

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**SIĞIR MASTİTİSLERİNE NEDEN OLAN STAFİLOKOK
TÜRLERİNİN MALDI-TOF MS İLE
İDENTİFİKASYONLARININ YAPILMASI**

**TANSU TANIR
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN**

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17010 nolu proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim DalıProgramı çerçevesinde tarafından
hazırlanan “.....” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek
Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Üye (Tez Danışmanı):
.....

*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
.....

*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
.....

*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
.....

*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
.....

*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince destek ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, ayrıca ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

En sıkıntılı anlarımda bana anlayış gösteren, her zaman destek olan, ne olursa olsun bana sevgi, şefkat ve güler yüz ile yaklaşan aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mastitis	3
2.2. Bulaşıcı ve Çevresel Mastitis	4
2.3. İnfeksiyonun Klinik ve Subklinik Formları	5
2.4. Mastitis İnfeksiyonlarında Tanı	6
2.5. Stafilokok Kaynaklı Mastitis	7
2.6. Stafilok Kaynaklı Mastitislerinin Patogenezi ve Tanısı	7
2.6.1. Katalaz Testi	8
2.6.2. Koagulaz Testi	8
2.6.3. Doğrulayıcı Testler	10
2.6.3.1. Deoksiribonükleaz (DNAz) Testi	10
2.6.3.2. Termostabil Endonükleaz Testi	11
2.6.3.3. Mannitol Fermentasyonu.....	11
2.6.3.4. Diğer Testler	12
2.6.3.5. Slaym Oluşumu	12
2.6.3.5.1. Christensen Yöntemi (Kalitatif Tüp Testi, TT).....	12
2.6.3.5.2. Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Testi (MT)	12
2.6.3.5.3. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi (KKA)	13
2.7. <i>S. epidermidis</i> İdentifikasyonunda Fosfataz Üretimi	13
2.8. <i>S. epidermidis</i> ve <i>S. hominis</i> 'in İdentifikasyonunda Desferrioksamın Duyarlılığı	14
2.9. <i>S. saprophyticus</i> 'un İdentifikasyonu İçin Novobiosin Duyarlılığı	15
2.10. <i>S. saprophyticus</i> ve <i>S. epidermidis</i> İdentifikasyonunda Trehaloz-Mannitol- Fosfataz Agar	15

2.11. <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> ve <i>S. saprophyticus</i> 'un İdentifikasyonunda Florojenik/Kromojenik Metotlar	15
2.11.1. Rapidec Staph	15
2.12. Konvansiyonel İdentifikasyon Prosedürleri	16
2.13. Ticari İdentifikasyon Sistemleri	17
2.13.1. API Staph-Ident	17
2.13.2. API Staph	17
2.13.3. ID32 Staph	17
2.13.4. MicroScan Rapid Pos Combo Paneli	18
2.13.5. Staph-Sistem 18-R	18
2.13.6. VITEK Gram Pozitif İdentifikasyon (GPI) Kartı	18
2.13.7. MALDI-TOF MS Yöntemi	18
2.14. Sanger Sekans Yöntemi	21
2.15. <i>Staphylococcus aureus</i> Kaynaklı Mastitislerin Tedavisi, Koruma ve Kontrol	21
2.16. Koruma ve Kontrol	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Gereç	23
3.1.2. Besiyerleri ve Ayraçlar	23
3.1.2.1. Besiyerleri	23
3.1.2.1.1. Blood Agar (Merck 1. 10886)	23
3.1.2.1.2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA) (Merck 1.05404)	24
3.1.2.1.3. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129)	24
3.1.2.1.4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (% 20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225).....	24
3.1.2.1.5. Trypton Soya Broth (TSB) (% 7,5 Tuzlu) (Oxoid CM 129)	24
3.1.2.1.6. DNase Test Agar (Merck 1.10449)	25
3.1.2.2. Kaliforniya Mastitis Test Ayraç (Immucell®).....	25
3.1.3. Primerler	25
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Örneklerin alınması	25
3.2.2. <i>Staphylococcus</i> sp. İzolasyonu	26
3.2.3. <i>Staphylococcus</i> sp. Bakteriyoskopisi	26
3.2.4. <i>Staphylococcus</i> sp. Konvansiyonel İdentifikasyonu	26
3.2.4.1. Katalaz Testi	27
3.2.4.2. Basitrasin Duyarlılığı	27

3.2.4.3. Koagulaz Testi	27
3.2.4.4. Mannitol Fermentasyonu	27
3.2.4.5. DNAz Testi	28
3.2.5. <i>Staphylococcus</i> sp. API Staph ile İdentifikasyon	28
3.2.6. <i>Staphylococcus</i> sp. VITEK 2 Compact ile İdentifikasyon	29
3.2.7. <i>Staphylococcus</i> sp. VITEK MS (MALDI-TOF MS) ile İdentifikasyon	31
3.2.8. <i>Staphylococcus</i> sp. 16S rRNA ile Genotipik İdentifikasyon ve Sekans Yöntemi	32
3.2.8.1. DNA Ekstraksiyonu	32
3.2.8.2. PCR	33
3.2.8.3. PCR Ürün Purifikasyonu	34
3.2.8.4. Sekans PCR İşlemi	34
3.2.8.5. Sekans PCR Purifikasyon Protokolü	35
3.3. Antibiyogram	36
4. BULGULAR	37
4.1. Konvansiyonel Yöntemler ile <i>Staphylococcus</i> sp. İzolasyon Bulguları	37
4.2. API Staph ile <i>Staphylococcus</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	38
4.3. VITEK 2 Compact ile <i>Staphylococcus</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	40
4.4. VITEK MS (MALDI-TOF MS) ile <i>Staphylococcus</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	41
4.5. <i>Staphylococcus</i> sp. 16S rRNA ile Genotipik İdentifikasyon ve Sekans Bulguları	43
4.6. Antibiyogram Bulguları	47
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CMT	: California Mastitis Testi
KNS	: Koagulaz Negatif Stafilokok
PCR	: Polymerase Chain Reaction
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
MIC	: Minimal Inhibitory Concentration
MALDI-TOF MS	: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-Flight Mass Spectrometry
° C	: Santigrat Derece
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	İzole kültürden identifikasyon yöntemini kullanan MALDI-TOF MS tarafından yapılan bakteri ve maya saptanmasının genel şeması	19
Şekil 2.	İyonize edilmiş mikrobiyolojik izolatların ve klinik numunenin MS analizinin genel şeması.....	20
Şekil 3.	Sanger sekans yöntemi.....	21
Şekil 4.	VITEK MS Slaytı	32

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	<i>Staphylococcus</i> sp. identifikasyonu için kullanılan universal primerler.....	25
Tablo 2.	API Staph test kiti için değerlendirme kriterleri.....	29
Tablo 3.	VITEK 2 Compact cihazı veritabanında yer alan Stafilokok türleri	30
Tablo 4.	VITEK GP kartı içeriğinde yer alan substratlar.....	30
Tablo 5.	Mastermiks hazırlanma oranları	33
Tablo 6.	<i>Staphylococcus</i> sp. 16 S rRNA PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	33
Tablo 7.	Sekans PCR bileşenleri.....	35
Tablo 8.	Sekans PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	35
Tablo 9.	VITEK AST–P641 kartında yer alan antibiyotikler, konsantrasyonları ve raporlanabilir aralıkları	36
Tablo 10.	Örneklerden konvansiyonel yöntemlerle izole edilen <i>Staphylococcus</i> türlerinin dağılımı	38
Tablo 11.	API Staph identifikasyon sonuçları	39
Tablo 12.	VITEK 2 Compact identifikasyon sonuçları	40
Tablo 13.	VITEK MS (MALDI-TOF MS) identifikasyon sonuçları.....	42
Tablo 14.	Sekans identifikasyon sonuçları.....	43
Tablo 15.	Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesi.....	45
Tablo 16.	<i>Staphylococcus</i> izolatlarının MIC düzeyindeki sonuçları	48
Tablo 17.	CLSI standart MIC değerleri	50
Tablo 18.	Araştırmamızda izole edilen Stafilokok suşlarının antibiyogram sonuçlarının değerlendirilmesi	51
Tablo 19.	Araştırmamızda izole edilen Stafilokok suşlarının antibiyogram sonuçlarının yüzde değerleri.....	54

ÖZET

SIĞIR MASTİTİSLERİNE NEDEN OLAN STAFİLOKOK TÜRLERİNİN MALDI-TOF MS İLE İDENTİFİKASYONLARININ YAPILMASI

Tanır T. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017.

Bu çalışmada, mastitisli sütlerden Stafilocok türlerinin izolasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, izole edilen suşların API, VITEK, MALDI-TOF MS gibi ticari identifikasyon metodlarıyla tiplendirilmeleri ve sonuçların karşılaştırılması, tiplendirmenin ardından 16S rRNA primerleri ile yapılacak olan PCR sonucu Stafilocokal etkenlerin sekans analizi ile birlikte doğrulanması amaçlanmıştır. Aydın ili ve çevresindeki süt sığırcılığı işletmelerinde bulunan hayvanlardan klinik mastitis problemi gösterdiği belirlenen hayvanlara ait sütler steril koşullarda alınan, toplam 100 adet süt örneği Stafilocok varlığı yönünden incelenmiştir. Stafilocok türlerinin identifikasyonları biyokimyasal yöntemlere ilave olarak VITEK 2, VITEK (MALDI-TOF) MS, PCR ve Sekanslama ile yapılmıştır. Süt örneklerinin % 34'ünden Stafilocok izolasyonu yapılmıştır. Yapılan identifikasyon çalışmaları sonucunda, izolatların 7 (% 20,60)'si *Staphylococcus aureus*, 10 (% 29,40)'u *Staphylococcus simulans*, 8 (% 23,50)'i *Staphylococcus epidermidis*, 4 (% 11,80)'ü *Staphylococcus saprophyticus*, 2 (% 5,90)'si *Staphylococcus chromogenes*, 2 (% 5,90)'si *Staphylococcus hyicus* ve 1 (% 2,95) *Staphylococcus arlettae* olarak tiplendirilmiştir. Yapılan antibiyogram testi sonucunda identifiye edilen 34 *Staphylococcus* sp. izolatının Cefoxitin, Siprofloksasin, Vankomisin, Tigesiklin ve Fosfomisine % 100 ve Linezolid % 85.2 oranlarında duyarlı; Klindamisine %100 ve Tetrasikline %82.4 oranlarında dirençli olduğu görülmektedir. Sonuç olarak; MALDI-TOF MS proteomik biyokütle spektrofotometri yönteminin güvenilirliği doğrulanmış ve uygulanabilir olduğu ortaya koyulmuştur.

Anahtar sözcükler: Mastitis, *S. aureus*, Koagulaz Negatif Stafilocok, MALDI-TOF MS, PCR, Sekans

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF THE STAPHYLOCOCCUS SPECIES WHICH CAUSE CATTLE MASTITIS WITH MALDI-TOF MS

Tanır, T. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Department of Microbiology, Master Thesis, Aydın, 2017.

The aim of this study was identification and antibiotic susceptibility of Staphylococcus species from mastitic milk, comparison of results by using commercial identification methods such as API, VITEK, MALDI-TOF MS, PCR and confirmed Staphylococcal agents with sequence analysis. A total of 100 milk samples taken in sterile conditions were investigated for the presence of Staphylococcus, which were found to have clinical mastitis problems in animals in the milk province of Aydın province and surrounding areas. Identification of Staphylococcus species was performed by VITEK 2, VITEK (MALDI-TOF) MS, PCR and sequencing in addition to biochemical methods. *Staphylococcus* sp. was isolated from 34 % of the milk samples. Seven (20.60 %) of the isolates were *Staphylococcus aureus*, 10 (29.40 %) were *Staphylococcus simulans*, 8 (23.50%) were *Staphylococcus epidermidis* and 4 (11.80 %) *Staphylococcus saprophyticus*, 2 (5.90 %) were *Staphylococcus chromogenes*, 2 (5.90 %) were *Staphylococcus hyicus* and 1 (2.95 %) were *Staphylococcus arlettae*. As a result of the antibiogram test, 34 *Staphylococcus* sp. isolates were sensitive to Cefoxitin, Ciprofloxacin, Vancomycin, Tigecycline and Phosphomycin in the ratio of 100 % and resistant to Linezolid, Clindamycin and Tetracycline in the ratio of 85.2%, 100 % and 82.4% respectively. As a result; the reliability of the MALDI-TOF MS proteomic biomass spectrophotometry method has been demonstrated to be verifiable and feasible.

Key Words: Mastitis, *S. aureus*, *Coagulase Negative Staphylococcus*, MALDI-TOF MS, PCR, Sequencing