

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Erdem SUR tarafından hazırlanan “**SUBKLİNİK MASTİTİSLİ İNEK SÜTLERİNDE ELDE EDİLEN STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARINDA BAZI TOKSİN GENLERİNİN VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN İNCELENMESİ**” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/01/2019

Üye : Prof. Dr. Şükrü KIRKAN ADÜ

Üye(Tez Danışmanı): Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ ADÜ

Üye : Dr. Öğr. Üy. Fulya OCAK CBÜ

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün2019 tarih ve 201../.... sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinde ve çalışmaların yürütülmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen, beni sürekli yönlendiren ve daima yüreklendiren tez danışmanım Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, çalışmam esnasında katkılarını gördüğüm Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, özellikle Arş. Gör. Tuğba YÜKSEL'e ve tüm değerli öğretim üyelerine, laboratuvar çalışmalarında bana yol gösteren ADÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve aynı zamanda ADÜ Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Merkezi (REDPROM) Müdürü Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, tez çalışmam boyunca manevi varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim ve eğitim hayatımı daima destekleyen babam Ahmet SUR, annem Dilek SUR ve ablam Gizem SUR ÖZEN'e, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca sürekli yanımda olup her türlü desteği veren tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Özellikleri.....	2
1.2. Tarihçe.....	3
1.3. Bakterinin Prevalansı ve Önemi	4
1.4. Rezervuarları ve Bulaşması.....	5
1.5. Sığırların Meme İçi <i>S. aureus</i> Enfeksiyonunun Patogenezi.....	6
1.5.1. <i>S. aureus</i> 'un Meme Bezine Girişi.....	6
1.5.2. <i>S. aureus</i> 'un Meme Bezine Kolonizasyonu.....	8
1.5.3. Meme Bezine Adhezyonu.....	9
1.5.3.1. Adhezinlerin rolü.....	9
1.5.3.2. Antifagositik faktörlerin ekspresyonu.....	10
1.5.3.3. <i>S. aureus</i> yüzey bileşenlerinin in vivo ekspresyonunun kuramsal kinetiği.....	13
1.5.4. Meme Bezinde Oluşan Patolojik Değişiklikler.....	14
1.5.4.1. Toksinlerin rolü.....	15
1.5.4.2. Ekstrasellüler enzimlerin ve koagülazın rolü.....	16
1.5.5. <i>S. aureus</i> ve Sığır İmmun Sistemi Arasındaki Etkileşim.....	17
1.6. <i>S. aureus</i> 'un Virülens Faktörlerinin Meme İçi Enfeksiyonundaki Rolü.....	17
1.6.1. Virülens Faktörlerin Kontrolü ve Ekspresyonu.....	18
1.6.2. Enfeksiyonun Oluşmasında Rol Oynayan Toksinler.....	18
1.6.2.1. Panton-Valentine lökositidin.....	19
1.6.2.2. Toksik şok sendrom toksini.....	20
1.6.2.3. Eksfoliyatif toksin.....	21

1.6.3. Enfeksiyonun Sürdürülmesinde Rol Oynayan Virülens Faktörleri.....	22
1.7. Antibiyotik Dirençliliği.....	24
1.7.1. <i>S. aureus</i> 'un Direnç Geliştirdiği Antibiyotikler.....	26
1.7.1.1. Penisilin direnci.....	26
1.7.1.2. Metisilin direnci.....	26
1.7.1.3. Aminoglikozid direnci.....	27
1.7.1.4. Kinolon direnci.....	27
1.7.1.5. Tetrasiklin direnci.....	28
1.7.1.6. Trimetoprim sülfametoksazol direnci.....	29
1.7.1.7. Linezolid direnci.....	29
1.7.1.8. Makrolid, linkozamid ve streptogramin direnci.....	30
1.7.1.9. Vankomisin direnci.....	30
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
2.1. Gereç.....	31
2.1.1. İzolasyon Örnekleri.....	31
2.1.2. Standart Suşlar ve Pozitif Kontroller.....	31
2.1.3. Kullanılan Besiyerleri.....	31
2.1.3.1. Mannitol salt agar.....	32
2.1.3.2. Mueller hinton agar.....	32
2.1.3.3. Skim milk powder.....	32
2.1.4. Boyalar ve Ayıraçlar.....	33
2.1.4.1. Gram boyama seti.....	33
2.1.4.2. Katalaz testi.....	33
2.1.4.3. Koagülaz testi.....	33
2.1.5. Antibiyotik diskleri.....	33
2.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	33
2.1.6.1. Solüsyon ve boyalar.....	33
2.1.6.1.1. TBE buffer.....	33
2.1.6.1.2. Yükleme tamponu.....	34
2.1.6.2. Primerler.....	34
2.1.6.3. Kullanılan cihazlar.....	35
2.1.6.4. Agarose jel.....	35
2.1.6.5. Marker.....	35

2.2. Yöntem.....	35
2.2.1. Örneklerin Alınması.....	35
2.2.2. Stafilokok İzolasyonu.....	36
2.2.3. <i>S. aureus</i> 'un İdentifikasyonu.....	36
2.2.3.1. Fenotipik identifikasyon.....	36
2.2.3.1.1. Biyokimyasal testler.....	36
2.2.3.1.1.1. Katalaz testi.....	36
2.2.3.1.1.2. Lam koagulaz testi.....	37
2.2.3.2. Genotipik identifikasyon.....	37
2.2.3.2.1. DNA ekstraksiyonu.....	37
2.2.3.2.2. PZR.....	38
2.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testinin Yapılışı ve Değerlendirilmesi.....	39
3. BULGULAR.....	41
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon.....	41
3.2. Genotipik İdentifikasyon.....	41
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	42
3.4. Antibiyotik Dirençlilik.....	45
4. TARTIŞMA.....	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR.....	54-75
ÖZGEÇMİŞ.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ATCC:** Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
- Bp** : Baz çifti
- BPI-4** : Bakterisidal permabilite artırıcı 4
- C3b** : Kompleman 3b
- CD4** : Yüzey farklılaşma antijeni 4
- CD8** : Yüzey farklılaşma antijeni 8
- Cfu** : Koloni oluşturan faktör
- CLSI** : Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
- CMT** : Kaliforniya mastitis test
- dH₂O** : Distile su
- DNA** : Deoksiribonükleik asit
- Dsg-1** : Desmoglein 1
- ETA** : Eksfoliyatif Toksin A
- ETB** : Eksfoliyatif Toksin B
- ETD** : Eksfoliyatif Toksin D
- Fn** : Fibronektin
- Fnbp** : Fibronektin bağlayıcı protein
- I** : Orta derece duyarlı
- IgA** : İmmunglobulin A
- IgE** : İmmunglobulin E
- IgG** : İmmunglobulin G
- IgG₁** : İmmunglobulin G₁
- IgG₂** : İmmunglobulin G₂
- IgM** : İmmunglobulin M
- IL-1** : İnterlökin 1
- IL-6** : İnterlökin 6
- IL-10** : İnterlökin 10
- IU** : İnternasyonal ünite
- Kb** : Kilobaz
- kDa** : Kilodalton
- MDR** : Çoklu antibiyotik direnci

MgCl₂ : Magnezyum klorür
MHA : Müeller Hinton Agar
MHC-2:Major Histocompatibility Complex 2
MI : Mililitre
mM : Mikro molar
MLS : Makrolid Linkozamid Streptogramin
Mm : Milimetre
MRSA: Metisilin Dirençli *S. aureus*
MSA : Mannitol Salt Agar
NaCl : Sodyum Klorür
Nuc : Termonükleaz
PBP : Penisilin Bağlayıcı Protein
Ph : Power of Hydrogene
Pmol : Pikomol
PVL : Panton-Valentine Lökosidin
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R : Dirençli
RNA : Ribo Nükleik Asit
rRNA : ribozomal Ribo Nükleik Asit
S : Duyarlı
SEA : Stafilokokkal Enterotoksin A
SEC : Stafilokokkal Enterotoksin C
SEE : Stafilokokkal Enterotoksin E
SEG : Stafilokokkal Enterotoksin G
SER : Stafilokokkal Enterotoksin R
SEU : Stafilokokkal Enterotoksin U
SpA : Stafilokokkal protein A
SSA : Serum Soft Agar
TBE : Tris, Borik Asit, EDTA
TNF-α: Tümör Nekrozis Faktör alfa
TSST-1: Toksik Şok Sendrom Toksin 1
VRE : Vankomisin Dirençli *Enterococcus*
µg : Mikrogram
°C : Santigrat Derece

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılmış olan primerler.....	34
Tablo 2. Mastermiks hazırlanma oranları.....	38
Tablo 3. Kullanılan antimikrobiyel ajanlar disk içerikleri ve değerlendirme kriterleri	40
Tablo 4. <i>S. aureus</i> izolatlarının içerdikleri toksin gen sayıları.....	44
Tablo 5. <i>S. aureus</i> izolatlarının toksin genlerinin fenotipik dağılımı.....	44
Tablo 6. İzolatların antimikrobilyellere karşı direnç oranları.....	45
Tablo 7. <i>S. aureus</i> izolatlarının antibiyotik direnç fenotipleri.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>S. aureus</i> izolatlarının taşıdıkları toksin genlerin sayı ve oranları.....	45
Şekil 2. <i>S. aureus</i> izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık ve dirençlilik oranları.....	46

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. MSA'da mannitol negatif (üstte) ve mannitol pozitif (altta) üreyen stafilokok.....	41
Resim 2. Toksin genlerinin jel elektroforez görüntüleri.....	42
Resim 3. <i>eta</i> geni sekans sonucu.....	43
Resim 4. <i>etd</i> geni sekans sonucu.....	43
Resim 5. <i>luk-PV</i> geni sekans sonucu.....	43
Resim 6. <i>tst-1</i> geni sekans sonucu.....	44

ÖZET

SUBKLİNİK MASTİTİSLİ İNEK SÜTLERİNDEN ELDE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARINDA BAZI TOKSİN GENLERİNİN VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN İNCELENMESİ

Sur E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.

Bu çalışmada subklinik mastitisli inek sütlerinden elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında önemli toksin genlerinin ve antibiyotik dirençliliğinin incelenmesi amaçlandı. Çalışmanın materyalini 200 subklinik mastitisli süttten elde edilen 31 adet *S. aureus* izolatı oluşturdu. Bakteri identifikasyonunun doğrulanmasında ve toksin (eksfoliyatif toksin, Panton-Valentine lökositidin, toksik şok sendrom toksin 1) genlerinin belirlenmesinde polimeraz zincir reaksiyonundan (PZR) faydalanıldı. İzolatların dokuz antimikrobiyal aileye ait dokuz antibiyotiğe karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile incelendi. *S. aureus* olarak identifiye edilen 31 izolatın toksin genlerinin PZR ile incelenmesi sonucu izolatların %48,38 (15/31)'inin bu toksin genlerinin en az bir tanesinin bulunduğu gösterildi. Toksin geni taşıyan izolatların %73,3 (11/15) 'ünün eksfoliyatif toksin D geni (*etd*), %33,3 (5/15)'ünün Panton-Valentine lökositidin geni (*luk-PV*), %26,6 (4/15)'sının toksik şok sendromu toksini 1 geni (*tst-1*), %13,3 (2/15)'ünün eksfoliyatif toksin A geni (*eta*) genlerini taşıdığı belirlendi. Toplam 5 toksin gen profili elde edildi. İzolatların tümü penisilin G'ye karşı dirençli olup; 23'ü (%74,1) çoklu antimikrobiyel dirençli idi. Toplam 9 antibiyotik direnç fenotipi saptandı. Sonuç olarak; materyal alınan işletmede mastitisli ineklerin sütlerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarında çoklu antibiyotik dirençli izolatların varlığı işletmede ciddi bir direnç probleminin bulunduğunu ortaya koymuş ve çeşitli toksin genlerine sahip patojenik *S. aureus* izolatlarının olması bu hayvanlardan elde edilen sütlerin halk sağlığı açısından potansiyel bir tehdit oluşturabileceğini kanaatini doğurmuştur.

Anahtar kelimeler: Subklinik mastitis, *Staphylococcus aureus*, toksin gen, antibiyogram

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SOME TOXIN GENES AND ANTIBIOTIC RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATIONS FROM SUBCLINIC MASTITISM COW MILK

Sur E. Aydin Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Microbiology Program, M.Sc. Thesis, Aydın, 2019.

The aim of this study was to investigate important toxin genes and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from cows milk with subclinical mastitis. Material of the study consisted of 31 *S. aureus* isolates obtained from 200 subclinical mastitis milk. Polymerase chain reaction (PCR) was used to confirm bacterial identification and to determine toxin (exfoliative toxin, Panton-Valentine leukocidin, toxic shock syndrome toxin 1) genes. The susceptibility of nine isolates to nine antibiotics of nine antimicrobial families was investigated by disk diffusion method. As a result of PCR analysis of toxin genes of 31 isolates detected as *S. aureus*, 48.38% (15/31) of the isolates had at least one of these toxin genes. Of the isolates containing toxin gene, 73.3% (11/15) had exfoliative toxin D (*etd*), 33.3% (5/15) had Panton-Valentine leukocidin (*luk-PV*), 26.6% (4/15) had *tst-1*, 13%, 3 (2/15) was found to carry the genes of exfoliative toxin A (*eta*). A total of 5 toxin gene profiles were obtained. All isolates were resistant to penicillin G; 23 (74.1%) were multiple antimicrobial resistant. A total of 9 antibiotic resistance phenotypes were determined. As a result; the presence of multiple antibiotic resistant derived in *S. aureus* isolates isolated from the milk of cows with mastitis during the operation of the material taken from the cows showed that there is a serious resistance problem in the enterprise and the presence of pathogenic *S. aureus* isolates with various toxin genes has led to the conclusion that the milk obtained from these animals can pose a potentially threat to public health.

Key words: Subclinical mastitis, *Staphylococcus aureus*, toxin gene, antibiogram