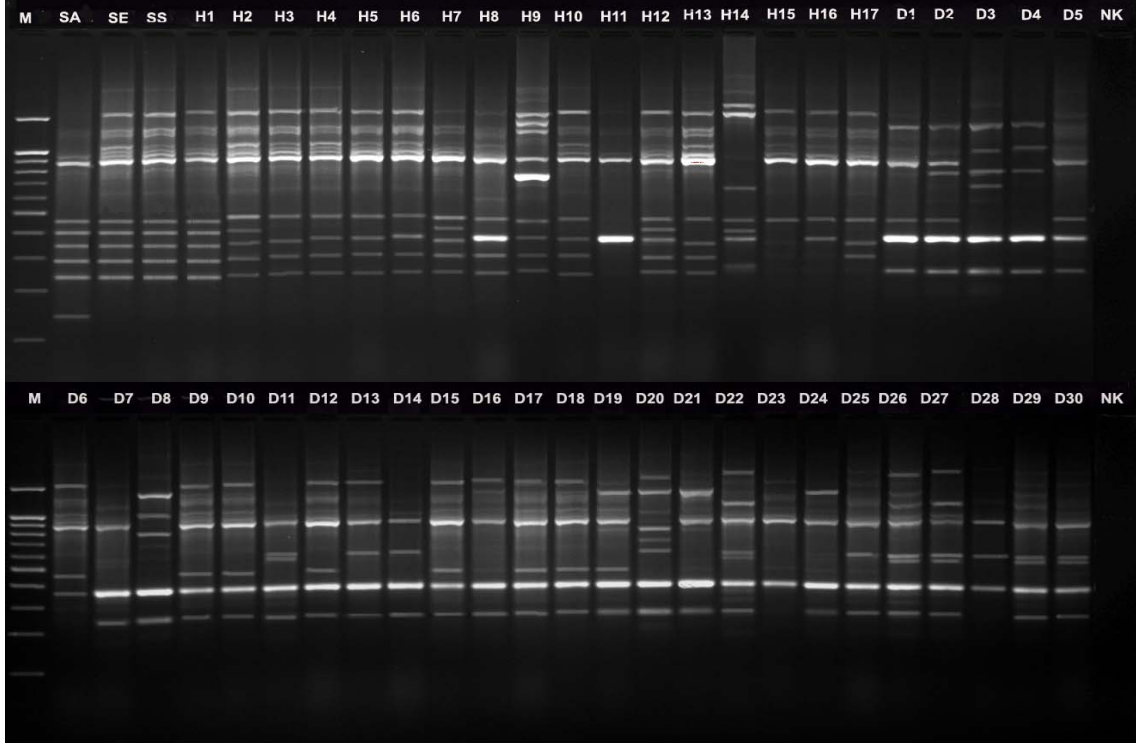


Şekil 4.23. S224 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

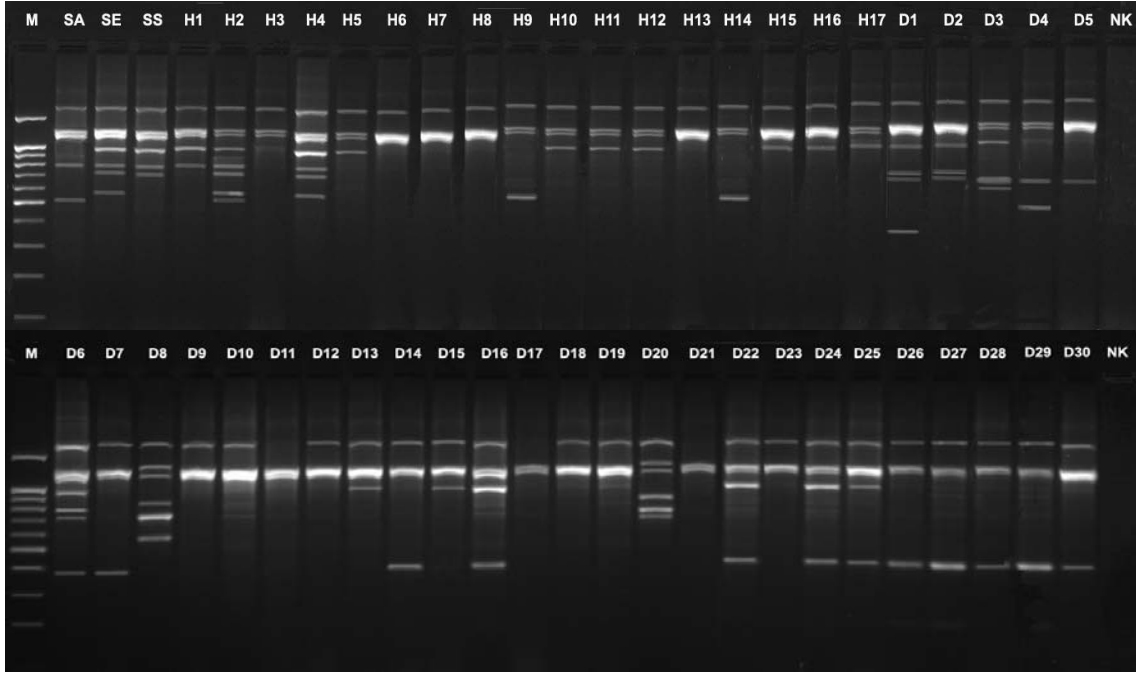


Şekil 4.24. S252 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.

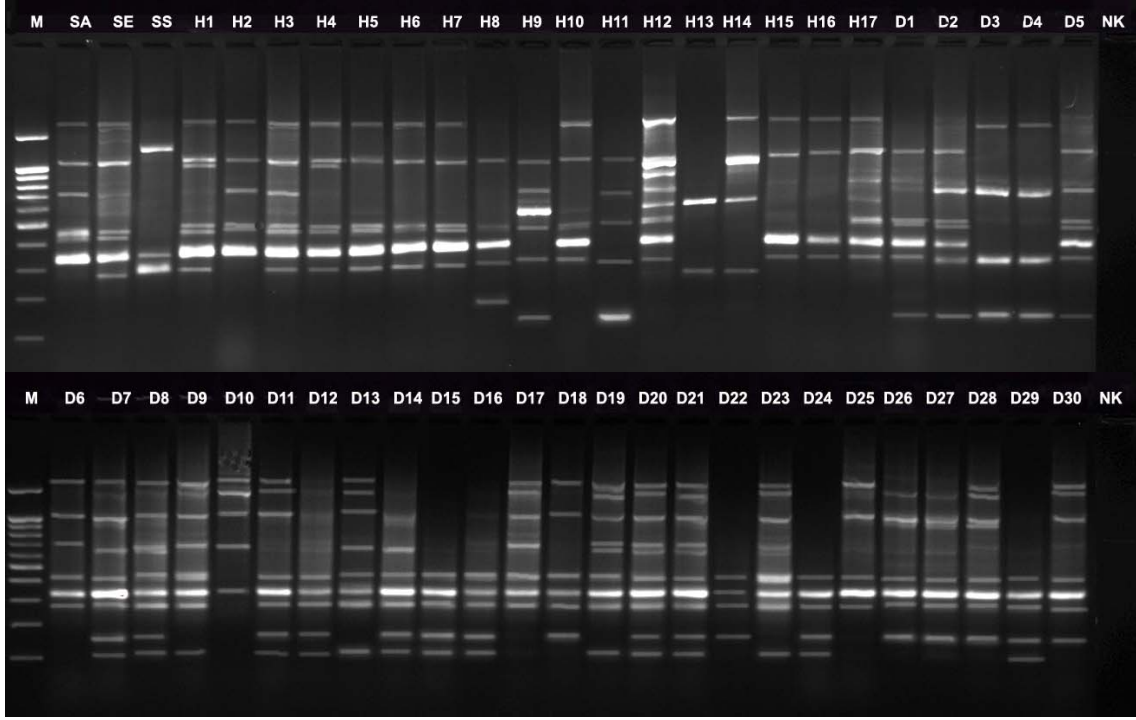


Şekil 4.25. S312 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.



Şekil 4.26. S1112 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.



Şekil 4.27. S1452 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, SS; *Staphylococcus saprophyticus*, H1-17; Hassas *Staphylococcus aureus* suşları, D1-30; Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları, NK; Negatif kontrol, M; 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.

Kullanılan 25 primerden 15'i *Staphylococcus aureus* suşlarının analizinde tekrarlanabilirlik ve güvenilir polimorfik RAPD-PCR ürünleri verirken, primerlerden 9'u (B0043-1 2, B0043-1 7, B0043-1 10, B0043-1 14, B0043-1 16, S19, S24, S33, S312) pozitif kontrol olan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus saprophyticus* örnekleri dikkate alındığında cins düzeyinde ayırım yapamadığı görüldü. Primerlerden sadece S211 ile çalışılan 50 adet genotipin hiçbirinden PCR ürünü elde edilememiştir.

Yurt içi ve yurt dışı literatür taraması yapılarak yapılan çalışmalarda birçok primerin taranması sonucu seçilen primerler çalışma kapsamımıza alınmıştır. Bunların içerisinde; B0043-1 2 primerinin *S.aureus* ve *S.saprophyticus* suşlarında (Şekil 4.5.), B0043-1 10, S19 ve S24 primerlerinin *S.aureus* ve *S.epidermidis* suşlarında (Şekil 4.10., 4.16. ve 4.18.), B0043-1 14 ve B0043-1 16 primerlerinin *S.epidermidis* ve *S.saprophyticus* suşlarında (Şekil 4.14 ve 4.15) ve B0043-1 7, S33 ve S312 primerlerinin *S.aureus*, *S.epidermidis* ve *S.saprophyticus* suşlarında (Şekil 4.8., 4.20. ve 4.25.) aynı profili gösterdiğinden bu primerler elenmiştir. Bu sonuçlar ile ilgili bant matrisleri EK-1'de gösterilmiştir.

Kullanılan primerlerin analizi sonucunda en yüksek polimorfizm oranı %100 iken en düşük polimorfizm oranı %72,7 olarak saptandı (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4. 6 : Rastgele primerlerin oluşturduğu monomorfik ve polimorfik bant sayıları.

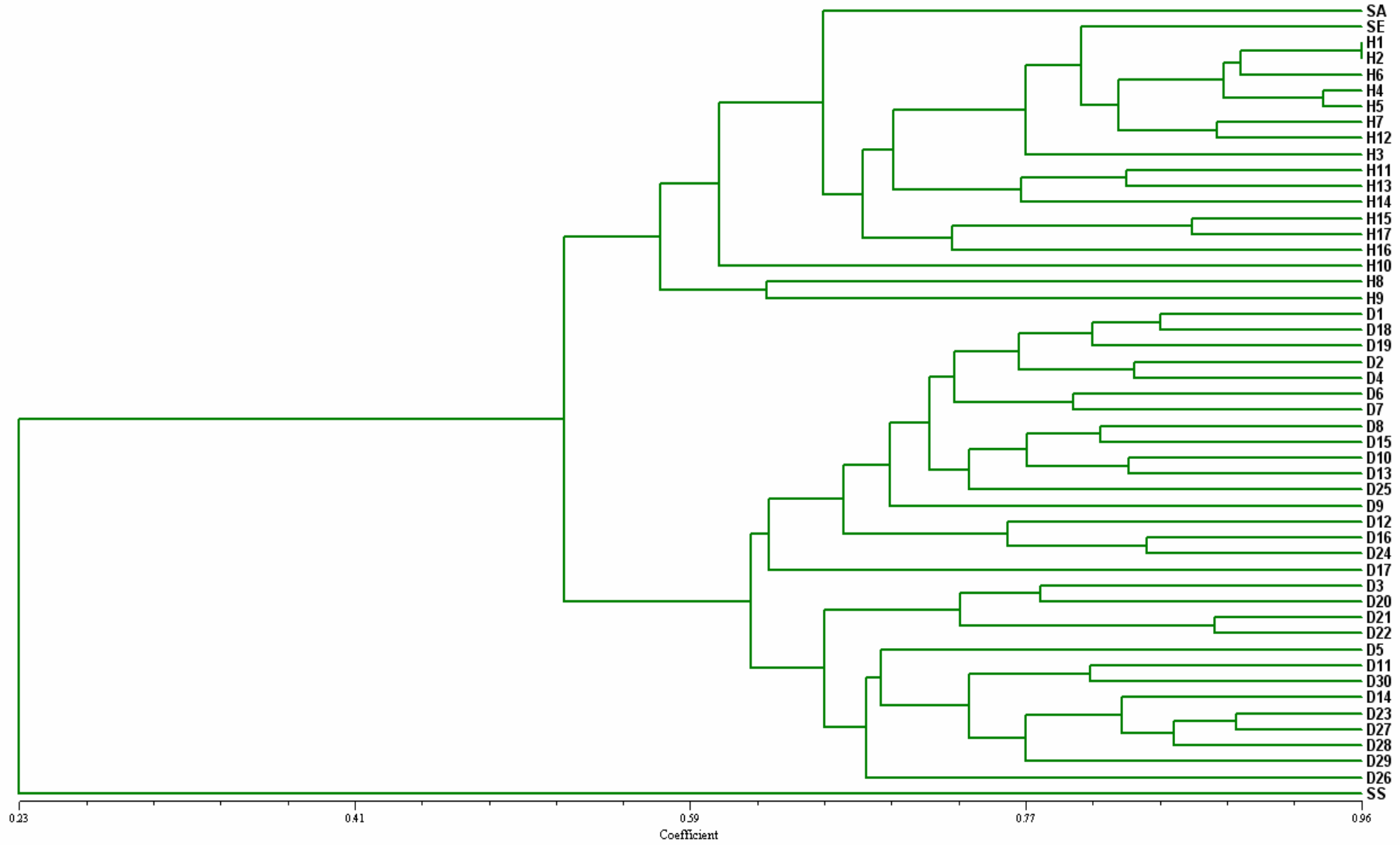
Sıra	Primer	Sekans	Toplam bant sayısı	Monomorfik bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	% Polimorfizm
1	B0043-1 1	AAGAGCCCGT	13	0	13	100
2	B0043-1 2	AGCGTCACTG	10	0	10	100
3	B0043-1 4	AGCAGCCTGC	18	0	18	100
4	B0043-1 6	GTGGATGCGA	13	0	13	100
5	B0043-1 7	GCGATCCCCA	18	0	18	100
6	B0043-1 9	TCACGATGCA	13	1	12	92,3
7	B0043-1 10	TCACGCTGCG	12	1	11	91,6
8	B0043-1 11	AAGTCCGCTC	19	0	19	100
9	B0043-1 12	CAATCGCCCT	13	0	13	100
10	B0043-1 13	CGGATCGACA	14	0	14	100
11	B0043-1 14	AATCGGGCAG	12	0	12	100
12	B0043-1 16	AATCGGGCGG	11	1	10	91
13	S19	ACCCCCGAAG	14	0	14	100
14	S21	CAGGCCCTTC	12	1	11	91,6
15	S24	AATCGGGCTG	14	3	11	78,6
16	S31	CAATCGCCGT	10	0	10	100
17	S33	CAGCACCCAC	13	0	13	100
18	S112	ACGCGCATGT	15	0	15	100
19	S144	GTGACATGCC	15	0	15	100
20	S211	TTCCCCGCGA	0	0	0	0
21	S224	CCCCTCACGA	13	0	13	100
22	S252	TCACCAGCCA	14	1	13	93
23	S312	TCGCCAGCCA	12	2	10	83,3
24	S1112	TCTCACCGTC	11	3	8	72,7
25	S1452	AAGAGGGCGT	15	0	15	100

#### 4.5. Kümeleme Analizi Sonuçları

Polimorfik primerlerden oluşan bant indekslerinin var ya da yok şeklinde veri bilgisinin kullanılmasıyla elde edilen ve Dice eşitliği ile oluşturulan benzerlik matrisine ait değerler Ek2'de gösterilmiştir. Cins düzeyinde ayırım yapamayan primerlerin elenmesine ek olarak NTSYS-pc 2.1 ile her bir primer için ayrı ayrı harita çizilerek primerler tek başına değerlendirildi. Elde edilen dendogram sonuçları ile fenotipik ve antibiyogram sonuçları paralellik gösteren primerler analiz için seçildi. Bunun sonucunda; B0043-1 6, B0043-1 11, B0043-1 13, S31 ve S144 primerleri dendogram çiziminde toplu olarak değerlendirildi. Bu verilere göre tüm örnekler içerisinde en düşük benzerlik oranı 0.1142 değeri ile *Staphylococcus saprophyticus* ve H9, en yüksek benzerlik oranı ise 0.9565 değeri ile H1 ve H2 örnekleri arasında bulundu. *Staphylococcus saprophyticus* ve H9 birbirine en uzak örnekler, H1 ve H2 ise birbirine en yakın örnekler olarak tespit edildi.

Metisilin hassas *Staphylococcus aureus* örnekleri dikkate alındığında en düşük benzerlik oranı 0.4000 değeri ile H10 ve H14, en yüksek benzerlik oranı 0.9565 değeri ile H1 ve H2 örnekleri arasında bulunurken; metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* örnekleri dikkate alındığında ise en düşük benzerlik oranı 0.4545 değeri ile D9 ve D11, en yüksek benzerlik oranı 0.8888 değeri ile D23 ve D27 örnekleri arasında bulundu.

Dice eşitliğinden elde edilen benzerlik değerleri temel alınarak oluşturulan dendogram bilgilerine göre çalışılan örneklerin iki ana gruba ayrıldığı görüldü (Şekil 4.28). Grup1'i yalnızca *S.epidermidis* ve diğer *S.aureus* örnekleri oluştururken Grup2'yi yalnızca *S.saprophyticus* örneğinin oluşturduğu görüldü. Grup1'in yine kendi içerisinde 2 alt gruba ayrıldığı ve bu alt gruplardan birini metisilin hassas örnekler oluştururken diğer grubu ise metisilin dirençli suşların oluşturduğu görüldü.



Şekil 4. 28. UPGMA metoduyla oluşturulan ve *Staphylococcus aureus* örnekleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrogram.

## 5. TARTIŞMA

*Staphylococcus aureus* insanda hastalık etkeni olarak sık rastlanan, virülansı yüksek bir mikroorganizmadır. 1950'li yıllarda birçok antibiyotiğe direnç kazanmış ve 1961 yılında ise metisiline karşı dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında çoklu antibiyotik direnci problemi ortaya çıktığı bilinmektedir. (Tambic et al., 1997; Günaydın et al., 2002). Son yıllarda vankomisin dirençliliğinin bildirilmeye başlanması MRSA enfeksiyonları ile mücadelede ciddi endişelere neden olmaktadır (William et al., 1997; Onasanya et al., 2003).

Birçok antibiyotiğe dirençlilik gösteren Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* 1980'li yıllardan sonra hastane enfeksiyonu etkenleri arasında önemli bir sorun haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, hastanede yatarak tedavi gören yaklaşık 10 hastadan birinde hastane enfeksiyonu ortaya çıkmaktadır (Mayon-White et al., 1988; Onasanya et al., 2003). Çoklu dirençliliğe sahip suşların neden olduğu bu tip enfeksiyonları tedavi etmek için daha geniş spektrumlu ve genellikle daha pahalı antibiyotikler kullanmak gerekmektedir (Çıtak ve Karaçocuk, 2004). Hastane enfeksiyonları, bilindiği üzere klasik enfeksiyonlardan daha ağır seyreden, tedavisi oldukça güç ve tedavi maliyeti de bir o kadar yüksek enfeksiyonlar olmaktadır. Örneğin; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan bir çalışmada, hastane enfeksiyonu nedeniyle hastaların hastanede yaklaşık 20 gün daha fazla kaldığı ve hasta başına maliyetin 1582 dolar arttığı gösterilmiştir (Yalçın et al., 1997).

Günümüzde MRSA ile enfekte olguların tedavisi ancak; nadiren etkili olan birkaç antibiyotik dışında, glikopeptid grubu olarak adlandırılan ve sadece damar içi yoldan uygulanabilen vankomisin ve teikoplanin adlı iki antibiyotikle mümkün olabilmektedir. Diğer önemli bir husus ise, uygun dozda kullanılsa bile vankomisinin, hastada mevcut MRSA kolonizasyonunu ortadan tamamen kaldıramamasıdır; yani MRSA enfeksiyonu olduğu için etkin olarak tedavi edilen bir hastanın tedavi bitiminden sonra da bu bakteri ile kolonize olma olasılığı bulunmaktadır (Haznedaroğlu, 2007).

*Staphylococcus aureus*'un yayılmasını önleme, enfeksiyon kaynağını saptama ve ortadan kaldırılmasına ilişkin çalışmalar, kökenlerinin doğru tanımlanmasını ve tiplendirmeleri gerekmektedir (Tenover et al., 1994). *Staphylococcus aureus*



izolatlarının tanımlanmasında kullanılan fenotipik yöntemler arasında, besin gereksinimleri, izoenzim tiplendirme, faj tiplendirme, antibiyotik duyarlılık testleri, yağ asiti analizi, multilokus enzim elektroforezi ve protein içeriklerinin analizi olarak sıralanabilmektedir. Günümüzde bu tekniklerin, PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve PCR (Polymerase Chain Reaction) gibi nükleik asite dayalı yöntemlerle birlikte kullanılması tercih edilmektedir (Tenover et al., 1994; Marguet-Van Der Mee et al., 1995; Wieser and Busse, 2000; Onasanya et al., 2003). Çalışmalarda DNA temel alınarak yapılan genetik tiplendirme metotları klasik fenotipik yöntemlere göre çok daha doğru ve hızlı cevap vermesi nedeniyle özellikle mikrobiyolojide patojen organizmaların tanımlanmasında uygulanmaya başlanmıştır (Tenover et al., 1994; van Belkum et al., 1995).

Fenotip tiplendirme yöntemlerinden biri olan Antibiyogram iyi bir şekilde standardize edilmiş bir yöntemdir. Ancak ayırım gücü iyi olmaması ve antibiyotik dirençlilik genlerini içeren plazmidlerin transformasyonu gibi durumlarla hızlıca değişkenlik gösterebilmektedir. Bu bağlamda tiplendirme için tek başına yeterli olamamakta ve diğer çalışmalar ile birlikte değerlendirildiğinde anlamlı sonuçlar elde edilebilmektedir (Busch and Nitschko, 1999).

Çalışmamızda izolatlar; fenotip metot olarak bugün rutin pratikte mikroorganizmalar arasındaki ilişkileri belirlemede en sık kullanılan yöntem olan antibiyotik profilleri ve genotip metot olarak da RAPD PCR ile tiplendirildi.

RAPD PCR metodunun avantajları olarak; amplifikasyon için kullanılan kısa primer dizilerinin ticari olarak bulunabilirliği ve kolay sentezlenebilirliği, agaroz jel elektroforezi ile belirgin bir ayırımın yapılabilirliği ve bu teknik için genel PCR yöntemlerine kıyasla spesifik ekipmanlara ihtiyaç olmaması sayılabilmektedir. RAPD-PCR'ı biyokimyasal yöntemlerle karşılaştıracak olursak; bu yöntemin ekonomik, basit, daha duyarlı ve oldukça hızlı olduğunu söylemek mümkündür (van Leeuwen et al., 1996; Onasanya et al., 2003).

Çalışmamızda test edilen antibiyotiklere karşı direnç oranları metisilin direncine göre değerlendirildiğinde; MSSA örneklerinde direnç oranları düşük MRSA örneklerinde ise bu oranlar yüksek bulunmuştur (Şekil 4.3.). Hasbek ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışma da bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Çalışmada izole edilen MSSA ve MRSA örneklerinin antibiyotik direnç profilleri incelendiğinde ise; MSSA suşlarının %94'ünün, MRSA suşlarının ise %100'ünün penisilin'e dirençli oldukları saptanmıştır (Şekil 4.3.). Elde edilen bu sonuçlar ülkemiz literatüründe de bildirilen sonuçlarla benzerlik taşımaktadır (Aydın vd., 2001; Saçılık, 1998). *S.aureus*'larda CLSI önerilerine göre penisilin ve oksasilin veya metisilin direncinin saptanması tüm  $\beta$ -laktam ajanları için yorum yapılabilmesini sağlamaktadır (CLSI, 2005). Dolayısıyla farklı servislerden toplanmış olan MRSA örneklerinin de tüm  $\beta$ -laktam antibiyotiklere (penisilin, seflosporinler, karbanepemler) dirençli olduğu söylenebilmektedir. Çalışmamızda; MRSA örneklerinde penisilin ve metisilin direncinin yanı sıra taranan diğer antibiyotiklere de yüksek oranda direnç tespit edilmiştir (Şekil 4.3.). Bu nedenle de olası enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri de son derece kısıtlı olmaktadır. Elde edilen sonuçlar MRSA enfeksiyonlarının kontrolüne ve önlenmesine yönelik çalışmaların önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

MRSA'ların direnç geliştirdiği diğer bir grup ise aminoglikozid antibiyotiklerdir. Aminoglikozidlere karşı direnç artışının yanı sıra, birden fazla aminoglikozide karşı direnç de gözlenmiştir (Çizelge 4.3 ve 4.5.). 1995 yılında yapılan bir çalışmada da benzer bir sonuç bulunmuştur (Arslan, 1995). Çalışmamızda MRSA'larda aminoglikozid antibiyotiklerden streptomisin ve gentamisin incelenmiş ve her iki antibiyotiğe de direnç geliştiren suşlara rastlanmıştır (Çizelge 4.3.). Bu durum da aminoglikozidlerin bu tip enfeksiyonlarda tek ilaç olarak kullanılmaması gerektiğini ispatlamaktadır.

MRSA'larda dikkat çeken diğer bir durum ise aminoglikozid grubuna giren antibiyotiklere (streptomisin / gentamisin) ve rifampin antibiyotiğine karşı geliştirdikleri direnç oranının önceki yıllara göre artış göstermesidir. Arslan (1995) tarafından yapılmış olan bir çalışmaya göre MRSA'larda gentamisine direnç %61, rifampine direnç %26, Mentеш (1995) tarafından bir başka çalışmada gentamisine direnç

%90.5, rifampine direnç %66.7 bulunurken bizim çalışmamızda bu değerler sırasıyla %100 ve %86 şeklindedir (Şekil 4.3.). Görüldüğü gibi çalışmamızda; bu iki antibiyotiğe karşı görülen dirençlilik değerleri literatür sonuçlarına göre daha yüksek oranda saptanmış olup; bu bulgu da çalışmamızda kullanılan suşların aminoglikozid grubuna giren antibiyotiklere ve rifampin antibiyotiğine karşı artan bir dirençlilik gösterdiği belirtilebilmektedir.

Farklı servislerden toplanan izolatlardan elde edilen antibiyogram sonuçları, bütün izolatların vankomisine duyarlı olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.2. ve 4.3.). Elde edilen bu sonuç literatür ile uyumlu bulunmuştur (Arslan, 1995; Diler ve Kocabeyoğlu, 1998; Saçılık, 1998; Çıtak ve Karaçocuk, 2004). Bugüne kadar vankomisine dirençli izolatın bulunamaması bu antibiyotiğin stafilokoklara karşı kullanımını arttırmıştır. Metisilin de önceleri stafilokoklar için ideal bir antibiyotik olarak nitelendirilmiş ancak kullanıma girmesinden çok kısa bir süre sonra metisilin dirençli suşlar ortaya çıkmıştır (Tanır, 1999). Bu tip suşların artışıdaki neden bilindiği gibi direncin plazmid kökenli olmasıdır. Plazmid kökenli dirençliliklerin bakteriler arası geçişinin daha kolay olması nedeniyle yine plazmid kökenli vankomisin dirençliliğinin de enterokoklarda olduğu gibi ileride *Staphylococcus aureus* için de tehlike oluşturabileceği düşüncesi akla gelmektedir (Yüce, 2001).

RAPD PCR analizi sonucunda; çalışmada kullanılan rastgele seçilmiş 25 primerden sadece S211 ile hiçbir örnekte PCR ürünü elde edilemezken primerlerden 9'unun (B0043-1 2, B0043-1 7, B0043-1 10, B0043-1 14, B0043-1 16, S19, S24, S33, S312) pozitif kontrol örnekleri arasında cins düzeyinde ayırım yapamadığı görüldü (Şekil 4.5., 4.8., 4.10., 4.14., 4.15., 4.16., 4.18., 4.20. ve 4.25.).

Çalışmamızda; S312 primeri pozitif kontrol olarak kullanılan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus saprophyticus* örneklerinde aynı profili gösterirken (Şekil 4.25), S312 primerinin kullanıldığı Onasanya ve ark. (2003) tarafından yapılan insan, bitki ve hayvan kökenli *Staphylococcus aureus* örneklerinin kullanıldığı bir çalışmada; primerin örnekleri insan ve bitki-hayvan kökenli olmak üzere iki ana gruba ayırabildiği ileri sürülmüştür. Fakat insan kökenli örneklerin kendi içerisinde bir anlam ifade edip etmediği

çalışmada belirtilmemiştir. Bu da bize S312 primerin *S.aureus* örneklerinin kendi içerisinde ayrımı yapılması için kullanılmaması görüşünü desteklemektedir.

Kümeleme analizi sonucu elde edilen dendogram bilgilerine göre örneklerin iki ana gruba ayrıldığı, Grup1'in yalnızca *S.saprophyticus*'tan oluştuğu görülmüştür. Antibiyogramdan elde edilen sonuçlara göre metisilin hassas ve dirençli ayrımı yapılan suşların dendogram sonucunda da Grup 2'de kendi içerisinde aynı alt grupta toplandığı görülmüştür (Şekil 4.28). Metisilin hassas ve dirençli örneklerin 4 farklı primer ile RAPD analizinin yapıldığı benzer bir çalışmada; analiz sonucu metisilin hassas ve dirençli örneklerin bizim çalışmamızdaki gibi iki ayrı alt grupta toplanması çalışmamızla paralellik göstermektedir (Neela; 2005).

Çalışma kapsamındaki örneklerin antibiyotip paternleri karşılaştırıldığında; MSSA örneklerinde 6, MRSA örneklerinde ise 8 farklı patern belirlenmiştir (Çizelge 4.4 ve 4.5). Buna göre, incelenen suşlardan MSSA için %29,4 oranıyla iki baskın tip (Ant tip2 ve tip3), MRSA için ise %26,6 oranıyla bir baskın tip (Ant tip1) elde edilmiştir. PCR analizinde; B0043-1 6, B0043-1 11, B0043-1 13, S31 ve S144 primerlerinin bant matrisleri kullanılarak çizilen dendogram sonuçlarında örneklerin aynı antibiyotip paternine sahip olmasının yanı sıra aynı klinik izolattan köken alıp almadığı benzerlik oranını etkilemektedir. Metisilin hassas örneklerden benzerlik oranı en yüksek olan H1 ve H2 örnekleri aynı antibiyotip paternini (Ant tip1) göstermesinin yanında aynı klinik örnekten izole edildikleri görülmüştür. Bunun gibi metisilin dirençli örneklerden benzerlik oranı en yüksek olan D23 ve D27 örneklerinin de aynı antibiyotip paternine (Ant tip 3) sahip olduğu görülmüştür. Diğer metisilin hassas farklı antibiyotip paterni gösteren ve farklı klinik örneklerden izole edilen H10 ve H14 örneklerinin 0.4000, metisilin dirençli aynı antibiyotip paterni gösteren (Ant tip 5) ve farklı klinik örneklerden izole edilen D9 ve D11 örneklerinin de 0.4545 gibi düşük benzerlik oranına sahip olduğu saptanmıştır. Bu da bize; metisilin dirençli ve hassas *S.aureus* örneklerinde antibiyotip paternlerinin ve izole edilen klinik örneklerinin farklılığının benzerlik oranını ciddi biçimde etkilediğini göstermektedir. Çalışmada kullanılan örnekleri topluca değerlendirildiğimizde; aynı antibiyotip paternine sahip ve aynı klinik materyallerden izole edilen örneklerin benzerlik oranının yüksek, farklı antibiyotip paternine sahip ve ya farklı klinik materyallerden

izole edilen örneklerin ise benzerlik oranının düşük olduğunu söylemek mümkündür (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve EK2).

Kümeleme analizi sonucunda; çalışmada kullanılan örneklerin metisilin dirençli ve duyarlı olarak iki alt gruba ayrılabilirdiği görülmektedir. Bunun yanında antibiyotip profili ve izole edilen klinik örneklerin aynı olması durumunda benzerlik oranlarının yüksek olması çalışmada kullanılan fenotip tiplendirme yöntemlerinden biri olan antibiyotiplendirme ile genotip tiplendirme yöntemlerinden RAPD PCR sonuçlarının birbirleri ile uyumlu olduğunu göstermiştir.

*S.aureus* örneklerinin tiplendirilmesiyle ilgili çeşitli fenotipik ve genotipik metotlar tanımlanmıştır. Ancak bu metotlar içerisinde PFGE özellikle MRSA'ların tiplendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmiştir (Saulnier , 1993; Schlichting, 1993). Saulnier ve ark. (1993) tarafından yapılan bir çalışmada MRSA'larda RAPD PCR analizinin ayırım gücünün PFGE yönteminin ayırım gücünden daha düşük olduğu ileri sürülmüştür. Buna karşın; Hojo ve ark.'nın (1995) yaptığı bir çalışmada da RAPD ve PFGE analizi sonuçları birbirleri ile uyumlu bulunmuştur. Van Belkum ve ark.'nın (1993) çalışmasında ise *S.aureus* için yapılan faj tiplendirme yöntemi kullanılarak 48 MRSA örneği 13 tipe ayrılmışken bu örneklerle RAPD PCR analizi uygulandığında 23 farklı tipin saptandığı görülmektedir. Bu çalışmalar bize RAPD PCR yönteminin stafilokokların tiplendirilmesi için uygun bir analiz yöntemi olduğunu vurgulamaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız RAPD PCR yönteminin; hızlı sonuç vermesi, teknik olarak basit olması ve tiplendirilecek mikroorganizma ile ilgili genom bilgisine gereksinim göstermemesi açısından epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilecek başarılı bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz. Bundan ayrı olarak, çalışmamızda 25 ayrı primerin kullanılmış olması çalışmanın sonraki araştırmalar açısından iyi bir zemin oluşturabileceği de ifade edilebilir.

## 6. KAYNAKLAR:

Arda, M., 2000, Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınları. Ankara.

Arslan, H., 1995, Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olarak İzole Edilen *Staphylococcus aureus*'larda Metisilin Direncinin Saptanması ve Epidemiyolojik Tiplendirme, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara.

Aydın, N. vd., 2001, Klinik Örneklerimizden İzole Edilen Stafilokokların Antibiyotik Direnci. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 2 (3) : 21-26.

Bardakçı, F., 2001, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Turk. J. Biol. 25:185-196.

Bauer, J.D., Ackermann, PG. and Toro, G., 1974, Clinical Laboratory Methods. 8th Ed. Mosby.

Beers, M. H., 2003, The Merck Manual of Medical Information-Second Home Edition, Online Version. <http://www.merck.com/mmhe/sec18/ch211/ch211g.html>.

Bilgehan, H., 1990, Klinik mikrobiyoloji, özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları, Barış Yayınları, İzmir. 184-204.

Busch, U. and Nitschko, H., 1999, Methods for differentiation of microorganisms, Journal of Chromatography B, 722, 263-278.

Cekovska, Z., Panovski, N., Petrovska, M., 2005, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility test methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (Methicillin) resistance in our clinical isolates. Bratisl Lek Listy. 106 (4-5):163-167.

Chambers, H.F., Sachdevo, M., 1992, Binding affinity for penicillin binding protein 2a correlates with in vivo activity of beta-lactam antibiotics against Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, J. Antimicrob. Chemother., 30, 821-826.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005, Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları, Onbeşinci bilgi eki, 25, 1, CLSI Wayne, Pa, USA 172 p.

Collins, C.H., Lyne, P.M. and Grange, J.M., 2001, Collin's and Lyne's Microbiological Methods. Oxford University Press Inc., Newyork, 110-111p.

Çıtak, S. ve Karaçocuk, E., 2004, Hastane ve Toplum Kaynaklı Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılığı. C.Ü.Tıp Fakültesi Dergisi 26 (1) : 13-17.

Diler, M. ve Kocabeyoğlu, Ö., 1998, Değişik Kaynaklardan İzole Edilen 1200 Stafilocok Suşunun Türlerine ve Metisilin Direncine Göre Dağılımı ile Beta-Laktam Dışı Bazı Antibiyotiklere Duyarlılık Oranları. Klimik Dergisi. Cilt 11: 112-115.

Dündar, V, 2000, Metisiline Dirençli Stafilocok İnfeksiyonları. Klimik Dergisi. Cilt 13 : 26-27.

Dündar, V., Dündar, D.Ö., 2002, Stafilocok enfeksiyonları, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Topçu, W. A., Söyletir, G., Doğanay, M. (eds.). Nobel Tıp Kitabevleri, cilt 2, 1507-1516.

Foster, T., 1996, *Staphylococcus*, Medical Microbiology. Baron S. (eds.), <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch012.htm>.

Günaydın, M., Esen, Ş., Saniç, A. and Leblebicioğlu, H. ed., 2002, Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları. Simad Yayınları. Samsun.

Hasbek, M. vd., 2002, Stafilocoklarda Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Belirlenmesi ve Çoğul Antibiyotik Direnci. C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 24 (4) :179-184.

- Hayes, P.S. et al., 1984, Production of toxic-shock-associated protein(s) in *Staphylococcus aureus* strains isolated from 1956 through 1982, *Journal of Clinical Microbiology*, 20 : 1, 43-46.
- Haznedaroğlu, T., 2007, Metisilin Dirençli *S.aureus* (MRSA), Korunma ve Kontrol, GATA İnfeksiyon Kontrol Komitesi. <http://www.gata.edu.tr/infkom/MRSA.pdf>.
- Hojo, S., Fujita, J., Negayama, K., Ohnishi, T., Xu, G., Yamaji, Y., Ohada, H., and Takahara, J., 1995, DNA fingerprinting by arbitrary primed polymerase chain reaction (AP-PCR) for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, 69:506–510.
- Hughey, M.J, 2001, Atlas of Dermatology, <http://www.brooksidepress.org/Products/OperationalMedicine/DATA/operationalmed/Manuals/GMOManual/clinical/Dermatology/Furuncle1500.jpg>.
- Hussein, O., 2006, Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, [http://members.tripod.com/dr\\_osama\\_hussein0/id13.html](http://members.tripod.com/dr_osama_hussein0/id13.html).
- Kaiser, G.E., 2005, Isolation and identification of staphylococci, BIOL 230 Microbiology Laboratory Manual. <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab15/lab15.html>.
- Kalaycı, G., 2000, Göğüs Cerrahisi, Yüksel, M. (eds.). Bilmedya Grup, İstanbul.
- Kapral, F.A., Miller, M.M., 1971, Product of *Staphylococcus aureus* Responsible for the Scalded-Skin Syndrome, *Infection and Immunity*, 4:5, 541-545.
- Kiehlbauch, J.A., Hannett, G.G., Salfinger, M., Archinal, W., Monserrat, C., Carlyn, C., 2000, Use of National Committee for Clinical Laboratory Standards Guidelines for Disk Difusion Susceptibility Testing in New York State Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:3341-3348.



- Kluytmans, J., van Leeuwen, W., Goessens, W. et al., 1995, Food-initiated outbreak of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. J. Clin. Microbiol. 33 :1121-1128.
- Lowy, F.D., 1998, *Staphylococcus aureus* Infections. N. Engl J. Med. 339:520-532.
- Lowy, F.D., 2003, Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Invest., 111, 1265-1273.
- Marquet-Van Der Mee, N., Mallet, S., Loulergue, J. et al., 1995, Typing of *Staphylococcus epidermidis* strains by random amplification of polymorphis DNA. FEMS Microbiol. Let. 128 :39-44.
- Mayon-White, R.T., et al., 1988, An international survey of the prevalence of hospital-acquired infection. J . Hosp. Infect. 11 Suppl A:43-8.
- Menteş,M., 1995, Hastane Kaynaklı Stafilokok Suşlarının Metisilin'e Dirençlerinin Tespiti, Çukurova Üniversitesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Morreillon, P., at al., 1995, Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis, Infection and Immunity, 63:12, 4738-4743.
- Neela, V., Mariana, N.S., Radu, S., Zamberi, S., Raha, A.R. and Rosli, R., 2005, Use of RAPD to investigate the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Malaysian hospitals, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21:245-251.
- Olive, M.D. and Bean, P., 1999, Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J. Clinic. Microbiol. 37 : 1661-1669.

- Onasanya, A., Mignouna, H.D. and Thottappilly, G., 2003, Genetic fingerprinting and phylogenetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolates from Nigeria. African J. Biotech., 2 : 246-250.
- Özerol, İ.E., 2001, *Staphylococcus aureus*, Bakteriyoloji. [http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/iozerol/BAKTERIYOLOJI/Staphylococcus\\_spp/Staphylococcus\\_aureus](http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/iozerol/BAKTERIYOLOJI/Staphylococcus_spp/Staphylococcus_aureus)
- Roderick, P.R.D., Holmes, C.E., 1998, Molecular Evolution (Phylogenic Approach). Blackwell Science, Oxford.
- Rohlf, F. J., 2000, NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and multivariate analysis system: version 2.01. Applied Biostatistics, New York.
- Rollof, J. and Normark, S., 1992, In vivo processing of *Staphylococcus aureus* Lipase, Journal of Bacteriology, 174:6, 1844-1847.
- Saçılık, S.C., 1998, Türkiye'deki Klinik Örneklerden Elde Edilen Patojenik *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Karakterizasyonu, Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Doktora Tezi, Ankara.
- Saulnier, P., Bourneix, C., Prevost, G. et al., 1993, Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 31:982–985.
- Seppala, H., Osterblad, Q.M. and Huovinen, P., 1994, Typing of Group A Streptococci by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. J. Clinic. Microbiol. 32: 5-1948.
- Schlichting, C., Branger, C. and Fournier, J.M., 1993, Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing and phage typing: resolution of clonal relationships. J. Clinic. Microbiol. 31: 227-232.

- Smith, T.L. and Jarvis, W.R., 1999, Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Microbe and Infection*, 795-805.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. ed., 1986, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Tambic, A., Power, E.G.M., Talsania, H. et al., 1997, Analysis of outbreak of non-phage-typeable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a randomly amplified polymorphic DNA assay. *J. Clin. Microbiol.* 35 : 3092-3097.
- Tanır, G., Göl, N., 1999, Antibiyotik Direnci. *Klinik Dergisi*. 12 (2): 47-54.
- Thacher, T. and Thacher, R., 2000, Orthopedics, <http://www.thachers.org/orthopedics.htm>.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Archer, G. et al., 1994, Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 32: 407-415.
- Trindade, P.A., McCulloch, J.A., Oliveira, G.A. et al., 2003, Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *The Brazilian J. Infect. Diseases*. 7:32-43.
- Tünger A., Çavuşoğlu, C., Korkmaz, M., 2003, *Mikrobiyoloji*, Asya Tıp Yayıncılık, İzmir, 41-50.
- U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2006, Staphylococcal Infections, Human Diseases and Conditions. <http://www.humanillnesses.com/Infectious-Diseases-Sk-Z/Staphylococcal-Infections.html>.
- Ünal, S., 1996, Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizmaları ve metisilin direnç tespit yöntemleri, *Flora Dergisi*, 1, 14-17.

- van Belkum, A., Bax, R., Peerbooms, P. , Goessens, W. H. F., Leeuwen, N. and Quint, W. G. V., 1993, Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 31:798–803.
- van Belkum, A., De Jonckheere, J., and Quint, V.G.V., 1993, Typing *Legionella pneumophila* strains by polymerase chain reaction-mediated fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 31:2198–2200.
- van Belkum, A., Kluytamans, J., Van Leeuwen, W. et al., 1995, Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 33, 1537–1547.
- van Leeuwen, W., Sijmons, M., Sluijs, J. et al., 1996, On the nature and use of randomly amplified DNA from *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 34: 2770-2777.
- van Leeuwen, W., Verbrugh, H., van der Velden, J. et al., 1999., Validation of binary typing for *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 37 : 664-674.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R., 1991, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19:6823–6831.
- Wagner, G. E., 1990, Staphylococci, Streptococci and Gram-Positive Cocci Microbiology, Kingsbury, D.T., wagner, G. E. (eds), John Wiley&Sons, 81-86.
- Wandenesch, F. et al., 2003, Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence, Emerging Infectious Diseases, 9:8, 978-984.
- Welsh, J. and McClelland, M., 1990, Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.

- Wieser, M. and Busse, H.J., 2000, Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. Internation. J. Sys. Evol. Microbiol. 50 : 1087-1093.
- William, D., Ibergan, T., Moosdean, F., 1997, Arrival of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antibiotics. Chemother. 2:1.
- Williams, J.G, Kubelik, A.R., Livak, K.J., et al., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
- Yalçın, A.N., Hayran M., Ünal, S., 1997, Economic analysis of nosocomial infections in a Turkish university hospital. J. Chemother. 9 : 411-4.
- Yu, K. and Pauls, K.P., 1992, Optimization of the PCR program for RAPD analysis. Nucleic Acids Res. 20 : 2606.
- Yüce, A., 2001, Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları, Klimik Dergisi, 14 (2) : 41-46.
- Zinsser, H., 2005, *Staphylococcus*, Todar's Online Textbook of Bacteriology, Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esra Deniz ÜSLÜ

Doğum Yeri : Samsun

Doğum Yılı : 1981

Medeni Hali : Bekar

### Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 1995 -1998 Eryaman Lisesi, Ankara

Lisans: 1998 - 2003 Hacettepe Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce

### Yayınları:

(2006) 18. Ulusal Biyoloji Kongresi “Klinik İzolatlardan Elde Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Tanımlanması ve Karşılaştırılması” Esra Deniz ÜSLÜ, Nilüfer AKSÖZ, Işıl SEYİS (Poster Sunumu)

### Katıldığı projeler:

- 2005-2007, (Proje Yardımcı Araştırmacı), Klinik İzolatlardan Elde Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Fenotip ve Genotip Olarak Tanımlanması. Tübitak Proje No: 104T481

# EK-1

Fenogram çiziminde kullanılan bant matrisleri

prm1	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B2	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
B3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
B7	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
B8	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
B9	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1
B10	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B12	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
B13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
prm1	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1
B2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
B3	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
B7	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
B12	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
B13	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
prm2	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
B4	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
B5	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
B7	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
B8	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
B9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
B10	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
prm2	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
B4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**EK-1 devam ediyor**

prm4	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
B2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
B3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
B5	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0
B6	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
B7	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
B8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
B10	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
B11	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
B13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
B14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
B15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
B17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
prm4	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
B5	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B6	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
B7	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
B10	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
B11	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
B12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
B13	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B14	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
B17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B18	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
prm6	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
B3	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
B5	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
B6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
B10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B13	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



EK-1 devam ediyor																										
prm6	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30	
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
B2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B5	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
B8	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
B13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
prm7	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5	
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
B13	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
B17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
B18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
prm7	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30	
B1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B14	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B17	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B18	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

EK-1 devam ediyor																									
prm9	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
B3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
B6	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
B7	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1
B10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B12	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B13	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
prm9	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
B3	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
B4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
B9	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
prm10	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
B5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
prm10	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1
B4	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0



EK-1 devam ediyor																									
prm12	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
B3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
B5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0
B7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
B8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B10	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
prm12	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B7	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
prm13	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
B2	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
B3	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
B4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
B6	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
B7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
B11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
B12	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B13	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
B14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-1 devam ediyor																									
prm13	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
B2	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
B3	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B7	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
B8	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
B9	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B10	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B11	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B13	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
B14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
prm14	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
B5	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
B6	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
prm14	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
B3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
B9	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1

EK-1 devam ediyor																									
prm1 6	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
prm1 6	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
B3	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1
B4	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
B5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B6	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
B7	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
B8	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
B9	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
B10	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
B11	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
S31	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0
B3	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
B4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
B5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0
B6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
B8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1
B9	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
B10	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1
B11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
S31	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B8	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
B9	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
B10	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
B11	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
B12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

EK-1 devam ediyor																									
S19	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
B2	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
B4	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B14	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
S19	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B3	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
B9	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B13	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
B14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
S21	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
B2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B8	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-1 devam ediyor																									
S21	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
B2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S24	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B11	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
B13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
B14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
S24	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B9	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
B10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
B12	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B14	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



EK-1 devam ediyor																										
S33	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5	
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
B13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
S33	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30	
B1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
B4	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1
B13	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
S112	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5	
B1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
B3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
B4	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
B5	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
B7	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
B8	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
B11	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
B13	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B14	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
B15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-1 devam ediyor																									
S112	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B7	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B12	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
B13	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B14	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
B15	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
S144	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
B3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
B6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
B8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
B9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
B14	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
S144	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B8	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B9	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
B12	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1
B13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

EK-1 devam ediyor																										
S224	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5	
B1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
B5	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
B7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	
B8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
B9	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
B11	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	
B12	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
S224	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30	
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B2	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
B6	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
B7	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B11	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
S252	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5	
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	
B2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
B4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
B5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B10	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	
B11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	
B12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
B13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
B14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	



EK-1 devam ediyor																									
S1112	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B4	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
B8	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
B9	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
B11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S1112	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
B5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B11	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
S1452	SA	SE	SS	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	D1	D2	D3	D4	D5
B1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
B5	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
B11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
B12	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
B15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S1452	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
B1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
B2	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B12	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B14	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1

B15	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---