

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

METSİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
(MRSA) ENFEKSİYONU İÇİN HIZLI UYARI SİSTEMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYFER ÇETİN

DENİZLİ, KASIM - 2020

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI



METSİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
(MRSA) ENFEKSİYONU İÇİN HIZLI UYARI SİSTEMİ

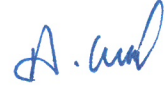
YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYFER ÇETİN

DENİZLİ, KASIM - 2020

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

AYFER ÇETİN



ÖZET

**METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA)
ENFEKSİYONU İÇİN HIZLI UYARI SİSTEMİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
AYFER ÇETİN
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. AHMET KOLUMAN)**

DENİZLİ, KASIM - 2020

Bu çalışmada, insan vücudunda patojen olarak görülen MRSA için hızlı tespit sistemi kurulmuştur. Çalışmada belli yoğunluklarda bulunan MRSA tespiti hangi saat aralığında tespit edildiği test edilmiştir. Sekiz saatin sonunda yüksek ve orta yoğunluklu brotlarda MRSA test edilirken on saatin sonunda tüm yoğunluklardaki MRSA üremesi test edildi. Deneyin 24 saat sonrasında ependorflar tamamen renk değiştirmişlerdi. Bu tespit sisteminde hem kalitatif hem de kantitatif sonuç alındı. Kalitatif sonuç olarak RGB sensörü pozitif sonuçta yeşil yanarken negatif sonuçta kırmızı yanmaktadır. Kantitatif olarak sonucun negatif veya pozitif olduğu aurdino programının seriport ekranında gösterildi.

Sonuç olarak, çalışmada tasarlanan sistemin MRSA tespitinde spesifik, tutarlı, hızlı, düşük maliyetli, eğitimli teknisyen gerektirmeyip PCR testi yapılmadan önce tarama testi olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

ANAHTAR KELİMELELER: MRSA (Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*), *Staphylococcus aureus*, biyosensör, hızlı tespit yöntemi

ABSTRACT

RSYSTEM FOR METHİCİLLİN RESİSİSTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA)

**MSC THESIS
AYFER ÇETİN**

**PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOMEDICAL ENGINEERING DEPARTMENT**

(SUPERVISOR: PROF. DR. AHMET KOLUMAN)

DENİZLİ, NOVEMBER - 2020

In this study, a rapid detection system was established for MRSA detection, which is a pathogen in that causes hospital infections. The study mainly focused on faster diagnosis and rapid evaluation. MRSA was tested in high and medium density broths at the end of eight hours, while MRSA growth at all intensities was tested after ten hours. The ependors had completely changed color after 24 hours of the experiment. Both qualitative and quantitative results were obtained in this detection system. As a qualitative result, the RGB sensor lights up green for a positive result and red for a negative result. Quantitatively, whether the result was negative or positive was shown on the seriport screen of the aurdino program. As a result, we think that the system designed in the study can be used as a screening test before performing the PCR test, without requiring a specific, consistent, fast, low cost, trained technician for MRSA detection.

KEYWORDS: MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, Rapid detection method, biosensor

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ÖNSÖZ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Sorun Analizi	1
1.2 Amaç	2
1.3 Hastane Enfeksiyonu Tespitinin Önemi	2
1.4 Literatür Özeti	5
2. MRSA HIZLI TESPİT SİSTEMİ BİLEŞENLERİ VE PRENSİPLERİ	16
2.1 Klasik Kültür Yöntemleri	16
2.2 Hızlı Tespit Yöntemleri	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1 Gereç	23
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Besiyerler	23
3.1.2 Şeker Oranları ile Pasajlama İşleminin Yapılması	27
3.1.3 Elektronik Devre Tasarımında Kullanılan Malzemeler	27
3.2 Yöntem	28
3.2.1 MRSA Besiyeri Tasarlanması	28
3.2.2 Şeker Oranın Belirlenmesi	30
3.2.3 Renk İndikatörünün Belirlenmesi	31
3.2.4 Brothdan Ekimin Yapılması ve Metisilin Eklenmesi.....	33
3.2.5 Spesifite (Özgüllük) Testi	33
3.2.6 Optik Donanımın Tasarlanması ve Programlanması	34
3.3 Sistemin Optimizasyonu	39
3.3.1 Validasyon	39
3.3.2 Verifikasyon	42
4. BULGULAR	43
4.1 Sayımın Yapılması	43
4.2 Renk İndikatörü Seçimi	47
4.3 Spesifite (Özgüllük) Testi Sonuçları	48
4.4 Verifikasyon İşlemleri	50
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
7. KAYNAKLAR.....	60
8. EKLER	70
9. ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: <i>S. aureus</i> 'un elektron mikroskop görünümü.....	6
Şekil 2: MRSA'nın küresel yayılımı.....	14
Şekil 3: Ekime hazır PCA görüntüsü.....	24
Şekil 4: <i>S. aureus</i> 'a ait koloni morfolojisi ve saf ekimin görüntüsü	29
Şekil 5: Ekim işlemi aşamaları.	30
Şekil 6: Homojenize edilmiş broth görünümü.	32
Şekil 7: Devre şeması	34
Şekil 8: TCS 3200 sensörü çalışma prensibi	34
Şekil 9: TCS 3200 sensörü kalibrasyon durumu	35
Şekil 10 : RGB ledi kalibrasyon durumu.....	35
Şekil 11: Solidworkste kutu çizimi.....	37
Şekil 12: Kutunun 3D baskısı.....	38
Şekil 13: Kutu ve optik sistemin entegrasyonu	38
Şekil 14: Renk skalası.....	39
Şekil 15: Bakterinin olmadığı renk skalasında sistem cevabı.....	40
Şekil 16: Bakterinin düşük yoğunlukta olduğu renk skalasında sistem cevabı ..	40
Şekil 17: Bakterinin orta yoğunlukta olduğu renk skalasında sistem cevabı	41
Şekil 18: Bakterinin yüksek yoğunlukta olduğu renk skalasında sistem cevabı ..	41
Şekil 19: İnkübasyon sonrası ekimlerin görüntüsü.....	44
Şekil 20: Kullanılan şeker yüzdesine göre standart sapma grafiği	45
Şekil 21: Kullanılan şeker yüzdesine göre üreme grafiği	45
Şekil 22: Kullanılan şeker yüzdesine göre detaylı üreme grafiği	46
Şekil 23: Renk indikatörlerin başlangıçta renk görünüşleri.	48
Şekil 24: Yirmi dört saatin sonunda renk indikatörlerinin değişimi	48
Şekil 25: Yirmi dört saatte spesifite için yapılan testte kullanılan <i>S.epidermidis</i> 'e ait görüntü	49
Şekil 26: Sonucu negatif olan süre yoğunluklarda sistem görünümü.....	51
Şekil 27: Sonucu pozitif olan süre yoğunluklarda sistem görünümü.	51
Şekil 28: Yirmi dört saatin sonunda optik sistemin cevabı.	52
Şekil 29: Brothlarda bakteri üremesine bağlı oluşan renk değişimleri.....	52
Şekil 30: Brothlarda başlangıç ve inkübasyon işlemi sonunda oluşan renk farkları.....	53
Şekil A: Optik sistem aurdino kod yazılımları	70

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Hastane enfeksiyonu kaynakları.	3
Tablo 2: Hastane enfeksiyonun yaygın olarak görülen türleri	4
Tablo 3: Hastane enfeksiyonunda sık görülen etmenler.	4
Tablo 4: <i>Staphylococcus</i> için önemli tarihsel gelişimler.....	5
Tablo 5: <i>Staphylococcus</i> sınıflandırmaları.	6
Tablo 6: Hücre duvarı bileşenleri.....	7
Tablo 7: <i>S. aureus</i> biyokimyasal test özellikleri.	8
Tablo 8: <i>S. aureus</i> 'un virülans faktörlerini oluşturan yapılar.	8
Tablo 9: Virulans faktörü içerisinde bulunan enzimler	9
Tablo 10: Virulans faktörü içerisinde bulunan toksinler.....	10
Tablo 11: Virulans faktörü içerisinde hücre yapısında bulunan bileşenler.....	11
Tablo 12: MRSA kaynaklı enfeksiyon semptomları.....	14
Tablo 13: MRSA enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotikler.....	15
Tablo 14: Mikroorganizma tespitine yönelik yapılan bazı hızlı tespit sistemleri.....	19
Tablo 15: Brain heart infusion broth (BHI) içeriği.	23
Tablo 16: Plate Count Agar (PCA)	24
Tablo 17: Maximum Recovery Diluent içeriği.	25
Tablo 18: Baird Parker Agar içeriği.....	26
Tablo 19: Arduino uno teknik özellikleri.....	27
Tablo 20: TCS 3200 renk sensörü teknik özellikleri.....	28
Tablo 21: Brothlara bakteri bulaştırma düzeyleri	42
Tablo 22: Sayım sonuçları.	43
Tablo 23: MRSA zaman ve üreme sonuçları.	44
Tablo 24: BCP indikatörünün süre ve yoğunluğa bağlı renk değişimleri.....	47
Tablo 25: Phenol red indikatörünün süre ve yoğunluğa bağlı renk değişimleri.....	47
Tablo 26: Spesifite test sonuçları.	49
Tablo 27: Verifikasyon işlem sonuçları.	50
Tablo 28: Metisilin direncini belirlemede farklı klasik kültür yöntemlerinin parametleri.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

MRSA	: Methicillin Resistant Staphylococcus- metisilin Dirençli <i>S. aureus</i>
CDC	: Centers for Disease Control-Hastalık Denetim Merkezleri
VISA	: Vancomycin Intermediate <i>S. aureus</i> -Vankomisin Dirençli <i>S. aureus</i>
VRSA	: Vancomycin Resistance <i>S. aureus</i> - Vankomisin Duyarlı <i>S. aureus</i>
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	: Methicillin Sensitive Staphylococcus - metisilin Duyarlı <i>S. aureus</i>
LAMP	: Loop Mediated Isothermal Amplification
CRF	: Coagülase Reacting Factor- Koagülas Reaksiyon Faktörü
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
DNase	: Deoksiribonükleaz
β-toksin	: Beta Hemolizin
α-toksin	: Alfa Hemolizin
CAMP	: Christie Atkins Munch Peterson
SSSS	: Staphylococcal Scalded Skin Sendrome-Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu
TSST-1	: Toksik Şok Sendromu Toksini
IgG	: İmmünoglobulinG
IgA	: İmmünoglobulinA
IgM	: İmmünoglobulinM
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
SCC	: <i>Staphylococcal</i> Casette Chromosome
MİK	: Minimal İnhibitörük Konsantrasyon
NaCl	: Sodyum Klorür
CAMHB	: Mueller-Hinton Sıvı Besiyeri
FDA	: Food and Drug Administration- Gıda ve İlaç Dairesi
SAW	: Yüzey Akustik Dalga- Surface Acoustic Wave
PCR	: Polymerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Na₂HPO₄	: Sodium Hydrogen Phosphate- Di Sodyum Hidrojen Fosfat
PCA	: Plate Count Agar
BPA	: Baird Parker Agar
BHI	: Brain Heart Infusion Broth
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- Enzim Bağlı İmmünosorbent deneyi
ECL	: Elektromilüminesan
PWM	: Pulse Width Modulation- Darbe Genlik Modülasyonu
IR	: Infrared - Kızılötesi
BP	: Baird-Parker Agar
BCP	: Brom Creosol Purple
FTIR	: Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre
HCl	: Hidroklorik Asit
ISO	: International Organization of Standardization- Uluslararası Standartlar Teşkilâtı
RGB	: Red, Green, Blue - Kırmızı, Yeşil, Mavi
kob	: Colony Forming Unit-Koloni Oluşturan Birim
log	: Logaritmik
NPV	: Negative Preditive Volume- Negatif prediktif Volüm
PPV	: Positive Preditive Volume- Pozitif prediktif Volüm

ÖNSÖZ

Staphylococcus aureus, taşıdığı virülans faktörleri sayesinde insan vücudunda patojen olarak bulunur. Bakteri kendisine karşı kullanılan antivirallere karşı hızlı bir biçimde direnç geliştirmektedir. Bu sebepten dolayı *S. aureus* enfeksiyonları hızlı bir yayılım gösterip günümüzde önemli patojenlerden biri olarak kabul görmektedir. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) birden fazla antibiyotiğe direnç gösteren *S. aureus* suşlarından biridir. MRSA enfeksiyonları, *S. aureus* enfeksiyonlarına kıyasla tedavi edilmeleri daha zordur. Kontrol altına alınmadıkları durumda ciddi septomlar oluşturabilirler. Bu yüzden enfeksiyon kontrolü MRSA enfeksiyonlarında büyük önem taşımaktadır. Enfeksiyon kontrolünde önemli noktalardan biri bakterinin tanımlanmasıdır. MRSA tespitinde birden fazla yöntem bildirilmiştir. Geleneksel kültür yöntemleriyle tanımlanan MRSA uzun zaman gerektirmektedir. Bir diğer tanımlama testi olan PCR yüksek özgüllük ve duyarlılık gösterip geleneksel kültür yöntemine göre daha kısa sürede sonuç verir. Fakat PCR testinin dezavantajı yüksek maliyet ve eğitimli tekniker ihtiyacının olmasıdır.

Çalışmamızda düşük maliyetli, hızlı sonuç, yüksek özgüllüğe sahip bir tarama testi tasarlanıp 6 saat sonunda tutarlı ve duyarlı sonuçlar veren bir hızlı tespit sistemi tasarlanmıştır.

Bu çalışmada ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini hep yanımda hissettiğim danışmanım Prof. Dr. Ahmet KOLUMAN'a, tez aşamamda yardımlarını esirgemeyen Ahmet KANAT ve Veysi FİLİZ arkadaşlarıma teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Staphylococcus cinsinde sınıflandırılan bakterilerin insan ve hayvanlarda deri, yumuşak doku, üriner sistem, kemik yapılarında enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. *Staphylococcus* gram pozitif bakteri olup doğada yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Appelbaum 2006, Cadena ve diğ. 2016).

S. aureus ayrıca halk sağlığı yönünden, özellikle deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının bir nedeni olarak belirlenmiştir. Salgınlara çoğu kolay tedavi altına alınmasına rağmen, bakteriyemi, septik artrit, toksik şok sendromu, osteomyelit ve endokardit gibi bazı invaziv enfeksiyonları tetikleyebilir ve bu tablolar zorlu komplikasyonlara nedeniyle yatarak tedavi gerektirebilir. Patojenin vücutta yarattığı enfeksiyonlara karşı antibiyotik tedavisi uygulanması tavsiye olunmaktadır (Appelbaum 2006, Cadena ve diğ. 2016, Becker ve Von Eiff 2011).

1.1 Sorun Analizi

Penisilin tedavide kullanılmasıyla *S. aureus* suşlarında penisilin direnci gözlemlenmiştir. Penisilin direncinin yenilmesi amacıyla metisilin gibi penisilinaze dirençli antibiyotikler kullanılmaya başlanmış ancak *S. aureus* suşları metisiline de direnç geliştirmiştir. *Staphylococcus* enfeksiyonlarının tedavisinde beta laktam antibiyotikleri metisilin direnci nedeniyle kullanılmadığı rapor edilmiştir. MRSA enfeksiyonlarında glikopetit grubunda olan vankomisin antibiyotiği kullanılmıştır. 2002 yılında *S. aureus* suşlarında vankomisin direnci gözlemlenmiştir. Bu durum *Staphylococcus* enfeksiyonlarının tedavisini zorlaştırdığı raporlanmıştır (Becker ve Von Eiff 2011, Weems 2001).

MRSA suşlarıyla ortaya çıkan enfeksiyonlarda çoklu antibiyotik direncinin oluşması nedeniyle enfeksiyon tedavisi uzun sürmektedir. MRSA enfeksiyonunun

yayılımı genellikle hastane ortamında olmaktadır. Hastane ortamına MRSA enfeksiyonu hastalar tarafından veya sağlık çalışanlarınca taşınmaktadır. MRSA enfeksiyonu saptandığında, olgunun hastanede yattığı, hastanede yatan biriyle yakın temasta olduğu, kronik hastalık öyküsü olması gibi risk faktörlerin olması gerektiği gözlemlenmiştir (Weems 2001).

Tüm nedenlerden kaynaklı hastane ortamında MRSA kolonizasyonunu ve yayılımını önlemek amacıyla tedavi sürecinin hemen başlatılması önemlidir. Erken tespit ile MRSA enfeksiyonunda kullanılan topikal ilaç tedavisinin başlatılması enfeksiyonun insidensinde azalmayı tetikleyebilecektir (Blumberg ve diğ. 2005).

1.2 Amaç

Bu tezin amacı hastane enfeksiyonları arasında yer alan MRSA için hızlı tespit sistemi geliştirmektir. MRSA taraması için besiyerlerin kullanıldığı kültüre dayalı yöntemler 48 ile 96 saat arasında sonuç vermektedir (Cadena ve diğ. 2016). Ancak bu süreç kontrol için alınacak önlemlerin gecikmesine neden olmaktadır. Bu tez çalışması içerisinde metisilin içeren özel besi ortamlarında bakterilerin gelişme düzeyleri izlenerek, elde edilen veriler ile hazırlanan hızlı tespit sistem optimizasyonu yapıp ve söz konusu sistem içerisinde hastane örneklerinin analizine uygun olacak şekilde sistem düzeneği kurulmuştur.

1.3 Hastane Enfeksiyonu Tespitinin Önemi

Hastane enfeksiyonu; hastane ortamında alınan mikroorganizma kaynaklı gelişen enfeksiyonlardır. Enfeksiyonların neden olduğu hastalıklar arasında önemli rol oynar. Nozokomiyal enfeksiyonlar olarak da bilinmektedir. Hastane enfeksiyonu tanımı Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından şu şekildedir: hasta hastaneye yattığı günden itibaren inkübasyon süresinde olmayıp enfeksiyon bulguları yok ise hastane ortamında meydana gelen enfeksiyonlara denilmektedir. Hastane enfeksiyonları genellikle hastanın hastane yatışından 48-72 saatin sonunda ve hasta taburcu olduktan 10 gün içerisinde bulgular ortaya çıkar (Brandão ve diğ. 2011, Vincent 2003).

Hastane enfeksiyonları (HE) küresel olarak hasta güvenliği açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerde hastane enfeksiyonu, hastaneye yatan hastaların %5-10 oranında değişmektedir. Gelişmemiş ülkelerde bu durum %25 oranına kadar çıkmaktadır (Fridkin ve diğ. 1997).

Hastane enfeksiyonu sadece hasta olan bireyi etkilemez. Hastayla beraberinde ailesini ve sağlık çalışanlarını da etkilemektedir. Hastane enfeksiyonu beraberinde birçok sorunu meydana getirmektedir. Bunlar; morbiditede artış, mortalitede artış, yaşam kalitesinde bozulma, hastanede kalış süresinde uzama, maliyet kaybı ve üretkenlik kaybı gibi sorunlar oluşur (Vincent 2003, Fridkin ve diğ. 1997).

Hastane enfeksiyonu daha çok temas yoluyla yayılım göstermektedir. MRSA enfeksiyonu kaynakları **Tablo 1**'de gösterilmiştir (Chastang ve diğ. 2003).

Tablo 1: Hastane enfeksiyonu kaynakları

MRSA enfekte hasta	Hastane ortamında havanın kontamine olması durumunda bulaşma riskini artırmaktadır (Blok ve diğ. 2003).
MRSA taşıyan sağlık çalışanı	MRSA enfeksiyonu sağlık çalışanlarından da hastaya geçtiği görülmüştür. Hastadan sağlık personeline geçen MRSA başka hastaya iletilerek yayılımı artırmaktadır (Cookson ve diğ. 1989, Boyce ve diğ. 2002).
Hastane ortamı invitro çevresi	MRSA enfeksiyonunun hastane ortamında bulunan cansız ortamlardan geçtiği de görülmüştür. Kritik araç-gereç, sedyeler, lavabolar MRSA enfeksiyonunun kaynağı olarak test edilmiştir (Bottone ve diğ. 2002).

Hastane enfeksiyonunun yaygın olarak görülen türleri **Tablo 2**'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Hastane enfeksiyonunun yaygın olarak görülen türleri (Al-Abdli ve Baiu 2016)

Hastane enfeksiyonlarının en çok görülen türleri
Üriner sistem enfeksiyonu
Ventilatör kaynaklı pnömoni
Kan dolaşımı enfeksiyonu
Cerrahi alan enfeksiyonu

S. aureus etkenli hastane enfeksiyonlarının hepsinde antibiyotik tedavisi uygulanmaz. *S. aureus* enfeksiyonlarında penisilinaz enziminin fazla saptanması nedeniyle penisilin antibiyotiği tedavide uygulanmamaktadır. Endokardit, osteomyelit enfeksiyonları görülüyor ise rifambisin kullanılmaktadır (Kluytmans ve Wertheim 2005).

Hastane enfeksiyonlarında metisiline karşı direnç gözleniyorsa glikopeptit grubu antibiyotikleri tedavide kullanılabilir. MRSA enfeksiyonlarında çoğunlukla vankomisin ve teikoplanin kullanılmaktadır. Vankomisine karşı direnç geliştiren bakteri ABD’de son yıllarda tespit edilmiştir. Vankomisin dirençli *S. aureus* (VRSA) enfeksiyonlarında linezolidler denenmektedir (Sahm ve diğ. 2006).

Hastane enfeksiyonunda en sık görülen etmenler **Tablo 3’te** belirtilmiştir.

Tablo 3: Hastane enfeksiyonunda sık görülen etmenler (Edmond ve Wenzel 1995).

Gram pozitif koklar	Gram negatif basiller
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	<i>Escherichiae coli</i>
<i>Enteroccus sp.</i>	<i>Proteus sp.</i>

1.4 Literatür Özeti

Staphylococcus aureus

S. aureus 'un tarihsel gelişimi **Tablo 4**'te özetlenmiştir.

Tablo 4: *Staphylococcus* için önemli tarihsel gelişimler (Conly ve Johnston 2002, Hiramatsu ve diğ. 2002).

Tarih	Gelişim	Kişiler
1881	İnsana ait iltihapta üzüm salkımı görünümünde mikroorganizma identifiye edildi.	Ogston 1881
1884	Rosenbach <i>Staphylococcus</i> ları pigmentlerine bağlı olarak gruplandırdı.	Rosenbach 1884
1940'lı yıllar ve öncesi	Doktorlar invaziv <i>Staphylococcus</i> enfeksiyonlarında karşılaşılan mortalite için çözüm bulamadı.	Fluit ve Schmitz 2003, Richardson ve ark. 1994
1950'li yıllar	<i>S. aureus</i> çoklu dirençli gösterdiği belirlendi.	Barber 1961
1959	Tedavide <i>S. aureus</i> 'un penisilin direnç göstermesi durumunda metisilin kullanılması denendi.	Richardson ve ark. 1994
1961	<i>S. aureus</i> 'un suşlarında metisilin direnci olduğu bildirildi.	Barber 1961
1963	metisilin dirençli <i>S. aureus</i> (MRSA) rapor edildi.	Jevons 1963
1960-2000	<i>Staphylococcus</i> lar'da makrolid, aminoglikozid, kloramfenikol, tetrasiklin ve fluorokinolon'e dirençleri olduğu bildirildi.	Lyon ve ark. 1987, Shanson 1961
1980'li yıllar	MRSA'nın direnç mekanizması belirlendi, PBP2a geni karakterizasyonu yapıldı.	Hartman ve Tomasz 1984, Matsuhashi ve ark. 1986

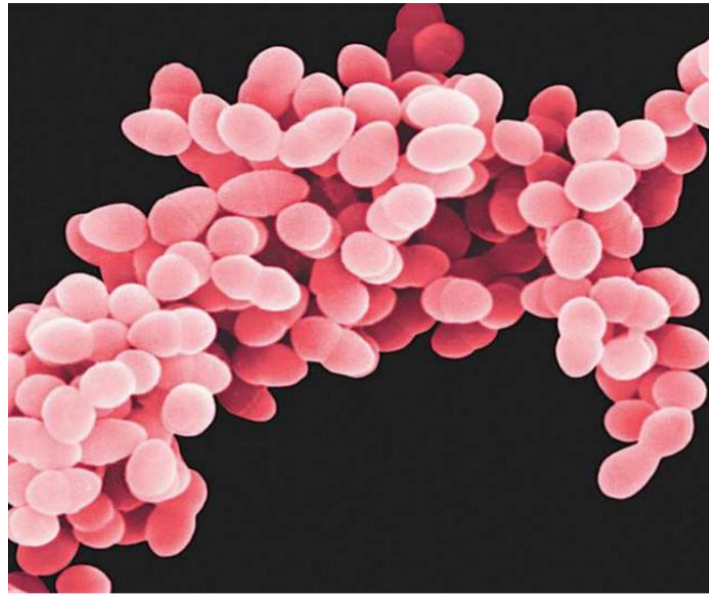
Staphylococcus aureus stafilocok türleri içerisinde en patojen olanıdır. *Staphylococcus aureus* hariç stafilocoklar koagülaz negatif stafilocok (KNS) olarak toplanmaktadır. *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus saprophyticus* fırsatçı patojen olarak sıklıkla klinik enfeksiyonlarda izole edilmektedir (Becker ve Von Eiff 2011, Bronner ve diğ. 2004).

Staphylococcus 'a ait sınıflandırmalar **Tablo 5**'te belirtilmiştir.

Tablo 5: *Staphylococcus* sınıflandırmaları (Bronner ve diğ. 2004)

	Bakteri
Alem	<i>Eubacteria</i>
Bölüm	<i>Firmicutes</i>
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Takım	<i>Bacillales</i>
Aile	<i>Staphylococcaceae</i>
Cins	<i>Staphylococcus</i>
Tür	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lugdunensis</i>

S. aureus; gram pozitif, hareketsiz, sporsuz ve yuvarlak olup çapı 0,5-1,5 µm'dir. Katı besiyerlerinde izole edildiklerinde üzüm salkımı şeklinde düzensiz olarak görülürler. Sıvı besiyerlerinde kısa zincir halde olan koklar şeklinde olurlar (Allen ve diğ. 2006). *S. aureus*'un görünümü **Şekil 1**'de gösterilmiştir.



Şekil 1: *S. aureus*'un elektron mikroskop görünümü (Franklin ve Lowy 1998)

S. aureus'un optimal üreme ısısı 30-37 °C'dir. Üreme için ideal pH:7-7.5 arasındadır. Bakterinin üreyebildiği pH ise 3-8 aralığındadır. Çoğunlukla aerob üremeyi seçerler. Basit besiyerlerinde (%7,5-10 NaCl içeren) ürerler. En iyi kanlı agarda ürerler. *S. aureus* suşları 18-24 saat içerisinde pigmentli, yuvarlak besiyerinin

yüzeyinde koloni oluştururlar. Kapsülleri belirgin olan suşlar ıslak görünümde olup parlaktırlar (Butel ve diğ. 2007).

S. aureus ısıya dayanıklı olup 60 °C'de 1 saat içerisinde inaktive olur. Kuruluğa dayanıklı olup antiseptiklere karşı duyarlıdır. Kültürlerde oda sıcaklığında (25 °C) aylarca yaşayabilir (Waldvogel 2000).

Hücre yapısını incelediğimizde;

S. aureus genomu 2800 çift bazlı sirküler kromozom ile profajlar, transpozonlar, plazmidler içerir. *S. aureus* genomunda yaklaşık %32 mol Guanin+Sitozin bulunur (Waldvogel 2000).

S. aureus hücre duvarında bulunan yapılar **Tablo 6**'da açıklanmıştır.

Tablo 6: Hücre duvarı bileşenleri

Peptidoglikan tabaka	Teikoik asit	Yüzey proteinleri
Peptidoglikan tabaka N-asetil muramik ve N-asetilglukozamin polimerleri içerir. <i>S. aureus</i> 'un hücre duvarının %50'sini bu tabaka oluşturur. Bakteriye şekil verir ve ozmotik dengesini sağlar (Waldvogel 2000).	Peptidoglikan tabakasında bulunan tabaka N-asetil muramik asit molekülüne kovalent olarak fosfodiester bağlarıyla bağlanan polimerlerdir. Teikoik asit uzun zincirler şeklinde bulunan şeker-alkol-fosfat polimerleridir (Dinges ve diğ. 2000).	Kollajen, protein A, elastin, fibronektin bağlayan proteinler ve kümeleştirici faktör k hücre duvarları ve kimyasal yapıları birbirine benzer (Waldvogel 2000).

Bugüne kadar *Staphylococcus*'larda 11 tane kapsül serotip belirlenmiştir. *S. aureus*, suşların çoğunluğunda polisakkarit yapıda bulunan mikrokapsül bulunur. İnsan vücudunda hastalığa sebep olarak en sık izole edilen kapsül serotipleri tip 5 (KP5) ve tip 8'dir (KP8). *S. aureus*'un metisilin dirençli suşlarında sıklıkla tip 5 kapsül içermektedir (Waldvogel 2000, Breyer ve diğ. 1997, Dinges ve diğ. 2000).

S. aureus'un biyokimyasal özelliklerine baktığımızda *S. aureus* suşları glukozu parçalayıp son ürün olarak laktik asit oluştururlar. *S. aureus* suşları koagülaz ve katalaz pozitiflerdir. Stafilokoklar nitratı nitrite indirirler. Ayrıca oksidaz

negatiftir (Butel ve diğ. 2007). *S. aureus*'a ait biyokimyasal özellikler **Tablo 7**'de özetlenmiştir.

Tablo 7: *S. aureus* biyokimyasal test özellikleri (Waldvogel 2000).

Test	<i>S. aureus</i>
Katalaz aktivitesi	+
Koagülaz üretimi	+
Termonükleaz üretimi	+
Monnitölün anaerobik kullanımı	+
Glikozun anaerobik kullanımı	+
Furazolidin duyarlılığı	+
Lysostafin duyarlılığı	+
Lizozim duyarlılığı	-

S. aureus'un virülans faktörleri **Tablo 8**'de özetlenmiştir.

Tablo 8: *S. aureus*'un virülans faktörlerini oluşturan yapılar (Dinges ve diğ. 2000).

<i>S. aureus</i> virülans faktörleri		
Hücre Yapısında Bulunanlar	Enzimler	Toksinler
Peptidoglikan tabaka Teikoik asit Yüzey proteinleri Clumping faktör Ekstrasellüler matriks bağlacı proteinler	Katalazlar Lipaz Koagülaz Fibrinolizin (stafilokinaz) Beta-laktamaz Deoksiribonükleaz (DNaz) Kollajenaz Proteaz Hiyalarunidaz	Pnaton-Valentin lökositidin Entorotoksinler (SE) Epidermolitik toksin (Eksfoliyatin) Hemolozinler (α, β) Toksik şok sendromu (TSST-1)

S. aureus 'un virulans faktörlerinde bulunan enzimler **Tablo 9**'da açıklanmıştır.

Tablo 9: Virulans faktörü içerisinde bulunan enzimler

Koagülaz	Ekstraselüler bir proenzim ve plazma pıhtılaşma proteini. <i>Staphylococcus</i> lar tarafından üretilen bir protein olup globülin yapıda bulunan CRF (Coagülase reacting factor) etkileşip staflotrombini oluşturur. Staflotrombin trombine benzer yapıda olup fibrinojeni fibrine çevirip plazmayı pıhtılaştırır. Bu fibrin tabakası patojeniteye katkı sağlar ve mikroorganizmayı fagositoza karşı korur (Allen ve diğ. 2006, Waldvogel 2000).
Katalaz	Hidrojen peroksidi (H ₂ O ₂) oksijen ve suya parçalayan bir enzimdir. Bütün <i>Staphylococcus</i> lar tarafından üretilir. Bu enzim, mikroorganizmaların fagositlerin içerdiği oksijen radikallerince öldürülmelerine karşı direnç kazandırır (Allen ve diğ. 2006, Waldvogel 2000).
Lipaz	Lipaz enzimi yağları hidrolize eder ve yağların bulunduğu bölgelerde <i>Staphylococcus</i> ların yaşamasını sağlar. Tüm <i>Staphylococcus</i> lar tarafından üretilir. Bu enzim yüzey dokularını invaze edip karbonkül benzeri enfeksiyonların gelişmesine neden olmaktadır (Allen ve diğ. 2006, Waldvogel 2000).
Fibrinolizin(stafilokinaz)	<i>Staphylococcus</i> lar tarafından salgılanan fibrinolizin, plazma içerisindeki plazminojeni aktive edip plazmin oluşturur. Fibrin ağını çözüp enfeksiyonun dokulara yayılımına sebebiyet vermektedir (Allen ve diğ. 2006, Waldvogel 2000).
Deoksiribonükleaz (DNase)	<i>S. aureus</i> suşlarının çoğunluğunda bulunmaktadır. Isıya dayanıklıdır. Bu enzim endonükleaz ve ekzonükleaz aktivitesi gösterip nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalar (Allen ve diğ. 2006, Waldvogel 2000).
Beta-laktamaz(penisilinaz)	<i>Staphylococcus</i> lar tarafından salgılanan bu enzim penisilin grubunda bulunan antibiyotiklerin beta-laktam halkasının hidroksil grubu parçalar. Bu enzim penisilin dirneğinin gelişmesine neden olmaktadır (Allen ve diğ. 2006, Waldvogel 2000).
Hyaluridaz	Bu enzim <i>S. aureus</i> suşlarının %90'nı tarafından salgılanır. Konak bağ dokusu matriksinin içerdiği hyalüronik asiti parçalar. Böylece doku içerisinde mikroorganizmanın yayılımı sağlamaktadır (Allen ve diğ. 2006, Waldvogel 2000).
Fosfotidilinozitol (spesifik fosfolipaz)	Bu enzimi içeren suşlar antimikrobiyal ajanlara karşı daha fazla direnç gösterirler (Allen ve diğ. 2006).

S. aureus'un virulans faktörlerinde bulunan toksinler **Tablo 10**'da açıklanmıştır.

Tablo 10:Virulans faktörü içerisinde bulunan toksinler.

Beta hemolizin (β-toksin)	Sfingomyelinaz etkisiyle membrandaki lipid yapılarını tahribe uğratar. <i>S. aureus</i> 'un hemolizini artıran yapılar olan CAMP (Christie Atkins Munch Peterson) faktörüyle etkileşime girip sinerjik hemolize sebep olurlar (Allen ve diğ. 2006, Waldvogel 2000).
Alfa hemolizin (α-toksin)	<i>S. aureus</i> suşlarında temel hemolizin olarak bulunurlar. En etkili membran hasar proteindir. Membranda por oluşumuna neden olup inflamatuvar yanıtı başlatır (Allen ve diğ. 2006, Waldvogel 2000).
Gama hemolizin	Staphylococcal kemik enfeksiyonlarında, toksine karşı antikor seviyesinin yüksek olması durumunda bu toksinin enfeksiyonlarda etkili olduğu düşünülmektedir (Waldvogel 2000, Waldvogel 2000).
Delta hemolizin	Bu toksin hücre membranlarının tümlüğünü bozup adenilat siklazı aktive eder ve cAMP (cylic adenosine monophosphate) salınımını gerçekleştirir. Lenfositler üzerine makrofaj etkisi yaratır ve trombositler, lenfositlerin hasarına neden olur. Alfa toksin ve Delta toksin insanlarda enfeksiyona neden olan suşlarda en çok görülen toksinlerdir (Waldvogel 2000, Waldvogel 2000).
Enterotoksin	Enterotoksinler, polipeptid yapıda olup ısıya dirençlidirler. Bu toksinler 100 °C'de 30 dakika dayanabilirler (Breyer ve diğ. 1997).
Epidermolitik toksin (Eksfoliyatin)	Staphylococcal scalded skin sendrome(SSSS)'ne neden olmaktadır. Stafilococcal enfeksiyonların eksfoliyatif ve veziküler deri lezyonlarından sorumludurlar (Allen ve diğ. 2006).
Panton-Valentin lökositidin	Valentin ve panton isimli kişiler tarafından tanımlanmıştır. Bu toksin hemolizin olup makrofajlar ve lökositleri parçalar. F (flat) ve S (slow) isimli iki proteinden oluşur. Bu proteinler birbirlerini sinerjik olarak etkiler. Molekül ağırlıkları F=32 kDa, S=35kDa'dır. Her iki protein de antijen yapıdadır. Bu toksin konak hücre zarının katyonlara (özellikle potasyum) karşı geçirgenliğini artırıp hücrelerin erimesine ve doku nekrozuna sebep olur (Waldvogel 2000).
Toksik şok sendromu toksini (TSST-1)	<i>S. aureus</i> suşlarının %5-25'i bu geni taşımaktadır. Stafilokoksik Enterotosin F olarak da bilinmektedir. TSST-1 geni süper antijen gibi davranır ve T lenfositlerin proliferasyonu ve monositlerden IL-1 salınımını uyarır. TSST-1, sistemik olarak etki gösterip toksik şok sendromu geliştirir (Allen ve diğ. 2006, Dinges ve diğ. 2000).

S. aureus'un virulans faktörü olan hücre yapısında bulunan bileşenler **Tablo 11**'de açıklanmıştır.

Tablo11: Virulans faktörü içerisinde hücre yapısında bulunan bileşenler

Peptidoglikan tabaka	Bu tabaka, makrofajlardan stokin salgılanmasını uyarır ve kompleman aktivasyonu yaratır. <i>S. aureus</i> 'un peptidoglikan tabakası trombosit agresyonuna sebebiyet vermektedir. Bir diğer özelliği, monositlerden IL-1 salınımını uyarıp enfeksiyon bölgesinde polimorfonükleer lökositlerin toplanıp apse oluşturmaya yol açar (Butel ve diğ. 2007, Waldvogel 2000).
Teikoik asit	Konak dokuların mukozasında yer alan özgül reseptörlere bağlanarak <i>Staphylococcus</i> ların konak hücrelerine adherensini gerçekleştirir (Butel ve diğ. 2007).
Yüzey proteinleri	<i>S. aureus</i> 'un konak hücrelerinde kolonize olmalarında önemli rol oynarlar. Bu proteinlerin içerisinde bulunan protein A 42 kilo dalton ağırlığındadır. IgG3 hariç tüm IgG'leri, IgA2 ve bazı IgM'lerin Fc reseptörleriyle etkileşim göstermesi en önemli özelliğidir. Bu özelliğinden dolayı protein A antifagositer ve antikomplemanter etkisi gösterir (Waldvogel 2000).
Kapsül	Polisakkarit yapıda bulunan kapsül, mikroorganizmayı fagositozdan korur ve konak hücrelerine adherensini artırır (Waldvogel 2000).

***S. aureus* Direnç Mekanizmaları**

Antibiyotik duyarlılığı ve direnç gelişimi:

Penisilinler, 1940 yıllarında *Staphylococcus*lara karşı etkili bir ilaç iken kısa süre içerisinde bakterilerin penisilinaz enzimi üretmesiyle etkisini yitirmiştir. Penisilinin ardından metisilin kullanılmaya başlanmıştır. Fakat 1961 yılında metisiline dirençli laboratuvar suşları tanımlanmıştır. Yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe (kloramfenikol, tetrasiklinler, aminoglikozitler, klindamisin, makrolidler) karşı 1970'li yıllarda direnç gelişimi gözlemlenmiştir. Kinolona karşı direnç 1980'lerde görülmüştür. Glikopeptid direnci gösteren *S. aureus* suşları 1990'ların sonlarında görülmeye başlanmıştır. En son 2002 yılında Amerika'da

vankomycin dirençli *S. aureus* (VRSA) izole edilmiştir (Waldvogel 2000, Bonomo ve diğ. 2001).

Beta-laktam antibiyotik direnci:

S. aureus'ta penisilin direnci beta-laktamaz olan penisilinaz enzimi ile gelişmiştir. Penisilin ilk kullanılmaya başlandığı yıllarda *S. aureus* suşları %5 yakını penisilinaz üretirken günümüzde *S. aureus* suşlarını yaklaşık %80'i bu enzimi üretmektedir (Bonomo ve diğ. 2001).

Penisiline karşı direnç, antibiyotığın beta-laktamaz enzimi tarafından parçalanması ile oluşur. Ardından enzim-substrat kompleksi oluşur ve direnç başlar. Beta-laktam antibiyotığının halkasında bulunan karbon atomu serinin yapısında olan hidroksil grubunun nükleofilik etkileşimiyle tetrahedrik bir yapı oluşturur. Ve böylece enzim serbest kalarak beta-laktam halkasını parçalar (Bonomo ve diğ. 2001, Cui ve diğ. 2001).

Beta-laktamaz enzimini kodlayan gen *blaZ*'dir. Bu genin ekspresyonunun regüle edilmesinde *blaRZ* ve *blaI* sorumludur. Beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin saptanmasında indikatör olarak metisilin kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklere karşı direncin oluşmasında üç tane mekanizma görülmektedir (Cui ve diğ. 2001, Curnock ve diğ. 1994).

PBP2a (penisilin bağlayan protein2a) sentezlenmesi ile oluşan direnç:

S. aureus suşlarında en çok metisiline karşı direnç geliştiren mekanizmadır. Metisiline duyarlı *S. aureus* suşlarından farklı olarak metisiline karşı dirençli *S. aureus* suşlarında ek olarak farklı bir PBP proteini vardır. Bu protein 76 kDa ağırlığında olup PBP2a olarak isimlendirilir. PBP2a hücre membranında bulunur ve transpeptidasyon reaksiyonunu katalize eder. PBP2a'nın diğer PBP'lere göre beta-laktam antibiyotiklere karşı affinitesi daha düşüktür. Beta-laktam antibiyotiklerin kullanımında diğer PBP'ler inhibisyona uğrarken PBP2a aktive olmaya devam edip bakterinin yaşamını devam ettirir. PBP2a *S. aureus*'larda bulunan *mec A* geni tarafından üretilir. *Mec A* geni, metisiline karşı direnç gösteren suşlarda bulunur. *Mec A* geninin birçok stafilokok türü arasında yayıldığı görüldüğünde, bu genin hareketli olan genetik eleman aracılığıyla aktarılabileceği hipotezini ortaya atmıştır (Hiramatsu ve diğ. 2000, Kuroda ve diğ. 2001).

MRSA suşlarında ayrıca homojen ve heterojen olmak üzere iki direnç mekanizması vardır:

Homojen direnç: Bu direnç çevresel faktörlere bağlı değildir. Ortamın ısısı, pH, inkübasyon süresi gibi şartlarla ilişkili değildir. Kolonide bulunan bütün bakterilerde *mec A* geni bulunup aktif durumdadır (Hiramatsu ve diğ. 2001).

Heterojen direnç: Kolonideki bakterilerde *mec A* geni bulunmasına rağmen 10^4 veya 10^8 bakteriden birinde direnç görülmesi durumudur. Bu suşlar çevresel faktörlerden etkilenir. Bu suşlarda gelişen direnç ortamın ısısı, pH'sı, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon süresi ile orantılıdır. Bu direnç türü klinik ortamlarda çok görülür fakat tespiti zordur (Hiramatsu ve diğ. 2001).

Aşırı beta-laktamaz salgılanması ile gelişen direnç:

Bu tür suşlarda *mec A* geni negatiftir. Aşırı beta-laktamaz salgılanması metisilini parçalayarak metisilin direncine neden olur. Bu direnç karşısında beta-laktam antibiyotik, beta-laktamaz inhibitörü ve beta-laktamaz dirençli beta-laktam antibiyotiklerin kullanılabilir (Bonomo ve diğ. 2001, Ericson Sollid ve Hanssen 2006).

Mevcut PBP'lerde beta-laktamlara affinitesindeki azalma nedeniyle gelişen direnç:

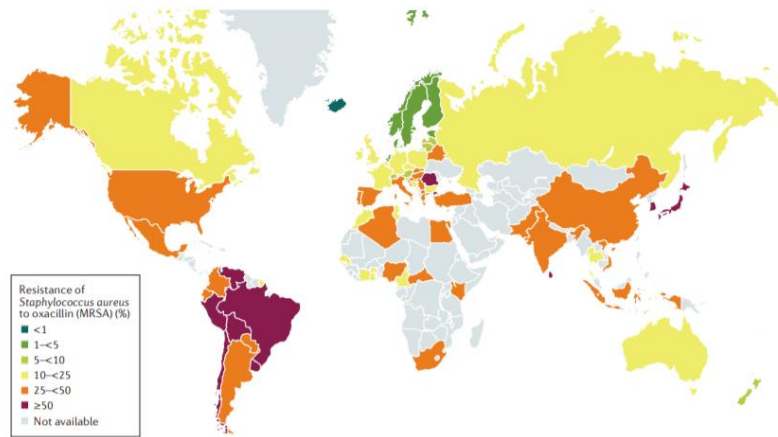
Bazı MRSA suşlarının *mec A* geni taşımamalarına rağmen metisiline direnç gösterdikleri test edilmiştir. Bu suşlar incelemeye alındığında PBP'lerin beta-laktamlara karşı düşük affinite gösterdiği görülmüştür. Bu suşlara çok sık rastlanmamaktadır (Franklin ve Lowy 1998, Bonomo ve diğ. 2001, Ericson Sollid ve Hanssen 2006).

MRSA enfeksiyonlarının %80'nine yakın deri ve yumuşak dokularda toplanıp hızlı yayılım göstermektedir. MRSA enfeksiyonuna bağlı olarak bursitis, osteomyelitis, artiritis, sinüzit, idrar yolu enfeksiyonu gibi hastalıklara neden olduğu ortaya konulmuştur (David ve diğ. 2010, Bannerman 2003). MRSA'dan kaynaklanan enfeksiyon septomları **Tablo 12'**de belirtilmiştir.

Tablo 12: MRSA kaynaklı enfeksiyon semptomları (Ebong ve diğ. 1999)

Hastalık	Görünüm
Yara Enfeksiyonu	Cerrahi kesiklerin enfekte olmasıdır.
Haşlanmış Deri Sendromu	Eksfoliyatif toksin tarafından oluşturulur.
Toksik Şok Sendromu	TSST-1 tarafından oluşturulur.
İmpetigo	Deride kabuklanmaların oluşmasıdır.
Fronkül	Kıl foliküllerinde enfeksiyon oluşmasıdır.
Bakteriyem	Bakteri enfeksiyonunun kana geçmesidir.
Pnömoni	Akciğerde abse oluşmasıdır.
Gıda Zehirlenmesi	Karın ağrısıyla beraber kusma ve ishal görülür.
Karbonkül	Subkutan dokuya fronküllerin yayılması sonucu oluşur.
Osteomyelit	Kemiklerin metafizinde kemik deformitesi görülür. (Uzun kemiklerde)
Septik Artrit	Eritemli ve ağrılı eklem enfeksiyonu

S. aureus, fazla sayıda virülans faktörüne sahip olup insan vücudunda yayılıp gelişme fırsatı olan bir patojendir. MRSA 1960 yıllarında rapor edildi. Hızlı yayılım gösteren MRSA dünyanın birçok yerinde artış göstermiştir (Stefani ve diğ. 2012). MRSA'nın dünyadaki yayılımı **Şekil 2**'de görülmektedir.



Şekil 2: MRSA'nın küresel yayılımı (Stefani ve diğ. 2012).

MRSA enfeksiyonlarında tedavi için glikopeptid antibiyotikler kullanılır. Yaygın olarak vankomisin tedavi için tercih edilir. Quinopristin-Dalfobristin, tigesiklin, linezolid, daptomisin kullanılan antibiyotikler arasındadır. MRSA enfeksiyon tedavisinde kullanılan antibiyotikler **Tablo 13**'te verilmiştir. (Horan ve diğ. 1999).

Tablo 13: MRSA enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotikler (Horan ve diğ. 1999).

MRSA enfeksiyonlarında kullanılan antimikrobiyal ajanlar
Glikopeptidler
Linezolid
Quinopristin-Dalfobristin
Mupirosin
Daptomisin
Tigesiklin

Sonuç olarak; küresel bir sorun haline gelen MRSA tespiti PCR gibi geleneksel yöntemlerle test edilmesi enfeksiyon müdahalesinde ön zenginleştirme gereksinimi olabileceği gibi, PCR inhibitörlerinin sıklıkla reaksiyonu engellediği veya geciktirdiği bilinmektedir. Birçok alanda kullanılan biyosensörler; yüksek hassasiyet, hızlı sonuç veren ve düşük maliyetli olmaları sebebiyle hastane enfeksiyonu tespitinde kullanılmaları enfeksiyon kontrolünde başarılı adımlar atılacağı öngörülmüştür (Cookson ve diğ. 2004).

Bu tezin konusunu oluşturan mikroorganizma için tarama testi yaygın olmayıp optik temelli hızlı tespit sistemi literatürde az bulunmaktadır. Sektörel olarak uygulanabilir bir yöntem ile halk sağlığına katkı sağlamak hedeflenmiştir.

2. MRSA HIZLI TESPİT SİSTEMİ BİLEŞENLERİ VE PRENSİPLERİ

2.1 Klasik Kültür Yöntemleri

Agar Yöntemi

Agar tarama yönteminde MHA agar kullanılır. Bu agarın içinde %4 NaCl ve 6 µg/mL oksasilin içermektedir. Bu agara bakteri süspansiyonundan ekim yapılarak 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılır. İnkübasyon işleminden sonra koloni oluşması halinde suşun MRSA olduğu düşünülür. Bu yöntemin spesifikliğı ve duyarlılığı yüksektir (Lois ve Schmidt 2009).

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon yöntem içerisinde Mueller-Hinton sıvı besiyeri (CAMHB) kullanılır. Bu besiyeri %2 NaCl içerir. Yirmi dört saat içerisinde 37 °C'de inkübasyon işlemi gerçekleştirir. MİK değerleri ≥ 4 µg/ml ise metisilin dirençli kabul edilir (Lois ve Schmidt 2009).

2.2 Hızlı Tespit Yöntemleri

E-test Yöntemi

Metisilin duyarlılığı tespiti için ince platistik stripler kullanılır. Test striplerin alt zemini antimikrobiyal konsantrastlar içermektedir. Üst zemininde konsantrasyon ölçekle işaretlenmiştir. Agara inoküle edilen mikroorganizma test striplerine koyulur. On iki saat inkübasyona bırakılan stripler etraflarında bulunan elips şekilli inhibisyon zonları gözlemlenir. Elips şeklinin kestiğı nokta bakteri direncinin MİK'i olarak kabul edilir (Mahon 2007).

Lateks Aglutinasyon Yöntemi

Bu yöntem lateksle kaplanmış olan PBP2a'nın antikorlar ile reaksiyona girmesi temeline dayanır. Sonucu kısa bir sürede verir. Koloniden alınan süspansiyondan PBP2a ekstraksiyonu yapıp latekst kaplı antikorlarla yaptığı aglutinasyon test edilir (Alfa ve diğ. 2008).

Kromojenik Besiyeri

MRSA tespiti için çeşitli kromojenik besiyerleri mevcuttur. Bu besiyeler hem seçici hem de ayırt edici özelliklere sahiptirler. Bu besiyerleri, içerdikleri ayıraçlar yardımıyla çeşitli koloni renkleri meydana getirip tür ayrımı yapılmasını sağlarlar. Besiyelerine ekim yapıp 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra MRSA kolonileri renkli görüntüleriyle belirlenir. Kromojenik besiyerlerinin özgüllükleri yüksektir (Almodovar ve diğ.1994).

Moleküler Yöntem

MRSA tespitinde birden fazla PCR testleri tanımlanmıştır. Multipleks PCR testleri PBP2a genini kodlayan *mec A* genini tespit etmektedir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında MRSA tespitinde bu testler kullanılmaktadır (Almodovar ve diğ.1994).

PCR, üç farklı ısı ile çalışan belli döngü oluşur. Bu döngü içerisinde birinci basamak denatürasyondur. DNA zincirinin 94 °C'ye gelmesi ile birbirinden ayrılır. Bu döngünün ikinci basamağı annealing (birleşim) basamağıdır. Ortamdaki ısı düşürülmesiyle beraber çoğaltılacak olan bölgenin primer uç kısımları kendilerine spesifik dizileri tanıyıp hidrojen bağlarıyla bağlanırlar. Bu primerlerin ortamdaki derişimlerinin kalıp DNA'da oldukça fazla olmasından kaynaklı ayrılan kalıp DNA zincirleri primer DNA zincirlerine bağlanır. Bu bileşimin olması için optimum sıcaklık genellikle 50-70 °C arasında değişmektedir. Bu döngünün üçüncü basamağı primer DNA'ların uzamasıdır. Primerlere bağlanan enzim molekülleri, bunların uç ucuna kalıp DNA'ya uyumlu nükleotidler ekler ve böylece DNA sentezi gerçekleşmiş olur. Bu 3 basamaktan oluşan döngünün sonunda primerler arasında kalan özgül DNA'ların birer kopyası sentezlenmiş olur. Bu sentezlenen DNA kopyaları agaroz jel yardımıyla elektroforez ile ayrıştırılır. Bu DNA zincirleri

etidyum bromür ile boyanır. Bu boyama işlemi sayesinde ultraviyole ışık altında görünebilir hale gelir (Caliendo ve Nolte. 2003).

Zhang ve arkadaşları 2004 yılına *Staphylococcus* türüne özgü 16SrRNA, *nuc* geni, MRSA'ya özgü *mec A* genini tespit edebilen kuadripleks PCR yöntemin ortaya koymuşlardır. Kuadripleks PCR yöntemin spesifikliğı ve duyarlılığı %100 olarak bulmuşlardır (Chow ve diğ. 2004).

Günümüzde MRSA tespiti için direk sürüntü örneklerinden sonuç veren reel-time PCR testleri tanımlanmıştır. Bu testler normal PCR testlere göre daha kısa sürede sonuç verip kontaminasyon riskleri daha azdır. İki tane reel-time PCR testleri FDA'dan onay almıştır. Bunlar; GeneOhm MRSA (Becton Dickinson) ve GeneXpert (Cepheid)'dir. Bu testler *mec A* geni taşıyan *S. aureus*'ların SCC*mec*'lerin etrafındaki özgül dizileri hedef alır. Cepheid GeneXpert SCC*mec*'de olan AttBScC bölgesini hedef alırken GenOhm MRSA ise SCC*mec*'deki orfX bölgesini hedef alır. Bu testler arasındaki önemli farklılıklardan biri de GeneXpert eğitimli teknisyen gerektirmezken GenOhm MRSA özel eğitimli teknisyenler tarafından uygulanabilecek bir testtir. Bu testler oldukça yüksek maliyetlidir. Bir diğer moleküler test yöntemi GenoType MRSA Direct'dir. Bu testte hedef olarak SCC*mec* I- SCC*mec* IV genlerinin çoğaltıldığı bir ters hibridizasyon yöntemidir. Bu testte sonuçlar 7 saatin sonunda çıkmaktadır (Ünal 2007).

Hızlı tespit sistemleri ilk olarak klinik tanımlamada kullanılmak üzere tasarlanmış fakat hızlı tespit sistemleri, yüksek hassasiyet ve erken sonuç vermeleri sebebiyle birçok dalda yol almışlardır. Hızlı tespit sistemleri; ortamda bulunan biyolojik tanıma elemanına karşı özgülük gösteren ve aldığı biyolojik yanıtı ölçülebilir bir sinyale dönüştüren analitik cihazlardır (Banerjee ve diğ. 1992, Olaimat ve diğ. 2018). Bazı hızlı tespit sistemleri **Tablo 14**'te belirtilmiştir.

Tablo 14: Mikroorganizma tespitine yönelik yapılan bazı hızlı tespit sistemleri

Sıra	Analit	Tespit yöntemi	Kaynak	Yıl
1	<i>Escherichia coli</i> O157: H7, <i>Listeria monocytogenes</i> ve <i>Salmonella</i>	BAX PCR	Bhagwat, A.A.	2003
2	DNA hasarı	DNA Comet Deneyi	Liao ve diğ.	2009
3	<i>E. coli</i>	Altın Nanopartikül İşaretli Biyosensör	Wang ve diğ.	2015
4	<i>E. coli</i>	Elektrokimyasal sensörler	Chunhua ve diğ.	2015
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Karbapenemaz Geni (bla KPC)	Multiplex Real-Time PCR Testi	Bonomo ve diğ.	2011
6	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	VIDAS LAMP	Aktüre ve diğ.	2019
7	Termofilik <i>Campylobacter</i> spp.	PCR	Koluman ve diğ.	2006
8	<i>Salmonella</i>	FTIR	Celik ve diğ.	2012

Amperometrik Hızlı Tespit Sistemleri

Amperometrik hızlı tespit sistemlerinde çeviricilerin çalışma prensibi doğrusal akım ve analit konsantrasyonu aralarındaki ilişkiye bağlıdır. Çıkış elektrodu potansiyeli ile analit doğrudan akımı üretir ve elektrot yüzeyinde biyokimyasal bir tepkime meydana gelir. Amperometrik transdüserler reaksiyonda meydana gelen akım değişimini ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürür (Csoregi ve diğ. 2000).

Amperometrik donanımlarda elektrokimyasal değişimi ölçmek için çalışma elektrodu, karşı elektrot ve referans elektrodu kullanılır. Bu üç elektrodun yarattığı değişimi kaydedebilmek için potansiyostat kullanılır. Amperometrik ölçümler enzimatik reaksiyon sonucunda meydana gelen değişimi ölçtüğü için hidrojen peroksit konsantrasyonu ile değişen potansiyostat ve bunlara bağlı enzim mobilize edilmiş elektrotlar temel çalışma prensibini oluşturur (Ahmad ve diğ. 2018).

Potansiyometrik Hızlı Tespit Sistemleri

Potansiyometrik hızlı tespit sistemlerinde elektrot yüzeyinde doğru ve faradik akım akışı oluşmaz. Elektrot yüzeyinde yük yoğunluğu oluşumu ile yüksek miktarda gerilim oluşur. Potansiyometrik hızlı tespit sistemlerinde, biyoreseptörler ve çeviriciler varlığı ile bir iyonun iyonofora olan tepkimesiyle ortaya çıkan elektriksel gerilimdeki değişimleri ölçer. Potansiyometrik ölçüm, biyolojik algılama elementi içeren bir elektrokimyasal hücre içerisinde genellikle ya bir ürünün aktivitesi ya da elektrokimyasal reaksiyondaki bir analitin oluşturduğu gerilimi ölçer (Atanasov ve diğ. 2000, Bakker ve diğ. 2004).

E. coli tespiti için kurulan potansiyometrik bir sistemde, üre tutan bir hazne içerisine piston membran ve pH'a duyarlı sensör ve led kullanılmışlardır. Sensör ve ledin önünü kapatan n-tipi yarı iletken silikon yerleştirilmiştir. Ledler sayesinde oluşan foto akım referans elektrottaki enzim reaksiyonu sonucu değişen pH'tan voltaj ölçümü yapılmıştır (Gehring ve diğ. 1998).

Empedans Hızlı Tespit Sistemleri

Empedans temelli hızlı tespit sistemleri elektriksel alandaki değişimleri ölçer. Bu değişimler çözeltilinin veya ara maddenin elektriksel iletkenliğine ve elektrot yüzeyine sabitlenmiş tabakaya bağlıdır. Empedans temelli hızlı tespit sistemleri hedef analitlerin neden olduğu, ara maddeler üzerindeki iletkenlik değişimini ölçerler (Brettle ve diğ. 1988, Berggren ve diğ. 2001).

Sulphate Reducing Bacteria (SRB) için tasarlanan bir empedans hızlı tespit sistemlerinde çalışma elektrodu ve karşı elektrot için grafit çubuk kullanılırken referans elektrodu için kalomel tercih edilmiştir. Ölçüm için sistemde kullanılan voltaj ise 1-100 kHz frekans aralığında 5 mV olarak kullanılmıştır. Veri kaydı için bilgisayar kullanılmıştır (Azız ve diğ. 2009).

Optik Hızlı Tespit Sistemleri

Optik hızlı tespit sistemleri için ışık kaynağından ışık demeti oluşturmak gerekir. Bu ışık demeti için belli optik bileşen ve bu bileşenlerin oluşturduğu ışığı yönlendirmek ve algılayacak bir ışık dedektörüne ihtiyaç duyulmaktadır (Liley 1998). İki tip optik hızlı tespit sistemleri tasarlanabilir. Bunlar; hedef analitin doğrudan ve dolaylı tespiti. Doğrudan tespit; analit, gönderilen dalgaının optik özelliklerini doğrudan etkiler. Doğrudan tespit, ışınma, metal partiküller gibi optik malzemelerle, hedef analitte optiksel sinyaller üretmek için kullanılır (Mascini ve diğ. 1998).

Fiberoptik hızlı tespit sistemlerinde biyoyumlu matriksler kullanılır. Bu matrikslerde genellikle biyoyumluluk yönüyle solgel tercih edilir. Polimer tercih edilmemesinin de içersisinde bulunan monomerlerdir. İçerdikleri monomerlerin vivo ölçüm alınmasını engellemektedir. Solgel elyaf üzerine kaplanarak matriksler oluşturulur. Optik fiberler bu matrikslerin önünden geçer. Optik sistemde beyaz ışık kaynağı olarak kullanılan tungsten-halojen lamba, temas halinde olduğu sensör elemanını uyararak için kullanılır. Spektrometreden fiber ucundaki değişim algılanır. Bu değişimin algılanması DAQ (Data Acquisition Card) kartı ile sağlanır (Asundi ve diğ. 2002).

Pizoelektrik Hızlı Tespit Sistemleri

Pizoelektrik hızlı tespit sistemleri, kristal yüzeyinde oluşan kütle değişimi sonucu piezoelektrik kristalinin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesi temeline dayanır. İki farklı tip piezoelektrik hızlı tespit sistemleri bulunur: Bunlar, kuartz kristal mikrobals (Quartz Crystal Microbalance) ve yüzey akustik dalga (SAW) temelli hızlı tespit sistemleridir. Yapılan araştırmalar pizoelektrik hızlı tespit sistemleri biyokimyasal reaksiyonları tek basamakta ve düşük maliyetli tespit sistemleri olduğu belirtilmiştir (Buck ve diğ. 2004, Buttry ve Ward 1990, Galla ve diğ. 2000).

Piezoelektrik hızlı tespit sistemlerinde rezonans değişimi için kuvars kristali tek yönlü hücre ile temas ettirilecek şekilde yerleştirilir. Kuvars kristali üzerinde oluşan frekans farkı kristal analizörü tarafından kaydedilip sistem tarafından okunabilir hale getirilir (Mascini ve diğ. 2000).

Termal Hızlı Tespit Sistemleri

Temel ilkesi enzimatik reaksiyon sonucu oluşan entalpi değişimini ölçerek substrat konsantrasyonunu belirler. Biyokimyasal reaksiyon sonucu oluşan entalpi değişimi ve substrat yoğunluğu arasındaki doğrusal orantıdan faydalanılır. Sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamlarda termistör ve termofiller kullanılarak ölçülür (Hua ve diğ. 2006).

MRSA dünya genelinde hızla yayılım göstermektedir. Amerika kıtasında ve birçok Avrupa ülkelerinde *S. aureus* suşlarının %10-40'ı MRSA'dan oluşmaktadır. Dünyada hızla artan sürveyans, MRSA'nın hastane ortamında yayılımını kısıtlamak için enfeksiyon kontrol programları oluşturulmuştur (Braveny ve diğ. 1994). Tüm bu nedenlerden dolayı MRSA enfeksiyonunun hızlı ve doğru olacak şekilde teşhis edilmesi gerekmektedir. Geleneksel yöntemleri (Disk difüzyon, Sıvı mikrodilüsyon vb.) için minimum 24 saat gibi bir süre gerekmektedir. Bu süre enfeksiyon kontrol programında çok uzun bir süredir. Bundan kaynaklı enfeksiyon kontrolü için daha kısa sürede sonuç veren sistemler oluşturulmuştur (Banerjee ve diğ. 1992, Hiramatsu ve diğ. 1992, Buescher ve diğ. 1990).

Kalorimetrik titrasyonlar, mikrok calorimetre ile ısıyı ölçen sistemlerdir. Bu sensörlerde bir reaksiyon hücresi ve bir referans hücresi bulunur. Sistem bu hücreler arasındaki ısı akışını ölçer (Fein ve diğ. 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Besiyerler

Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Merck 1.13825)

Laboratuvar ortamında yapılan mikrobiyoloji analizlerde genellikle bakteriler için katı besiyeri olarak tercih edilir. BHI içeriği **Tablo 15**'te miktarları ile beraber verilmiştir.

Tablo 15: Brain heart infusion broth (BHI) içeriği

İçindekiler	Miktarı
Nutrient substrate	27,5 g/L
D(+) Glucose	2,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Na ₂ HPO ₄	2,5 g/L
Agar-agar	15,0 g/L

Dehidre besiyeri 52,0 g/L şeklinde distile su içinde homojenize hale getirilip, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra ve petrilere 12,5'er mL dökülür. Sterilizasyon sonrası 25 °C'de pH'sı 7,4±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve bazen kahverengidir.

Hazırlanan besiyerleri 15-25 °C'de ve besiyeri kutusu hava almayacak şekilde kapatılıp son kullanma tarihine kadar saklanabilir.

Plate Count Agar (PCA) (Merck 1.05463)

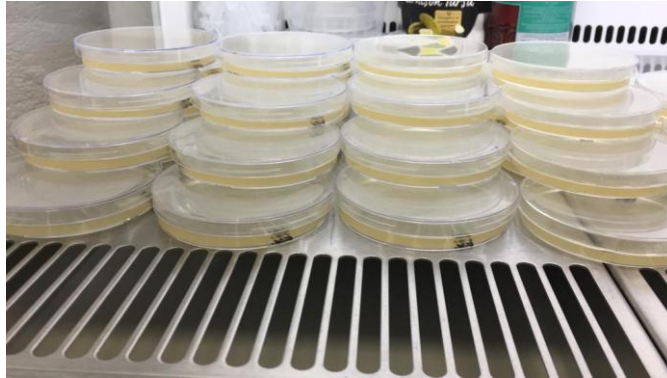
Canlı olmayan ortamda yapılan standart mikrobiyolojik çalışmalarda, aerobik bakteri sayımında kullanılan katı besiyeridir. İçerisinde inhibitör ve indikatör içermez. PCA içeriği **Tablo 16**'da verilmiştir.

Tablo 16: Plate Count Agar (PCA)

İçindekiler	Miktarı
Peptone from casein	5,0 g/L
Yeast extract	2,5 g/L
D(+) Glucose	1,0 g/L
Agar-agar	14,0 g/L

Dehidre besiyeri, 22,5 g/L ölçülecek şekilde distile edilmiş su içerisinde homojenize edilip, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyon işlemi yapıp petrilere 12,5'er mL dökülür. Hazır hale gelen besiyeri berrak, çok açık sarımsı renktedir ve 25 °C'de pH'sı 7,0±0,2'dir.

Hazırlanan besiyeri 15-25 °C'de ve besiyeri kutusu her kullanımda hava almayacak şekilde kapatılıp son kullanma tarihine kadar kullanılabilir. Petrilere dökülmüş PCA görüntüsü **Şekil 3**'te verilmiştir.



Şekil 3: Ekime hazır PCA görüntüsü

Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

İzotonik kuvvetine bağı olarak mikroorganizmaların en yüksek düzeyde geri alınmasını sağlar. Laboratuvar ortamında yapılan standart mikrobiyolojik işlemlerde seyreltme çözeltilisi şeklinde kullanılır.

Pepton, fizyolojik tuzlu suya ozmotik kuvvet desteği sağlar. Konsantrasyonu düşük pepton düzeyine bağı olarak, bu çözeltiliye örnekten aktarılan organizma sayısında 1-2 saat içinde değışim olmaz. Maximum Recovery Diluent içeriğı **Tablo 17**'de belirtilmiştir.

Tablo 17: Maximum Recovery Diluent içeriğı

İçindekiler	Miktarı
Peptone	1,0 g/L
NaCl	8,5 g/L

Distile su içinde 9,5 g/L ölçülerinde hazırlanır. İstenilen oranlarda tüplere dağıtılıp, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon edildikten sonra 25 °C'de pH'sı 7,0±0,2'dir. Çözeltinin son hali berrak ve renksizdir. Otoklav sonrasında laboratuvar şartlarında 1 ay saklanabilir.

Hazırlanan besiyeri 15-25 °C'de ve besiyeri kutusu sıkıca kapalı olacak şekilde son kullanma tarihine kadar saklanabilir.

Baird Parker Agar (Merck 1.05406)

Laboratuvar ortamında yapılan standart mikrobiyolojik deneylerde, *Staphylococcus* ve *Micrococcus* türleri ile ve özellikle *Staphylococcus aureus* analizinde katı besiyeri olarak tercih edilir. Baird Parker Agar içeriğı **Tablo 18**'de açıklanmıştır.

Tablo 18: Baird Parker Agar içeriği

İçindekiler	Miktarı
Peptone from casein	10,0 g/L
Meat extract	5,0 g/L
Yeast extract	1,0 g/L
Sodium pyruvate	10,0 g/L
Glycine	12,0 g/L
Lithium chloride	5,0 g/L
Agar-agar	15,0 g/L

Baird-Parker Agar içindeki piruvat ve glisin stafilokokların üremesini seçici olacak şekilde stimüle eder. *S. aureus* kolonileri lipoliz ve proteoliz sonucunda koloni etrafında tipik zon ve halka oluşturmaları, tellurit telluriuma indirgenmesi sonucunda siyah koloni oluşturmaları olmak üzere 2 tipik karakteristik özellik ile belirlenirler. İnkübasyon (37 °C'de 24 saat) sonunda *S. aureus* 1-1,5 mm çapında siyah, konveks koloniler oluşturur. 48 saat inkübasyondan sonra çap 1,5-2,5 mm olur. Yumurta sarısı reaksiyonu ve tellurit indirgenmesi çoğunlukla pozitif koagülaz reaksiyonu ile beraber gerçekleşir.

Lesitinaz aktivitesi, besiyerinin 37 °C'de 24 veya 48 saat inkübasyonu ve inkübasyon sonunda buzdolabında 1 gece kalmasıyla sonuçlar daha net saptanır.

Toz besiyerinden 58,0 g dehidre besiyeri 950 mL distile edilmiş su içinde 1-2 dakika sıcaklık yardımıyla çözündürme işlemi gerçekleşir ve otoklavda 121 °C'de 15 dakikada sterilizasyon işlemi yapılır. Besiyeri 45 °C'de soğutulur ve manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılırken içerisine önceden hazırlanmış oda sıcaklığında 50 mL yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu (Merck 1.03785) eklenip, standart 9 cm çaplı petrilere 12,5'er mL veya 14 cm çaplı petrilere 50'şer mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri sarımsı-kahverengi görünümünde olup 25 °C'de pH'sı 6,8±0,2'dir. Petrilere buzdolabında (4 °C) 1 ay saklanabilir.

3.1.2 Şeker Oranları ile Pasajlama İşleminin Yapılması

Dört yüz elli ml distile su için 12 gr BHI ölçüldü. BHI hat plate yardımıyla su içinde homojenize edildi. BHI 50 ml olacak şekilde tüplere bölündü. Dokuz tane tüp alınıp standı yerleştirildi. Glikoz, früktoz ve galaktoz için %1, %2, %3 olacak şekilde şeker gramları sırayla 0,5 gr, 1 gr, 1,5 gr olarak hesaplandı. Dokuz tane BHI içine sırasıyla 0,5 gr, 1 gr, 1,5 gr galaktoz, 0,5 gr, 1 gr, 1,5 gr früktoz, 0,5 gr, 1 gr, 1,5 gr galaktoz eklendi.

3.1.3 Elektronik Devre Tasarımında Kullanılan Malzemeler

Arduinio Uno

Bu çalışmada elektronik devrenin oluşturulmasında Arduinio Uno kullanılmıştır. Arduinio Uno'ya ait teknik özellikler **Tablo 19**'da verilmiştir.

Tablo 19: Arduino uno teknik özellikleri (Semiz 2018).

Mikrodenetleyici	ATmega328
Çalışma Gerilimi	5V
Giriş Gerilimi (önerilen)	7-12V
Giriş Gerilimi (limit)	6-20V
Dijital G/Ç Pinleri	14 (6 tanesi PWM çıkışı)
Analog Giriş Pinleri	6
Her G/Ç için Akım	40 mA
3.3V Çıkış için Akım	50 mA
Flash Hafıza	32 KB (ATmega328)
SRAM	2 KB (ATmega328)
EEPROM	1 KB (ATmega328)
Saat Hızı	16 MHz
Uzunluk	68.6 mm
Genişlik	53.4 mm
Ağırlık	25 gr

TCS 3200 Renk Sensörü

Yapılan çalışmada elektronik devrede TCS 3200 renk sensörü kullanılmıştır. TCS 3200 renk sensörüne ait teknik özellikler **Tablo 20**'de verilmiştir.

Tablo 20: TCS 3200 renk sensörü teknik özellikleri (Kopuz 2018).

Giriş voltajı	2.7 V-5 V
Arayüz	Dijital TTL
Boyutları	28.4x28.4mm
Programlanabilir ve tam ölçekli çıkış frekansı	
Programlanabilir ve tam ölçekli çıkış frekansı	

RGB Ledi

TCS 34725 sensörü, bulundurduğu IR (infrared - kızılötesi) filtre sayesinde, rengi algılanan cisimden yansıyan kızılötesi ışınları bloke ederek renk tanımlanmasını sağlar. Dinamik aralığı 3.800.000: 1'dir (İzgöl 2015).

3.2 Yöntem

3.2.1 MRSA Besiyeri Tasarlanması

BHI Hazırlanması

Bazal besiyeri için 450 ml distile su için hassas terazide 12 gr BHI tartıldı. Suyun içine boşaltılan BHI içine balık atılıp manyetik karıştırıcıda homojenize edildi. Homojenize olan BHI 50 ml olacak şekilde tüplere boşaltıldı. Ardından tüpler otoklava atılıp sterilize edildi. Hassas terazide belli oranlarda şekerler tartıldı. Miktarlar aşağıdaki oranlarda eklendi:

- %1 oranında glukoz (Sigma G8270-100G), galaktoz (Sigma G0750-100G), früktoz (Sigma F0127-100G)
- %2 oranında glukoz, galaktoz, fruktoz
- %3 oranında glukoz, galaktoz, fruktoz olacak şekilde ayarlandı.

Tartılan şekerler sırayla 2'şer tane tüplere boşaltılıp karıştırıldı. 50 ml şekerli BHI'lar 10 ml tüplere mikropipet yardımıyla dağıtıldı. 10 ml tüpler kapaklara şeker yüzdeleri yazılarak 121 °C'de 15 dakika 1 atm basınç altında otoklavlanarak, +4 °C'de stoklanmıştır.

***S. aureus* Pasajlama İşlemi**

Önceden hazırlanan BHI'nın içine BP'den saf koloni alınarak pasajlama işlemi yapıp 37 °C etüvde 24 saatlik üreme için bekletildi. BHI pasajlanan staflar *S. aureus* ATCC 29213 nolu tüplerden alınarak pasajlandı. Yirmi dört saatin sonunda etüvden alındı.

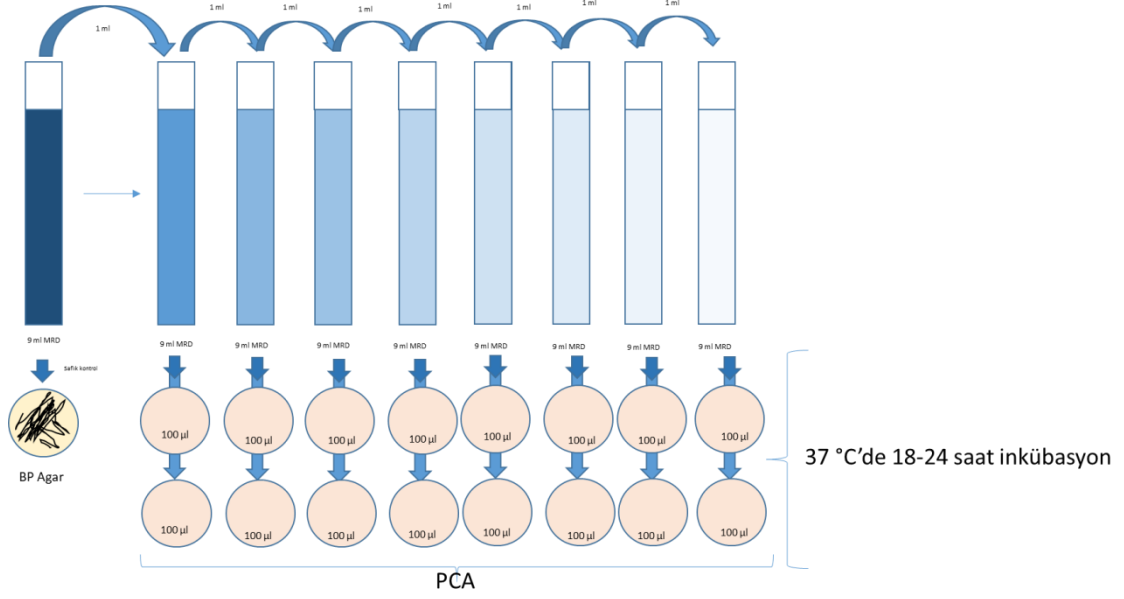


Şekil 4: *S. aureus*'a ait koloni morfolojisi ve saf ekimin görüntüsü

Ekimin Yapılması

Önceden hazırlanan peptonlu sulardan 8 tane alınıp standa yerleştirildi. BHI içine pasajlanan *S. aureus* içeren besiyeri içinden mikropipet yardımıyla 1000 µL çekilip 1 numaralı peptonlu su içine boşaltıldı. Mikropipetin ucu değiştirilip 1 numaralı peptonlu sudan 1000 µL alınıp 2 numaralı peptonlu suya eklendi. Döngü 8 numaralı peptonlu suya kadar devam edip saflaştırma işlemi tamamlandı. Bu işlemin ardından hazırlanan PCA agarlardan 16 tane alınıp laminar aflow biyogüvenlik kabini içerisinde paralelli (her ekim dilüsyonu için çift agar olacak) şekilde 8'e kadar

numaralandırıldı. Mikropipet ile 1 numaralı peptonlu sudan 100 µL alınıp 1 numaralı agar drigalski spatülü yardımıyla yaydırıldı. Aynı işlem çifti içinde yapıldı. Ekim işlemi sekizinci dilüsyona kadar yapıldı. Ve ekim yapılan agarlar 37 °C etüve 24 saatlik üreme için bırakıldı. Kullanılan peptonlu sular ve kirli pipet uçları sterilizasyon için otoklava gönderildi. Genel olarak ekim işlemi **Şekil 5**'te gösterilmiştir.



Şekil 5: Ekim işlemi aşamaları

Sayımın Yapılması

Yirmi dört saatin sonunda etüvden alınan ekimler sayım için siyah zemin üzerine ters olarak ve aynı numaralar altı üstlü olacak şekilde yerleştirildikten sonra koloni sayımı yapıldı.

3.2.2 Şeker Oranın Belirlenmesi

Öncesinde hazırlamış olan farklı şeker içeren tüplere pasajlama işlemi yapıp etüve atıldı. Yirmi dört saatin sonunda alındı.

Ön Hazırlıkların Yapılması

Üç yüz ml distile su için 3 gr proteose peptone tartıldı. Tartılan madde distile su içinde çözdürüldü. Karıştırılan malzeme dispenser yardımıyla 9 ml olacak şekilde

tüplere dağıtılıp otoklavlandı. Ardından 8 tane tüpün içine %1 oranında früktoz, 8 tane tüpün içine %2 früktoz, 8 tane tüpün içine %3 oranında früktoz eklendi. Bunların içine 1000 ml'lik *S. aureus* eklendi. Bu işlem galaktoz ve glikoz için yapıldı.

Ekimin Yapılması

Früktoz (%1, %2, %3) içeren 8'er tane peptonlu sular standa yerleştirildi. Bir numaralı sudan 2 numaralı suya pipetle 1 ml su eklendi 2 numaralı sudan 3 numaralı suya pipetle 1 ml su eklendi işlem 8 numaralıya kadar devam etti. Laminar sisteme her yüzde için 16 tane PCA çift sıralı olacak şekilde 8'e kadar numaralandırılarak dizildi. Bir numaralı %1 früktozlu sudan 100 mikron alınıp 1 numaralı petriye ekim yapıldı. Tekrar 100 mikron alınıp 2. Periyottaki 1 numaralı petriye ekim yapıldı. Diğer numaralar için işlem tekrarlandı.

Bu işlemin tamamı %2 früktoz, %3 früktoz, %1 galaktoz, %2 galaktoz, %3 galaktoz, %1 glikoz, %2 glikoz, %3 glikoz şeker yüzdeleri için ayrı ayrı yapıldı.

Tüm bu işlemlerin sonunda her şeker oranı için ekim yapılan petriyer etüve alındı. İnkübasyon işlemi 24 saat sürdü. Bu işlem sonucunda her şeker oranı için ayrı ayrı sayım yapıp grafiksel analizleri yapıldı.

3.2.3 Renk İndikatörünün Belirlenmesi

Brom Creosol Purple

Yüz ml distile su için 3,7 gr BHI, %0,33 früktoz, %0,33 galaktoz, %0,33 glikoz 0,1 gr Brom Creosol Purple hassas terazide tartıldı. Hazırlanan karışım otoklava atıldı. Otoklavdan alınan malzeme tüplere 3 ml olacak şekilde dağıtıldı. Üç yüz ml distile su mezura ile ölçüldü. Hassas terazi ile 3 gr proteose peptone tartıldı. Karıştırılan malzeme 9 ml olacak şekilde tüplere dağıtılıp otoklavlandı. Peptonlu sulardan 9 tane alınıp standa yerleştirilip dilisyon işlemi yapıldı. *S. aureus* içeren BHI'dan pipetle 1 ml alınıp 1 numaralı peptonlu suya aktarıldı. Bir numaralı sudan 2 numaralı suya pipetle 1 ml su eklendi, 2 numaralı sudan 3 numaralı suya pipetle 1 ml su eklendi ve işlem 9 numaralıya kadar devam etti. Dokuz tane broth tüp standa yerleştirilip numaralandırıldı. Bir numaralı peptonlu sudan 1 ml pipetle alınıp 1

numaralı broth içine boşaltıldı. Pipet ucu atılıp yenisi takıldı. İki numaralı peptonlu sudan 1 ml alınıp 2 numaralı broth içine boşaltıldı. Aynı işlem 9 numaraya kadar devam etti. İşlem sonunda broth tüpler üreme için etüve atıldı. Hazırlanan karışım görüntüsü **Şekil 6**'da verilmiştir.



Şekil 6: Homojenize edilmiş broth görünümü

Fenol Red

Hazırlanırken, 100 ml distile su için 3,7 gr BHI, %0,33 fruktoz, %0,33 galaktoz, %0,33 glikoz, 0,01 gr Fenol Red tartıldı. Karıştırılan malzeme tüplere pipetasyon işlemiyle 3 ml olacak şekilde dağıtıldı. Tüpler otoklavda strelize edildi. Üç yüz ml distile su mezura ile ölçüldü. Hassas terazi ile 3 gr proteose peptone tartıldı. Karıştırılan malzeme 9 ml olacak şekilde tüplere dağıtılıp otoklavlandı. Peptonlu sulardan 9 tane alınıp standa yerleştirilip dilisyon işlemi yapıldı. *S. aureus* içeren BHI'dan pipetle 1 ml alınıp 1 numaralı peptonlu suya aktarıldı. Bir numaralı sudan 2 numaralı suya pipetle 1 ml su eklendi, 2 numaralı sudan 3 numaralı suya pipetle 1 ml su eklenip işlem 9 numaralıya kadar devam etti. Dokuz tane broth tüp standa yerleştirilip numaralandırıldı. Bir numaralı peptonlu sudan 1 ml pipetle alınıp 1 numaralı broth içine boşaltıldı. Pipet ucu atılıp yenisi takıldı. İki numaralı peptonlu sudan 1 ml alınıp 2 numaralı broth içine boşaltıldı. Aynı işlem 9 numaraya kadar devam etti. İşlem sonunda broth tüpler üreme için etüve atıldı.

3.2.4 Brothdan Ekimin Yapılması ve Metisilin Eklenmesi

Broth tüpler etüvden alındı. Ve renk değişimi için fotoğrafı çekildi. Brothlar etüve atıldıktan 2 saat sonra ve 4 saat sonunda ayrı olacak şekilde ekim yapıldı. Laminer sisteme 2 periyot olacak şekilde 9 tane PCA dizildi. Bu PCA'lar çift olacak şekilde numaralandırıldı. Bir numaralı brothdan 100 mikrolitre alınıp 1 numaralı petriye ekim yapıldı. Tekrar 100 mikron alınıp 2. Periyottaki 1 numaralı petriye ekim yapıldı. Dokuz numaralı petriye kadar aynı işlem tekrarlandı. Sonunda petriyer etüve konuldu. Yirmi dört saatin sonunda yapılan sayımlar yapıp grafikleri çizildi.

Hazırlanan renk indikatörlü besiyerlerinin içerisinde 50 µL metisilin supplement eklenmiştir.

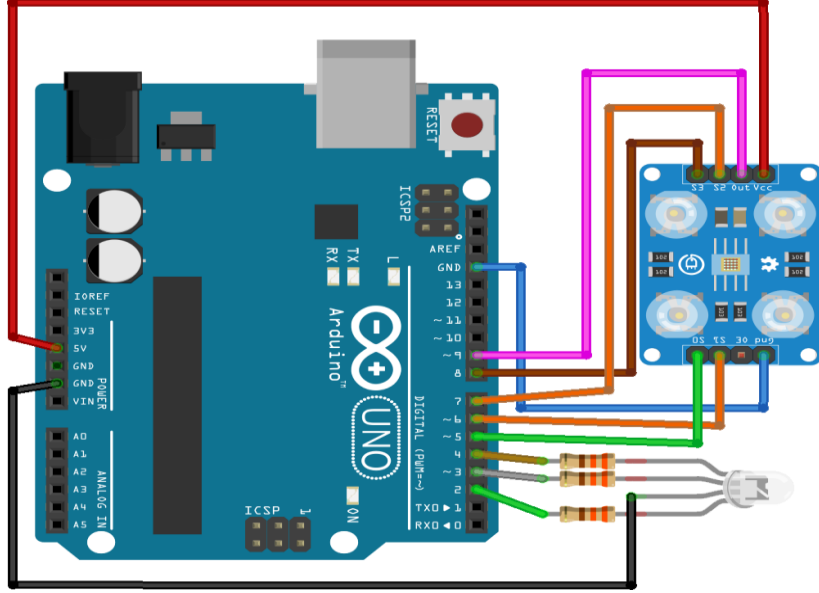
3.2.5 Spesifite (Özgüllük) Testi

Bu amaçla yedi farklı mikroorganizma hazırlanan broth ortamına konulmuştur. Bakteriler 2 saatte bir sistemden ölçümü alınacak şekilde 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bakteriler şu şekilde seçilmiştir:

Escherichia coli ATCC 25922, *Staphylococcus epidemidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Enterococcus fecalis* ATCC 29212, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 24853.

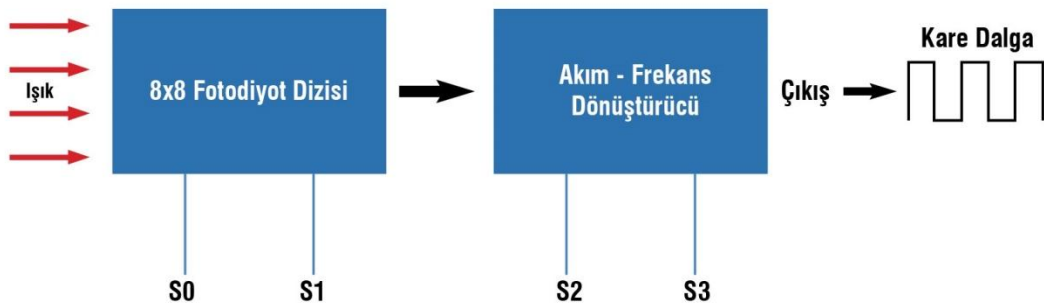
3.2.6 Optik Donanımın Tasarlanması ve Programlanması

Devre bağlantıları Şekil 7’ de gösterilmiştir.



Şekil 7 : Devre şeması

Çalışmada kullanılan TCS 3200 sensörü fotodiyotlar ve bir akım-frekans dönüştürücüsü yardımıyla renk ayırımı sağlar. Sensör, üzerine gelen ışığın şiddetiyle orantılı bir frekansta kare dalga üretilir, kare dalgayı kullanarak veriler alınır. TCS 3200 sensörü çalışma prensibi Şekil 8’de özetlenmiştir.



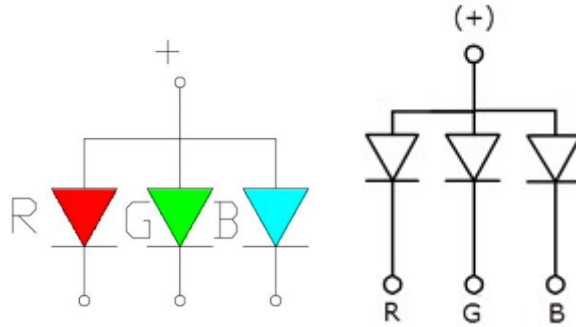
Şekil 8 : TCS 3200 sensörü çalışma prensibi (Kopuz 2018).

TCS 3200 sensörü kalibrasyon durumları **Şekil 9**'da verilmiştir.

S0	S1	ÇIKIŞ FREKANS ÖLÇEĞİ
Düşük	Düşük	Kapalı
Düşük	Yüksek	2%
Yüksek	Düşük	20%
Yüksek	Yüksek	100%
S2	S3	FOTODİYOT TİPİ
Düşük	Düşük	Kırmızı
Düşük	Yüksek	Mavi
Yüksek	Düşük	Filtresiz
Yüksek	Yüksek	Yeşil

Şekil 9 : TCS 3200 sensörü kalibrasyon durumu (Kopuz 2018).

Ayrıca çalışmada kullanılan RGB ledi çalışma prensibi aşağıda gösterilmiştir. Pozitif ucuna 5 V bağlı iken kırmızı, yeşil, mavi uçlarından hangisini yakmak istersek nötr ile yolu tamamlanmaktadır. Bu sayede + kutbundan nötre doğru akan elektronlarının yolları tamamlanmış olur ve nötr bağlanan ledin ışığı yanmaktadır. RGB ledi kalibre görüntüsü **Şekil 10**'da verilmiştir.



Şekil 10 : RGB ledi kalibrasyon durumu (İzgöl 2015).

Optik donanım için yazılım Aurdino programında kodlandı. Kodlar ekler kısmında bulunan **Şekil A**' da belirtilmiştir.

Kumpas yardımıyla ölçüler alınıp solid works programında kutu çizildi. Tasarımı yapılan kutu 3D yazıcıda bastırıldı. Ölçüler aşağıdaki gibidir;

Kutu; Boyu: 70 cm Yüksekliği: 70 cm Eni: 70 cm

Pencere; Boyu: 24,21 cm Eni: 31,04 cm Tabandan yüksekliği: 12,90 cm

Orta bölüm: 62 cm Kenar Çıkıntısı: 4 cm Orta bölme aşağıdan yukarı 38 cm yükseklikte

Orta Kısıma yerleşecek parça boyu: 66 cm Eni: 66 cm

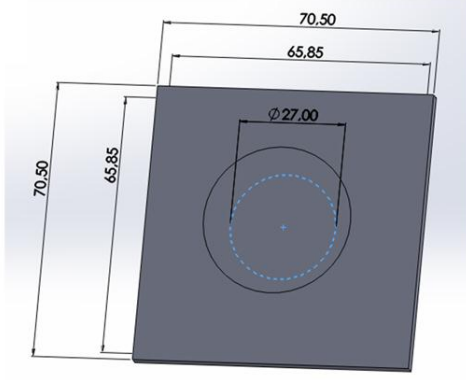
Ependorf gireceği delikler: 11,50 cm

Kapak Boyu: 70,50 cm Eni: 70,50 cm

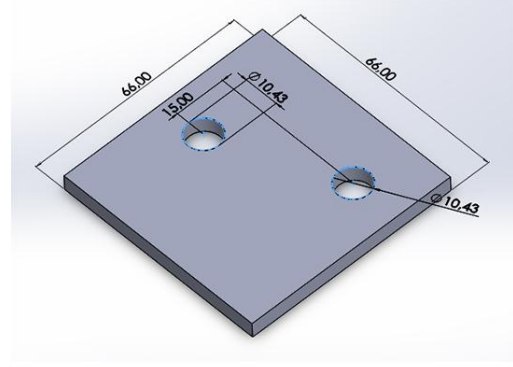
Kapak Alt Kısım: Boyu: 65,85 cm Eni: 65,85 cm

Kutu ölçüleri **Şekil 11**'de gösterilmiştir. Kutu baskısı **Şekil 12**'de verilmiştir. Kutu ve sistemin entegrasyonu **Şekil 12**'de gösterilmiştir.

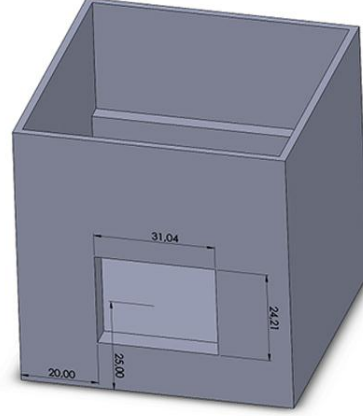
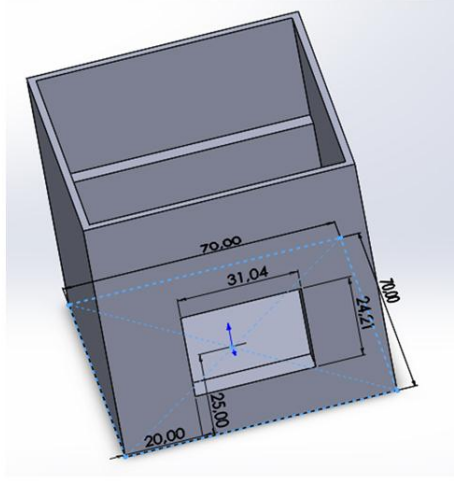
KAPAK



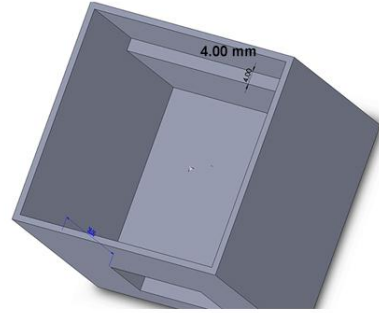
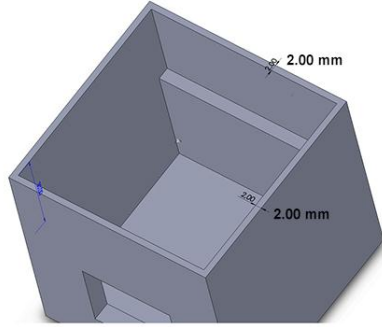
BROTH YERLEŞİM YERİ



TCS 3200 YERLEŞİM YERİ



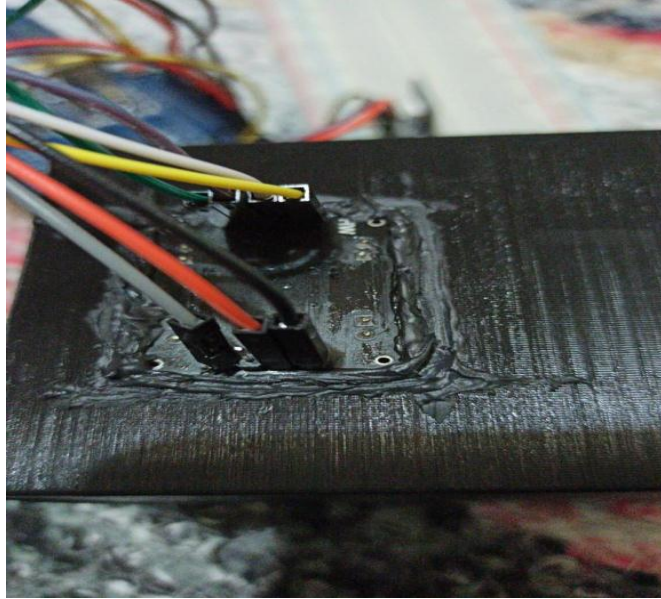
KUTU ÇEPER KALINLIĞI



Şekil 11: Solidworkste kutu çizimi



Şekil 12: Kutunun 3D baskısı



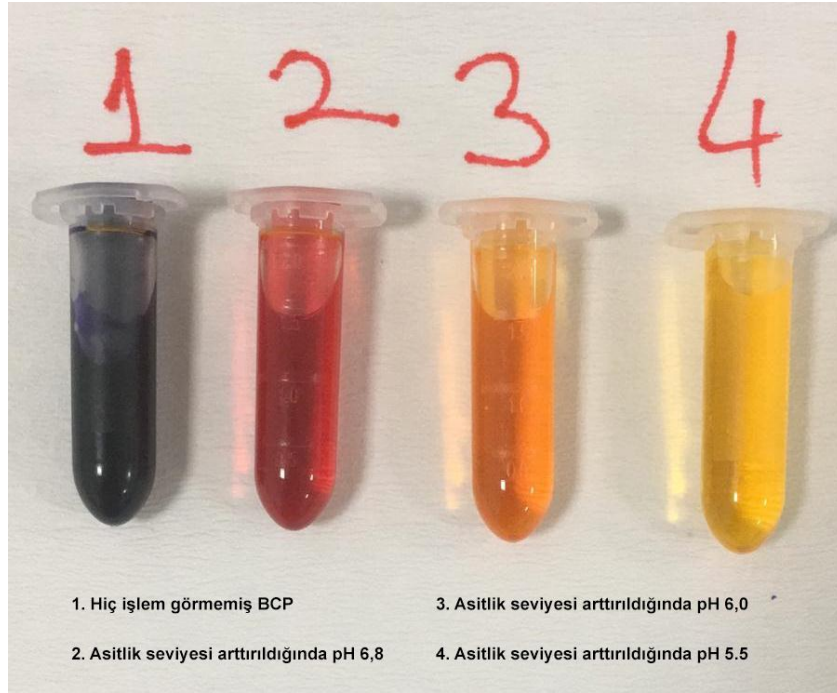
Şekil 13: Kutu ve optik sistemin entegrasyonu

Devre TCS 3200 kutuya siyah silikon ile yapıştırıldı. Işığın geçmesi engellendi. Deney için stabil ortam sağlanmış oldu.

3.3 Sistemin Optimizasyonu

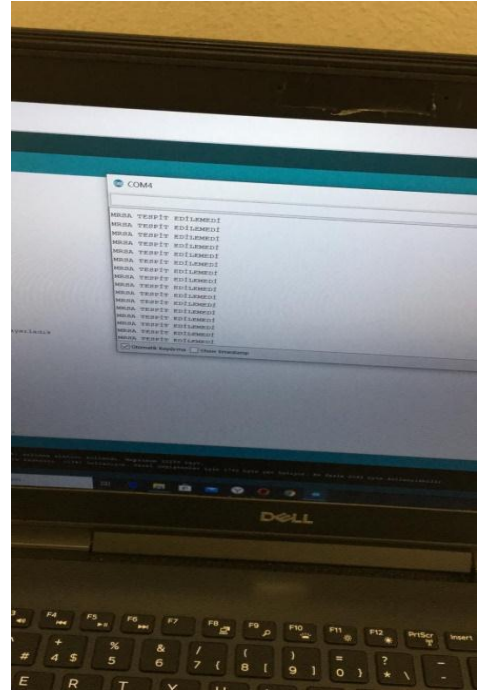
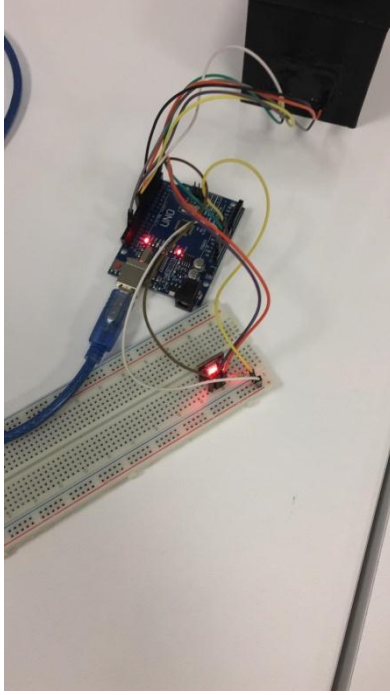
3.3.1 Validasyon

Validasyon işlemi ISO 13485 standardına uyacak şekilde yapılmıştır. Bu amaçla, tasarlanan broth hazırlandı. Hazırlanan brothdan 4 tane ependorfa alındı. Broth içine damla damla HCl eklendi ve böylece renk skalası oluşturuldu. Oluşturulan renkler sırayla sisteme alınıp test edildi. Yapılan ölçüm sonuçlarında hem RGB sensöründe hem de arduino seriport ekranında doğru ve tutarlı sonuçlar alındı. Validasyon işleminde kullanılan renkler **Şekil 14**'te gösterilmiştir.



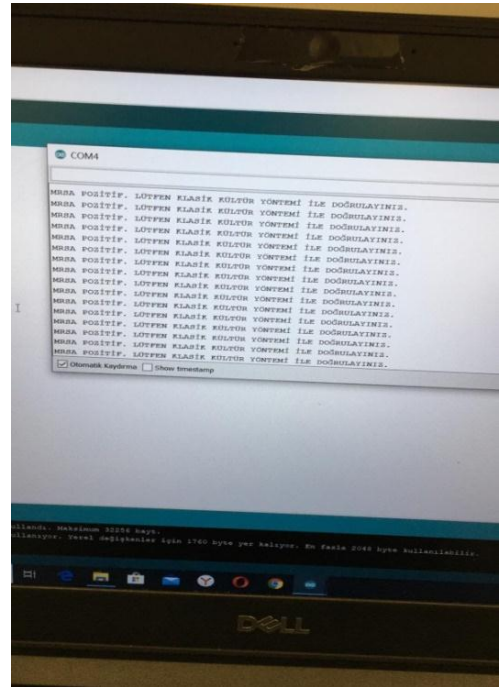
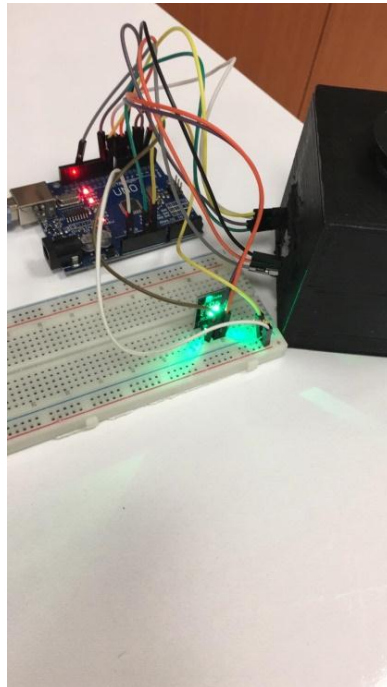
Şekil 14: Renk skalası

Ölçümlerde 1 numaralı ependofta bakteri bulunmamaktadır. 1 numaralı örneği kutuya koyup ölçüm aldığımızda RGB sensörü kırmızı yanar ve seriport ekranında "MRSA TESPİT EDİLEMEDİ." uyarısı geldi. Sonuçlar **Şekil 15**'te verilmiştir.



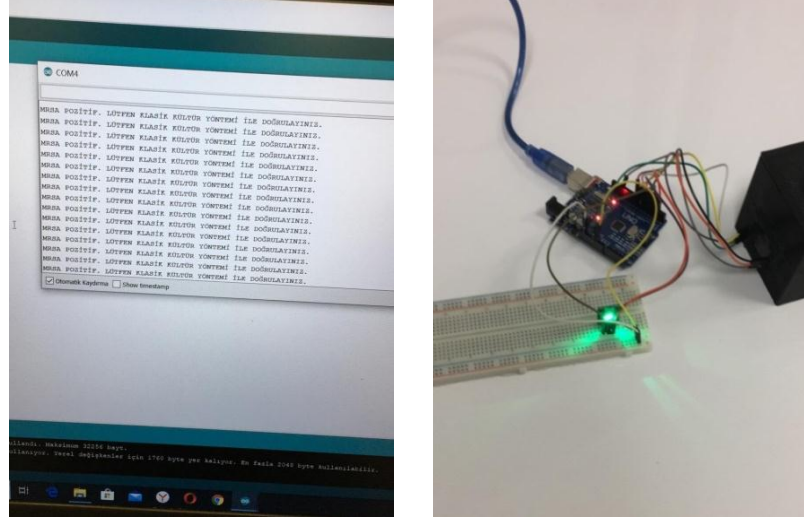
Şekil 15: Bakterinin olmadığı renk skalasında sistem cevabı

İki numaralı ependorf örneğinde düşük yoğunluklu MRSA dönüşüm renginde olup kutuya konulduğunda RGB sensörü yeşil yanıp seriport ekranında "MRSA POZİTİF. LÜTFEN KLASİK KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE DOĞRULAYINIZ." uyarısı okundu. Sistem sonuçları **Şekil 16**'da gösterilmiştir.



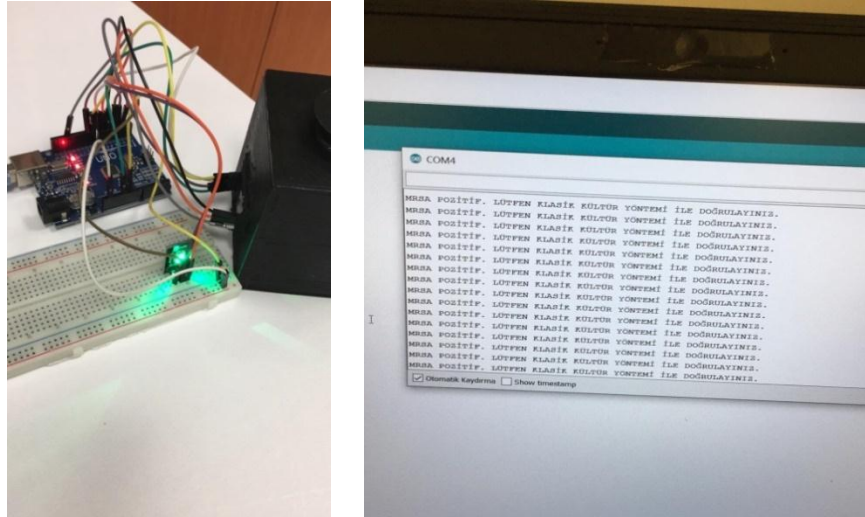
Şekil 16: Bakterinin düşük yoğunlukta olduğu renk skalasında sistem cevabı

Üç numaralı örnek orta yoğunluklu MRSA renk değişiminde olup teste alındığında RGB sensörü yeşil seript ekranında "MRSA POZİTİF. LÜTFEN KLASİK KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE DOĞRULAYINIZ." Okundu. Sonuç **Şekil 17**'de gösterilmiştir.



Şekil 17: Bakterinin orta yoğunlukta olduğu renk skalasında sistem cevabı

Dört numaralı örnek yüksek yoğunluklu MRSA içermekte olup test edildiğinde RGB sensörü yeşil seript ekranında "MRSA POZİTİF. LÜTFEN KLASİK KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE DOĞRULAYINIZ." uyarısı verildi. Sonuç **Şekil 18**'de verilmiştir.



Şekil 18: Bakterinin yüksek yoğunlukta olduğu renk skalasında sistem cevabı

3.3.2 Verifikasyon

Hazırlanan broth 6 tane ependorfa dağıtıldı. Ependorflar düşük yoğunluklu, orta yoğunluklu, yüksek yoğunluklu olacak şekilde 2'şerli sınıflandırıldı. Bulaştırma düzeyleri **Tablo 21**'de verilmiştir.

Tablo 21: Brothlara bakteri bulaştırma düzeyleri

Bulaştırma düzeyi	Koloni oluşturan birim sayısı	Logaritmik bulaştırma düzeyi Kob/ml
Düşük	20	1,3
Orta	300	2,47
Yüksek	1000	3

Ardından brothlar üreme için 37 °C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. İki saatte bir renk değişimi ölçülerek, bulaştırılmış MRSA tespiti yapıldı. Sabah saat 9:00'da başlayan deneyde ölçümleri 11:00, 13:00, 15:00, 17:00, 19:00, 21:00 ve 24 saat sonunda ertesi gün 9:00 da ölçümler alındı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada *S. aureus* özellikle MRSA için hızlı tespiti yönelik bir sistem kullanılması hedeflenmiştir.

4.1 Sayımın Yapılması

Sayımlar yayma plak tekniği ile seri dilüsyonlardan yapılmıştır. Ekimler 24 saatin sonunda etüvden alınmış ve sayım için siyah zemin üzerine ters olacak ve aynı numaralar altlı üstlü olacak şekilde yerleştirildikten sonra koloniler sayıldı. Sayım sonucu aşağıdaki **Tablo 22**'de gösterilmiştir.

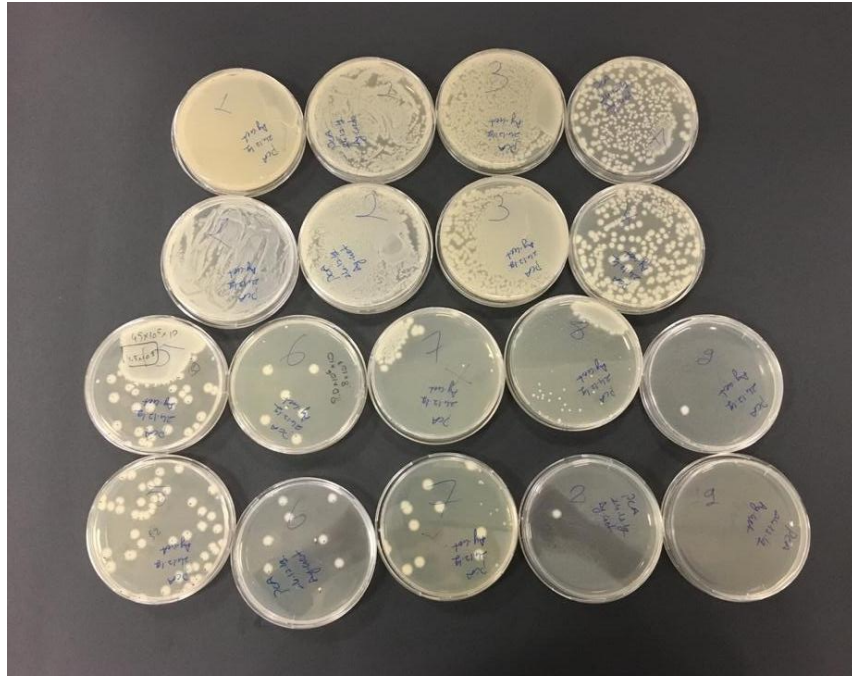
Tablo 22: Sayım sonuçları

	7. Dilüsyon	8. Dilüsyon	
1. Deneme	8,954	9,278	
2. Deneme	8,845	9,698	
3. Deneme	8,602	10	
Ortalama	8,823	9,750	
Standart sapma	0,127	0,259	
Kabul edilen sapma			±0,193

Farklı şeker katkılarına bağlı olarak elde edilen paralel ekim sonuçları **Tablo 23**'de gösterilmiştir. Ekim işleminde inkübasyon sonucu üreme görüntüsü **Şekil 19**'da verilmiştir.

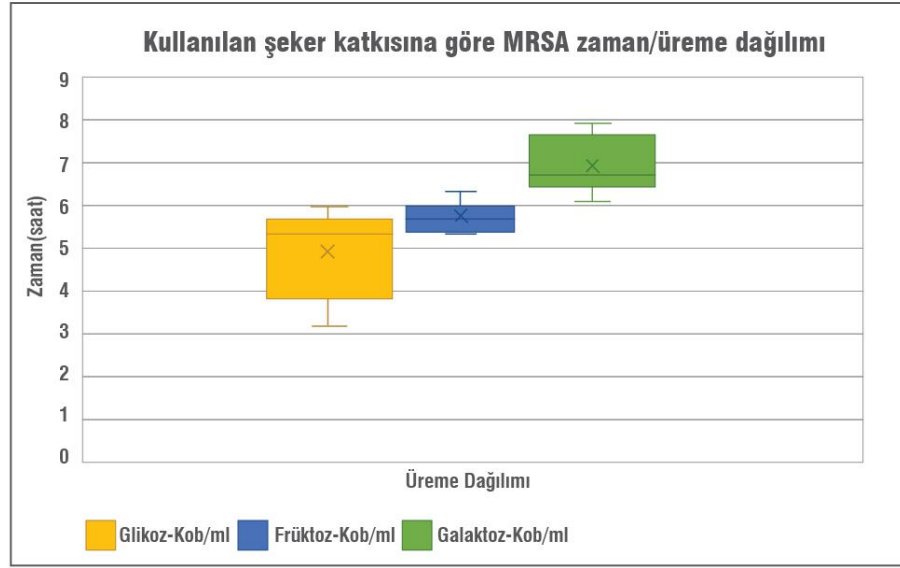
Tablo 23: MRSA zaman ve üreme sonuçları

Kullanılan şeker	Eklenen şeker yüzdesi	Ekim sonuçları log ₁₀ kob/mL			
		Bulaştırma düzeyi	2. saat	4. saat	6. saat
Glikoz	1%	2,903	5,361	5,361	7,602
	1%	2,903	5,278	5,447	7,602
	2%	2,903	5,954	6,301	7,903
	2%	2,903	5,602	6,301	7,903
	3%	2,903	5,361	6,301	7,903
	3%	2,903	5,278	6,301	7,778
Fruktoz	1%	2,903	3,146	5,301	6,698
	1%	2,903	3,146	5,301	6,602
	2%	2,903	3,973	5,698	6,301
	2%	2,903	3,792	5,301	6,176
	3%	2,903	3,778	5,602	6,079
	3%	2,903	3,778	5,602	6,204
Galaktoz	1%	2,903	5,903	5,778	6,477
	1%	2,903	5,778	5,698	6,602
	2%	2,903	5,477	5,602	6,903
	2%	2,903	5,602	5,301	6,778
	3%	2,903	5,079	5,778	6,698
	3%	2,903	5,954	5,845	6,602



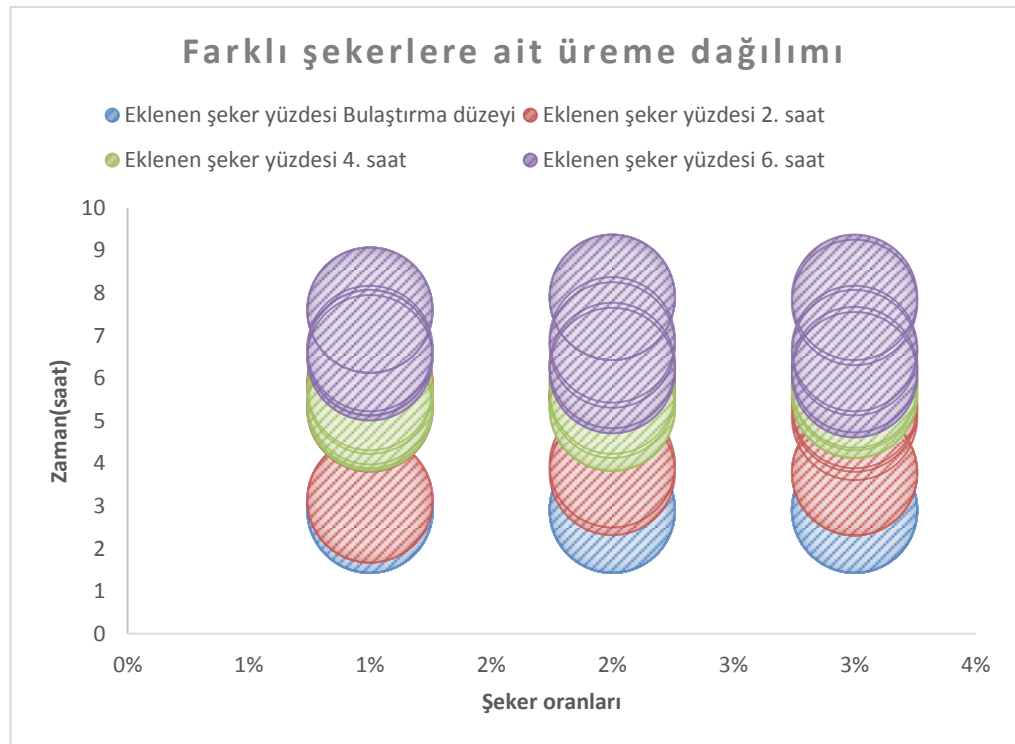
Şekil 19: İnkübasyon sonrası ekimlerin görüntüsü

Ekim sonuçlarında kullanılan şekerlere bağlı zamana bağlı standart sapma hesaplanmış olup buna ait veriler **Şekil 20**'de özetlenmiştir.



Şekil 20: Kullanılan şeker yüzdesine göre standart sapma grafiği

Benzer şekilde farklı şekerlere ait üreme dağılımı özet grafiği **Şekil 21**'de verilmiştir.



Şekil 21: Kullanılan şeker yüzdesine göre üreme grafiği

4.2 Renk İndikatörü Seçimi

BCP indikatörünün zamana bağlı olarak belli yoğunluklardaki bakteri üreme sonuçları **Tablo 24**'te verilmiştir.

Tablo 24: BCP indikatörünün süre ve yoğunluğa bağlı renk değişimleri

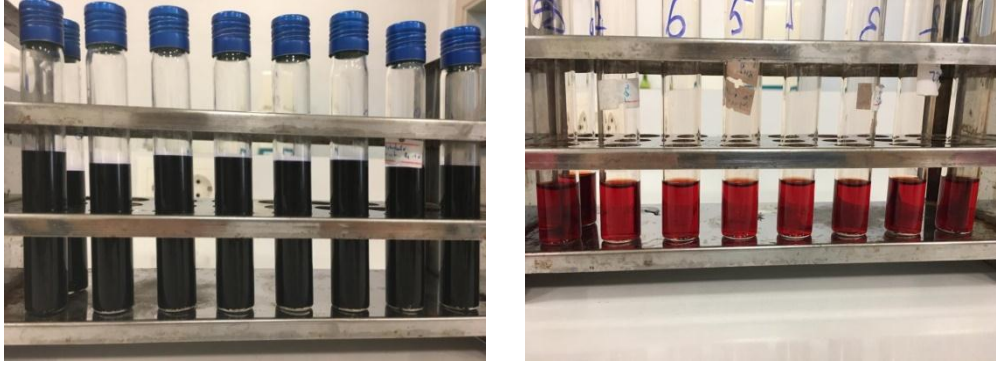
Süre	İndikatör çeşidine bağlı renk değişimi								
	Brom creosol purple								
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
0. Saat	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
2. saat	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
4. saat	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Var
6. saat	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Var	Var	Var	Var
24. saat	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var

Phenol red zamana bağlı olarak belli yoğunluklardaki bakteri üreme sonuçları **Tablo 25**'te verilmiştir.

Tablo 25: Phenol red indikatörünün süre ve yoğunluğa bağlı renk değişimleri

Süre	İndikatör çeşidine bağlı renk değişimi								
	Phenol red								
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
0. Saat	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
2. saat	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
4. saat	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
6. saat	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Var
24. saat	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var

Renk indikatörlerinin inkübasyon işleminden önceki görüntüleri **Şekil 23**'te gösterilmiştir.



Şekil 23: Renk indikatörlerinin başlangıçta renk görünümleri

Renk değişimleri göz önüne alındığında BCP indikatörüyle daha hızlı renk değişimi olduğu gözlemlendi. İnkübasyon işleminden sonra renk indikatörlerindeki değişimler **Şekil 24**'te gösterilmiştir.



Şekil 24: Yirmi dört saatin sonunda renk indikatörlerinin değişimi

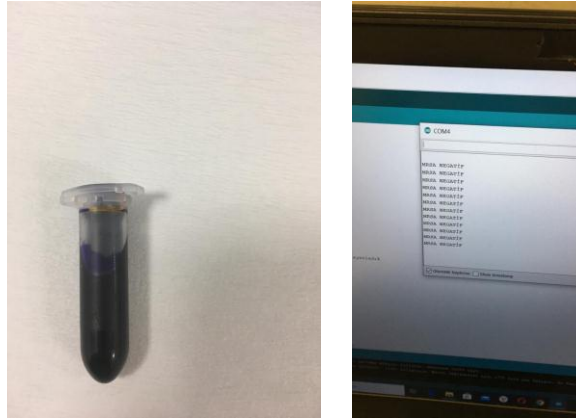
4.3 Spesifite (Özgüllük) Testi Sonuçları

Yapılan spesifite testinde hiçbir bakterinin 24 saat dahil olmak üzere görsel olarak renkte ve donanımın okuyabileceği seviyede değişiklik tetiklemediği gözlemlenmiştir. Buna ait veriler **Tablo 26**'da özetlenmiştir.

Tablo 26: Spesifite test sonuçları

Bakteri adı	İnkübasyon süreleri									
	2. saat		4. saat		6. saat		8. saat		24. saat	
	Renk değişimi	Donanım ölçümü	Renk değişimi	Donanım ölçümü	Renk değişimi	Donanım ölçümü	Renk değişimi	Donanım ölçümü	Renk değişimi	Donanım ölçümü
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19115	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC12453	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC24853.	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA Tespit edilmedi

Spesifite için kullanılan bakterilerin inkübasyon işleminden sonraki görüntüleri ve sistem cevabı **Şekil 25**'te verilmiştir.



Şekil 25: Yirmi dört saatte spesifite için yapılan testte kullanılan *S.epidermidis*'e ait görüntü. (tüm bakterilerde aynı olduğu için temsilen eklenmiştir.)

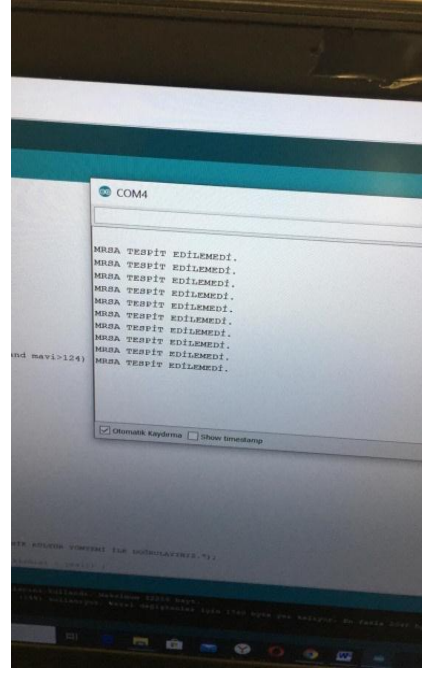
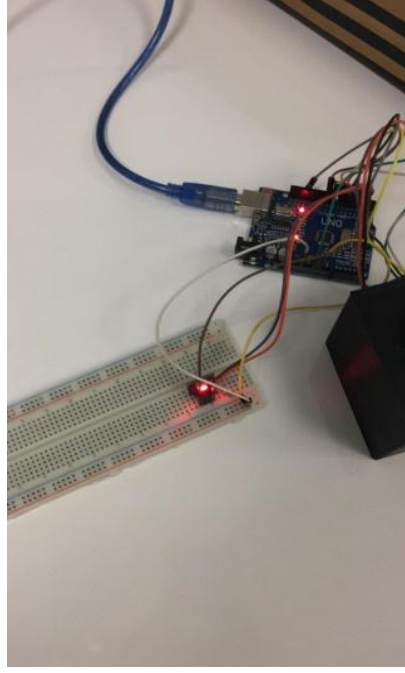
4.4 Verifikasyon İşlemleri

Verifikasyon işlemi sabah 9:00'da başlayıp belli saatlerde sistem optimizasyonu yapıldı. Saatler ve sonuçlar **Tablo 27**'de belirtilmiştir.

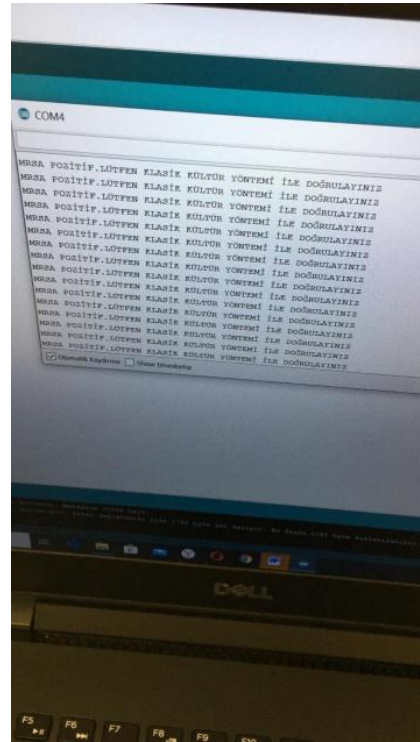
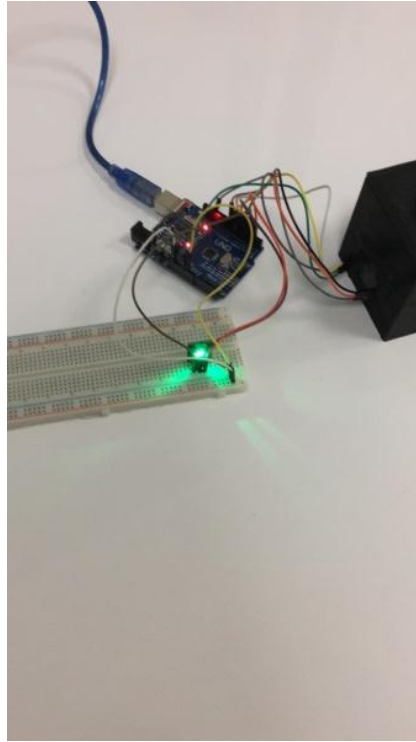
Tablo 27: Verifikasyon işlem sonuçları

	Bulaştırma düzeyi		
Ölçüm saati	Düşük yoğunluk;	Orta yoğunluk;	Yüksek yoğunluk;
09:00	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
11:00	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
13:00	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
15:00	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi	MRSA tespit edildi
17:00	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi	MRSA tespit edildi
19:00	Tespit edilemedi	MRSA tespit edildi	MRSA tespit edildi
21:00	MRSA tespit edildi	MRSA tespit edildi	MRSA tespit edildi
09:00 (24. Saat)	MRSA tespit edildi	MRSA tespit edildi	MRSA tespit edildi

Sistemin RGB renk sensöründe ve seriport ekranında oluşan cevaplar aşağıdaki **Şekil 26** ve **Şekil 27**'de gösterilmiştir.



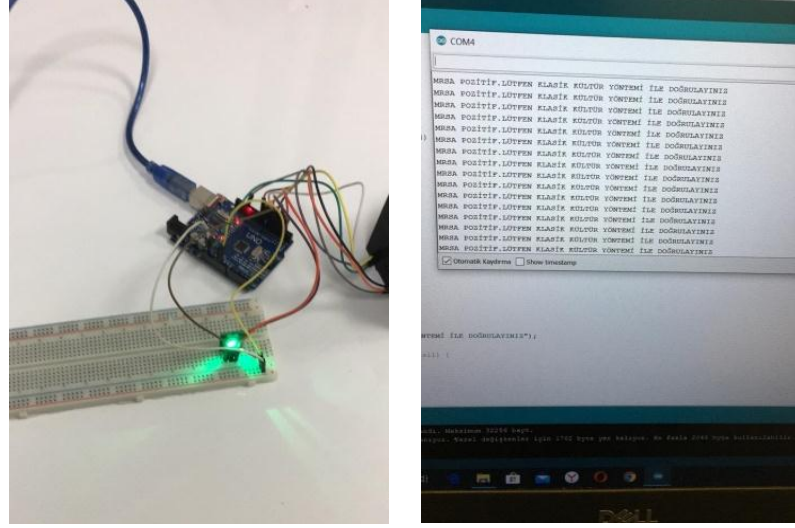
Şekil 26: Sonucu negatif olan süre yoğunluklarda sistem görünümü



Şekil 27: Sonucu pozitif olan süre yoğunluklarında sistem görünümü

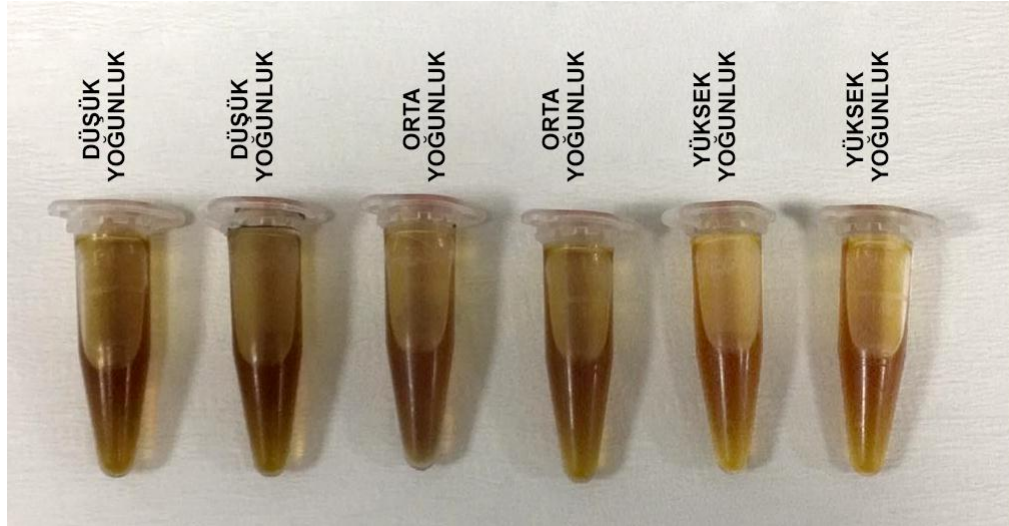
Saat 9:00, 24 saatin sonunda renler tüm yoğunluklarda tamamen dönmüş olup sistem tekrarlandığında tüm yoğunluklar için RGB sensörü yeşil, seriport ekranında

"MRSA POZİTİF. LÜTFEN KLASİK KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE DOĞRULAYINIZ." uyarısı çıkmıştır. İnkübasyon işlemi sonunda sistem cevabı **Şekil 28**'de gösterilmiştir.



Şekil 28: Yirmi dört saatin sonunda optik sistemin cevabı

Tüm yoğunluktaki brothlarda MRSA üremesi ile 24 saatin sonunda renkleri sarıya dönmüştür. Brothlarda oluşan renk değişimleri **Şekil 29**'da verilmiştir.



Şekil 29: Brothlarda bakteri üremesine bağlı oluşan renk değişimleri

Brothların başlangıçta ve 24 saatin sonundaki renk değişimi **şekil 30**'da gösterilmiştir.



şekil 30: Brothlarda başlangıç ve inkübasyon işlemi sonunda oluşan renk farkları.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada *S. aureus* özellikle MRSA için hızlı tespitiye yönelik bir sistem kullanılması hedeflenmiştir. Çalışmada farklı şeker katkıları ile oluşturulan besiyerinde MRSA üremesine bağlı pH değişimine cevap veren renk indikatörlerinin optik bir donanım ile okunması hedeflenmiştir.

ISO 6888-1 kapsamında yapılan referans malzeme çalışmalarında 5000 kob/ml içeren sertifikalı referans malzeme ile standart sapmanın 1,76 olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda $\pm 0,193$ sonucu elde edilerek, standartta bildirilen standart sapmanın altında kalınmış ve %95 güven aralığında sonuç sağlanabileceği gösterilmiştir (ISO 6888-1999).

Farklı şeker katkılarına bağlı olarak elde edilen paralel ekim sonuçları değerlendirildiğinde altıncı saat itibarıyla 6,079-7,903 \log_{10} kob/mL seviyesinde bir üremenin yakalanabildiği gözlemlenmiştir. Zamana bağlı üreme eğrisinin 6 saat içerisinde belirgin şekilde yüksek olduğu ve istatistiksel olarak ($p < 0.05$) arttığı belirlenmiştir. Bu kapsamda zamana bağlı artışın olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada (Strasters ve Winkler 1963) *Staphylococcus* türlerinin pentoz şekerlerin tamamından enerji dönüşümü yapabildiği gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada (Grosser ve diğ. 2016) *Staphylococcus* türlerinin şeker alımı konusunda benzersiz bir transport sistemleri olduğunu ve şekerlerden maksimum faydalandıkları bildirilmiştir. Bu da çalışmamızda tüm şekerlerden benzer cevabı almamızı açıklamaktadır.

Çalışmamızda, renk değişimleri göz önüne alındığında Brom Creosol Purple (BCP) indikatörüyle daha hızlı renk değişimi olduğu gözlemlendi. BCP pH göstergesi olarak kullanılır. BCP'de PH 5,2'nin altına düştüğü zaman sarı renge dönmektedir. BCP içerisinde pH 6,8'in üzerinde olduğunda mor renk görünümündedir. Bir başka renk indikatörü olarak kullanılan phenol red ise pH 6,6'nın altında sarı, pH 8'in üstünde olursa kırmızı renk görünümündedir. Başka bir çalışmada indikatörler arasında farklılık olmadığı bildirilmiştir (Chesney

1922). Bizim çalışmamız ile aradaki muhtemel farkın kullanılan şeker ekleri, kullanılan bakterinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Verifikasyon işlemi sabah 9:00'da başlayıp belli saatlerde sistem optimizasyonu yapıldı. İlk pozitif cevabın saat 15:00 ölçümünde yani bulaştırmanın altıncı saatinde yüksek konsantrasyonda alındığı gözlemlenmiştir. Hastaların çevreleri ve ellerinden sayım yapılan bir çalışmada hastanın temas yüzeyleri ve ellerinde bulaşmanın 0-6 log arasında değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir. Bu kapsamda özellikle el örneklerinde $6 \log_{10}\text{kob}/\text{cm}^2$ seviyesinde bulaşma olduğu gözlemlenmiştir. Bu kapsamda 6. saat itibarıyla alınan yüksek bulaşma cevabının hızlı yanıt olarak yeterli olabileceği düşünülmüştür (Kamiya ve diğ. 2007).

Tespit sistemimizde hassasiyete bakıldığında sistemimizin $2 \log_{10}\text{kob}/\text{mL}$ seviyesinde en geç 8 saat içerisinde cevap verdiğini gözlemlemekteyiz. Bu kapsamda klasik kültür tekniklerine ait tespit süreleri ve tespit sınırları ISO 6888-1 içerisinde 4 gün içerisinde sonuç verildiği ve $3,27 \log_{10}\text{kob}/\text{mL}$ seviyesi için bu sonucu elde ettikleri bildirilmiştir. Kültür tekniği ile yapılan diğer çalışmalarda da disk difüzyon testlerinde duyarlılık 48 saatin sonunda daha güvenilir. Disk yapısına bağlı olarak sefoksitin diski en iyi hassasiyeti vermiştir. Kültür yönteminde olan mikrodilasyon yönteminde sadece 24 saatte sonuç okunmaktadır (Beceiro ve diğ. 2005). Yapılan başka çalışmada oksasisin disk yöntemi ve oksasilin agar tarama yöntemleri MRSA tespitinde kullanılmıştır. İki yöntemdede 24 saat inkübasyon süresi gerekmektedir. Yirmi dört saatin sonunda oksasilin disk difüzyon yönteminin duyarlılığı %83,5 iken agar tarama yönteminin duyarlılığı %91,7 olarak test edilmiştir (Bille ve diğ. 1999). ISO ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan bir *S. aureus* için pozitif toplam 91 kan kültüründen 51 tanesi MRSA, 40 tanesi MSSA örneği olmak üzere PBP-LA testi ne uygulanmış olup duyarlılık, özgüllük değerleri sırasıyla %94,1, %97,5 olarak test edilmiştir (Gold ve diğ. 2010). Tarafımızdan yapılan testte kullanılan şeker eklemelerinin ve renk indikatörünün kullanılmasının etkili olduğu düşünülmüştür. Aynı zamanda, cihazımızda kullanılan donanımın renk hassasiyetinin yüksek olmasının da katkısı olduğu kanaati oluşmuştur. MRSA tespitinde klasik kültür yöntemleri **Tablo 28**'de parametreleriyle beraber verilmiştir.

Tablo 28: Metisilin direncini belirlemede farklı klasik kültür yöntemlerinin parametreleri (Beceiro ve diğ. 2005).

Yöntem	Süre	Yanlış negatifler	Yanlış pozitifler	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	NPV	PPV
Oksasilin disk	24 saat	3	0	94,1	100	94,4	100
Oksasilin disk	48 saat	1	1	98,0	98,0	98,0	98,0
Sefazolin disk	24 saat	7	0	86,2	100	87,9	100
Sefazolin disk	48 saat	6	0	88,2	100	89,4	100
Cefoxitin disk	24 saat	0	1	100	98,0	100	100
Cefoxitin disk	48 saat	0	1	100	98,0	100	98,0
Sefotaksim disk	24 saat	3	1	94,1	98,0	94,3	97,9
Sefotaksim disk	48 saat	2	1	96,0	98,0	96,1	98,0
Imipenem disk	24 saat	7	0	86,2	100	87,9	100
Imipenem disk	48 saat	7	0	86,2	100	87,9	100
Etest oksasilin	24 saat	3	0	94,1	100	94,4	100
Etest oksasilin	48 saat	1	0	98,0	100	98,0	100
Oksasilin mikrodilüsyon	24 saat	3	0	94,1	100	94,4	100

Tespit sisteminde optik donanım kullanılmıştır. Yapılan çalışmada ELISA testi minimum 16 saat inkübasyon süresi gerektirdiği bildirilmiştir. Uzun süre test eden ELISA sistemi yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip oldu gözlemlenmiştir. ELISA testi için örnek alımı teknisyen yaptığı için bu testte yanlış sonuçların bir kısmı teknisyen hatasından oluşmaktadır (Audurier ve diğ. 1989). ELISA testinin birçok aşamadan oluştuğu ve aşamalarda teknisyenin yüksek dikkatli çalışması gerektiği bildirilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan sistem tamamen MRSA tarafından eklenen şeker katkılarının kullanımına bağlı olarak meydana gelen pH değişiminin tetiklediği indikatörde renk değişimidir. ELISA'nın maliyetinin de yüksek olduğu bildirilmiştir (Blay ve diğ. 2004, Eberhart ve diğ. 1994).

Çalışmamızda kullanılan sistem tamamen MRSA tarafından eklenen şeker katkılarının kullanımına bağlı olarak meydana gelen pH değişiminin tetiklediği indikatörde renk değişimi olduğundan dolayı PCR gibi hassas bir yöntem öncesi tarama testi şeklinde çalışması hedeflenmiştir. Bu kapsamda PCR ile yapılan çalışmalara bakıldığında hassasiyetin çok yüksek olduğu ancak maliyetin yüksek olduğu, ek bir donanım gerektirdiği ve ayrı analiz protokolleri gerektirdiği bilinmektedir. PCR analizinde aynı zamanda inhibitörlerinde sonucu etkilediği gösterilmiştir (Ellerbroek ve diğ. 2012, Bonnet ve diğ. 1997, Braid ve diğ. 2003).

Polimeraz zincir reaksiyonu enzimatik bir reaksiyon olduğu için inhibitör maddelere karşı duyarlıdır. PCR inhibitörleri, test aşamalarında farklı mekanizmalarla etki gösteren maddelerdir. PCR inhibitörleri sıvı veya katı formda bulunabilen organik veya inorganik maddelerdir. Bunlar miyogloblin, hemogloblin, immünogloblin (IgG), kollajen, proteinler, laktoferrin ve proteinazlar organik inhibitörlerdir. Safra tuzları, üre, etanol, fenol humik asitler, tanik, melanin ise inorganik inhibitörlerdir. PCR testinin sonuçlarında negatif etkide bulunabilirler. Aynı zamanda duyarlılığını da olumsuz etkileyebilmektedir (Kim ve diğ. 1992, Axelsson ve diğ. 2004).

Yapılan bir araştırmada PCR testi ile MRSA tespitinin 4 saatten daha kısa sürede test edildiği ve hassasiyetinin yüksek olduğunu bildirmiştir (Baby ve diğ. 2017). Real-time PCR testleri MRSA'yı geleneksel kültür yöntemlerinden daha hızlı tespit ettiği gözlemlenmiştir. Saf kolonilerde MRSA tespiti için PCR'in özgüllüğü %100 olarak görülmüştür. PCR testleri 10-15 dk arasında sonuç verip hassasiyet ve özgüllük değeri diğer tespit sistemlerinden daha yüksektir (Dunne ve diğ. 2004). Fakat PCR maliyetli olup eğitimli teknisyen gerektirmesi tarama yöntemi olarak kullanılması zordur.

Optik donanımlarla geliştirilen cihazlara bakıldığında tarafımızdan seçilen TCS 3200 ile yapılan analizlerde sonuçların güvenli olduğu ve elde edilen sonuçların uygulamada da doğruluğu gösterilmiştir (Fitriyah ve diğ. 2018).

Yapılan bir çalışmada biyosensör içerisinde bulunan algılama platformunu altın kaplama yapıp *S. aureus* proteaz olan spesifik substrat nonobead yardımıyla kaplanmıştır. Tanısal algılama platformu *S. aureus* proteazlarının proteolitik aktivitesini ölçmeye dayanmaktadır. Bu oluşan enzimatik reaksiyon altın tabakasında renk değişimi meydana getirmektedir. Belli konstrasyonlarda bakteri ile hassasiyet testi yapılmıştır. Bu sensörün 10^5 yoğunluğu için %36, 10^4 için %28, 10^3 için %22 şeklinde sonuçlanması sensörün yeterli hassasiyeti test edilmiştir. Bu çalışmada kalitatif olarak çıplak gözle ve kantitatif olarak görüntüleme yazılımı olarak test edilmektedir (Alhogail ve diğ. 2017). Bizim çalışmamızda kalitatif olarak renk intikatörünün renk değişimi, kalitatif olarak RGB renk sensörü renk değişimi ve yazılım ile uyarı sistemlerinden oluşmaktadır. Bir başka çalışmada IgG'nin Fc bölgesi ile *S. aureus* arasında spesifik etkileşime dayalı elektromilüminesan (ECL) biyosensörü geliştirilmiştir. Bu biyosensörde 10^3 için %2,5, 10^5 için %2,6 ve 10^9 için %5,9 değerlerinde olup özgüllüğü test edilmiştir (Fu ve diğ. 2016).

Çalışmamızdaki optik sistem ile esas ölçülen pH değişimidir. Brothlar içerisinde değişen pH ortamda renk değişimi yarattığı gibi serbest iyon sayısında da değişim yaratır. Sistemde alternatif olarak, serbest iyon değişimi de ölçülebilir ki bunun da ortamdaki akımı değiştirdiği bilinmektedir. Bu akım değişimi esas alınarak amperometrik hızlı tespit sistemleri kullanılabilir. Bu şekilde akım değişimine bakılıp bakteri varlığı test edilebilir. Brothlar içerisinde oluşan serbest iyonlar ve pH değişimi ortamın voltajını değiştirir. Bu voltaj değişimi esas alınıp voltmetrik hızlı tespit sistemleriyle de bakterinin varlığı test edilebilir.

Kurduğumuz optik sistem, brothlar içerisinde değişen pH oranına bağlı renk değiştirmesi ve sistemin bu değişimi test etmesi büyük bir avantaj sağlamaktadır. Bu donanım için herhangi bir kimyasal maddeye ve elektrotlara ihtiyaç bulunmamaktadır. Elektrotlarda besiyerleriyle etkileşim oluştuğunda kullanım ömürleri kısa olmaktadır. Diğer bir avantajı taşınabilir yani ergonomik olmasıdır. Güç devresi içerisinde olacak şekilde ebatların 6x13 cm olacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

S. aureus, hastane ortamında gelişen ve yapılarında bulunan virülans faktörleri nedeniyle patojen etki yaratırlar. Zaman içerisinde *S. aureus* enfeksiyonlara karşı antibiyotikler kullanılmıştır. *S. aureus* kullanılan antibiyotiklere karşı hızlı şekilde direnç mekanizması geliştirebilmektedir. MRSA çoklu antibiyotik direnci olup hastane enfeksiyonunun en önemli etkenlerindedir. Bu etkenin tespiti enfeksiyon kontrolünde önemli bir basamaktır.

Bu çalışmada, MRSA tespitinde süre gelen teşhis yöntemlerinin dezavantajlarını aza indirgicek şekilde hızlı tespit sistemi tasarlanmıştır. Çalışmanın sonucunda da görüldüğü gibi sistemimiz kısa sürede sonuç verebilmektedir. MRSA üremesi için belli şekerlerden farklı yüzdelerde denenmiş olup bütün şekerlerde ürediği gözlemlenmiştir. Bütün şekerlerden eşit miktarda alınıp MRSA için uygun besiyeri hazırlanmıştır. Bu üreme sonucunu gözlemlemek için TCS 3200 sensörünün algılayabileceği bir renk değişimi oluşturulmak istenmiştir. Bunun için iki tane renk indikatörü için dilüsyon yapıp bakteri üremesi gözlemlendikten sonra indikatör olarak Brom Creosol Purple tercih edilmiştir. İndikatör ve eşit miktarda şeker yüzdeleri ile hazırlanan brothlar içerisine belli yoğunluklarda MRSA eklenmiştir. Altı saatin sonunda yüksek yoğunluğun pozitif olduğu gözlemlenmiştir.

Halihazırda yapılan enfeksiyon kontrol stratejileri daha çok klasik kültür tekniği uygulanarak yürütülmektedir. Bu süre olarak müdahalede gecikmeleri tetikleyebileceği gibi hayatta kalım üzerine de doğrudan etkilidir.

Çalışmamızda bulunan sistemin MRSA tespitinde PCR tekniğinden önce tarama sistemi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu sistemin MRSA enfeksiyon kontrolünde önemli bir adım olacağı kanaatindeyiz.

Hastanelerde kullanılmasını öngördüğümüz optik sistem, enfeksiyon yayılımını takip edebilmek için kullanılmasını öngörmekteyiz. Hastanelerde özellikle enfeksiyonun gözlemlenebildiği yataklı servis ve yoğun bakımlarda hastalara hemşire veya hasta bakıcı tarafından kullanılmasını uygun görmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

Ahmad, N.S., Arifin, K.T., Futra, D., Hassan, N.I., Heng, L.Y., Itnin, A., Leong, T.T., Mansor, N.N.N., Nasuruddin, D.N., Safitri, E., Zaini, I.Z., “An Amperometric Biosensor for the Determination of Bacterial Sepsis Biomarker, Secretary Phospholipase Group 2-IIA Using a Tri-Enzyme System”, *sensors*, 18(3), 686, (2018).

Aktüre, A., Ataşalan, A., Incili, G.Ş., Koluman, A., “Validation and verification of LAMP, ISO, and VIDAS UP methods for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in different food matrices”, *Journal of Microbiological Methods*, 165, (2019).

Al-Abdli, N.E., Baiu, S.H., “Inducible Clindamycin Resistance in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*”, *American Journal of Infectious Diseases and Microbiology*, 4, 25-27, (2016).

Alfa, M.J., Godfrey, K.M.H., Kanchna, M., Lagace, W., Philippe, R. S., “Reductions in Workload and Reporting Time by Use of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Screening with MRSA Select Medium Compared to Mannitol-Salt Medium Supplemented with Oxacillin”, *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 1174–1177, (2008).

Alhogail, S., Suaifan, G.A.R.Y., Zourob, M., “Rapid and low-cost biosensor for the detection of *Staphylococcus aureus*”, *Biosensors & Bioelectronics*, 90, 230-237, (2017).

Allen, S.D., Koneman, E.W., Schereckenberger, P.C., William, M.J., Winn, W.C., “Gram-positive cocci, Part I: *Staphylococci* and related gram-positive cocci”, (ed: Winn, W.C), *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 623–671, (2006).

Almodovar, E., Hussain Qadri, S.M., Imambaccus, H., Ueno, Y., “Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Crystal MRSA ID System”, *Journal Of Clinical Microbiology*, 32, 1830-1832, (1994).

Alocilja, E.C., Wang, Y., “Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens”, *J Biol Eng*, 2:9-16, (2015).

Anonim, The European Standard EN ISO 6888-1 (has the status of a British Standard), (1999).

Appelbaum, P.C., "MRSA-the tip of the iceberg", *Clin Microbiol Infect*, 12, 3-10,(2006).

Asundi, A., John, M.S., Kishen, A., Sing, L.C., "Determination of bacterial activity by use of an evanescent-wave fiber-optic sensor", *Applied Optics*, 41(34), 7334-7338, (2002).

Atanasov, P., Hamid, I.A., Ivniński, D., Stricker, S., Wilkins, E., "Application of Electrochemical Biosensors for Detection of Food Pathogenic Bacteria.", *Electroanalysis*, 12, 317-325, (2000).

Audurier, A., Boutonnier, A., Bouvet, A., Fournier, J.M., Lebrun, L., Mazie, J.C., Nato, F., "Direct testing of blood culture for detection of the serotype 5 and 8 capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*", *Journal of Clinical Microbiology*, 27(5), 989-993, (1989).

Axelsson, C.E., Löfström, C., Knutsson, R., Rådström, P., "Rapid and Specific Detection of Salmonella spp. in Animal Feed Samples by PCR after Culture Enrichment", *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 69-75, (2004).

AZIZ, M., Ibrahim, Z., Sahrani, F.K., Yahya, A., "Electrochemical Impedance Spectroscopy and Surface Studies of Steel Corrosion by Sulphate-Reducing Bacteria", *Sains Malaysiana*, 38(3), 359-364, (2009).

Baby, N., Faust, A.C., Goodman, E.L., Knoll, L., Sheperd, L.A., Smith, T., "Nasal MRSA PCR Testing Reduces Duration of MRSA-Targeted Therapy in Patients with Suspected MRSA Pneumonia", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), 1-7, (2017).

Bakker, E., "Electrochemical sensors.", *Analytical Chemistry*, 76, 3285-3298, (2004).

Banerjee, S., Culver, D.H., Gaynes, R.P., Henderson, T.S., Martone, W.J., Panlilio, A.L., Tolson, J.S., "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals", *Infect. Control Hosp. Epidemiol*, 13,582-586,(1992).

Bannerman, T.L., "*Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase positive cocci that grow aerobically", (eds: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A., Tenover, R.H.), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed., Washington: ASM, 384-404, (2003).

Beceiro, A., Bou, G., Cartelle, M., Molina, F., Moure, R., Perez, A., Tomas, M.D.M., Velasco, D., Villanueva, R., "Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(3), 379-382, (2005).

Becker, K., Von Eiff, C., “*Staphylococcus*, Micrococcus and other catalase-positive cocci”, (eds: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW), *Manual of Clinical Microbiology*, Washington DC: ASM Press, 308-330, (2011).

Berggren, C., Bjarnason, B., Johansson, G., “Capacitive Biosensors.”, *Electroanalysis*, 13(3), 173-180, (2001).

Bhagwat, A.A., ‘Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR’, *International Journal of Food Microbiology*, 84, 217–224,(2003).

Bille, J., Blanc, D.S., Cavassini, M., Jaton, K., Wenger, A., “Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*”, *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5), 1591- 1594, (1999).

Blay, G.L., Fliss, I., Lacroix, C., “Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cells with ELISA, radioactivity and plate count methods”, *Journal of Microbiological Methods*, 59(2), 211-221, (2004).

Blok, H.E., Kamp-Hopmans, T.E., Troelstra, A., “Role of healthcare workers in outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 10-year evaluation from a Dutch university hospital”, *Infect. Control. Hosp. Epidemiol*, 24, 679, (2003).

Blumberg, H.M., Halvosa, J.S., Hidron, A.I., Kourbatova, E.V., McDougal, L.K., Terrell, B.J., Tenover, F.C., “Risk Factors for Colonization with Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Patients Admitted to an Urban Hospital: Emergence of Community-Associated MRSA Nasal Carriage”, *Major Article*, 41, 159-166, (2005).

Bonnet, J., Bonnemaïson, D., Cabrita, J., Mégraud, F., Monteiro, L., Petry, K., Vekris, A., Vidal, R., “Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model”, *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), 995-998, (1997).

Bonomo, R.A., Rice, L.B., Sahn, D., “Mechanism of resistance to antimicrobial agents”, (eds: Murray, P.R., Baron ,E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A., Tenover, R.H.), *Manual of Clinical Microbiology 8th Ed.*, Washington: ASM Press, 1074-1101, (2001).

Bonomo, R.A., Chen, L., Endimiani, A., Kreiswirth, B.N., Mediavilla, J.R., Rosenthal, M.E., Zhao, Y., “Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (bla KPC) variants ”, *J Clin Microbiol*, 49; 479-585, (2011).

Bottone, E.J., Guinto, C.H., Raffalli, J.T., “Evaluation of dedicated stethoscopes as a potential source of nosocomial pathogens”, *Am. J. Infect. Control*, 30, 499-502, (2002).

Boyce, J.M., Potter-Bynoe, G., Chenevert, C., King, T., “Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Possible infection control implications”, *Infect. Control. Hosp. Epidemiol*, 18, 622-627, (1997).

Braid, M.D., Daniels, L.M., Kitts, C.L., “Removal of PCR Inhibitors From Soil DNA by Chemical Flocculation”, *Journal of Microbiological Methods*, 52(3), 389-393, (2003).

Brandão, M., Cardoso, T., Ribeiro, O., Sousa, C., “Community-Acquired Severe Sepsis: A Prospective Cohort Study”, *Open Journal of Internal Medicine*, 5, 37-49, (2011).

Braveny, I., Milatovic, D., Rosdahl, V.T., Voss, A., Wallrauch-Schwarz, C., “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect*, 13, 50–55, (1994).

Brettle, J., Cullen, D.C., Lowe, C.R., Maynard, P., Sethi, R.S., Watson, L.D., “A microelectronic conductimetric biosensor.”, *Biosensors*, 3(2), 101-115, (1988).

Breyer, S., Graninger, W., Prester, E., Schuameis, E., Vukovich, T., Wenisch, C., “Management of Serious *Staphylococcal* Infections in the Outpatient Setting”, *Adis International Limited*, 6, 21-28, (1997).

Bronner, S., Monteil, H., Prévost, G., “Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: Complexity and applications”, *FEMS Microbiol Rev*, 28, 183-200, (2004).

Brooks, G.F., Butel, J.S., Carroll, K.C., Morse, S.A., “The *Staphylococci*”, (eds: *Jawetz, Melnick and Adelberg'*), Sultan Qaboos Üniversitesi Med J, New York: McGraw-Hill, 273–275, (2007).

Buck, R.P., Inzelt, G., Kutner, W., Lindner, E., “Piezoelectric chemical sensors.”, *Pure and Applied Chemistry*, 76(6), 1139–1160, (2004).

Buescher, G., Jungkind, D., Lewis, N., Liu, H., Snyder, S., “Detection of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* and differentiation from methicillin-resistant strains”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.*, 9, 717–724, (1990).

Buttry, D.A., Ward, M.D., “In situ interfacial mass detection with piezoelectric transducers.”, *Science*, 249(4972), 1000-1007, (1990).

Cadena, J., Frei, C.R., Thinwa, J., Walter, E.A., “Risk factors for the development of active methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in patients

colonized with MRSA at hospital admission”, *American Journal of Infection Control*, 44, 1617-1621, (2016).

Caliendo, A.M., Nolte, F.S., “Molecular Detection and Identification of Microorganisms”, (eds: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A., Tenover, R.H.), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed., Washington:ASM, 234-256, (2003).

Celik, G., Koluman, A., Unlu, T., “*Salmonella* identification from foods in eight hours: A prototype study with *Salmonella Typhimurium*”, *Iran J Microbiol*, 4(1), 15–24, (2012).

Chastang, C., Chevret, S., Durand-Zaleski, I., Lucet, J.C., Regnier, B., “Prevalence and risk factors of carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to the intensive care unit”, *Arch Intern Med*, 163, 181-188, (2003).

Chesney, A.M., “The Use of Phenol Red and Brom-Cresol Purple as Indicators In The Bacteriological Examination of Stools.”, *Journal of Experimental Medicine*, 35(2), 181-186, (1922).

Chow, B.L., Conly, J.M., Church, D.L., Elsayed, S., Gregson, D.B., Hussain, Z., Louie, T., Sparling, J., Zhang, K., “New quadruplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci”, *J Clin Microbiol*, 42, 4947-4955, (2004).

Chunhua, W., Dongheng, W., Haixia, W., Qian, S., Songtao, B., Yuwen, Z., Zheng, L., “Application of DNA based electrochemical biosensor in rapid detection of *Escherichia coli* exist in licorice decoction”, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 43, 1209-1214, (2018).

Conly, J., Johnston, L., “VISA, hetero-VISA and VRSA: The end of the vancomycin era?”, *Adult Infectious Disease Notes*, 13, 282-284, (2002).

Cookson, B., Peters, B., Webster, M., “Staff carriage of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”, *J. Clin. Microbiol*, 27, 1471–1476, (1989).

Cookson, B.D., Cooper, B.S., Duckworth, G., Ebrahim, S., Kibbler, C.C., Lai, R., Medley, G.F., Roberts, J.A., Stone, S.P., “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: Stealth dynamics and control catastrophes.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(27), 10223-10228, (2004).

Csoregi, E., Frebort, I., Mattiasson, B., Niculescu, M., Nistor, C., Pec, P., “Redox hydrogel-based amperometric bienzyme electrode for fish freshness monitoring”, *Anal. Chem.*, 72, 1591-1597, (2000).

Cui, L., Hiramatsu, K., Kuroda, M., “The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”, *Trends Microbiol*, 9, 486-493, (2001).

Curnock, S.P., Gregory, P.D., Lewis, R.A., “Studies of the repressor (BlaI) of beta-lactamases”, *Trends Microbiol*, 2, 372-380, (1994).

David, M.Z., Daum, R.S., “Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 23, 616-687, (2010).

Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M., “Exotoxins of *Staphylococcus aureus*”, *American Society For Microbiology*, 13, 16-34, (2000).

Dunne, W.M., Eveland, M., Liao, R., Merz, L.R., Warren, D.K., “Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Nasal Swab Specimens by a Real-Time PCR Assay”, *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5578-5581, (2004).

Eberhart, R.J., Hicks, C.R., Sisco, W.M., “Comparison of microbiologic culture, an enzyme-linked immunosorbent assay, and determination of somatic cell count for diagnosing *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows”, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(2), 255-260, (1994).

Ebong, P.E., Eyong, E.U., Igile, G.O., Iwara, I.A., Mboso, O.E., Ogar, I.P., Ujong, U.P., “Anti-Lipidemic Effect of Combined Leaf Extracts of *Moringa oleifera* and *Peristrophe bicalyculata* in Alloxan-Induced Diabetic Rats”, (eds: Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T.), *Robbins Pathologic Basis of Disease. 6th Edition*, W.B. Saunders Company: Philadelphia, (1999).

Edmond, M.B., Wenzel, R.P., “Infect control.In” (eds:Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4, New York: Churchill Livingstone Inc., 2572-75, (1995).

Ellerbroek, L., Johne, R., Schielke, A., Schrader, C., “PCR inhibitors – occurrence, properties and removal”, *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026, (2012).

Elsayed, S., McClure, J.A., Zhang, K., “Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of *staphylococcal* cassette chromosome mec types I to V in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*”, *J Clin Microbiol*, 43, 5026-5033, (2005).

Ericson Sollid, J.U., Hanssen, A.M., “SCCmec in *staphylococci*: genes on the move”, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 46, 8-20, (2006).

Fein, J.B., Jensen, M.P., Lewis, D.G., “Enthalpies and entropies of proton and cadmium adsorption onto *Bacillus subtilis* bacterial cells from calorimetric measurements”, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 4862–4873, (2006).

Fitriyah, L.A., Indahwati, E., Wardana, H.K., “Measurement of Non-Invasive Blood Glucose Level Based Sensor Color TCS3200 and Arduino”, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 336(1), 1-6, (2018).

Franklin, D., Lowy, M.D., “*Staphylococcus aureus* infections”, *The New England Journal Of Medicina*, 339, 2025-2027, (1998).

Fridkin, S.K., Welbel, S.F., Weisten, R.A., “Magnitude and prevention of nosocomial infection in Intensive Care Unit”, *Infect Dis Clin North Am*, 11, 479-496, (1997).

Fu, Z., Wang, P., Wang, X., Wang, Z., Wang, L., Yue, H., Zhou, Y., *Talanta*, Çin: Elsevier, 153, 401-406, (2016).

Galla, H.J., Janshoff, A., Steinem, C., “Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors?”, *Angewandte Chemie International Edition*, 39(22), 4004-4032, (2000).

Gehring, A.G., Patterson, D.L., Tu, S.I., “Use of a Light-Addressable Potentiometric Sensor for the Detection of *Escherichia coli* O157:H7”, *Analytical Biochemistry*, 258, 293–298, (1998).

Gold, H.S., Kirby, J.E., Qian, Q., Venkataraman, L., Yamazumi, T., “Direct Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* in Blood Culture Broth by Use of a Penicillin Binding Protein 2a Latex Agglutination Test”, *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1420-1421, (2010).

Grosser, M.R., Khatri, D., Lance, T.R., Richardson, A.R., Vitko, N.P., “Expanded Glucose Import Capability Affords *Staphylococcus aureus* Optimized Glycolytic Flux during Infection.”, *mBio*, 7(3), 1-10, (2016).

Hiramatsu, K., Ito, T., Katayama, Y., “Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical *Staphylococcal* Strains: Role of IS431-Mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA*-Carrying, Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus haemolyticus*”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 1955-1963, (2001).

Hiramatsu, K., Ito, T., Katayama, Y., “Staphylococcal cassette chromosome *mec*, a new class of genetic elements, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*”, *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 1549-1555, (2000).

Hiramatsu, K., Hori S., Kapi M., Ma X.X., Okuma, K., Yamamoto M., “New trends in *Staphylococcus aureus* infections: glycopeptide resistance in hospital and methicillin resistance in the community”, *Current Opinion in Infectious Diseases*, 15,407-413, (2002).

Hiramatsu, K., Ito T., Katayama, Y., “A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*”, *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 1549-1555, (2000).

Hiramatsu, K., Katayama, Y., Yuzawa, H., “Molecular genetics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*”, *Int J Med Microbiol*, 292, 67-74, (2002).

Hiramatsu, K., Kihara, H., Yokota, T., “Analysis of border line resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction”, *Microbiol. Immunol*, 36, 445–453, (1992).

Hogan, P., Sahm, D.F., Sheehan, D.J., Styers, D., “Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States”, *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 5, 134-142, (2006).

Horan, T.C., Jarvis. W.R., Mangram, A.J., Pearson, M.L., Silver, L.C., “Guideline for Prevention of Surgical Site Infection”, *American Journal of Infection Control*, 27(2), 97-134, (1999).

Hua, T.C., Sun, D.W., Wang, F.F., Xiao, J.J., Zheng, Y.H., “Detection of dichlorvos residue by flow injection calorimetric biosensor based on immobilized chicken liver esterase.”, *Journal of Food Engineering*, 74(1), 24-29, (2006).

İzgül, K., RGB LED Nedir? Arduino İle Kontrolü Nasıl Yapılır?, (11 Eylül 2015), <https://maker.robotistan.com/rgb-led-nedir-arduino-kontrolu/>, (2015).

Kamiya, A., Oie, S. Sawa, A. Suenaga, S., “Association between isolation sites of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients with MRSA-positive body sites and MRSA contamination in the surrounding environmental surfaces.”, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 60(6), 367-369, (2007).

Kim, H., Pernille, N., Rasmussen, O.F., Rossen, L., “Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions”, *International Journal of Food Microbiology*, 17(1), 37-45, (1992).

Kluytmans, J.A.J.W., Wertheim, H.F.L., “Nasal carriage of *S. aureus* and prevention of nosocomial infections”, *Infection*, 33, 3-8, (2005).

Koluman, A., Özdemir, H., “Piliç Karkaslarına Ait Boyun Derilerinde Termofilik *Campylobacter* Türlerinin Varlığı Ve C. Jejuni'nin PCR Tekniği İle Saptanması”, Doktora, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara,(2006).

Kopuz, A., TCS3200 ve Arduino ile Renk Algılama Uygulaması, (16 Ekim 2018), <https://maker.robotistan.com/tcs3200-ile-renk-algilama-uygulamasi/>, (2018).

Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., “Whole genome sequencing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*”, *Lancet*, 292, 67-74, (2001).

Liao, W., McNutt, M.A., Zhu, W.,” The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells”, *Methods*, 48 , 46–53,(2009).

Liley, M.,’ Optical transducers’, (eds: Gizeli, E. Lowe, C.R.), *Biomolecular Sensors*, 6, London, UK: Taylor & Francis Group, 317-331, (1998).

Lois, M., Schmidt, D.A., “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement”, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 30, 15-32, (2009).

Mahon, C.R., *Textbook of Diagnostic Microbiology, 3 th ed*, : USA:Saunders, 319-362, (2007).

Mascini, M., Rogers, K.R., “Biosensors for field analytical monitoring.”, *Field Analytical Chemistry & Technology*, 2(6), 317-331, (1998).

Olaimat, A.N., Oh, D.H., Rubab, M., Shahbaz, H.M., “Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food”, *Biosensors and Bioelectronics*, 105, 49-57, (2018).

Semiz, T.Y., Arduino Uno Nedir? Özellikleri ve Projeleri, (8 Mayıs 2018), <https://maker.robotistan.com/arduino-uno/>, (2018).

Stefani, S., “Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods”, *Int. J. Antimicrob*, 39, 273-282, (2012).

Strasters, K.C., Winkler, K.C., “Carbohydrate Metabolism of *Staphylococcus aureus*”, *J. gen. Microbiol.*, 33, 213-229, (1963).

Ünal, S., “Stafilokoklarda Metisilin ve Enterokoklarda Vankomisin Direncinin Belirlenmesi”, *Ankem*, 21, 166-170, (2007).

Vincent, J.L., “Nosocomial infections in adult intensive care unit”, *The Lancet*, 361, 2068-2077, (2003).

Waldvogel, F.A., “*Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock)” (eds: Gerald Mandell, John Bennett, Raphael Dolin), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, New York: Churchill Livingstone Inc., (2000).

Weems J.J., “The Many Faces of *Staphylococcus aureus* Infection: Recognizing and Managing Its Life-threatening Manifestations”, *Postgraduate Medicine*, 110,24–36, (2001).

EKLER

8. EKLER

```
#define s0 5 //arduino'nun 5 nolu pine TCS3200 sensörünün S0 bacağı tanımlandı.
#define s1 6 //arduino'nun 6 nolu pine TCS3200 sensörünün S1 bacağı tanımlandı.
#define s2 7 //arduino'nun 7 nolu pine TCS3200 sensörünün S2 bacağı tanımlandı.
#define s3 8 //arduino'nun 8 nolu pine TCS3200 sensörünün S3 bacağı tanımlandı.
#define cikis 9 //arduino'nun 9 nolu pini TCS3200 sensörünün cikisi olarak tanımlandı.
#define sled 2 //arduino'nun 2 nolu pini RGB ledinin yeşil bacağına tanımlandı.
#define mled 3 //arduino'nun 3 nolu pini RGB ledinin kırmızı bacağına tanımlandı.
int kirmizi, yesil = 0; // kirmizi ve yeşil sayı olarak ve 0 olarak atandı.
void setup() {
  pinMode(s0, OUTPUT); //S0 pini mikrodenetleyicide çıkış olarak ayarlandı.
  pinMode(s1, OUTPUT); //S1 pini mikrodenetleyicide çıkış olarak ayarlandı.
  pinMode(s2, OUTPUT); //S2 pini mikrodenetleyicide çıkış olarak ayarlandı.
  pinMode(s3, OUTPUT); //S3 pini mikrodenetleyicide çıkış olarak ayarlandı.
  pinMode(cikis, INPUT); //cikis pini mikrodenetleyicide giriş olarak ayarlandı.
  pinMode(sled, OUTPUT); //sled pini mikrodenetleyicide çıkış olarak ayarlandı.
  pinMode(mled, OUTPUT); //mled pini mikrodenetleyicide çıkış olarak ayarlandı.
  // Arduino ve TCS3200 sensörü için Frekans değeri ayarlama.

  digitalWrite(s0, HIGH); // S0 pini '1' yapıldı.
  digitalWrite(s1, LOW); // S1 pini '0' yapıldı.
  // Yukarıdaki ayarlama ile TCS3200 sensörünün frekans ölçeği %20 olarak tanımlandı.
  Serial.begin(9600); // Arduino Seri haberleşme frekansı 9600 ayarlandı.
}
void loop() {
  kalibreedilmis(); // Döngüde kalibreedilmis fonksiyonunu çağır.
  renkbelirle(); // Döngüde renkbelirle fonksiyonunu çağır.
}
void kalibreet() {
  // Kırmızı rengi belirleme
  digitalWrite(s2, LOW); // S2 pini '0' yapıldı.
  digitalWrite(s3, LOW); // S3 pini '0' yapıldı.
  kirmizi = pulseIn(cikis, LOW); // cikis pini üzerindeki LOW süresini okur.
  Serial.print("Kırmızı renk: "); //Seri porta "Kırmızı renk:" yazısını yazar.
  Serial.print(kirmizi); // Kırmızı için aldığımız değeri seri porta yazdır.
  Serial.print("\t"); // Seri portta aşağıya satıra atma kodu

  delay(50); // Geçikme (zaman) koyma kodu
  // Yeşil rengi belirleme
  digitalWrite(s2, HIGH); // S2 pini '1' yapıldı.
  digitalWrite(s3, HIGH); // S3 pini '1' yapıldı.
  yesil = pulseIn(cikis, LOW); // cikis pini üzerindeki LOW süresini okur.
  Serial.print("Yeşil renk: "); //Seri porta "Yeşil renk:" yazısını yazar.
  Serial.print(yesil); // yeşil için aldığımız değeri seri porta yazdır.
  Serial.print("\t"); // Seri portta aşağıya satıra atma kodu
  delay(50); // Geçikme (zaman) koyma kodu
```



```

// Mavi rengi belirleme
digitalWrite(s2, LOW); // S2 pini '0' yapıldı.
digitalWrite(s3, HIGH); // S3 pini '1' yapıldı.
mavi = pulseIn(cikis, LOW); // cikis pini üzerindeki LOW süresini okur
Serial.print("Mavi renk: "); //Seri porta "Mavi renk:" yazısını yazar
Serial.print(mavi); // mavi için aldığımız değeri seri porta yazdır
Serial.println("\t"); // Seri portta aşağıya satıra atma kodu.
delay(50); // Geçikme (zaman) koyma kodu
}
void kalibreedilmis() {
digitalWrite(s2, LOW);
digitalWrite(s3, LOW);
kirmizi = pulseIn(cikis, LOW);
kirmizi = map(kirmizi, 48, 180, 0, 100); // map komutu kirmizi değerini 0-100 den 48-180 aralığına dönüştürür.
digitalWrite(s2, HIGH);
digitalWrite(s3, HIGH);
yesil = pulseIn(cikis, LOW);
yesil = map(yesil, 43, 210, 0, 100);
digitalWrite(s2, LOW);
digitalWrite(s3, HIGH);
mavi = pulseIn(cikis, LOW);
mavi = map(mavi, 40, 190, 0, 100);
}
void renkbelirle() {
if(kirmizi>180 )
digitalWrite(sled, LOW);
digitalWrite(mled, HIGH);
delay(2000);
Serial.println("\t");
Serial.print("MRSA TESPİT EDİLEMEDİ!");
}
if (kirmizi<170)
{
digitalWrite(sled, HIGH);
digitalWrite(mled, LOW);
delay(2000);
Serial.println("\t");
Serial.print("MRSA POZİTİF. LÜTFEN KLASİK KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE DOĞRULAYINIZ.");
}
}
}

```

Şekil A: Optik sistem aurdino kod yazılımları

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayfer ÇETİN

Doğum Yeri ve Tarihi : Mardin / 01.01.1996

Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi

Elektronik posta : ayfercetin521@gmail.com

İletişim Adresi : Kınıklı Mah. Bursa Cad. Orkent Sit. No:29
Pamukkale / DENİZLİ

Konferans Listesi :

• Çetin Ayfer, Demirci Kadir, Oral Özge, EGEMEN EMRAH, KOLUMAN AHMET (2018). Epileptik Nöbetlerin EEG dalgaları üzerine etkisi. BIOMATEN 23. Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, 120 (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4587786)

• Oral Özge, Demirci Kadir, Çetin Ayfer, KOLUMAN AHMET (2018). Gıda ve İçme sularında pestisit varlığının tespiti için biyosensör kiti tasarımı. BIOMATEN 23. Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, 119 (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4587762)

• Demirci Kadir, Oral Özge, Çetin Ayfer, Fırat Yavuz, KOLUMAN AHMET (2018). Kişiyeye özgü orbital implant üretiminde 3d printerların kullanımı. BIOMATEN 23. Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, 118 (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4587754)

• Çetin Ayfer, KOLUMAN AHMET, Rapid Alert System For Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, Mardin Artuklu Conference On Scientific Researches, Kongre Özet Kitabı page-173 ,7-8 Ağustos 2020