



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MİK-YL-2014-0003

**MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN  
*ENTEROCOCCUS FAECALIS* SUŞLARININ VİRULENS  
GENLERİNİN İNCELENMESİ**

**Biyolog Ömer YILDIZ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ**

**AYDIN-2014**

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MİK-YL-2014-0003

**MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN  
*ENTEROCOCCUS FAECALIS* SUŞLARININ VİRULENS  
GENLERİNİN İNCELENMESİ**

**Biyolog Ömer YILDIZ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ**

**AYDIN-2014**

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Biyolog Ömer YILDIZ tarafından hazırlanan “**Mastitisli Sığır Sütlerinden İzole Edilen *Enterococcus faecalis* Suşlarının Virulens Genlerinin İncelenmesi**” başlıklı tez, 16/01/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

**Ünvanı, Adı ve Soyadı :**

- 1- Prof. Dr. Osman KAYA
- 2- Prof. Dr. Ergün Ömer GÖKSOY
- 3- Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

**Üniversitesi :**

- Adnan Menderes Üniv.  
Adnan Menderes Üniv.  
Adnan Menderes Üniv.

**İmzası:**



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıyla .....tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Enterokoklar, insan ve hayvanları infekte etme yeteneğinde olan mikroorganizmalardır. Enterokokların düşük virülensli olarak bilinmelerine rağmen; pek çok antibiyotiğe karşı intrensek dirençli olmaları, diğer antibiyotiklere de kolaylıkla direnç geliştirebilmeleri ve çevreye adaptasyonlarının iyi olması gibi özellikleri, onları diğer patojenlerden daha avantajlı hale getirmektedir. Normalde süt ineklerinin sindirim sistemi florasında bulunan ve mastitislerine sebep olan fırsatçı patojenlerdir. Yapılan çalışmalarda mastitislerden yörelere göre ve kullanılan izolasyon yöntemlerine göre farklı oranlarda enterokok izolasyonu gerçekleştirilmektedir.

Çevresel bir epidemiyolojiye sahip olan enterokoklar, insanlarda nozokomial infeksiyonlarda önemli bir problem haline gelmelerine rağmen patogeneze ve virulens faktörleri konusunda bilgiler yetersizdir. Enterokok virulens faktörlerinin incelenmesi enterokokal infeksiyonların patogenezesinin açıklanmasına katkıda bulunmaktadır. Enterokoklar çok çeşitli virulens faktörlerinden (jelatinaz, agregasyon madde, yüzey proteinleri, v.s.) dolayı insan ve evcil hayvanları kolaylıkla infekte edebilirler. İnsandan insana da bulaşma yeteneği olduğu bilinen hayvansal kökenli enterokokların, özellikle süt ürünleri ile insanlara bulaştığı bilinmektedir. En fazla izole edilen ve klinik olarak da en çok üzerinde durulan enterokok türü *Enterococcus faecalis*'dir. Şu anki bilgilerimize göre mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokokların virulens genlerinin moleküler yöntemler kullanılarak incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple, çalışmamızda Aydın ilindeki 38 işletmeden temin edilen 600 mastitisli sığır sütünden izole edilen 56 *E. faecalis* izolatının potansiyel virülans faktörlerinin (jelatinaz [*gelE*], adezyonla ilgili protein [*EfaA*], cinsiyet hormonları [*cpd*, *cob*, *ccf*], enterokokal yüzey proteini [*esp*], sitolizinler [*cylM*, *cylB*, *cylA*], agregasyon faktörü [*aggA*], hormon salınımını arttıran yüzey proteini [*eep*]) moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (VTF 13044 no'lu proje) tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	2
1. 2. Mikrobiyolojik Özellikler	3
1. 2. 1. Görünüm ve boyanma özellikleri	3
1. 2. 2. Üreme ve Fizyolojik Özellikler	4
1. 2. 3. Hücre duvarı yapısı ve antijenik özellikleri	5
1. 2. 4. Sınıflama ve identifikasyon	6
1. 2. 5. Genetik bilgi transferi	8
1. 3. Virulens Faktörleri	9
1. 3. 1. Jelatinaz	11
1. 3. 2. <i>Enterococcus faecalis</i> antijen A ( <i>efaA</i> ) Proteini	11
1. 3. 3. Cinsiyet Hormonları	12
1. 3. 4. Enterokokal Yüzey Proteini ( <i>esp</i> )	12
1. 3. 5. Agregasyon Faktörü	14
1. 3. 6. Sitolizin	15
1. 3. 7. Hormon salınımını arttıran protein	17
1. 4. Enterokoklarda Antibiyotik Direnci	20
1. 4. 1. İnterensek Direnç	20
1. 4. 1. 1. B-Laktam direnci	20
1. 4. 1. 2. Aminoglikozid direnci	21
1. 4. 1. 3. Diğer antibiyotikler	21
1. 4. 2. Eksterensek Direnç	21

1. 4. 2. 1 $\beta$ -laktam Direnci	21
1. 4. 2. 2. Aminoglikozid Direnci	22
1. 4. 2. 3. Kloramfenikol direnci	22
1. 4. 2. 4. Tetrasiklin direnci	22
1. 4. 2. 5. Kinolon direnci	22
1. 4. 2. 6. MLSB (Makrolid, Linkozamid ve B tipi Streptogramin) direnci	23
1. 4. 2. 7. Oksazolidinon direnci	23
1. 4. 2. 8. Glikopeptit Direnci	23
1. 5. Epidemiyoloji	23
1. 6. Tanı	24
1. 7. Enterokokların Önemi	26
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Gereç	28
2. 1. 1. İzolasyon Örnekleri	28
2. 1. 2. Referans suş	28
2. 1. 3. Besiyerleri, Ayıraç ve Solusyonlar	29
2. 1. 3. 1. Besiyerleri	29
2. 1. 3. 1. 1. Chromocult® Enterococci Broth (EB)	29
2. 1. 3. 1. 2. Chromocult® Enterococci Agar (EA)	29
2. 1. 3. 1. 3. Brain Hearth Infusion Agar	30
2. 1. 3. 1. 4. Brain Hearth Infusion Broth	30
2. 1. 3. 1. 5. Brain Hearth Infusion Broth (BHIB) (%20 gliserinli)	30
2. 1. 3. 1. 6. %6.5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB)	31
2. 1. 3. 2. Ayıraç ve Solusyonlar	31
2. 1. 3. 2. 1. %3'lük Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	31
2. 1. 3. 2. 2. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH: 8.0) Buffer	31
2. 1. 3. 2. 3. Gel Loading Buffer (6X)	31
2. 1. 2. PZR	32
2. 1. 2. 1 Kullanılan Cihazlar	32
2. 1. 2. 2. MgCl <sub>2</sub> , Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer, dNTP Set	32
2. 1. 2. 3. Primerler	32
2. 1. 2. 4. Agarose Jel Hazırlanışı	32
2. 1. 2. 5. Marker	33

2. 1. 2. 6. Etidium Bromür	34
2. 2. Yöntem	34
2. 2. 1. Örneklerin Alınması	34
2. 2. 1. 1. Süt Örnekleri	34
2. 2. 2. Enterokok İzolasyonu	34
2. 2. 3. Enterokok İdentifikasyonu	34
2. 2. 3. 1. Katalaz Testi	35
2. 2. 3. 2. % 6.5 NaCl'de Büyüme	35
2. 2. 2. İzolatların İdentifikasyonunda Kullanılan Testler	35
2. 2. 2. 1. DNA İzolasyonu	36
2. 2. 2. 2. DNA'nın Elektroforezi	36
2. 2. 2. 3. DNA'nın Saflık Kontrolü ve Miktar Tayinleri	36
2. 2. 3. PZR	37
2. 2. 3. 1. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi	39
2. 2. 3. 2. Yürütme	39
2. 2. 3. 3. Görüntüleme ve Değerlendirme	39
2. 2. 4. Sekans Analizi	39
3. BULGULAR	41
3.1. İzolasyon	41
3.2. PZR	41
3. 2. 1. 16S	41
3. 2. 2. <i>Enterococcus</i> sp.	42
3. 2. 3. <i>E. faecalis</i>	42
3. 2. 4. Virulens genlerinin incelenmesi	43
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ	53
ÖZET	54
SUMMARY	55
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	68
TEŞEKKÜR	69

## ÇİZELGELER

Çizelge 1. 1.	Enterokokların sınıflandırılması	6
Çizelge 1. 2.	Fenotipik özelliklerine göre enterokok türlerinin sınıflaması	7
Çizelge 1. 3.	Enterokok önemli virulens genleri ve virulensde genin rolü	10
Çizelge 2. 1.	Kullanılan primerlerler, dizileri, ampikon büyüklükleri, kaynakları ve kullanım amaçları	33
Çizelge 2. 2.	Mastermixin hazırlanma oranları	37
Çizelge 2. 3.	16S PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	38
Çizelge 2. 4.	<i>Enterococcus</i> sp. PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	38
Çizelge 2. 5.	<i>E. faecalis</i> PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	38
Çizelge 2. 6.	<i>gelE</i> , <i>cylA</i> , <i>ccf</i> , <i>EfaAfs</i> , <i>cylM</i> , <i>cpd</i> , <i>cylB</i> , <i>eep</i> , <i>cob</i> virulens genlerinin PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	38
Çizelge 2. 7.	<i>esp</i> ve <i>aggA</i> virulens genlerinin PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	38
Çizelge 3. 1.	İzolatların virulens genlerinin toplu sunumu	44-45
Çizelge 3. 2.	İzolatların virulens genotiplerinin dağılımı	46



## RESİMLER

<b>Resim 1. 1.</b>	16S rRNA dizi analizi ile ortaya konulan <i>Enterococcus</i> türleri	3
<b>Resim 1. 2.</b>	Enterokokların Gram boyama görüntüleri	4
<b>Resim 1. 3.</b>	Enterokok identifikasyon şeması	8
<b>Resim 1. 4.</b>	Seks feromon sistemi transfer mekanizması	12
<b>Resim 1. 5.</b>	<i>E. faecalis</i> ( <i>esp</i> ) ve <i>E. faecium</i> ( $E_{sp(fm)}$ )'un <i>esp</i> yüzey proteini ile <i>S. aureus</i> 'un biyofilm ilişkili proteini (Bap) arasındaki benzerliklerin şematik görünümü	13
<b>Resim 1. 6.</b>	Bazı <i>E. faecalis</i> (ortada büyük koloni) suşları diğer bakterilerin üremesini inhibe eden veya öldüren maddeler salgırlar	16
<b>Resim 2. 1.</b>	Bakterilerin gen sekansına dayalı moleküler identifikasyonu	40
<b>Resim 3. 1.</b>	<b>a.</b> Ekim yapılmamış EB <b>b.</b> EB'da <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşunun görünümü <b>c.</b> EA'da <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşunun görünümü	41
<b>Resim 3. 2.</b>	16S universal primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR	42
<b>Resim 3. 3.</b>	<i>Enterococcus</i> sp. PZR elektroforez görüntüsü	42
<b>Resim 3. 4.</b>	<i>E. faecalis</i> PZR elektroforez görüntüsü	43
<b>Resim 3. 5.</b>	Virulens gen PZR	43
<b>Resim 3. 6.</b>	<i>esp</i> geni sekans sonucu	46
<b>Resim 3. 7.</b>	<i>aggA</i> geni sekans sonucu	46

# 1. GİRİŞ

Mastitis, çok farklı nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan meme bezi infeksiyonudur. Hastalığın etiolojisinde bakteriyel etkenler ilk sırayı oluşturur. Mastitise neden olan bakteriyel patojenler kaynağına göre çevresel ve bulaşıcı olarak iki grupta incelenir. Bulaşıcı patojenleri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ve *Streptococcus dysgalactiae*; çevresel etkenleri *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* ve enterokoklar oluşturur. Enterokoklar, *Streptococcocea* ailesi içerisinde yer alan Gram pozitif kok şeklinde görülen, katalaz negatif özellik gösteren, yüksek tuz ve pH düzeylerinde üreyebilen etkenlerdir (Hardie ve ark. 1997, Franzetti ve ark. 2004).

Enterokoklar geniş bir konakçı dağılımına sahiptirler. Hayvanların sindirim sisteminde yerleşik doğal flora bakterisi olan bu etkenler, özellikle sağım hijyenine dikkat edilmediği ve altlık temizliğinin düzenli yapılmadığı durumlarda memeleri kolaylıkla infekte ederek mastitise neden olmaktadırlar. Meme başından giren enterokoklar meme kanalı boyunca yerleşip kolonize olurlar ve meme bezinde enfeksiyona ilişkin klinik bulgular meydana getirirler. Enterokok etkenleri tek başlarına mastitis oluşturabilmelerine rağmen mastitis olgularından genellikle streptokokkal etkenlerle birlikte izole edilmektedirler (Smith ve Hogan 2003). Yapılan çalışmalarda mastitislerden % 6 ve % 42 oranları arasında enterokok izolasyonunun gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Çevresel bir epidemiyolojiye sahip olan enterokoklar, insanlarda nozokomial infeksiyonlarda önemli bir problem haline gelmelerine rağmen epidemiyolojileri konusunda bilgiler yetersizdir (Petersson-Wolfe ve ark. 2007).

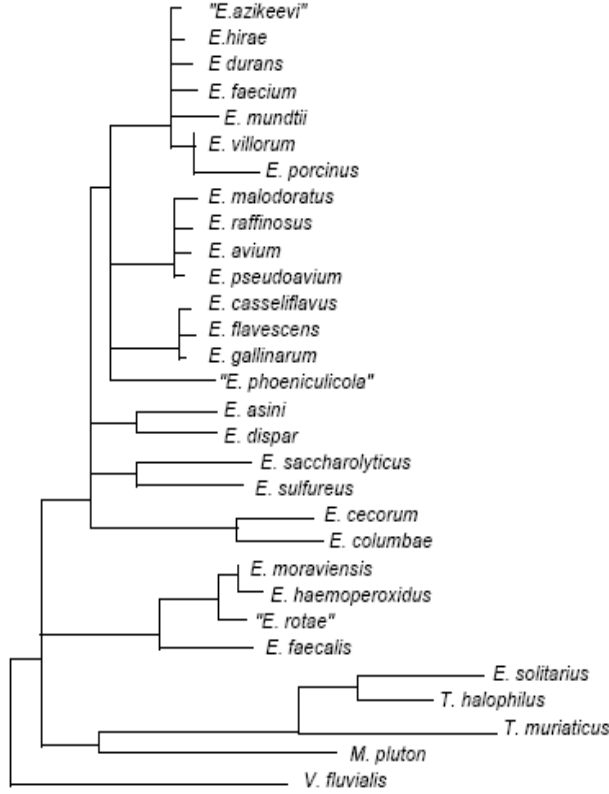
Enterokok suşlarının sahip oldukları virulens faktörleri, antibiyotik dirençliliği ve genetik heterojenitesi üzerine yapılan çalışmalarda, suşlar arasında konakçı orijinine göre farklılıkların olduğu, virulens özellikleri ve direnç mekanizması yönünden pek çok farklı mekanizma kazandıkları belirlenmiştir (Petersson-Wolfe ve ark. 2007). Normal gastrointestinal sistem bakteriyel florasının parçası olan enterokoklar insanlarda nosokomial bakteriyemi, peritonitis, endokarditis, üriner sistem ve yumuşak doku infeksiyonlarına neden olurlarken; hayvanlarda sporadik infeksiyonlar oluşturular.

Bunlardan en önemlileri kahverengi yumurtacılarda görülen *Enterococcus faecalis*'in neden olduğu amiloid artropati ve sığırlarda subklinik mastitis (Diker ve ark. 2011), kedi ve köpeklerde otitis eksterna, üriner sistem infeksiyonlarıdır. *E. durans*, *E. hirae* ve *E. villorum* türleri köpek, kedi, tay ve buzağılarda ishale yol açtığı, *E. hirae*'nin bir kedide enteropatiye, karaciğer safra kanalı ve pankreatik kanalında supuratif yangıya neden olduğu bildirilmiştir (Moellering 2000).

## 1. 1. Tarihçe

Enterokoklar çok uzun yıllardan beri tanımlanan bakterilerdir ve 1980'li yıllara kadar *Streptococcus* cinsi içinde değerlendirilmişlerdir. Streptokok cinsi içinde enterokoklar, fekal streptokoklar grubunda incelenmişler ve Lancefield gruplandırmasında çoğu tür D grubunda yer almıştır. *Enterococcus* izolasyonu ilk olarak 1899 yılında Fransız mikrobiyolog Thiercelin tarafından yapılmış, 1906 yılında, izolatin adı Andrewes ve Horder tarafından *Streptococcus faecalis* (*S. faecalis*) olarak değiştirilmiştir. Lancefield'in 1933 yılında yaptığı serolojik tiplendirme sistemine göre *Enterococci* grup D'ye karşı presipitasyon reaksiyonu vermişlerdir. 1937 yılında ise *Streptococcus*'lar, 4 gruba ayrılmış ve terim olarak *Enterococcus*, fekal *Streptococcus* ve grup D *Streptococcus* eş anlamda kullanılmıştır. *S. faecalis* ve *Streptococcus faecium*'un *Streptococcus* genusundan değişik bir genetik yapıya sahip olmaları nedeniyle farklı bir genusa alınmalarını ilk olarak 1970 yılında Kalina önermiştir (Kalina 1970). 1984 yılında ise bu *Streptococcus* türleri Schleifer ve Kilpper-Balnz tarafından *Enterococcus* cinsi olarak ayrılmıştır (Gunter 2003, Konrad ve ark. 2003).

Bakteri sistematğinde moleküler tekniklerin kullanılmasını takiben enterokoklar, *Enterococcus* cinsinde değerlendirilmişler ve tür isimleri korunarak isimlendirilmişlerdir (Diker ve ark. 2011) ve 16S rRNA sıralarının analizi ve hücre duvar yapılarının incelenmesi yöntemleri ile yapılan sınıflandırma çalışmaları sonucu aşağıdaki türler belirlenmiştir (Franz ve ark. 2003).



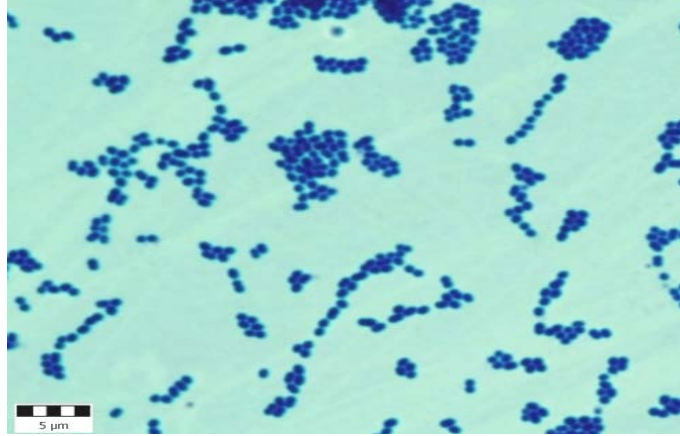
**Resim 1. 1.** 16S rRNA dizi analizi ile ortaya konulan *Enterococcus* türleri

## 1. 2. Mikrobiyolojik Özellikler

Enterokoklar sıcakkanlı hayvanların ve insanların gastrointestinal sistemlerinde, ayrıca böceklerde, bitkilerde dışkı ile kirlenmiş toprak, su ve yiyeceklerde de bulunur. Bu sebeple içme ve kullanma sularındaki fekal kontaminasyonun gösterilmesi için indikatör mikroorganizma olarak kullanılırlar. Enterokoklar doğal florada bulunabildikleri gibi (vajina, deri, oral kavite ve dental plaklarda, v.s.) laktik asit üretmelerinden dolayı peynir yapımında başlatıcı olarak da kullanılır ve peynirlerden ve et ürünleri ve diğer yiyeceklerden izole edilebilirler (Facklam ve Teixeira 1998).

### 1. 2. 1. Görünüm ve boyanma özellikleri

Enterokoklar tek tek veya çift olarak kısa zincirler halinde bulunan Gram pozitif yaklaşık 1  $\mu\text{m}$  çapında koklardır Enterokok türlerinin çoğu hareketsiz olmalarına karşın, *E. casseliflavus*, *E. flavescens* ve *E. gallinarum* türleri hareketlidir. Morfolojik olarak streptokoklardan ayrılmaları zordur.



**Resim. 1. 2.** Enterokokların Gram boyama görüntüleri

### 1. 2. 2. Üreme ve Fizyolojik Özellikler

Enterokoklar fakültatif anaerob mikroorganizmalardır. Optimal üreme ısıları 35°C (10-45°C) optimal üreme pH'ları da 7.2 ±0.2 dir. Koyun kanlı besiyerinde 24 saatlik inkübasyon periyodu sonunda, 1-2 mm çapta, streptokoklardan daha büyük, kabarık, gri beyaz renkli S tipi koloniler oluştururlar. *E. faecalis*'lerin 1/3'ü tavşan, insan ve at kanı içeren agarda β-hemoliz oluşturabilir ancak koyun kanlı agarda hemoliz yapmazlar (Facklam ve ark. 1998). Ancak bazı *E. durans* türleri bütün kanlı agarlarda β-hemoliz oluştururlar. Diğer türlerin tamamı genellikle α-hemolitik veya nonhemolitikdir. α-hemolitik görünen suşlar gerçekte peroksit üreten nonhemolitik suşlardır. Besiyerindeki yeşil renk α-toksin üretimi ile değil, eritrositlerde peroksin etkisi ile oluşmaktadır. *E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. mundtii*, *E. pallens* ve *E. sulfureus* kanlı agarda sarı pigment oluşturur. Yüksek ısının yanı sıra yüksek oranda tuz ve safra tuzlarını tolere ederler ve % 6.5 NaCl ile % 40 safra tuzu varlığında üremeye devam ederler. Eskulini hidrolize eder, Bile-Esculine (BE) agarda rahatlıkla ürerler. *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. pallens* ve *E. saccharolyticus* hariç pek çok enterokok türü, pyrolidonyl arylamidase (PYRase) üreterek pyrolidonyl-b-naftilamide (PYR)'i hidrolize ederler. Bütün suşlarda leucine aminopeptidase (LAPase) aktivitesi görülür ve leucine β-naphthylamide'i hidrolize ederler. Gram negatif bakterileri de içeren karışık örneklerden izole edilmeleri için selektif besiyeri olarak azid içeren safra-eskulinazid agar veya Enterococcosel agar, Columbia-Kolistin-Nalidiksik asit agar (CNA) veya fenil etil alkol agar (PEA) kullanılabilir (Akan 2004, Koneman ve ark. 2005).

Enterokokların karbon metabolizması, solunum, iyon transportu, pirimidin, stres cevapları, folat ve reaktif oksijen türleri metabolizmaları dikkat çekicidir. Enterokokların bazal metabolik faaliyetleri için, B1, B6 ve B12 vitaminlerine, nükleik asit bazları ve bir karbon kaynağına ihtiyaçları vardır. *E. faecalis*'in çoğalması için histidin, izolösin, metionin ve triptofan gerekli iken, diğer bazı türler arginin, glutamat, glisin, lösin ve valin'e ihtiyaç duyarlar (Facklam ve ark. 1998, Murray ve ark. 1993). Enterokoklar hem respiratuvar tip hem de fermentatif tipte metabolizmaya sahiptir. Enterokoklar porfirin prekürsörleri sentezleyemez ve bu yüzden sitokrom enzimleri eksprese olmaz ve katalaz negatiftir (Frankenberg ve ark. 2002). Bazı *E. faecalis*'ler kanlı besiyerinde üretildiğinde sitokrom aktivitesi gösterebilir ve zayıf olarak katalaz pozitifliğine yol açabilir (Svec ve ark. 2001).

### **1. 2. 3. Hücre duvarı yapısı ve antijenik özellikleri**

Enterokokların hücre duvarının üç bileşeni peptidoglikan, teikoik asit ve polisakkaritlerdir. Hücre duvarının % 40'ı peptidoglikandan oluşur, geri kalan kısım ise ramnoz içeren polisakkarit ve ribitol içeren teikoik asittir. Peptidoglikan polimerleri glikan zincirler ve bunlara bağlanmış kısa peptitler L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala'dan oluşur. Komşu peptitler, pentapeptid yan zincirler ile çapraz bağlanırlar. Peptidoglikan dışı yardımcı polimerlerin yapısal bileşimi kesin olarak bilinmemektedir (Facklam ve Teixeira 1998).

Lancefield'in serolojik tiplendirmesinde; streptokokların çoğunun, baskın olan hücre duvarı karbonhidratlarına göre sınıflanmasına karşın, enterokokların yer aldığı "D" grubunda serolojik tiplendirme lipoteikoik asitlerin (LTA) antijenik özelliklerine göre yapılır. Gruba özelliğini veren "D" antijeni, gliserol ünitelerine bağlanmış yüksek oranda glukoz içeren poligliserolfosfatın teikoik asit polimeridir. LTA in lipit kısmı 1-kojibiosyl digliseriddir. Bu glikolipit membranın bir parçası olarak bulunur. Streptokokal grup-D antijenleri enterokok türleri ile *Streptococcus bovis* kompleks, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Vagococcus*'larda bulunmaktadır (Fisher ve Phillips 2009).

#### 1. 2. 4. Sınıflama ve identifikasyon

*Enterococcus* cinsinin kabulünden sonra, streptokoklardan ayrılan enterokoklar içerisinde *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri dahil edilmişken, günümüzde enterococcus cinsinde en az 34 farklı tür tanımlanmıştır (*E. aquimarinus*, *E. faecalis*, *E. pallens*, *E. asini*, *E. faecium*, *E. phoeniculicola*, *E. avium*, *E. gallinorum*, *E. pseudoavium*, *E. caccae*, *E. gilvus*, *E. raffinosus*, *E. canintestini*, *E. haemoperoxidus*, *E. ratti*, *E. canis*, *E. hermanniensis*, *E. saccharolyticus*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. silesiacus*, *E. cecorum*, *E. italicus*, *E. sulfureu*, *E. columbae*, *E. malodoratus*, *E. termitis*, *E. devriesei*, *E. moraviensis*, *E. thailandicus*, *E. dispar*, *E. mundtii*, *E. villorum*, *E. durans*). Fenotipik farklılıkların yanı sıra 16SrRNA gen dizi analizi yöntemi ile yapılan katalaz negatif Gram pozitif kok cinslerinin filogenetik analizi sonuçlarına göre de, enterokoklar, streptokoklar ve laktokoklar'dan çok *Vagococcus*, *Tetragenococcus* ve *Carnobacterium* cinsleri ile daha yakın ilişkili bulunmuştur. Önceleri, katalaz negatif, Gram pozitif koklardan; BE besiyerinde üreyebilen, PYR ve LAP testi pozitif olan, % 6.5 NaCl'ü ve 45°C'yi tolere eden suşlar enterokok olarak tanımlanmıştır. Enterokoklar bu sınıflandırma ile, kendilerine çok benzerlik gösteren *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Vagococcus*'dan sadece BE reaksiyonu ve % 6.5 NaCl içeren besiyerinde üreme yetenekleri ile ayırt edilebilmiş, ancak sıklıkla hatalı sonuçlar alınarak sınıflandırmada yanlışlıklar yapılmıştır (Facklam ve Teixeira 1998, Fisher ve Phillips 2009).

**Çizelge 1. 1.** Enterokokların sınıflandırılması

<b>Kingdom</b>	<b>Bacteria</b>
Division	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Lactobacillales
Family	Enterococcaceae
Genus	<i>Enterococcus</i>

Enterokoklar mannitol, sorbitol, sorboz içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmalarına ve arginini hidrolize etmelerine göre beş gruba ayrılırlar.

**Grup 1:** *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus*, *E. pallens*, *E. gilvus*'dan oluşur. Bu türler mannitol, sorbitol ve sorboz sıvı besiyerinde asit oluşturur, ancak arginini hidrolize etmezler.

**Grup 2:** *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. haemoperoxidus*, *E.mundtii* ve *E. gallinorum*'dan oluşur. Bu gruptaki türler arginini hidrolize ederler, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler.

**Grup 3:** *E. villorum*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. hiraе*, *E. ratti* ve *E. faecalis* ile *E. faecium*'un mannitol negatif varyantları bu grubu oluşturur. Bu gruptaki türler D antijeni içermez, arginini hidrolize ederler, fakat mannitol, sorboz ve sorbitol içeren sıvı besiyerlerinin hiçbirisinde asit oluşturmazlar.

**Grup 4:** *E. sulfurens*, *E. asini*, *E. phoeniculicola* ve *E. cecorum* bu grupta bulunmaktadır. Bu gruptaki türler mannitol ve sorboz içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmaz ve arginini hidrolize etmezler. Sorbitol içeren sıvı besiyerinde ise *E. cecorum* asit oluştururken, *E. sulfureus* asit oluşturmaz.

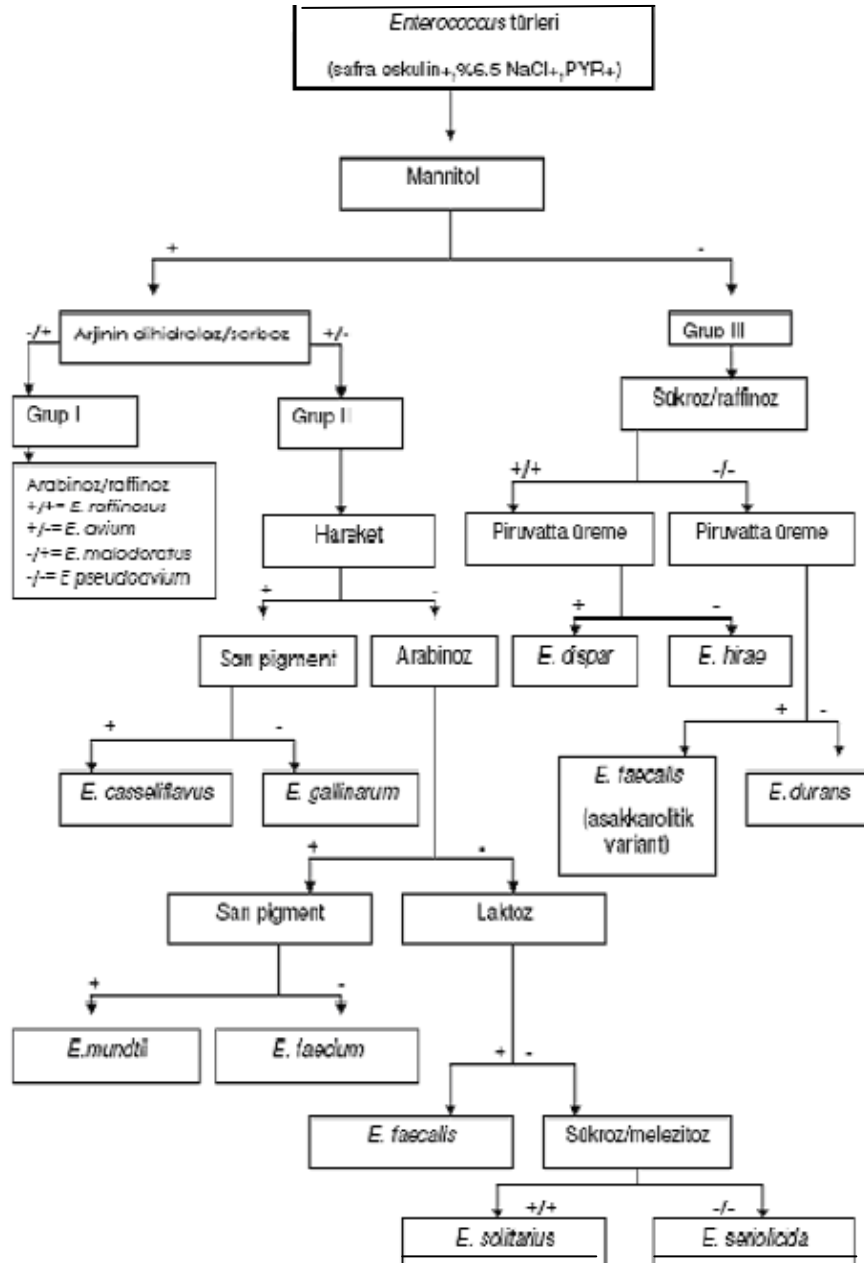
**Grup 5:** *E. columbae*, *E. canis*, *E. moraviensis* bu grupta bulunur. Bu gruptaki türler arginini hidrolize etmezler, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler (Facklam 1998). Fenotipik özelliklerine göre enterokok türlerinin sınıflaması Çizelge 1 .2.'de, enterokokların identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler Resim 1. 3.'de verilmiştir (Konaman ve ark. 2005).

**Çizelge 1. 2.** Fenotipik özelliklerine göre enterokok türlerinin sınıflaması

Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
<i>E. avium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E.durans</i>	<i>E.asini</i>	<i>E.canis</i>
<i>E. malodoratus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E.hiraе</i>	<i>E.cecorum</i>	<i>E.columbae</i>
<i>E. raffinosus</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E.ratti</i>	<i>E.sulfurens</i>	<i>E.moraviensis</i>
<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E.dispar</i>	<i>E.phoeniculicola</i>	<i>E.casseliflavus*</i>
<i>E. palens</i>	<i>E. haemoperoxidus</i>	<i>E.faecalis*</i>		<i>E.faecalis*</i>
<i>E. gilvus</i>	<i>E. gallinorum</i>	<i>E.faecium*</i>		
<i>E. saccharolyticus</i>		<i>E. villorum</i>		

\* Aynı türler farklı özelliklerine göre farklı gruplara dahil edilmiştir.





Resim 1. 3. Enterokok identifikasyon şeması

### 1. 2. 5. Genetik bilgi transferi

*E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında, virulens genleri veya ilaç direnci ile ilgili genetik bilgi transferinde rol oynayan, çok sayıda plazmid, transpozon, patojenite adası, integre plazmid geni ve faj bölgesi ile oldukça fazla sayıda insersiyon dizileri, plazmid ve transpozon bulunmuştur. Enterokoklarda Rolling Circle Replicating plazmid (RCR), Inc18 plazmid ve feromon ilgili plazmid olmak üzere üç sınıf plazmid tanımlanmıştır. RCR ve Inc18 plazmidleri pek çok cinsten replike olabilirken, feromon ilgili plazmid

replikasyonu sadece enterokoklarla özellikle de *E. faecalis* ile sınırlıdır. Plazmidi bulunmayan alıcı suşlar ekstraselüler feromon sentezleyerek, verici hücre dış yüzeyinde agregasyon faktör denilen proteinöz maddenin oluşumunu sağlar. AF alıcı hücrenin yüzeyine bağlanır ve alıcı ile verici hücrenin yakınlaşması sonucu plazmid değişimi oluşur. Feromon ile indüklenmiş transfer, plazmid geçişini  $10^5$  -  $10^6$  kat artırır. Enterokoklar ayrıca konjugatif transpozonlar ile de genetik bilgi değişimi yapabilir. Bunun için hücre-hücre teması gereklidir. Transpozonlar sıklıkla tetrasiklin, eritromisin, gentamisin, kanamisin ve diğer aminoglikozidler gibi antimikrobiyal ilaçlara direnç genleri taşırlar. Transpozonlar çok geniş bir konak spektrumuna sahip olup enterokokların yanı sıra streptokoklar, laktokoklar ve diğer Gram pozitif bakterilerde de bulunurlar. Konjugasyon ile ilgili belirli moleküller, infeksiyon sırasında immun modülatör rol oynayabildiğinden patojeniteye katkıda bulunurlar (Facklam ve Teixeira 1998, Tendolkar ve ark. 2003).

### 1. 3. Virulens Faktörleri

Enterokoklar, düşük virulensli bakterilerdir. Pek çok antibiyotiğe karşı intrinsek olarak dirençli olmaları, diğer antibiyotiklere de kolaylıkla direnç geliştirebilmeleri ve çevreye adaptasyonlarının iyi olması nedenleri ile diğer patojenlerden daha avantajlı hale gelmektedirler. Mikroorganizmanın antibiyotik direnci ve virulensle ilgili yeni genetik materyal kazanabilme özelliği onu daha virulan yapar ve konakta farklı bölgelere kolonizasyonuna alışılmışın dışında infeksiyon oluşturmaya yardım eder. Ancak kolay genetik bilgi transferi, mikroorganizmanın virulensinden sorumlu tek faktör değildir. Yapılan çok sayıdaki çalışma ile mikroorganizmaya ait farklı virulens faktörleri bulunmuştur (Upadhyaya ve ark. 2009).

Mikroorganizmanın virulensi genomda bulunan patojenite adaları (PI) denilen özel bölgelerde ve plazmidlerde kodlanan virulens genleri ile düzenlenir. Enterokokların patojenite adaları ilk kez 1980 yılında nozokomiyal salgına yol açan çoklu ilaç direnci *E. faecalis*'te tanımlanmıştır. G+C oranı % 32.2, büyüklüğü de 150 kb civarında olan bu PI; enterokokal yüzey proteini (*esp*), agregasyon (kümelenme) faktör (*aggA*) ve sitolizin (*cyl*) gibi virulens genlerinin yanı sıra 129 ORF (transpozazlar, transkripsiyonel regülatörler ve proteinleri kodlayan genlerin yer aldığı gen bölgesi) bölgesine sahiptir (Tendolkar ve ark. 2003, Upadhyaya ve ark. 2009,). Bu PI'nin bulunmasından iki yıl sonra

*E. faecium* suşlarında *E. faecalis*'dekinden farklı olan bir *PI* varlığı bulunmuştur. *E. faecium* klinik izolatlarında “*esp*” geninin görülmesi bu türdeki patojenite adası için bir indikatör olarak kabul edilmiştir (Leavis ve ark. 2004). Farklı VRE suşlarındaki *PI* dizilerinin karşılaştırılması sonucu; yüksek derecede dizi benzerlikleri olduğu ve spesifik gen bölgelerin değişen sıklıkta delesyona uğradıkları görülerek, bu mikroorganizmaların virulens düzenleme yeteneği kazandıkları gösterilmiştir. Ayrıca *PI* larda fonksiyonu henüz bilinmeyen 18 ORF bölgesi kodlanmaktadır. Kommensal enterokokların *PI*lerinde bu ORF bölgeleri gösterilememiş, bu sebeple de, bunların enterokokların hastane ortamında yaşamasına veya hastalık geçişine veya patogeneze katkıda buldukları düşünülmüştür (Upadhyaya ve ark. 2009). Enterokok infeksiyonlarının patogenezinde etkili olan ve moleküler olarak da belirlenebilen virulens faktörleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında en önemlileri aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir:

1. Jelatinaz (*gelE*) (Su ve ark. 1991),
2. Adezyonla ilgili protein *EfaA* (*E. faecalis* endocarditis antijen A) (Lowe ve ark. 1995)
3. Cinsiyet hormonları (*cpd*, *cob*, *ccf*) (Ember ve ark. 1989, Clewell ve ark. 2000),
4. Enterokokal yüzey proteini (*esp*) (Shankar ve ark. 1999),
5. Agregasyon faktörü (*aggA*) (Galli ve ark. 1990),
6. Sitolizinler (*cylM*, *cylB*, *cylA*) (Ike ve ark. 1990, Gilmore ve ark. 1994),
7. Hormon salınımını arttıran yüzey proteini (*eep*) (An ve ark., 1999, Bittencourt de Marques ve ark. 2004) olarak sıralanabilir.

**Çizelge 1. 3.** Enterokok önemli virulens genleri ve virulensde genin rolü

Gen (ler)	Virulensde genin rolü
<i>gelE</i>	Hemoglobin ve diğer biyoaktif bileşenleri parçalayan proteaz.
<i>efaAfs</i> ; <i>efaAfm</i>	Sırası ile <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşları tarafından serumda sentezlenen hücre duvar adezinleri.
<i>cpd</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i>	Cinsiyet hormonları, suşlar arasında plazmid DNA'sının konjugatif transferini kolaylaştıran ve organizma tarafından salınan küçük peptitler.
<i>esp</i>	Bakterinin konak immun sistemden kaçmasını kolaylaştıran hücre duvarı ile ilgili protein, patojenite adasında sitolizin genleri ile birlikte bulunabilir.
<i>aggA</i>	Hücreye tutunma ve konjugasyon, ökaryot hücre yüzeyine tutunmayı sağlayan protein feromon, sentezi ve salınımı indükleyen yüzey proteini.
<i>cylM</i> , <i>cylB</i> , <i>cylA</i>	Sitolizinler: Eritrositler için hemolizin aktivitesi gösterir. Üç çeşittir: Sitolizinin posttranslasyonel modifikasyonu, Sitolizinin transportu, Sitolizinin aktivasyonu.
<i>eep</i>	Hormon ekspresyonunu artıran <i>E. faecalis</i> membran proteini.

### 1. 3. 1. Jelatinaz

*E. faecalis* için salgılanabilen iki proteaz tanımlanmıştır, bunlar: jelatinaz ve serin proteazlardır. *E. faecalis*'ten saflaştırılan jelatinaz, çinko ihtiva eden ekstrasellüler bir metalloproteinazdır. Fakat, bu *E. faecalis* metalloproteinazları insan endotelyumunu (vazoaktif bir peptid) inaktive etmesi sebebiyle “kokkolizin” olarak tekrar isimlendirmiştir. Yine de jelatinaz pekçok çalışmada daha sık kullanılan bir terimdir (Portenier ve ark. 2003). Jelatin, kollajen, fibrinojen, kazein, hemoglobün, insülin, bazı *E. faecalis* cinsiyet hormonları ile ilişkili peptitler ve diğer biyoaktif peptitleri hidrolize edebilir (Makinen ve ark. 1989). Jelatinaz üreten *E. faecalis* suşlarının akut toksik etkilerinin daha fazla olduğu ve hayvan modellerinde endokardit oluşumuna katkıda bulunduğu; jelatinaz üretiminin inhibisyonunun doku kültüründe kemik rezorpsiyonunu azalttığı da gösterilmiştir. Ayrıca inflamatuvar hücreler, epitelyal hücreler, fibroblast ve osteoklast gibi memeli hücreleri tarafından da üretilen jelatinaz, ekstra selüler matriksi degrade etmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik 2004). Yapılan bir çalışmada; *E. faecium* ve *E. avium* izolatının jelatinaz üretmediği ancak *E. faecalis* hastane izolatlarının % 45'inin jelatinaz ürettiği rapor edilmiştir (Portenier ve ark. 2003). Farklı klinik materyalden izole edilen *E. faecalis* suşlarında jelatinaz üretim oranlarının farklı olduğu gösterilmiştir. Genel olarak tüm izolatların yaklaşık olarak % 45-68 inde jelatinaz üretiminden sorumlu olan “*fsr*” geni gösterilmişken; bir çalışmada bu gen, endokardit izolatlarının % 100'ünde, gaita izolatlarının ise % 53 ünde tespit edilmiştir (Kayaoglu ve Orstavik 2004). Gıdalardaki *E. faecalis* suşlarında da jelatinaz üretimi yüksektir. Çalışmalarda genotipte jelatinaz geninin bulunmasına karşılık fenotipte bu özelliği göstermeyen bazı suşların olduğu belirlenmiştir (Özmen ve Temiz 2011). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar jelatinaz üreten *E. faecalis* suşunun, yetersiz jelatinaz üretimi olan izogenik suş ile kıyaslandığında artan letal etkisini göstermektedir. *E. faecalis*'in insan klinik izolatları ile yapılan epidemiyolojik çalışmalarında jelatinaz üretimi, izolatların % 45-68'inde tespit edilmiştir ve jelatinaz aktivitesinin klinik izolatlarda, sağlıklı bireylerin fekal izolatlarından daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Kayaoglu ve Orstavik 2004).

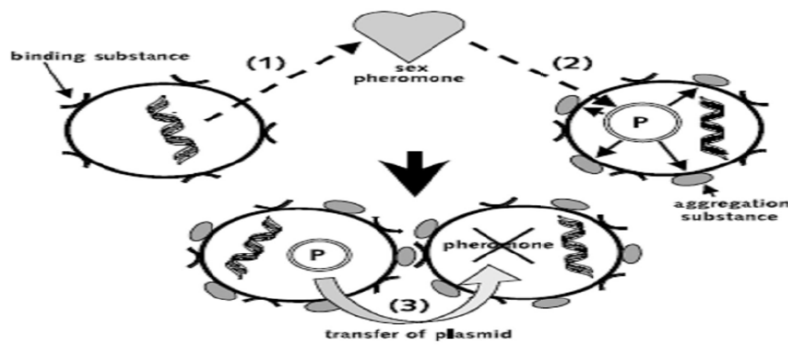
### 1. 3. 2. *Enterococcus faecalis* antijen A (*efaA*) Proteini

İlk olarak endokarditlerden izole edilen *E. faecalis* suşlarında tanımlanan *efaA* proteini, *efaA* geninde kodlanır. *efaA*'nın aminoasit dizisi, streptokokal adhesinler olarak

bilinen proteinlerle % 55-60 homoloji göstermektedir. *efaA*, mangan transport sistemi için gerekli protein reseptörüdür. Mikroorganizmanın yaşaması ve çoğalması için mangan gerekir ve *efaA* mangandan fakir ortamda fazla miktarda eksprese edilir. *efaA*, endokarditler de adhesin olarak fonksiyon gördüğü, ancak bütün klinik örneklerden, hastane ortamından, süt, peynir ve et gibi gıda izolatlarından izole edilen *E. faecalis* suşlarında da *efaA*'nin bulunduğu gösterilmiştir (Kayaoglu ve Orstavik 2004).

### 1. 3. 3. Cinsiyet Hormonları

Cinsiyet hormonları, kromozomda kodlanan, 7-8 amino asit uzunluğunda küçük, hidrofobik peptitlerdir. *E. faecalis*'te sinyal peptitleri olarak fonksiyon görürler. *E. faecalis*'te belirli konjugatif plazmidlerin transferi seks feromon sistemi ile birkaç kat artırılır. Alıcı bir suş besiyerine plazmidle uyumlu ancak onunla taşınmayan seks feromonları sekrete eder, cevap olarak verici suş agregasyon faktör sekrete eder. Böylece alıcı ve verici hücre arasında sıkı temas sağlanır ve konjugatif plazmidin geçişini kolaylaştırır. Antibiyotik direnci ve sitolizin gibi virulens faktörleri seks feromon sistemi ile *E. faecalis* suşları arasında yayılabilir. Bazı *E. faecalis* seks feromonları ve bunların inhibitör peptitleri, insan ve rat nötrofilleri için kemotaktiktir, süper oksit üretimini ve lizozomal enzim sekresyonunu indükler ve doku hasarı oluşturur (Kayaoglu ve Orstavik 2004).



Resim 1. 4. Seks feromon sistemi transfer mekanizması

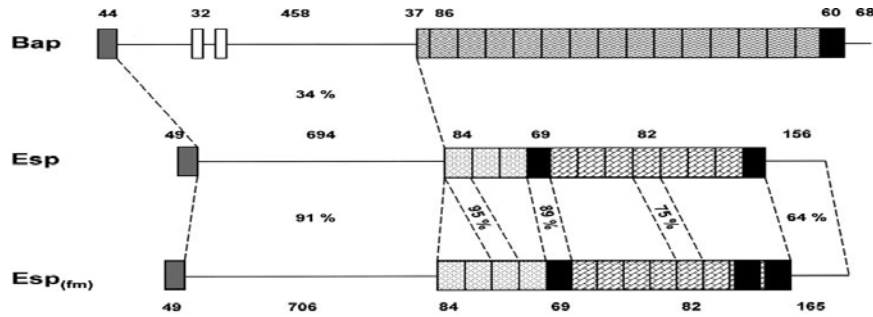
### 1. 3. 4. Enterokokal Yüzey Proteini (*esp*)

Yüksek moleküler ağırlığa sahip *esp*, 153 kb büyüklüğündeki bir patojenite adasında yer alan *esp* geninde kodlanır ve konjugasyonla enterokok izolatları arasında

aktarılabılır. *esp*, salgına yol açan *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında bulunduğundan, epidemik suşları gösteren bir marker olduğu düşünülmektedir (Coque ve ark. 2005, Oancea ve ark. 2004).

*esp*, bakteriyemi ve endokardit ile ilişkili suşlarda yüksek oranda bulunurken, gaita kökenli izolatlarında nadiren bulunur. *Esp*'nin karboksi-terminal ucu ile, üriner sistem enfeksiyonlarında musin veya uroplakin gibi mesane duvarı komponentlerine bağlanarak, bir kolonizasyon faktör gibi *E. faecalis*'in mesane epiteline yapışmasını sağladığı, persistense katkıda bulunduğu ve biyofilm oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir (Tendolkar ve ark. 2003, Upadyaya ve ark. 2009).

*esp*, ilk olarak virulensi yüksek gentamisin dirençli bakteri olan *E. faecalis* izolatından belirlenmiştir. Bu protein Resim 1. 5.'de gösterildiği gibi büyük ölçüde korunan tekrarlanan blokları içeren karakteristik yapısal özelliklere sahiptir. *E. faecalis* suşunun *esp*'i, 1873 aminoasitten oluşur. Çekirdek bölgesinin yaklaşık % 50'si proteinden oluşmuştur ve ardışık tekrarlayan farklı birimlerden oluşan benzersiz bir yapıya sahiptir (Tendolkar ve ark. 2003).



**Resim 1. 5.** *E. faecalis* (*esp*) ve *E. faecium* (*Esp<sub>(fm)</sub>*)'un *esp* yüzey proteini ile *S. aureus*'un biyofilm ilişkili proteini (Bap) arasındaki benzerliklerin şematik görünümü. Her bir etki ya da tekrarlama birimi içindeki aminoasit kalıntıları, bitişik numaralar ile gösterilmiştir. Benzerlik alanları noktalı çizgilerle gösterilmiştir ve yüzde benzerlik değerlerini kapsamaktadır (Tendolkar ve ark. 2003).

Karboksi ucu hücre duvarına tutunmayı sağlarken, iç kısım moleküle uzayıp kısalabilme yeteneği kazandırır. Bu proteinin, bakterinin immün sisteminden kaçmasını kolaylaştırdığı sanılmaktadır. *E. faecalis*'de enfeksiyona neden olan *esp* proteini yine bu *esp* geni tarafından kodlanmaktadır ve bu genin daha az patojen olan suşlarda bulunmadığı da gösterilmiştir (Gültekin 2004).

### 1. 3. 5. Agregasyon Faktörü

*E. faecalis* ve *E. faecium*'da bulunur. Agregasyon faktörü, donör ve alıcı bakteri arasında etkin temasın sağlanmasına aracılık eden ve plazmid alışverişini kolaylaştıran, feromon-duyarlı, plazmid-kodlu bakteriyel yüzey proteindir (Trotter ve Dunny 1990). Feromonlarla sentezi ve salınımı indüklenen bir adezindir. Alıcı ve verici hücrelerin birleşmesini sağlayarak plazmid transferini kolaylaştırır. Arg-Gly-Asp motifleri üzerinden etki ederek renal tübüler hücrelere bağlanmayı güçlendirir (Moellering 2000). Plazmid transferini kolaylaştırması neticesinde, antibiyotik dirençliliği gibi genetik materyaller *E. faecalis* türleri ve diğer türler arasında transfer edilebilmektedir (Portenier ve ark. 2003). Aynı zamanda bakterilerin agregasyonunu da sağlayarak virulense katkıda bulunmaktadır (Gültekin 2004). AF'ye sahip olan enterokoklar, kompleman reseptörü yoluyla nötrofillere opsonizasyondan bağımsız olarak bağlanırlar. Bu tür bağlanma nötrofiller tarafından bakterinin öldürülmesini engeller. Makrofajlar tarafından fagositozda ise, reaktif oksijen türleri üretimi ile oksidatif patlama inhibe edilerek, fagositik yıkıma karşı direnç gösterilir. Diğer taraftan AF içeren suşlarla indüklenmiş lökositlerde hem ekstraselüler süperoksit üretimi hem de fagozomal oksidan üretimi daha fazla olmaktadır. Bu oksidatif patlama enfeksiyonu sınırlandırmanın yanı sıra enterokoklarla oluşan doku hasarına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca süper antijen aktivitesine sahip olan AF'nin T hücre proliferasyonunu, proliferen T hücrelerden TNF- $\beta$  ve IFN- $\gamma$  ve makrofajlardan da TNF- $\alpha$  salınımını indüklediği gösterilmiştir (Kayaoglu ve Orstavik 2004, Upadhyaya ve ark. 2009). AF, *E. faecalis*'in feromon- indüklenabilen yüzey proteininin, kültüre edilen renal tübüler hücrelerine in vitro yapışmasına aracılık ettiği gösterilmiştir (Wells ve ark. 2000). İn-vivo olarak agresyon faktörü bir dizi mekanizma yoluyla enterokokal enfeksiyonların patojenezine katkıda bulunabilir (Mundy ve ark. 2000). Bakterinin kollajen tip1 gibi ekstraselüler matriks proteinlerine bağlanmasını sağlar. Özellikle kateter enfeksiyonların da *E. faecium*'a göre daha sık görülen *E. faecalis*'lere katetere tutunma yeteneği sağlamaktadır (Devriese ve ark 2006).

Agregasyon maddesi özetle 4 şekilde *E. faecalis*'in virulensine katkı sağlamaktadır:

\*Plazmid tarafından kodlanan virulens faktörlerinin dağılımını sağlamaktadır (türler arasında enterokokal sitozilin ve antibiyotik determinantları gibi).

\*Enterokokların böbrek ve bağırsak epitelyum hücrelerine bağlanmasını ve bu yüzeylerde kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır. Bunun sonucunda endokardit ve üriner sistem infeksiyonlarına yol açmaktadır.

\*Ayrıca bakterinin polimorfonükleer (PMN) lenfositlerin fagositozuna karşı da korunmasını sağlamaktadır, fakat bu durum mikrobiyal ölümle sonuçlanmamaktadır.

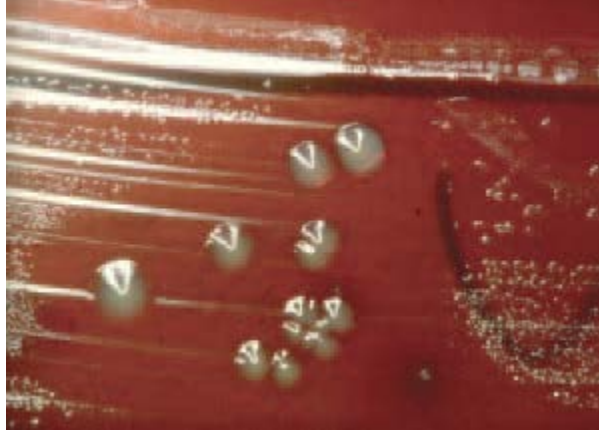
\* Agregasyon maddesinin ve sitolizinin, sitolizin regülasyonunu düzenleyen “quorum sensing” mekanizmasını aktifleştirerek virulensi arttıran sinerjistik bir işleve sahip olduklarını gösterilmiştir (Chow ve ark. 1993). Bu da doku hasarı ile sonuçlanmaktadır (Portenier ve ark 2003).

*E. faecalis* patogeneğinde AF'nün rolüne ilişkin hayvanlarla yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Tavşanlarla yapılan çalışmalarda AF endokarditi arttırmıştır ancak rat endokardit örneğinde durum böyle olmamıştır ve AF tavşan endoftalmi hastalığının şiddetini etkilememiştir. Tüm memeli dokularının ekstrasellüler matriksi glikoproteinlerden (kollajen, laminin, fibronektin gibi) oluşur ve proteoglikanlar mikroorganizmalar tarafından kolonizasyon ve infeksiyonun başlatılması için kullanılabilir. Bakterinin kollajene bağlanma yeteneğinin endokardit patogeneğinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, AF'nün klinik izolatlardan sıklıkla tespit edilmesi ancak sağlıklı bireylerin fekal izolatlarında nadiren bulunması, insan enterokokal infeksiyonlarında AF'ün olası rolünü akla getirmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik 2004).

### **1. 3. 6. Sitolizin**

*E. faecalis* ve *E. faecium*'un bazı suşları tarafından üretilen sitolizin (hemolizin), eritrositler için hemolizin aktivitesi gösterir. Bazı ökaryotik hücreler için toksiktir. Ökaryotik ve prokaryotik hücreleri lize eden *E. faecalis* sitolizini genellikle plazmid kodludur ve hayvanlarda *E. faecalis*'in virulensini artırır (Jett ve ark 1995). İnsan, at ve tavşan eritrositlerine karşı litik aktivite gösteren bu protein, eritrositler dışında, polimorfonükleer lökosit (PMNL)'ler, makrofajlar ve Gram pozitif organizmalar için de litik aktivite gösterir. Buna karşılık toksinin koyun eritrositleri ve Gram negatif bakterilere karşı inaktif olduğu gösterilmiştir. Sitolizin'in aynı zamanda bir bakteriosin olduğu ve litik aktiviteye ek olarak bütün Gram pozitif organizmalar için bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Upadhyaya ve ark 2009).





**Resim 1. 6.** Bazı *E. faecalis* (ortada büyük koloni) suşları diğer bakterilerin üremesini inhibe eden veya öldüren maddeler salgırlar.

Sitolizin operonu, *E. faecalis*'in patojenite adasının *esp* genine çok yakın bir bileşeni olarak saptanmıştır (Shankar ve ark. 2002). Sitolizin operonu *cy/R1*, *cy/R2*, *cy/LL*, *cy/LS*, *cy/IM*, *cylB*, *cylA*, ve *cy/II* olarak tanımlanan sekiz gen içerir. Aktif sitolizin subünitleri olan *cy/LL* ve *cy/LS* ribozomda sentezlenip posttranslasyonel modifikasyona uğrar ve sonra ekstrasellüler ortama sekrete edilerek aktive olur. *cy/R1* ve *cy/R2* iki ayrı regülatör genidir ve sitolizin yapısal genlerinin transkripsiyonunu baskırlar (Kayaoğlu ve Orstavik 2004).

Enterokokal virulense katkısı olduğu bilinen sitolizin sentezinin, quorum-sensing mekanizması yoluyla yeni iki bileşenli regülatör sistem tarafından düzenlendiği bulunmuştur. Sitolizin sistemi, klasik histidin kinaz ve yanıt regülatöründen oluşan iki bileşenli sinyal iletim sistemi ile düzenlenmemiş olduğu için eşsizdir (Haas ve ark 2002). *Cy/LS* sekresyonunu sağlayan quorum-sensing mekanizması ile sitolizin ekspresyonu indüklenir. Ayrıca başka bir çalışmada sitolizin yapısal subünitlerini kodlayan *cy/LL* ve *cy/LS* genlerinin regülasyonunun ortamın oksidasyon redüksiyon (Eh) potansiyeli ile ilişkili olduğu, düşük Eh potansiyeline sahip ortamlarda regülasyonun, yani sitolizin üretiminin arttığı gösterilmiştir. Sitolizin operonu, sitolizin dışında agregasyon faktör ve enterokokal yüzey proteini gibi diğer virulens genleri ile de ilgilidir (Kayaoğlu ve Orstavik 2004).

Aminoasit analizlerine dayanarak saflaştırılan *E. faecalis* sitolizini A lantibiyotik tipi olarak sınıflandırılmaktadır. Lantibiyotikler ise; amino lantionine içeren

ve normal olarak proteinlerde bulunmayan diğer modifiye olmuş aminoasitleri bulunduran ribozomal olarak sentezlenmiş peptidlerdir. Diğer tip A lantibiyotik örnekleri; epidermin, nisin, subtilin ve streptococin'dir. Daha fazlası; bakteriyal hücrenin sitoplazmik membranda spor oluşturmasıyla ve yapay fosfolipid vezikülleri ile antibakteriyal aktivite göstermektedir (Portenier ve ark 2003). İnsanlarda patojen olan enterokok suşları arasında, sitolizin üretenlerin oranının, non patojen olduğu düşünülen suşlardan daha fazla olduğu gösterilmiştir (Karagöz 2005).

Epidemiyolojik araştırmalar sitolozinin hastalık oluşumunda rolü olduğunu kısmen desteklemektedir. Ike ve arkadaşları (1987) sağlıklı bireylerin fekal örneklerinden elde edilen *E. faecalis* izolatlarının % 17'sinin hemolitik olmasına karşın, *E. faecalis*'in klinik izolatlarının yaklaşık %60'ının hemolitik olduğunu bildirmiştir. Coque ve ark. (1995) endokardit, bakteriyemi veya sağlıklı bireylerin dışkılarından elde edilen *E. faecalis* izolatları arasında sitolizin insidansı açısından herhangi bir fark saptamamıştır. *E. faecalis* klinik izolatlarının sadece %16'sının sitolizin ürettiği diğer bir çalışmada, ana virulens faktörü olarak bu proteinin rolünün küçük olduğu sonucuna varılmıştır (Elsner ve ark. 2000). Başka bir çalışmada *E. faecalis*'in klinik izolatlarında bulunan sessiz *cly* genlerinin negatif fenotipik profil verebildikleri ancak infeksiyon bölgesindeki faktörler gibi çevresel faktörlerin bu genleri aktive edebileceği bildirilmiştir (Eaton ve Gasson 2001). Hayvan ve nematod örneklerinden elde edilen veriler sitolizinin önemli bir virulens faktörü olduğunu göstermektedir. Bir tavşanın endoftalmi deneyinde, doku hasarının bir sonucu olarak görme kaybının önlenmesi için *E. faecalis*'e karşı kullanılan kortikosteroid tedavisi ile birlikte antibiyotik tedavisi sitolitik türlerin infeksiyonunda işe yaramazken, non-sitolitik türlerde etkili olmuştur ki bu da sitolizin için endoftalmide patojenik bir rol öne sürmüştür (Jett ve ark 1995).

### **1. 3. 7. Hormon salınımını arttıran protein (*eep*: enhanced expression of pheromone)**

Plazmid taşımayan *E. faecalis* suşları, hemolizin plazmidi pAD1 veya onunla ilgili elemanları taşıyan verici tarafından konjugasyon yanıtına sebep olan, cAD1 olarak bilinen bir cinsiyet hormonu salgılar. *E. faecalis* OG1X kromozomu üzerinde 46,5 kDa'luk bir proteini kodladığı bulunan bir bölge, hücre dışına salgılanan cAD1'in üretiminde önemli rol oynar. Plazmid taşıyan saha *E. faecalis* OG1X suşları cAD1

salgılanmasını sekiz katı kadar artışını ortaya koyan bu bölgeyi taşır ve mutasyona uğramış kromozomal bölgeye sahip plazmid taşımayan suşlarda hormon çok düşük veya saptanamayacak düzeydedir. cAM373 hormonu üzerine herhangi bir etkisi olmamasına rağmen pek çok hormon (cPD1, cOB1, ve cCF10) salınımı etkilenir. Kromozomal bir bölge olan *eep* konak *E. faecalis* OG1X suşları tarafından cAD1 salgılanmasını arttırılmasına yol açan protein ürünüdür. *eep* bir hormon değildir; ancak, hormon salgılanmasını arttırmak için gereklidir. *eep*'nin bir membran proteini olduğu bazı bilinen bakteriyel proteazlarla benzerlikler gösterdiği öne sürülmektedir. Tüm veriler *eep*'nin hormon üretim veya salgılanmasını etkileyen bir membran proteini olduğunu düşündürmektedir (An ve ark. 1999).

Moleküler olarak belirlenebilen yukarıda bahsedilen bu virulens faktörlerinin yanında MSCRAMM Ace (Microbial surface komponent recognizing adhesive matrix molecule adhesin of kollagen from enterococci), kapsül, hücre duvarı polisakkaritleri, lipoteikoik asit, süperoksitler, hyaluronidaz ve AS-48 gibi virulens faktörleri de bulunmaktadır (Tendolkar ve ark. 2003).

MSCRAMM Ace: Yapısal ve fonksiyonel olarak *S. aureus*'un kollajen bağlayan proteini *cna*'ya benzer özelliklere sahip olan *MSCRAMM Ace*, hücre dışı matriks proteinlerine bağlanmayı sağlayan protein yapıda bir adhezindir. Enterokoksik enfeksiyonlarda, özellikle *E. faecalis* endokarditlerinde *ace* yaygın olarak eksprese edilir. Klinik izolatlarda fekal izolatlardan daha yüksek oranda bulunmaktadır (Sillanpa ve ark. 2009).

Kapsül, Hücre Duvarı Polisakkaritleri: Klinik *E. faecalis* izolatlarında yaygın olarak üretilen kapsül polisakkaritini kodlayan bir operon bulunmaktadır. Bunun dışında hem *E. faecalis* hem de *E. faecium* izolatlarında ikinci bir kapsül polisakkariti daha tanımlanmıştır. Her iki polisakkaride karşı oluşan antikorlar koruyucudur. Enterokoklarda hücre duvarı, beta-D glikoz-1-fosfat, teikoik asit ve tetraheteroglikan komponentlerinden oluşur. Oponik antikorlar için hedef olan bu yapılarda virulensin yanı sıra karşı koruyucu immünite için hedef rolü oynarlar. Bu sebeple aşı oluşturmadaki önemleri araştırılmaktadır (Upadhyaya ve ark. 2009).

Lipoteikoik asit-LTA: LTA, poligliserol fosfat omurgasına kovalent bağlarla glikolipit rezidülerin bağlanması ile oluşan bir amfipatik moleküldür. Bu molekülün lipit parçası; trombosit, eritrosit, lenfosit, PMNL ve epitel hücresi gibi pek çok ökaryotik hücreye bağlanabilmektedir. *E. faecalis* suşlarında adhezif özelliği gösterilen LTA'nın donör hücre tarafından üretilen agregasyon faktörü için alıcı hücrede reseptör olarak fonksiyon gördüğü ve bu yüzden plazmid transferi ve agregat oluşumunu kolaylaştırarak *E. faecalis*'in virulensine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik 2004).

Süperoksitler: *E. faecalis*'lerin çoğu ve bazı *E. faecium* türleri tarafından ekstraselüler süperoksitlerin sentezlenip mikro-çevreye salındığı, bunun da bakterinin hayat süresini uzattığı gösterilmiştir. Enterokoksik bakteriyemi ve endokarditli hastalardan izole edilen klinik suşların gaita kökenli izolatlardan daha yüksek oranda süperoksid radikali ürettiği gösterilerek, süperoksid üretiminin virulensle ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Kayaoğlu ve Orstavik 2004).

Hyaluronidaz: Streptokokların dışında stafilokoklar gibi bazı Gram pozitif bakterilerde hyaluronidaz geninde *hyl* kodlanan hyaluronidaz enzimi, doğada sülük ve kancalı kurtlar gibi parazitler, zehirli yılanlar ve spermatozoa gibi memeli hücreleri tarafından da üretilir. Hyaluronidaz, hyaluronik asiti tahrip ederek doku hasarına yol açan bir enzimdir. Bağ dokudaki mukopolisakkaritlerin bir kısmını depolimerize ederek bakterinin yayılmasını sağlar. Ayrıca hyaluronik asidin degradasyon ürünü olan disakkaritler de bakteriler için besin kaynağı olabilir. Hyaluronidaz kendi zarar verici etkilerine ek olarak, diğer bakteriyel toksinlerin zararlı etkilerini kolaylaştırabilir ve doku hasarının şiddetini artırır (Kayaoğlu ve Orstavik 2004).

AS-48: *E. faecalis* tarafından üretilen AS-48, enterokoklar da dahil olmak üzere geniş spektrumda Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri inhibe ve lize eder. Bu basit peptit, hedef hücrelerin sitoplazmik membranlarında gözenek oluşturma yoluyla litik aktivite gösterir. Ayrıca otolizin aktivitesi yoluyla seçilen bir enterokokun lizisini indüklediği görünmektedir. AS-48, sitolizin operonunda olduğu gibi aktarılabılır plazmid tarafından kodlanmıştır. Bu bakteriyosinin önemi belirsizliğini korumaktadır (Jett ve ark 1994).

## **1. 4. Enterokoklarda Antibiyotik Direnci**

Klasik bir virulens faktörü olmamasına rağmen, enterokokların çoklu antimikrobiyal ajanlara geliştirdiği direnç, hayatta kalmalarını ve çoğalmalarını kolaylaştırır (Sood ve ark. 2008). Enterokokların en ilgi çekici özelliklerinden birisi yüksek antibiyotik dirençlilikleridir. Bu durum aynı zamanda enterokok infeksiyonlarındaki yüksek oranda mortalitenin de nedenlerinden birisidir. Enterokoklarda görülen antibiyotik direnci, suşların intestinal florada seçilip çoğalmasını kolaylaştırırken, sitolitik toksin ve jelatinaz gibi faktörler de doku invazyonunu kolaylaştırmaktadır. Enterokok enfeksiyonlarının tedavisi güç olmaktadır; çünkü, enterokoklar diğer Gram pozitif bakterilerin duyarlı olduğu birçok antibiyotiğe kısmen veya tamamen dirençlidir. Enterokoklar da antibiyotiklere direncin mekanizması iki ana grupta incelenebilir (Aktaş ve Derbentli 2009).

1-İnterensek (doğal/kromozomal) Direnç

2-Eksterensek (kazanılmış) Direnç

### **1. 4. 1. İnterensek Direnç**

İnterensek direnç türe/cinse özgüdür. Enterokok türlerinin tamamında görülen kromozomal direnci ifade eder. Mesela enterokok türleri penisilinlere, sefalosporinlere, linkozamidlere, trimetoprim-sulfametaksazol (TMP-SMX)'e, aminoglikozidlere (düşük düzeyde), polimiksinlere, monobaktamlara ve kinopristin/dalfopristin'e karşı kalıtsal olarak dirençlidir (Çetinkaya ve ark. 2000, Klare ve ark. 2003) .

#### **1. 4. 1. 1. B-Laktam direnci**

Enterokoklar  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı karakteristik olarak tolerans gösterirler, yani tedavi dozunda Minimum Bakterisidal Konsantrasyon/Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MBK/MİK) oranı 1/32'nin üzerindedir. Bu nedenle  $\beta$ -laktam antibiyotikler enterokoklara karşı bakterisidal değil, bakteriyostatik etkilidir. Enterokoklarda interensek penisilin direnci,  $\beta$ -laktam antibiyotiklere düşük bağlanma afinitesi gösteren penisilin bağlayan protein 5 (PBP-5) enziminin varlığına bağlıdır.

Ampisilin direnci *E. faecium* suşlarının % 85–90'ında, *E. faecalis* suşlarının ise % 2-3'ünde görülmektedir (Çetinkaya ve ark. 2000, French 1998).

#### **1. 4. 1. 2. Aminoglikozid direnci**

Enterokok türlerinin, antibiyotikleri hücre içine alabilmeleri için gerekli olan enerjiyi üretecek sitokrom enzimlerine sahip olmamaları, aminoglikozidlerin düşük konsantrasyonlarına doğal direnç göstermelerine neden olur (Fisher ve Phillips 2009). Enterokoklarda görülen düşük düzeyde aminoglikozid direnci, bu grup ilaçların bakteri içerisine girişinin az olmasından kaynaklanır. Aminoglikozidler bakteri hücre duvarından enerji bağımlı mekanizma ile geçtiklerinden ve enterokoklarda sitokrom enzimleri olmadığından geçirgenlik azalmaktadır (French 1998).

#### **1. 4. 1. 3. Diğer antibiyotikler**

Enterokoklar linkozamid grubu antibiyotiklere karşı da düşük düzeyde direnç gösterirler. Ayrıca enterokokların eksojen folatı kullanma yetenekleri olduğundan TMP/SMX'e de intrinsek olarak dirençlidirler. İn-vitro şartlar da duyarlı görülseler de, in vivo şartlarda etkisiz olduklarından antibiyotik duyarlılık testlerinde TMP-SMX kullanılmamalıdır. *E. faecalis* intrinsek olarak quinupristin/dalfopristine'de dirençlidir. (Çetinkaya ve ark. 2000, Klare ve ark. 2003).

#### **1. 4. 2. Eksterinsek Direnç**

Kazanılmış direnç genellikle DNA mutasyonları veya transpozon, plazmid veya patojenite adaları gibi yeni bir DNA segmentinin genoma transferi sonucu gelişir. En sık görülen mekanizma konjugasyondur.  $\beta$ -laktam, Aminoglikozid, Kloramfenikol, tetrasiklin, kinolon, Makrolid, Linkozamid ve B tipi Streptogramin, Glikopeptit en çok görülenlerdendir (Çetinkaya ve ark. 2000, Klare ve ark. 2003) .

##### **1. 4. 2. 1 $\beta$ -laktam Direnci**

$\beta$ -laktam direnci Enterokok cinsi bakterilerin tipik özelliğidir. Enterokoklar iki ayrı direnç mekanizması ile  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direnç kazanır. Direncin major

mekanizması, kromozomal olarak düşük afiniteli PBP5 miktarının artması sonucu penisilinin hücre içine girişinin azalmasıdır (Çetinkaya ve ark. 2000).

#### **1. 4. 2. 2. Aminoglikozid Direnci**

Enterokoklar aminoglikozidlere karşı direnç da iki farklı mekanizma ile ortaya çıkar.

- a. İlmli seviyede direnç (MIK= 62-500 µg/ml) : Genellikle düşük permeabiliteden dolayı gelişir. Aminoglikozidlerin hücre duvarı sentezini inhibe eden β-laktam grubu antibiyotiklerle kombine edilerek kullanımı ile bu tip direnç problemi aşılabilir.
- b. Yüksek seviyede direnç (MIK>2000 µg/ml): Aminoglikozidlerin ribozomdaki bağlanma bölgelerindeki değişiklik sonucu veya aminoglikozidleri inaktive eden enzimlerin sentezi sonucu oluşur (Murray ve ark. 1998).

#### **1. 4. 2. 3. Kloramfenikol direnci**

Enterokokların % 20-42'si kloramfenikole dirençlidir ve dirençten sorumlu esas mekanizma, plazmid üzerinde “*cat*” geni ile kodlanan kloramfenikol asetil transferaz üretimidir. Ayrıca efluks mekanizması da dirençte rol alabilir (Klare ve ark. 2003).

#### **1. 4. 2. 4. Tetrasiklin direnci**

Dirençten sorumlu *tetM*, *tetQ* ve *tetN*, *tetL* gibi çok sayıda gen tanımlanmıştır. *tetL* geni bir plazmid de taşınır. Bu genler efluks sistemini kodlayabildiği gibi ribozomal kaynaklı dirence de sebep olabilir (Klare ve ark. 2003). Tetrasiklinlerin hücre dışına pompalanmasını sağlayan gen, tetrasiklin ile temas sonucu indüklenir. Tetrasiklin direnci enterokoklarda konjugasyon yolu ile kazanılan direncin en tipik örneğidir (Murray 1998).

#### **1. 4. 2. 5. Kinolon direnci**

Direnç *gyrA* (giraz) ve *parC*(topoizomeraz) genlerindeki mutasyonlara bağlı gelişir (Klare ve ark. 2003).

#### **1. 4. 2. 6. MLSB (Makrolid, Linkozamid ve B tipi Streptogramin) direnci**

Genellikle 23S rRNA'nın metilasyonundan sorumlu *ermB* geni ile ilişkilidir ve metilasyon sonucu eritromisin ribozomlara bağlanamaz. *ermB* geni *Tn917* transpozonu ile çeşitli plazmidler üzerinde taşınabilmektedir. Ayrıca asetil transferaz veya eflüks mekanizması sonucu da oluşabilir (Klare ve ark. 2003).

#### **1. 4. 2. 7. Oksazolidinon direnci**

Çoklu ilaç direnci gösteren enterokoklar ile oluşan enfeksiyonlarda oksazolidinon grubu antibiyotik olan linezolid iyi bir seçenektir (Klare ve ark. 2003, Murray 1998).

#### **1. 4. 2. 8. Glikopeptit Direnci**

Enterokoklarda vankomisin ve teikoplanin en çok kullanılan glikopeptitlerdir. Enterokoklarda, normal şartlar altında, peptidoglikan sentezinde, iki molekül D-Alanin bir ligaz enzimi ile bağlanır ve "D-Ala-D-Ala" yı oluşturur. Daha sonra UDP-N-asetil muramil tripeptide eklenerek UDP-N-asetil muramil pentapeptit meydana getirir. Bu peptid oluşmaya başlayan peptidoglikana bağlanır, kros bağların oluşumunu sağlar ve peptidoglikan tabakanın gücüne katkıda bulunur. Vankomisin pentapeptit prekürsör ünitesinin D-Ala-D-Ala kısmına yüksek affinite ile bağlanır ve peptidoglikan zincire bağlanmasını bloke ederek kros bağların oluşumunu önler. Ancak peptidoglikan yan zincirine D-Ala-D-Ala yerine ligaz enzimi ile D-Ala-D-Laktat veya D-Ala-D-Serinin sentezlenerek bağlanması sonucunda, vankomisinin buraya bağlanma yeteneği azalır, hücre duvarı sentezi devam eder ve sonuç olarak vankomisine karşı direnç gelişir (Çetinkaya ve ark. 2000, Klare ve ark. 2003)

### **1. 5. Epidemiyoloji**

Enterokoklar genel olarak insan ve hayvanların sindirim sisteminde, ürogenital sistemde ve deride normal flora mikroorganizması olarak bulunurlar. Konakçı dağılımı oldukça geniştir. Bağırsak içeriğinde özellikle de orta bağırsak bölümünde yüksek düzeylerde bulunabilirler ( $10^5$ - $10^7$  bakteri/g). Ayrıca topraktan, besin maddelerinden, yüzey sularından ve lağım sularından izole edilebilirler (Diker ve ark. 2011).



Yakın zamanlara kadar enterokok infeksiyonlarının, insanların kendi floralarından endojen olarak kaynaklandığı düşünölmekteydi. Ancak son zamanlarda, enterokoklar hastane infeksiyon patojeni olarak adlandırılmaya başlamışlardır. Enterokokların insan sağlığı açısından önemi; özellikle, hastane infeksiyonlarından izole edilen suşlarda antibiyotik direncidir. Enterokoklar, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinin üyeleridir. İnsanlarda, esas olarak gastrointestinal florada bulunmaları nedeni ile gerek hastane gerekse hastane dışı ortamda endojen kaynaklı infeksiyonlara yol açmaktadırlar (Göltekin 2004).

Enterokokların insanlara bulaşmasında hayvanların rolü, ekzojen bulaşmanın anlaşılmasından ve hayvansal enterokok suşlarında da antibiyotik dirençliliğinin artmasından sonra dikkati çekmiştir. İnsanlarda infeksiyona neden olan suşlar ile hayvan suşlarının genetik düzeyde karşılaştırılmaları sonucunda, tavuk domuz ve ev hayvanlarının ve hayvansal ürünlerin enterokokların insanlara bulaşmasında önemli kaynak olabileceği ortaya konulmuştur (Eaton ve Gasson 2001).

Başta vankomisin olmak üzere diğerk antibiyotiklere dirençli enterokoklara bağı infeksiyonların tedavisi problem oluşturmaktadır. Enterokoklarda vankomisin direnci, kanatlılarda avoparsin kullanımıyla ilişkili olarak artmış ve bu yem katkısı büyütme faktörünün yasaklamasından sonra vankomisin dirençli enterokların azaldığı gözlenmiştir (Diker ve ark. 2011).

Enterokok virulens faktörlerinin incelenmesi enterokokal infeksiyonların patogenezinin açıklanmasına katkıda bulunmaktadır. İnfeksiyonların lokalizasyonu açısından enterokokal patogenezis 4 başlık altında incelenebilir: bakteriyemi, endokardit, yumuşak doku infeksiyonları ve üriner infeksiyonlar (Göltekin 2004).

## **1. 6. Tanı**

Enterokok türlerinin tanısı biyokimyasal ve fizyolojik testlerle konur. Enterokokların sadece % 80'i Lancefield Grup D antijenine karşı hazırlanan antiserumla reaksiyon vermektedir. Buna rağmen çoğu enterokok safralı ortamda eskulini hidrolize eder, % 6.5'luk NaCl buyyonunda ürer, PYR pozitifdir. Klinik materyallerden en çok izole edilen 2 tür *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur. Enterokokları mannitöl ve sorboz sıvı

besiyerinde asit yapımına ve arjinin hidrolizine göre beş gruba ayırmışlardır. Şüpheli izolatlar birkaç besiyerine ekilmek suretiyle ilgili biyokimyasal testler uygulanır. Grup I' de bulunan 5 tür (*E. avium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. pseudoavium* ve *E. saccharolyticus*) mannitol, sorbitol ve sorboz sıvı besiyerinde asit yapar ama arjinini hidrolize edemez. Grup II türleri (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* ve *E. gallinorum*) mannitol sıvı besiyerinde asit oluşturur, arjinini hidrolize eder fakat sorbozda asit yapmaz, sorbitolde ise değişken reaksiyon verirler. İnsanda bulunan 2 Lactococcus türü (*L. garviea* ve *L. lactis*) de fenotipik benzerlikleri nedeniyle grup II' ye dahil edilmişlerdir. Grup III türleri (*E. durans*, *E. hirae* ve *E. dispar*) arjinini hidrolize eder, ancak 3 karbonhidrattan asit yapamaz (Di Rosa ve ark. 2000).

*E. faecalis* suşları genellikle % 0.04 potasyum tellurite karşı tolerandır ve agarda siyah koloniler yaparlar. Bazı *E. gallinorum*, *E. casseliflavus* ve *E. mundtii* suşları da tellurite tolerandır. Motilite ve hareket sarı pigment oluşumu Grup II'deki *E. faecalis* ve *E. faecium* dışındaki türleri ayırmada yardımcıdır. *E. casseliflavus* hareketlidir, sarı pigment yapar *E. mundtii* sarı pigment yapar ama hareketli değildir. *E. gallinorum* hareketli ama sarı pigment yapmaz. *E. sulfureus*, hareketli olmayan ancak pigment yapan bu grup IV organizma, grup D antijeni içermez ve mannitol, inulin, arabinoz ve arjinin testlerinde reaksiyon vermez. Grup V, *E. columbae* ve *Vagococcus*'dan oluşur (Di Rosa ve ark. 2000).

Enterokok identifikasyonunda konvansiyonel yöntemler kullanılırken biyokimyasal testler için Brain Heart Infusion broth gibi besiyerleri kullanılır. Gram negatif bakteri içeren karışık klinik örneklerden izolasyon için azid içeren Safra-eskulin-azid veya Enterococcosel agar kullanılır. CNA (Columbia kolistin-nalidiksik azid agar) veya PEA (fenil etil alkol agar) da bu amaçla kullanılabilir. VRE tespiti içinse genellikle 6 mcg/ml vankomisin içeren Enterococcosel sıvı besiyeri veya BHI agar kullanılır (Hallgren ve ark 2000).

Çoğu laboratuvarında identifikasyon için hızlı kit sistemlerini kullanmaktadır (API Rapid System, RAPID ID32 System, RAPID STR, VITEK Gram Pozitif İdentifikasyon (GPI) Kartları, Micro Scan G pozitif Breakpoint Combo Panel gibi.) Enterokok türlerinin genetik ve moleküler yöntemlerle identifikasyonunda DNA hibridizasyon, ribotipleme,

pulsed field jel elektroforezi (PFGE), PZR gibi yöntemler kullanılır. Bunlar arasında en faydalı ve güvenilir metot PFGE' dir (Kawalec ve ark 2000).

## 1. 7. Enterokokların Önemi

Enterokoklar, hayvanların bağırsak florasındaki yaygınlığa bağlı olarak özellikle hayvansal gıdalar başta olmak üzere pek çok gıdada bulunabilmektedir. Bu nedenle bazı kaynaklarda *E. faecalis* ve *E. faecium*'un fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirildiği görülmektedir. Ancak pek çok gıdada *E. faecalis*'in yaygın bulunuşunun her zaman için doğrudan fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirilmemesi gereğine de değinilmektedir. Enterokokların gıdalarda sadece yetersiz hijyen indikatörü olarak değil ayrıca gıdanın bir parçası olarak da göz önüne alınması gerektiği belirtilmektedir (Klein 2003). Bununla birlikte enterokoklar diğer pek çok laktik asit bakterileri gibi ısıtma işlemi görmüş et ürünlerinde yüksek sıcaklığa karşı dirençli olma özelliğinden dolayı pastörizasyon sonrası canlı kalarak ya da dilimleme ve paketlenme gibi işlem basamaklarında çapraz kontaminasyona bağlı olarak üründe bozulma yapabilmektedirler. Enterokoklar ayrıca fermente gıdalarda kontaminasyon düzeyini ya da kütleme işleminin yetersizliğini de yansıtmaktadır (Hugas 2003). Bu bakteriler, yukarıda açıklanan istenmeyen özelliklerinin yanında sahip oldukları pek çok yararlı özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde starter, yardımcı kültür (adjunct) ve probiyotik olarak da kullanılmaktadır. Pastörizasyon sıcaklıklarına direnci ve farklı sıcaklıklara ve üreme koşullarına adapte olabilme yeteneği enterokokların özellikle peynir ve et ürünleri gibi fermente gıdaların mikroflorasının önemli bir parçasını oluşturmasını sağlamaktadır. Fermente gıdaların organoleptik özelliklerine katılması ve bakteriyosin (enterosin) üretim yetenekleri enterokokların gıda teknolojisinde kullanımını açısından önem taşımaktadır (Klein 2003). Enterokokların ürettikleri bakteriyosinler ise enterosin olarak isimlendirilmektedir. Enterokokların ürettiği enterosinlerin kullanımı, sucuk fermantasyonunda ve dilimlenmiş vakum paketli pişmiş et ürünlerinde *L. monocytogenes*'in gelişiminin ve laktik asit bakterileri tarafından üründe yapışkan tabaka oluşumunun önlenmesinde ek koruma yöntemi olarak yarar sağlamaktadır. Enterosin oluşturma özelliğindeki enterokoklar geleneksel kimyasal koruyuculara alternatif olarak et ürünlerinde patojenlerin kontrolü için kullanılabilir (Hugas ve ark. 2003).

Bazı suşlarının iyi bilinen yararlı etkilerinin yanında enterokokların en yaygın hastane kaynaklı patojenlerin arasında yer aldığı, özellikle de *E. faecium* ve *E. faecalis*'in fırsatçı patojen olduğu, bakteriyemi ve endokarditisin yanında üriner sistemde ve merkezi sinir sistemi gibi dokularda enfeksiyonlara neden olabildiği bildirilmektedir (İşleroğlu 2008). Gıdaların doğal florasında bulunmasının yanında sahip oldukları fonksiyonel özelliklerden dolayı gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip olan enterokoklar insanlarda bakteriyemi, endokarditis, üriner sistemde ve diğer dokularda enfeksiyonlara yol açabilmekte ve taşıyabilecekleri virülens genleri ve antibiyotik dirençlilik özelliklerinden dolayı önem taşımaktadırlar.

Enterokoklar sığırlarda mastitis de dahil olmak üzere ekonomik önemi olan hastalıklara sebep olabilirler. Çevresel patojen olarak bilinen enterokoklar çevreden hayvana ya da daha fazla olmakla birlikte hayvandan hayvana kolayca bulaşır (Devriese ve ark. 1992). Hayvanların sindirim sisteminde yerleşik doğal flora bakterisi olan bu etkenler, özellikle sağım hijyenine dikkat edilmediği ve altlık temizliğinin düzenli yapılmadığı durumlarda memeleri kolaylıkla enfekte ederek mastitise neden olmaktadır. Meme başından giren enterokoklar meme kanalı boyunca yerleşip kolonize olurlar ve meme bezinde enfeksiyona ilişkin klinik bulgular meydana getirirler. Enterokokların patojenite mekanizmalarında bazı antibiyotiklere direnç özelliklerinin ve sahip oldukları çeşitli virülens faktörlerinin önemli rolü olduğu bilinmektedir (İşleroğlu 2008). Şu anki bilgilerimize göre mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokokların virülens genlerinin, moleküler yöntemler kullanılarak incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. İnsandan insana da bulaşma yeteneği olduğu bilinen hayvansal kökenli enterokokların özellikle subklinik mastitisli süt ve süt ürünleri ile insanlara bulaştığı bildirilmektedir (Tenhagen ve ark. 2006). Bu çalışmada, Aydın ilindeki 38 işletmeden temin edilen 600 mastitisli sütden izole edilen enterokokların potansiyel virülens faktörlerinin belirlenmesi moleküler yöntemler kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, enterokokların başlıca virülens faktörlerinden jelatinaz (*gelE*), adezyonla ilgili protein *EfaA* (*E. faecalis* endokarditis antijen A), cinsiyet hormonları (*cpd*, *cob*, *ccf*), enterokokal yüzey proteini (*esp*), agregasyon faktörü (*aggA*), sitolizinler (*cyIM*, *cyIB*, *cyIA*), hormon salınımını arttıran yüzey proteini (*eep*) genotipik yöntemlerle araştırılmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2. 1. Gereç

#### 2. 1. 1. İzolasyon Örnekleri

Çalışmada 2010-2011 yılları arasında, Aydın İl'inde bulunan özel sektöre ait süt sığırcılığı yapılan 38 işletmedeki 242 inekten, uzman veteriner hekim tarafından alınmış olan, 600 mastitisli süt örneği kullanıldı. Subklinik mastitisli olan ineklerin belirlenebilmesi amacı ile Kalifornia Mastitis Testi (CMT) yapıldı. Çalışmada hepsi laktasyon döneminde olan, son bir ayda antibiyotik tedavisi almamış, en az bir doğum yapmış, 3–9 yaşlı, Holştayn ırkı, fiziksel muayenede anormallik bulunan (meme loblarında şişkinlik, sıcaklık, ağrı, kızarıklık ya da sulu, kanlı, pıhtılı süt gibi) ve CMT ile pozitif reaksiyon (1+, 2+, 3+) veren ineklerin sütleri çalışmaya dâhil edildi. İşletmelerin hepsinde makine ile sağım işlemi yapılmıyordu.

#### 2. 1. 2. Referans suş

Pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (*gelE*, *cylA*, *ccf*, *EfaAfs*, *cylM*, *cpd*, *cylB*, *eep*, *cob* genleri pozitif) (Lanthier ve ark. 2010a), negatif kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. Çalışmada kullanılan her iki standart suş Vet. Hek. Dr. Lale Ataseven (Hatay İl Kontrol Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Laboratuvarı)'den sağlandı.

## 2. 1. 3. Besiyerleri, Ayıraç ve Solusyonlar

### 2. 1. 3. 1. Besiyerleri

Süt örneklerinden selektif olarak *Enterococcus* sp.'nin izolasyonu amacıyla aşağıda içeriği belirtilen Chromocult® Enterococci Broth (EB) (Merck) ve BBL™ Enterococcosel Agar (EA) (BD), suşların pasajlanmasında Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (Merck), organizmaların tuz toleranslarını tespit etmek için % 6.5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB) (Oxoid) ve suşların saklanması için % 20 gliserinli Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Merck) kullanıldı.

#### 2. 1. 3. 1. 1. Chromocult® Enterococci Broth (EB)

Pepton karışımı.....	8,6 g/L
NaCl.....	6,4 g/L
Sodyum azide.....	0,6 g/L
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside (X-GLU)....	0,04 g/L
Tween 80.....	2,2mL/L

Dehidre besiyeri 18,0 g/L olacak şekilde ısıtılarak çözüldü. 5 mL olacak şekilde tüplere dağıtılıp otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanan besiyeri berrak ve sarı renkli olup, pH 'sı 25 °C 'da 7,5±0,2 'dir. Besiyeri bileşiminde bulunan sodyum azid özellikle Gram negatiflerin gelişmesini baskılar. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucopyranoside (X-GLU) 'in parçalanması özel peptonlar ile desteklenir. X-GLU' nun parçalanması sonunda oluşan mavi-yeşil renk oluşumu enterokoklar ve D grup streptokoklar için karakteristiktir.

#### 2. 1. 3. 1. 2. Chromocult® Enterococci Agar (EA)

Pankreatik kazein.....	17 g/L
Hayvansal pepton.....	3 g/L
Maya Ekstraktı.....	5 g/L
Oxgall.....	10 g/L
Eskulin.....	1 g/L
Sodium azide.....	0.25 g/L

Demir amonyum sitrat.....	0.5 g/L
NaCl.....	5 g/L
Sodyum sitrat.....	1 g/L

Dehidre besiyeri 56 g/L olacak şekilde ısıtılarak çözüldü. Karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlandı, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup petrilere döküldü. Besiyeri bileşimindeki fosfatlar, Tween 80 ve seçilmiş peptonlar enterokokların gelişimini destekler. Enterokoklar, besiyerindeki kromojenik substratları parçalayarak kolonilerin siyah-koyu kahverengi almasını sağlar. Bu da enterokokların kolayca saptanmasını sağlar. Sodyum azid ve safra tuzları çoğu refakatçi mikroflorayı baskılar. Enterokok olmayan bakteriler şeffaf, beyaz-sarımsı renkte koloniler oluşturur bunlar enterokokların ürettiği siyah renkten kolayca ayrılırlar.

### **2. 1. 3. 1. 3. Brain Hearth Infusion Agar**

BHIA.....	52 g/L
-----------	--------

Karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanıp, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra, 50 °C'ye kadar soğutulup petrilere döküldü.

### **2. 1. 3. 1. 4. Brain Hearth Infusion Broth**

BHIB.....	37 g/L
-----------	--------

Karışımın pH' sı 7,2-7,4'e ayarlanıp, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra, 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldı.

### **2. 1. 3. 1. 5. Brain Hearth Infusion Broth (BHIB) (%20 gliserinli)**

BHIB.....	3,7 g
Gliserin.....	20 ml
Distile su.....	80 ml

Karışımın pH' sı 7,2-7,4'e ayarlanıp, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra, 500µl miktarda ependorf tüplere dağıtıldı.

### **2. 1. 3. 1. 6. %6.5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB)**

NB..... 8 g/l

NaCl..... 6.5 g

Nutrient Broth bileşenleri, % 6.5 NaCl ilavesi yapılarak çözülmüş, 5ml olarak tüplere dökülmüş, otoklavda steril edilmiş ve bu ortam, organizmaların tuz toleranslarını tespit etmek için kullanılmıştır (Atlas 2004).

### **2. 1. 3. 2. Ayıraç ve Solusyonlar**

#### **2. 1. 3. 2. 1. % 3'lük Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Ticari olarak temin edilen bu çözelti, organizmaların katalaz aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanıldı.

#### **2. 1. 3. 2. 2. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH: 8.0) Buffer**

10X TBE Stok Solusyonu:

Tris Base..... 121.1 g

Borik Asit..... 61.83 g

EDTA..... 5.84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121°C'de 15 dk otoklav edilip, pH 8,0 ayarlanarak buzdolabında saklanır.

0,5X TBE Kullanma Solusyonu:

10X TBE..... 50 ml

Distile su..... 950 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlanır.

#### **2. 1. 3. 2. 3. Gel Loading Buffer (6X)**

Bromfenol Mavisi..... 25 mg

Sükroz ..... 4 g

H<sub>2</sub>O..... 10 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlanır (Anderesson 2011).



## **2. 1. 2. PZR**

### **2. 1. 2. 1. Kullanılan Cihazlar**

PZR 96 örnek kapasiteli Boeco (Almanya) marka kademeli termal döngüleme cihazında elektroforez VWR marka, 64 kuyucuk kapasiteli elektroforez tankında, görüntüleme Vilber Lourmat (Infinity VX2, Almanya) marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

### **2. 1. 2. 2. MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer, dNTP Set**

25mM MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl), 100mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas) kullanıldı.

### **2. 1. 2. 3. Primerler**

Çalışmada kullanılan tüm primerlerin, dizileri, amplicon büyüklükleri, kaynakları ve kullanım amaçları Çizelge 2. 1’de verilmiştir.

### **2. 1. 2. 4. Agarose Jel Hazırlanışı**

Agarose (Sigma).....	1, 1,5 veya 2 g
TBE (0,5X).....	100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatılan karışım, 40-50°C’ye kadar soğutuldu. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

**Çizelge 2. 1.** Kullanılan primerlerler, dizileri, amplikon büyüklükleri, kaynakları ve kullanım amaçları

	Primer	Dizi (5'-3')	Amplikon Uzunluğu (bp)	Kaynak
1	16S20 16S1390	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GACGGGCGGTGTGTACAA	1391	Sghir ve ark. 1998, Suau ve ark. 1999
2	Ent1 Ent2	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112	Ke et al. 1999
3	DDF DDR	CACCTGAAGAAACAGGC ATGGCTACTTCAATTTACAG	475	Vilela ve ark. 2006
4	<i>gel</i> EF <i>gel</i> ER	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	419	Eaton ve Gasson 2001
5	<i>cyl</i> AF <i>cyl</i> AR	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTC	517	Eaton ve Gasson 2001
6	<i>ccf</i> F <i>ccf</i> R	GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT	543	Eaton ve Gasson 2001
7	<i>efaAfs</i> F <i>efaAfs</i> R	GACAGACCCTCACGAATA AGTTCATCATGCTGCTGTAGTA	705	Eaton ve Gasson 2001
8	<i>cyl</i> MF <i>cyl</i> MR	CTGATGGAAAGAAGATAGTAT TGAGTTGGTCTGATTACATTT	742	Eaton ve Gasson 2001
9	<i>cpd</i> F <i>cpd</i> R	TGGTGGGTTATTTTTCAATTC TACGGCTCTGGCTTACTA	782	Eaton ve Gasson 2001
10	<i>cyl</i> BF <i>cyl</i> BR	ATTCTACCTATGTTCTGTTA AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	843	Eaton ve Gasson 2001
11	<i>esp</i> F <i>esp</i> R	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933	Shankar ve ark. 1999
12	<i>eep</i> F <i>eep</i> R	GAGCGGGTATTTTAGTTTCGT TACTCCAGCATTGGATGCT	937	Bittencourt de Marques ve ark. 2004
13	<i>cob</i> F <i>cob</i> R	AACATTCAGCAAACAAAGC TTGTCATAAAGAGTGGTCAT	1,405	Eaton ve Gasson 2001
14	<i>agg</i> AF <i>agg</i> AR	AAGAAAAAGTAGACCAAC AACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	Eaton ve Gasson 2001

### 2. 1. 2. 5. Marker

Marker olarak 100 bp (Vivantis ve Fermentas marka) ve PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı (Fermentas) kullanıldı. PstI Enzimi ile Kesilmiş Lambda Faj DNA'sının Hazırlanışı: 30 µl λ DNA (Fermentas), 30 µl 10X Buffer, 4 µl PstI enzimi (Fermentas), 236 µl enjeksiyonluk distile su karıştırıldı. Bir saat 37°C'de bekledikten sonra 30 µl loading dye eklendi. Her elektroforez reaksiyonu için 7 µl kullanıldı (Anderesson 2011).

### **2. 1. 2. 6. Etidium Bromür**

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka % 1'lik Ethidium Bromür 500 ml 0,5X TBE içerisine 100 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

## **2. 2. Yöntem**

### **2. 2. 1. Örneklerin Alınması**

**2. 2. 1. 1. Süt Örnekleri:** Her süt örneği alınırken, meme başları su ve sünger yardımı ile temizlenip kurulandı ve %70'lik alkol ile silindi. Eller sabunla yıkandıktan sonra eldiven giyilip meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak için ilk birkaç ml süt atılıp (Baştan 2002) steril enjektörler içine 5 ml miktarda alındı. Alınan tüm örnekler soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvar'ına aynı gün getirilip izolasyon çalışmalarına başlandı.

### **2. 2. 2. Enterokok İzolasyonu**

Mastitisli sığırlardan alınan süt örnekleri en kısa sürede laboratuvara getirildikten sonra örnekler selektif enterokok M buyyona öze dolusu inokule edildi. Buyyonlar aerobik koşullarda 37°C'de, besiyerinin parlak sarı rengi mavi-yeşil renge dönüşünceye kadar, yaklaşık 24-72 saat, bekletildi. Renk değişimi besiyerinde enterokok üremesinin göstergesi olarak değerlendirildi. Mavi-yeşil renk olan buyyonlardan bir öze dolusu alınarak enterokokosel agara ekimleri yapıldı. Besiyeri 37°C'de aerobik koşullarda 24-48 saat süreyle inkube edildi. Sürenin sonunda üreyen siyah-koyu kahverengi koloniler *Enterococcus* sp. yönünden incelenmek üzere EA'a pasajlandı.

### **2. 2. 3. Enterokok İdentifikasyonu**

Enterokokların cins düzeyinde ayrımı için ekilen selektif besiyerinde siyah-koyu kahverengi üreyen *Enterococcus* sp. şüpheli kolonilere Gram boyama, % 6.5 tuz içeren NB'da üreme ve lam üzerinde katalaz testleri yapıldı (Lanthier ve ark. 2010b). Gram pozitif kok şeklinde görülen, % 6.5 tuz içeren NB'da üreyebilen ve katalaz negatif olan kolonilerin identifikasyonları için EA pasajları yapıldı ve 37°C'de 24-48 saat inkube edildi. Süre sonunda

tüm şüpheli koloniler moleküler yöntemler kullanılarak identifiye edilinceye kadar -20°C'de % 20 gliserinli BHIB içerisinde saklandı.

**2. 2. 3. 1. Katalaz Testi:** Bu test mikroorganizmalar tarafından sentezlenen katalaz (hidrojen peroksit oksido redüktaz) enziminin varlığını saptamak amacıyla yapıldı. Enzim hidrojen peroksidi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), su (H<sub>2</sub>O) ve oksijene (O<sub>2</sub>) ayırıştırır. Mikroorganizmaların taze yatık TSA kültürleri üzerinden öze yardımıyla alınarak lam üzerine yayılması ve %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunun lam üzerine damlatılmasıyla hava kabarcıklarının oluşup oluşmadığının kontrolü esasına dayanır (Temiz 2000).

**2. 2. 3. 2. % 6.5 NaCl'de Büyüme:** Enterokoklar için ayırt edici testlerden biridir ve identifikasyonda önemlidir. %6.5 oranında NaCl içeren NB ortamına ve aynı şekilde NaCl içermeyen NB ortamına da inokule edilen mikroorganizmaların, 24 saatlik inkübasyondan sonra büyüme kontrol edildi. Nutrient broth'daki kadar bulanıklık gözlenen NaCl'lü NB içeren tüplerdeki suşlar için sonuç pozitif olarak kaydedildi ve bu türlerle identifikasyona devam edildi. Kontrol mikroorganizma olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kullanıldı (Gerhardt ve ark.1994).

## **2. 2. 2. İzolatların İdentifikasyonunda Kullanılan Testler**

İzolatların identifikasyonunda aşağıdaki moleküler testler uygulandı:

i) 16S PZR: Örneklerde DNA izolasyonu sonrasında, bakteriyel DNA izolasyonu yapıp yapılamadığının kontrolü için universal 16S primerleri kullanılarak bakteri DNA'sı varlığı saptandı.

ii) *Enterococcus* sp. PZR: Bakteriyel DNA izolasyonun başarılı bir şekilde yapılabildiği belirlendikten sonra örneklerden cins düzeyinde identifikasyonun yapılabilmesi için kullanıldı.

iii) *E. faecalis* PZR: *E. faecalis* izolatlarının tür düzeylerinde belirlenmesi için kullanıldı.

iii) Virulens Gen PZR: Tür düzeyinde *E. faecalis* olarak belirlenen izolatlarda 11 virulens gen (*gelE*, *cylA*, *ccf*, *efaAfs*, *cylM*, *cpd*, *cylB*, *esp*, *eep*, *cob*, *aagA*) varlığı spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR'ları ile belirlendi.

### **2. 2. 2. 1. DNA İzolasyonu**

Öncelikle enterokok izolatlarından PZR'da kullanılmak üzere DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (InstaGene Matrix, Katalog No: 732-6030, BIO-RAD, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

\*Bir öze dolusu stafilokok kültürü 1 ml steril bir ependorf tüp içerisinde steril enjeksiyonluk distile su ile süspanse edildi. 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.

\*200 µl InstaGene matrix pelet üzerine ilave edildikten sonra 56°C'de yarım saat inkübe edildi. Yüksek hızda 10 sn vortekslendi. Tüpler benmaride 100°C'de 8 dk inkübe edildi.

\*Yüksek hızda 10 sn vortekslendi. 12.000 rpm.de 3 dk santrifüj yapıldı. 30 µl'lik bir PZR reaksiyonu için 2 µl süpernatant kullanıldı.

### **2. 2. 2. 2. DNA'nın Elektroforezi**

Agaroz jel elektroforezi, 5µg/ml etidyum bromid'li %1 agaroz içeren mini jelde gerçekleştirildi. Jel hazırlanmasında ve elektrofrezde TBE tamponu kullanıldı 5µl DNA solüsyonu, 2µl yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 50V'ta 45 dakika süreyle yürütüldü. Elektrofrez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu gösterdi (Sambrook ve ark. 1989).

### **2. 2. 2. 3. DNA'nın Saflık Kontrolü ve Miktar Tayinleri**

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektrofrez ile kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometre ile yapıldı (Sambrook ve ark. 1989). Spektrofotometrede DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorbanları hesaplandı (OD260 ve OD280) ve bu değerler

arasındaki oran kullanılarak DNA'nın saflığı kontrol edildi. OD260/OD280 oranının 1.8-2.0 arasında olması DNA'nın saf olduğunu, bu aralıktan daha aşağıda olması RNA kontaminasyonu olduğunu ve bu aralıktan daha yukarıda olması da protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir. Saflık kontrolleri yapılan genomik DNA miktarlarının hesaplanması için OD260 değeri kullanıldı ve DNA miktarları;  $DNA(\mu g/ml) = OD260 \times Seyreltme\ Oranı \times 50$  formülü ile hesaplandı (Turner ve ark. 2004).

### 2. 2. 3. PZR

Tüm PZR reaksiyonlarında master mikserler aşağıdaki gibi hazırlandı.

Master Mikslerin Hazırlanışı: Tüm PZR reaksiyonlarında bir örnek için PZR amplifikasyonu 30 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, magnesium klorür (MgCl<sub>2</sub>) 2 mM, dNTP 0,2 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polimerase 1,5 U olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2. 2.'de belirtilmiştir.

**Çizelge 2. 2.** Mastermiksin hazırlanma oranları

Malzeme (Konsantrasyon)	İstenen Son Konsantrasyon	10 örnek (µl)
Buffer (10X)	1 X	30
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 mM	24
dNTP (10 mM)	0,2 mM	6
Primer-F (100 pmol)	0.4 pmol	1,2
Primer-R (100 pmol)	0.4 pmol	1,2
Taq Polimeraz (5 U)	0,3 µl/ 50 µl	1,8
dH <sub>2</sub> O	Son miktara tamamlanır	235,8
<b>TOPLAM</b>		300

Mastermikserler hazırlandıktan sonra 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 28'er µl hazırlanan mastermikserden ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. 16S, *Enterococcus* sp., *E. faecalis* ve *virulens* genlerinin tespiti için kullanılan PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı sırası ile Çizelge 2. 3., Çizelge 2.4., Çizelge 2. 5. ve Çizelge 2. 6.'da gösterilmiştir.

**Çizelge 2. 3.** 16S PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94	5 dk
Denatürasyon	35	94	30 sn
Bağlanma		55	30 sn
Uzama		72	90 sn
Son Uzama	1	72	10 dk

**Çizelge 2. 4.** *Enterococcus* sp. PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94	4 dk
Denatürasyon	30	94	30 sn
Bağlanma		55	30 sn
Uzama		72	30 sn

**Çizelge 2. 5.** *E. faecalis* PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94	4 dk
Denatürasyon	30	94	30 sn
Bağlanma		53	30 sn
Uzama		72	30 sn
Son Uzama	1	72	5 dk

**Çizelge 2. 6.** *gelE, cylA, ccf, EfaAfs, cylM, cpd, cylB, eep, cob* virulens genlerinin PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94	5 dk
Denatürasyon	35	94	30 sn
Bağlanma		54	30 sn
Uzama		72	90 sn
Son Uzama	1	72	10 dk

**Çizelge 2. 7.** *esp* ve *aggA* virulens genlerinin PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94	5 dk
Denatürasyon	35	94	30 sn
Bağlanma		57	30 sn
Uzama		72	90 sn
Son Uzama	1	72	10 dk

### **2. 2. 3. 1. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklmesi**

6x loading dye boyasından pipet yardımıyla alınıp her bir örnek için 1 µl kadar dağıtıldı, daha sonra elde edilen 5 µl PZR ürünleriyle loading dye karıştırıldı. Oluşturulan karışımdan 6 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyonadaki kuyucuğa yüklendi.

### **2. 2. 3. 2. Yürütme**

Hazırlanan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 100V 400A akımda 30 dakika yürütüldü.

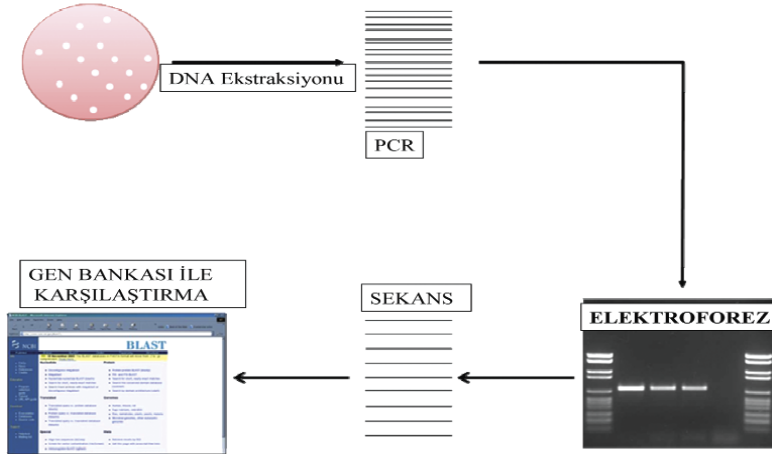
### **2. 2. 3. 3. Görüntüleme ve Değerlendirme**

Yüz voltta otuz dakikalık elektroforez süresinin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde içerisinde etidyum bromür olan tanka konuldu. Burada 15 dakika boyanmaya bırakıldı. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. Değerlendirme, jel UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PZR için ayrı daha önce bildirildiği şekilde (Çizelge 2. 1.) yapıldı.

### **2. 2. 4. Sekans Analizi**

Saha izolatlarımızda *esp* ve *aggA* virülens genleri varlığını belirlemek için, uygun primerler kullanılarak çoğaltılan DNA'lardan bazıları sekans analizine tabi tutuldular. Elde edilen amplikonlar sekans analizleri için Macrogen (Korea) firmasına gönderildi. Firma saflaştırmayı takiben ABI Primse cihazı ile sekans analizini gerçekleştirdi. Elde edilen *esp* ve *aggA* sekansları pozitif kontrol olarak kullanmak için gen bankası ile karşılaştırıldı. Bu amaçla National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanıldı. Bakterilerden gen sekansına dayalı moleküler identifikasyonunun yapıışı Resim 2. 1.'de gösterilmiştir.



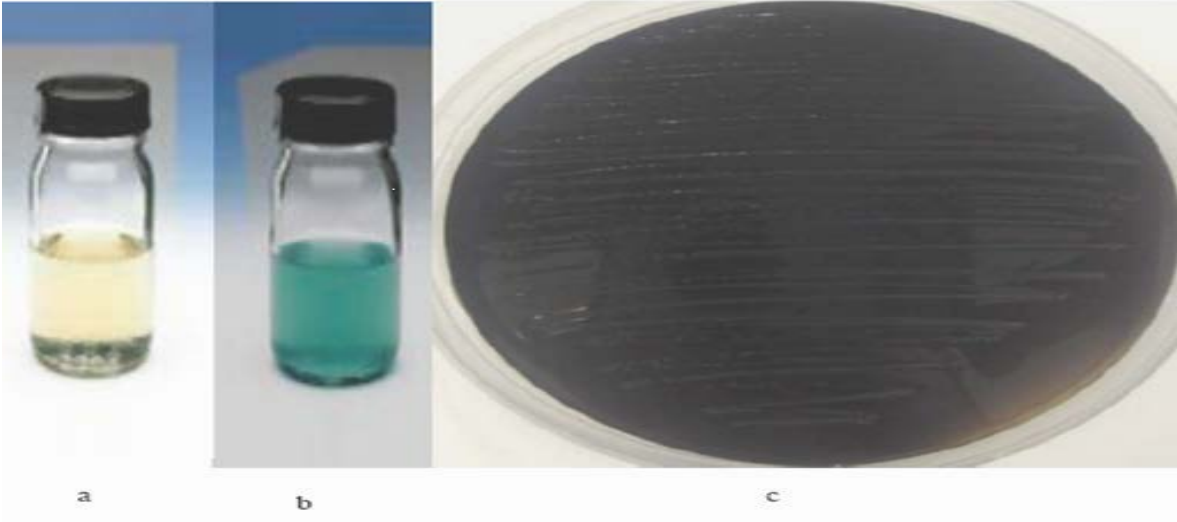


**Resim 2. 1.** Bakterilerin gen sekansına dayalı moleküler identifikasyonu

## 3. BULGULAR

### 3. 1. İzolasyon

Çalışmada 2010-2011 yılları arasında, Aydın İl'inde bulunan özel sektöre ait süt sığır yetiştiriciliği yapılan 38 işletmedeki 242 ineekten alınan 600 mastitisli süt örneğinin incelenmesi sonucunda, EA'da referans suşla (*E. faecalis* ATCC 29212) uygun görünümdeki (Resim 3. 1.) bakteri kolonileri seçilerek toplam 96 enterokok şüpheli suş izole edildi.

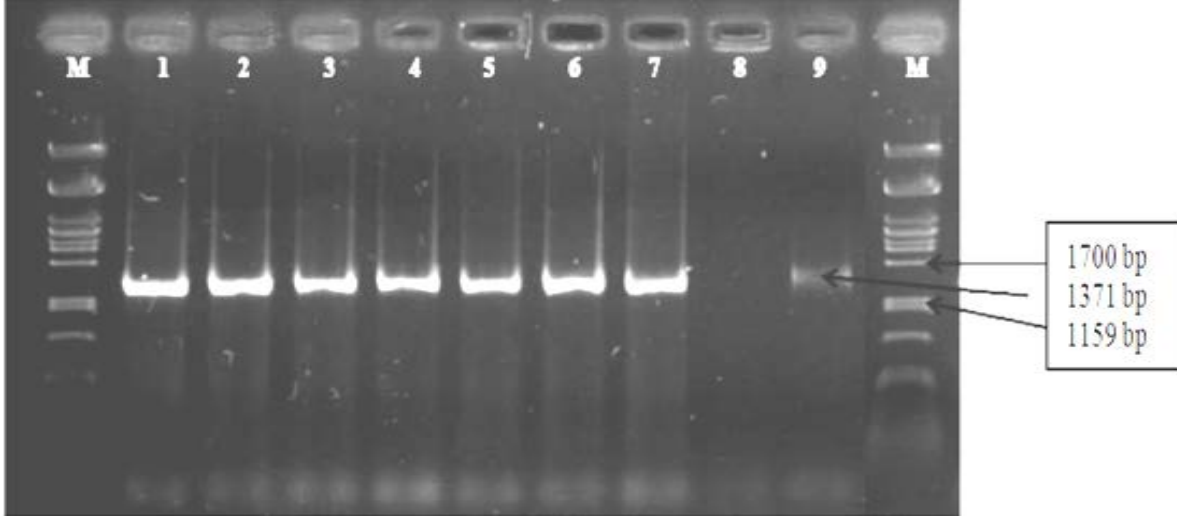


**Resim 3. 1.** a. Ekim yapılmamış EB b. EB'da *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun görünümü c. EA'da *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun görünümü

Bu izolatların hepsi % 6.5 tuzlu NB'da üreyebilen, katalaz negatif, Gram pozitif kok görünümünde oldukları belirlendikten sonra çalışmaya dâhil edildiler.

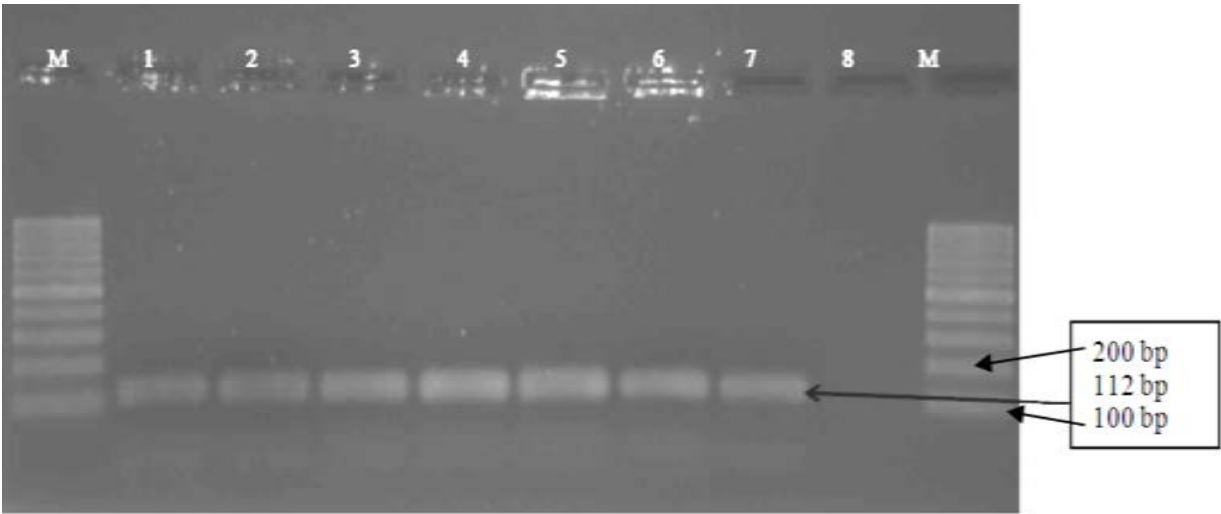
### 3. 2. PZR

**3. 2. 1. 16S:** 16S PZR sonucunda tüm bakterilerin DNA ekstraksiyonlarının yapıldığını gösteren 1361 bp uzunluğunda ampikon elde edildi (Resim 3. 2.) .



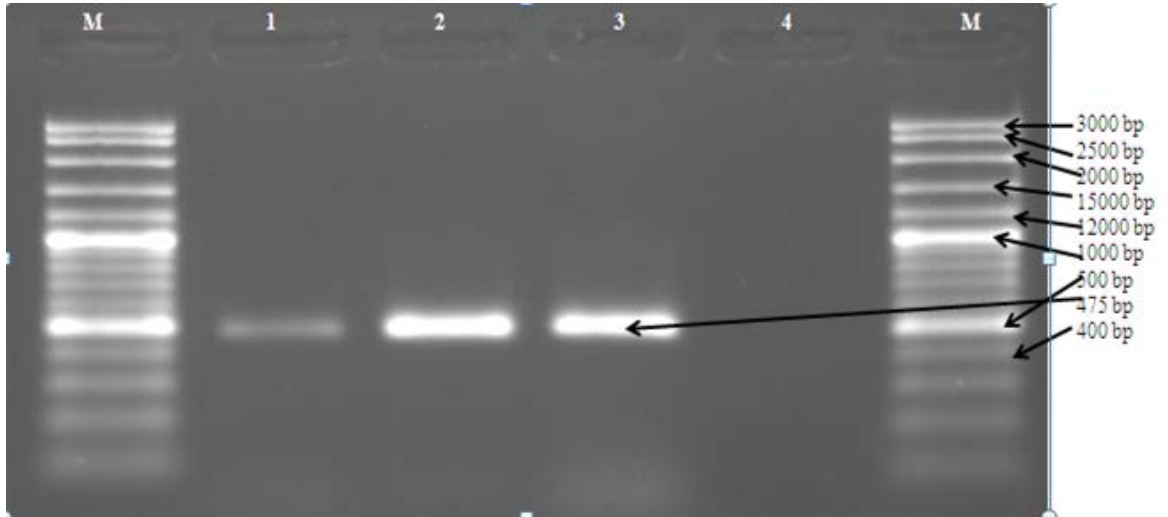
**Resim 3. 2.** 16S universal primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR **M:** Marker (PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı) **1-7:** *Enterococcus* sp. izolatları, **8:** Negatif Kontrol (DNA'sız master miks) **9:** Pozitif Kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212).

**3. 2. 2. *Enterococcus* sp.:** İzole ve identifiye edilen 96 izolata spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında 112 bp uzunluğunda amplicon elde edilen 96 izolata enterokok olduğu belirlendikten sonra *E. faecalis* izolatlarının belirlenebilmesi için *E. faecalis* PZR gerçekleştirildi.



**Resim 3. 3.** *Enterococcus* sp. PZR elektroforez görüntüsü **1-6:** *Enterococcus* sp. saha izolatları **7:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) **8:** Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 100 bp DNA ladder (Vivantis)

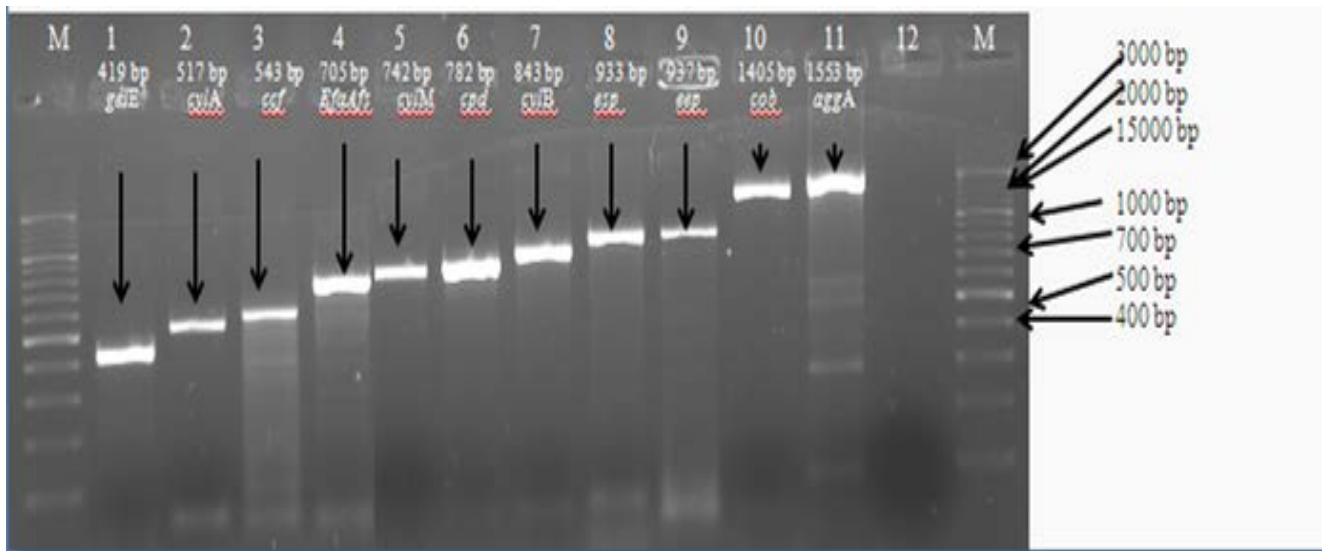
**3. 2. 3. *E. faecalis*:** İzole ve identifiye edilen 96 izolata spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında 475 bp uzunluğunda amplicon elde edilen 56 izolata (% 58.3) *E. faecalis* olduğu belirlendikten sonra virulens genleri incelendi (Resim 3. 4.).



**Resim 3. 4.** *E. faecalis* PZR elektroforez görüntüsü **1-2:** *E. faecalis* saha izolatları **3:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) **4:** Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 100 bp DNA ladder (Vivantis)

### 3. 2. 4. Virulens genlerinin incelenmesi

İzole edilen 56 *E. faecalis* suşunun içerdikleri virulens genlerinin verildiği PZR görüntüsü Resim 3. 5.'de verilmiştir. Her bir virulens genlerini içeren, en az bir izolat bulunmakta idi. Pozitif kontrol olarak kullandığımız *E. faecalis* ATCC 29212 suşu incelediğimiz virulens genlerinden *gelE*, *cylA*, *ccf*, *EfaAfs*, *cylM*, *cpd*, *cylB*, *cob*, *eep* genleri pozitifdir (Lanthier ve ark. 2010a). Pozitif kontrol suşu temin edilemeyen iki gen için (*esp*, *aggA*) pozitif olarak tespit edilen saha izolatları sekanslandı ve sekans sonucu olarak bu genleri taşıyan izolatlar pozitif kontrol suşu olarak kullanıldılar (Resim 3. 6., Resim 3. 7.)



**Resim 3. 5.** Virulens gen PZR. **1.** *gelE* **2.** *cylA* **3.** *ccf* **4.** *EfaAfs* **5.** *cylM* **6.** *cpd* **7.** *cylB* **8.** *esp* **9.** *eep* **10.** *cob* **11.** *aggA* gen pozitif izolatlar **12.** Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 100 bp DNA ladder (Vivantis)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value
AF034779.1	Enterococcus faecalis surface protein precursor, gene, complete cds	1351	1351	87%	0.0
AY032999.1	Enterococcus faecalis putative pathogenicity island, partial sequence	1351	1351	87%	0.0
AF454824.1	Enterococcus faecalis pathogenicity island, complete sequence	1351	1351	87%	0.0
AF329367.1	Enterococcus faecalis putative pathogenicity island, partial sequence	1351	1351	87%	0.0
CP002491.1	Enterococcus faecalis 62, complete genome	1334	1334	87%	0.0
JF826520.1	Enterococcus faecalis strain 95A enterococcal surface protein (esp)	1330	1330	86%	0.0
CP003351.1	Enterococcus faecium Aus0004, complete genome	1232	1232	86%	0.0
AY322150.1	Enterococcus faecium isolate F300 pathogenicity island, partial sequence	1232	1232	86%	0.0
AY322499.1	Enterococcus faecium isolate F734 putative enterococcal surface protein	1232	1232	86%	0.0
AJ487981.1	Enterococcus faecium esp gene for putative surface protein precursor	1232	1232	86%	0.0
AF444000.1	Enterococcus faecium surface protein Esp variant (esp) gene, esp-2	1230	1230	80%	0.0
AF443999.1	Enterococcus faecium surface protein Esp variant (esp) gene, esp-1	1230	1230	80%	0.0
AF417507.1	Enterococcus faecium Esp variant (esp) gene, partial cds	1230	1230	80%	0.0

Resim 3. 6. *esp* geni sekans sonucu

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
X17214.1	Enterococcus faecalis asa1 gene for aggregation substance and C	2117	2117	81%
AF454824.1	Enterococcus faecalis pathogenicity island, complete sequence	2111	2111	79%
AE016830.1	Enterococcus faecalis V583, complete genome	2111	3076	79%
GU046453.1	Enterococcus faecalis strain F99 plasmid pRFF99, complete sequence	2100	2100	81%
AE016831.1	Enterococcus faecalis V583 plasmid pTFE2, complete sequence	2100	2100	81%
AY855841.2	Enterococcus faecalis plasmid pCF10, complete sequence	2087	2087	81%
AB374546.1	Enterococcus faecalis plasmid pMG2200 DNA, complete sequence	2004	2004	84%
FP929058.1	Enterococcus sp. 7176 draft genome	1947	1947	85%
CP002494.1	Enterococcus faecalis 62 plasmid pF62nC, complete sequence	1860	1860	84%
U91527.1	Enterococcus faecium plasmid pHKK701 aggregation substance (ash)	1799	1799	81%
X62656.1	E.faecalis plasmid pPD1 asp1 and URFs pd57, pd125 and pd113 gene	942	942	79%
AB563188.1	Enterococcus faecalis plasmid pTW9 DNA, complete sequence	318	318	20%

Resim 3. 7. *aggA* geni sekans sonucu

İzolatların virulens genlerinin toplu sunumu Çizelge 3.1.'de detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 3. 1. İzolatların virulens genlerinin toplu sunumu

	<i>gel</i> E	<i>cyl</i> A	<i>ccf</i>	<i>efa</i> Afs	<i>cyl</i> M	<i>cpd</i>	<i>cyl</i> B	<i>esp</i>	<i>eep</i>	<i>cob</i>	<i>agg</i> A	Pozitif Virulens Gen/ Genleri (Sayısı)
1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>efaAfs</i> (1)
2	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>gelE</i> , <i>ccf</i> , <i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> , <i>esp</i> , <i>cob</i> (6)
3	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE</i> , <i>ccf</i> , <i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> , <i>esp</i> (5)
4	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE</i> , <i>ccf</i> , <i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> , <i>esp</i> (5)
5	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> (2)
6	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> (2)
7	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> (2)
8	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	<i>gelE</i> , <i>ccf</i> , <i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> , <i>esp</i> , <i>aggA</i> (6)
9	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>gelE</i> , <i>ccf</i> , <i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> , <i>esp</i> , <i>cob</i> (6)
10	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> (2)
11	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE</i> , <i>ccf</i> , <i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> (4)
12	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	<i>gelE</i> , <i>ccf</i> , <i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> , <i>esp</i> , <i>eep</i> , <i>cob</i> , <i>aggA</i> (8)
13	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>ccf</i> , <i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> , <i>esp</i> (4)
14	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> , <i>esp</i> (3)
15	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	<i>gelE</i> , <i>ccf</i> , <i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> , <i>esp</i> , <i>eep</i> (6)
16	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	<i>gelE</i> , <i>ccf</i> , <i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> , <i>esp</i> , <i>eep</i> (6)
17	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>gelE</i> , <i>ccf</i> , <i>efaAfs</i> , <i>cpd</i> , <i>esp</i> , <i>eep</i> , <i>cob</i> (7)

18	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>gelE, efaAfs, cpd, esp, eep, cob</i> (6)
19	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp, eep, aggA</i> (7)
	<i>gelE</i>	<i>cylA</i>	<i>ccf</i>	<i>efaAfs</i>	<i>cylM</i>	<i>cpd</i>	<i>cylB</i>	<i>esp</i>	<i>eep</i>	<i>cob</i>	<i>aggA</i>	Pozitif Virulens Gen/ Genleri (Sayısı)
20	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp</i> (5)
21	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd</i> (4)
22	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cylM, cpd, esp</i> (5)
23	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd</i> (4)
24	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp</i> (5)
25	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd</i> (3)
26	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd, esp</i> (4)
27	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd, esp</i> (4)
28	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>gelE, cylA, efaAfs</i> (3)
29	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd</i> (4)
30	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, cob</i> (5)
31	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp</i> (5)
32	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd</i> (3)
33	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd</i> (3)
34	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, esp</i> (3)
35	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd, esp</i> (4)
36	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, cpd</i> (2)
37	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd</i> (4)
38	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd, esp</i> (4)
39	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, ccf, cpd, esp</i> (4)
40	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd, esp</i> (4)
41	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>gelE, efaAfs</i> (2)
42	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd</i> (3)
43	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp</i> (5)
44	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, cpd</i> (2)
45	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp</i> (5)
46	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd, esp</i> (4)
47	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd</i> (3)
48	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd</i> (3)
49	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd</i> (3)
50	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd, esp</i> (4)
51	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd</i> (3)
52	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd, esp</i> (4)
53	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	<i>gelE, efaAfs, cpd, aggA</i> (4)
54	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>gelE, efaAfs</i> (2)
55	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, efaAfs, cpd</i> (3)
56	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd</i> (4)
Toplam (%)	49 87.5	1 1.8	24 42.8	53 94.6	1 1.8	51 91.0	0 0	29 51.7	6 10.7	6 10.7	4 7.1	

Toplam 56 *E. faecalis* izolatının virulens genlerinin incelenmesi sonucunda sırasıyla 53 (% 94.6) *efaAfs*, 51 (% 91.0) *cpd*, 49 (% 87.5) *gelE*, 29 (% 51.7) *esp*, 24 (% 42.8) *ccf*, 6 (% 10.7) *cob*, 6 (% 10.7) *eep*, 4 (% 7.1) *aggA*, 1'er izolatın (% 1.8) *cylA* ve *cylM* genleri taşırken hiçbir izolatın *cylB* geni taşımadığı tespit edildi. Herhangi bir virulens geni taşımayan izolat mevcut değildi (Çizelge 3. 1.).

**Çizelge 3. 2.** İzolatların virulens genotiplerinin dağılımı

Virulens gen genotip sayısı	Virulens gen sayısı	Taşınanı virulens gen/genleri	İzolat sayısı	(% )
1	1	<i>efaAfs</i>	1	1.8
2	2	<i>efaAfs, cpd</i>	4	7.2
3	2	<i>gelE, cpd</i>	2	3.6
4	2	<i>gelE, efaAfs</i>	2	3.6
5	3	<i>efaAfs, cpd, esp</i>	1	1.8
6	3	<i>gelE, efaAfs, cpd</i>	9	16.0
7	3	<i>gelE, cyla, efaAfs</i>	1	1.8
8	3	<i>gelE, efaAfs, esp</i>	1	1.8
9	4	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd</i>	6	10.7
10	4	<i>gelE, ccf, cpd, esp</i>	1	1.8
11	4	<i>ccf, efaAfs, cpd, esp</i>	1	1.8
12	4	<i>gelE, efaAfs, cpd, aggA</i>	1	1.8
13	4	<i>gelE, efaAfs, cpd, esp</i>	8	14.3
14	5	<i>gelE, efaAfs, cylM, cpd, esp</i>	1	1.8
15	5	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp</i>	7	12.5
16	5	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, cob</i>	1	1.8
17	6	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp, aggA</i>	1	1.8
18	6	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp, cob</i>	2	3.6
19	6	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp, eep</i>	2	3.6
20	6	<i>gelE, efaAfs, cpd, esp, eep, cob</i>	1	1.8
21	7	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp, eep, aggA</i>	1	1.8
22	7	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp, eep, cob</i>	1	1.8
23	8	<i>gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp, eep, cob, aggA</i>	1	1.8
Toplam			56	

İncelenen izolatların içerdikleri virulens genlerinin sayısına bakıldığında ise sırasıyla: bir, iki, üç, dört, beş, altı, yedi, sekiz virulens gen içeren 1 (% 1.8), 8 (% 14.3), 12 (% 21.4), 17 (% 30.3), 9 (% 16.0), 6 (% 10.7), 2 (% 3.6), 1 (% 1.8) suş belirlendi (Çizelge 3. 2.). Virulens genlerinin dağılımına bakıldığında ise “*gelE, efaAfs, cpd*” genlerini birlikte taşıyan 9 (% 16,0), izolat bulunurken; bunu, “*gelE, efaAfs, cpd, esp*” 8 (% 14.3), yedi (% 12.5) “*gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp*”, altı (% 10.7) “*gelE, ccf, efaAfs, cpd*”, dört (% 7.2) “*efaAfs, cpd*” izolat izledi. İkişer izolat (% 3.6) “*gelE, cpd*”, “*gelE, efaAfs*”, “*gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp, cob*”, “*gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp, eep*”, birer izolat ise “*efaAfs*”, “*efaAfs, cpd, esp*”, *gelE*, “*cyla, efaAfs*”, “*gelE, efaAfs, esp*”, “*gelE, ccf, cpd, esp*”, “*ccf, efaAfs, cpd, esp*”, “*gelE, efaAfs, cpd, aggA*”, “*gelE, efaAfs, cylM, cpd, esp*”, “*gelE, ccf, efaAfs, cpd, cob*”, “*gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp, aggA*”, “*gelE, efaAfs, cpd, esp, eep, cob*”, “*gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp, eep, aggA*”, “*gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp*,

*eep, cob*”, “*gelE, ccf, efaAfs, cpd, esp, eep, cob, aggA*” genlerini birlikte taşıyordu. Toplam 23 virulens genotipi belirlendi.

## 4. TARTIŞMA

Enterokoklar, birçok antibiyotiğe karşı gerek intrinsik, gerekse kazanılmış direnç göstererek sınırlı tedavi seçeneğine sahip olan, özellikle glikopeptid grubu antibiyotiklere direnci mobil genetik elementlerle diğer bakterilere kolaylıkla transfer edebilen ve intestinal florada asemptomatik persistent kolonizasyon göstererek endojen kökenli infeksiyonlara yol açabilen ve son yıllarda hastane enfeksiyonlarında ki önemi de giderek artan mikroorganizmalardır. Enterokoklara karşı ilgiyi arttıran önemli nedenlerden birisi de, yüksek letalitelere karşın, patojeniteyi belirleyen virulens faktörleri üzerine yapılan çalışmaların yetersizliğidir. Bu sebeple, enterokokların virulens faktörleri üzerine yapılacak olan her çalışma, patogenezlerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Bu nedenle gerçekleştirilmiş olan bu çalışmada, sığır mastitis orjinli sütlerden izole edilen *E. faecalis* suşlarının potansiyel virulens faktörlerinin (jelatinaz [*gelE*], adezyonla ilgili protein [*EfaA*], cinsiyet hormonları [*cpd, cob, ccf*], enterokokal yüzey proteini [*esp*], agregasyon faktörü [*aggA*], sitolizinler [*cyIM, cyIB, cyIA*], hormon salınımını arttıran yüzey proteini [*eep*]) moleküler yöntemler kullanılarak incelenmesi amaçlandı.

Laboratuvarlarda bakteriyel mastitis etkenlerinin identifikasyonu için genellikle izolatların fenotipik özelliklerden yararlanılıp, biyokimyasal testlerle sonuca gidilmektedir. Ancak biyokimyasal testler kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik identifikasyonun mastitise neden olan enterokoklar gibi bazı bakteriyel patojenlerin identifikasyonu için çok güvenilir olmadığı ve moleküler doğrulama gerektirdiği bildirilmektedir (Devriese ve ark. 1999, Bensalah ve ark. 2006). Bu nedenle de yapılan pek çok çalışmada mastitis kökenli enterokok izolatları sadece izolasyon aşamasında kalmış, izolatların tür düzeyinde identifikasyonuna gidilmemiştir (McDonald ve McDonald 1976, Park ve ark. 2007). Bu çalışmada da izolatlar fenotipik olarak cins düzeyinde identifiye edildikten sonra, cins ve tür düzeyinde doğrulama amacıyla moleküler yöntemler kullanılmıştır. PZR ile *Enterococcus* sp. olarak belirlenen 96



izolatın 56'sının *E. faecalis* olduğu (% 58.3) identifiye edilmiştir. Mastitis izolatu olan enterokokların identifikasyonları ile ilgili farklı yıllarda yapılan *Enterococcus* sp. ve *E. faecalis* izolasyon oranının farklılık göstermektedir. Aastrup ve ark. (2002) mastitis izolatu olan enterokoklarda *E. faecium*'un yanında *E. avium*'u da identifiye ederek, bu etkenlerinde mastitislerden izole edilebileceğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise incelenen 75 adet enterokok suşu içerisinde % 81.3 *E. faecium*, % 18.6 *E. avium* identifiye edilirken *E. faecalis* bulunmadığı bildirilmiştir. Petersson-Wolfe ve ark. (2007) izole ettikleri enterokokların % 3.0'ünün, Jayarao ve ark. (1992) % 8.3'ünün, Devriese ve ark. (1999) % 25.1'inin, Watts (1988) % 36.6'sının, Wolfgang ve ark. (2009) % 44.4'ünü, Nam ve ark. (2009) % 44.9'unu, Kuyucuoğlu (2011) % 53.4, Tenhagen (2006) % 54.0'ünün *E. faecalis* olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmanın temel konusu her ne kadar mastitisli sığır sütlerindeki enterokok sıklığını belirlemek olmamakla birlikte; çalışmada kullanılacak olan suşların sağlanabilmesi için izolasyon çalışmaları yapıldı ve bunun sonucunda da, izole edilen enterokok suşları içerisindeki *E. faecalis* izolasyon oranı diğer çalışmaların hepsinden yüksek (% 58.3) olarak belirlendi. Çalışmamızda identifikasyon işlemleri (izole edilen enterokok suşları hem cins, hem tür düzeyinde) spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR ile gerçekleştirildiğinden genotipik yöntem olan bu test oldukça güvenilirdir. Çalışmalar arasındaki izolasyon oranının çok değişik olması; yöresel farklılıklardan ya da kullanılan izolasyon identifikasyon yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Son yıllarda mastitislerden izole edilen enterokokları moleküler olarak cins ve tür düzeyinde identifikasyonlarını yapmak için birçok araştırmacı tarafından PZR yöntemi kullanılmıştır (Bensalah ve ark. 2006, Nam ve ark. 2009). Sonuç olarak, yöremizde enterokokların mastitislerin etiyolojisinde önemli rol oynadığı, bu etkenlerin cins ve tür düzeyinde identifikasyonlarının yapılmasında spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR yönteminin yararlı olduğu görülmüştür. Ayrıca farklı işletmelerden ya da bölgelerden izole edilen suşların kısa sürede tür düzeyinde belirlenebilmesi için PZR yönteminin kullanımının uygun olabileceği görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda, daha fazla izolatu, kısa sürede identifikasyonlarının yapılabilmesi ile enterokokların epidemiyolojisi hakkında daha geniş veriler elde edilmesine yol açacağı ve mastitis etiyolojisinde önem kazanan enterokokların daha ileri tekniklerle ve daha güvenilir bir şekilde araştırılmasının da süt sığırcılığı ve ekonomisine katkı sağlayacağı belirlenmiş ve bu bulgular enterokok etkenlerinin inek mastitislerindeki önemini ve rolünü gösterilmiştir.

Enterokoklar hem insan hem de hayvanların normal floralarında buldukları için, yıllarca apatojen mikroorganizmalar olarak kabul edilmişlerdir. Ancak, mikroorganizmaların yol açtıkları infeksiyonlarda yüksek letaliteli, virulens faktörlerinin incelenmesi gerekliliğini doğurmuştur. İnsan ve hayvanlarda doğal flora üyesi olarak bulunan enterokoklar, günümüzde, insanlarda başta üriner sistem enfeksiyonu olmak üzere birçok nozokomiyal enfeksiyonun en yaygın görülen etkenlerindedir (Vankerckhoven ve ark. 2008, Ozmen ve ark. 2010). Sığırlarda ise önemli mastitis etkeni olarak bilinmektedir (Devriese ve ark. 1999, Bensalah ve ark. 2006). Enfeksiyonlardan sorumlu en az 12 enterokok türünün varlığına rağmen en sık *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerine rastlanmaktadır. Enterokokların nozokomiyal olan hastalardan izolasyon oranı yıllar içerisinde düzenli artış göstermekte olup son yıllarda saptanma sıklıkları ikinci sıraya yükselmiştir. Tüm dünyada özellikle nozokomiyal enterokok suşlarında giderek artan çoklu antimikrobiyal direnç gelişimi, ciddi sorunlara neden olmaya başlamıştır (Sood ve ark. 2008). Enterokoklar, birçok beta-laktam antibiyotiğe ve aminoglikozidlere intrinsik olarak ya dirençli ya da toleranslıdır (Billström ve ark. 2008). Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, direnç genlerini içeren transpozon veya plazmidlerin kazanılmasıyla veya mutasyonlarla olmaktadır. Enterokokların antibiyotik direnci ile ilgili konularda yapılan çok sayıdaki çalışmaya rağmen, virulens faktörleri ve patojenite mekanizmaları konularında yapılan çalışmalar yetersiz kalmaktadır (Vergis ve ark. 2002). Özellikle mastitise neden olan enterokokların virulens faktörlerinin moleküler yöntemlerle incelendiği bir çalışmaya literatürlerde rastlanılmamıştır. Enterokokların virulensinde, genomda bulunan patojenite adaları ve plazmidlerde kodlanan virulens genleri rol oynar. Bu bakterilerin başlıca virulens faktörleri arasında; jelatinaz (*gelE*) (Su ve ark. 1991), adezyonla ilgili protein *EfaA* (*E. faecalis* endokarditis antijen A) (Lowe ve ark. 1995), cinsiyet hormonları (*cpd*, *cob*, *ccf*) (Ember ve ark. 1989, Clewell ve ark. 2000), enterokokal yüzey proteini (*esp*) (Shankar ve ark. 1999), agregasyon faktörü (*aggA*) (Galli ve ark. 1990), sitolizinler (*cylM*, *cylB*, *cylA*) (Ike ve ark. 1990, Gilmore ve ark. 1994), hormon salınımını arttıran yüzey proteini (*eep*) (An ve ark., 1999, Bittencourt de Marques ve Suzart 2004) olarak sıralanabilir. Bu çalışmada da bu virulens genleri moleküler yöntemler kullanılarak incelenmiştir.

*E. faecalis efaAfs* geni, enterokokların yüzeylere yapışmasını yani adezyonunu ayrıca konak immun sistemden kaçmasını sağladığından şüphelenilmekle ve endokarditis vakaları ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Lowe ve ark. 1995, Singh ve ark. 1998). Bu gen sıklıkla *E. faecalis* klinik izolatlarda tespit edilmekle birlikte (Eaton ve Gasson 2001; Bittencourt de

Marques ve Suzart 2004; Abriouel ve ark. 2008) son yıllarda yapılan çalışmalarda *efaAfs* geninin sulardan izole edilen enterokoklar arasında sıklıkla bulunduğu gösterilmektedir (Lanthier ve ark. 2010a). *E. faecalis*'in hücre duvarı adezinlerinden olan ve bakterinin konak hücrelerine yapışmasından sorumlu olan virulens geni *efaAfs*, bu çalışmamızda izolatların % 94.6'sında tespit edilerek en çok belirlenen virulens geni oldu. Benzer şekilde Eaton ve Gasson (2001) gıda ve tıbbi izolatlarının % 89.0'unda bu genin varlığını bildirmişlerdir. Şimdiye kadar yalnızca bir hayvan modelinde (Singh ve ark. 1998) bu genin patojeniteye etkisi gösterilmiştir (Eaton ve Gasson 2001).

Cinsiyet hormon genleri olan *cpd*, *ccf*, *cob* farklı kaynaklardan izole edilen *E. faecalis* suşları içerisinde daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda, sıklıkla tespit edildiği bildirilmektedir (Eaton ve Gasson 2001, Abriouel ve ark.. 2008, McGowan-Spicer ve ark. 2008, Valenzuela ve ark. 2008, Lanthier ve ark. 2010a, Özmen ve ark. 2010). Çalışmamızda, cinsiyet hormon genleri içerisinde en yüksek oranda *cpd* (izolatların % 91'inde) tespit edilerek, incelenen tüm genler içerisinde en çok belirlenen ikinci gen oldu. Bunu beşinci sıradaki *ccf* (% 42.8) ve altıncı sıradaki *cob* (% 10.7) genleri izledi. Bu çalışmada, böylece cinsiyet hormon genlerinin mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarında da yüksek oranda görüldüğünü ortaya koydu.

Cinsiyet hormonları ile ilişkili olan iki gen, *eep* (hormon salınımını arttıran protein geni) ve *aggA* (agregasyon faktörünü kodlayan gen)'nin *E. faecalis* izolatlarında varlığı ile ilgili olarak, geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda farklı bulgular mevcuttur. Agregasyon faktörü, plazmidlerdeki *aggA* geni tarafından kodlanan ve *E. faecalis*'lerin yüzeyinde eksprese edilen bir glikoproteindir ve bakterinin nötrofil, kalp endokard ve böbrek tübüler hücreleri gibi çeşitli hücre yüzeylerine adezyonunu artırmaktadır (Dupre ve ark. 2003, Seno ve ark. 2005, Klibi ve ark. 2007, Fisher ve Phillips 2009, Hallgren ve ark. 2009). Bazı araştırmacılar, gıda ve klinik izolatlarda yapılan çalışmalarda *aggA*'nın *E. faecalis*'te bulunduğunu, ancak *E. faecium*'da tespit etmediklerini bildirirlerken (Eaton ve Gasson 2001; Franz ve ark. 2001; Valenzuela ve ark. 2008), bir kısmı da gıda, klinik ve çevresel *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında (Semedo ve ark. 2003; Abriouel ve ark. 2008; Özmen ve ark. 2010) ve diğer enterokok türlerinde (Semedo ve ark. 2003, Lanthier ve ark. 2010a) bulunduğunu belirtmişlerdir. Şu anki bilgilerimize göre *eep* varlığı konusundaki çalışmalar oldukça sınırlı yapılmıştır ve klinik izolatların yarısından fazlasında mevcut olduğu bildirilmektedir (Bittencourt de Marques ve Suzart 2004), ayrıca sığır mastitislerinde rolü

olduğundan da şüphelenilmektedir (Denham ve ark. 2008). Bu çalışmada da, mastitisli sığır sütlerinden elde edilen izolatlarda % 10.7 *eep* ve % 7.1 *aggA* varlığı belirlenmiştir.

Kromozomal *gelE* geni tarafından kodlanan jelatinaz (metalloproteaz) enzimi ise, kollajen, jelatin, kazein, hemoglobin ve diğer biyoaktif küçük peptidleri hidrolize eden ve hayvan modellerinde endoftalmit ve endokarditi şiddetlendiren hücre dışı bir çinko-endopeptidazdır (Vankerckhoven ve ark. 2004, Seno ve ark. 2005, Klibi ve ark. 2007, Fisher ve Phillips 2009). Ekstrasellüler jelatinazı kodlayan *gelE* sularda (Lanthier ve ark. 2010a), gıda ve klinik izolatlarda (Eaton ve Gasson 2001, Semedo ve ark. 2003, Bittencourt de Marques ve Suzart 2004; Creti ve ark. 2004, McGowan-Spicer ve ark. 2008) sıklıkla bulunduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada da, *gelE* en çok tespit edilen üçüncü (% 87.5) gen olmuştur.

Kromozomal *esp* geni tarafından kodlanan ve hücre duvarı ile ilişkili bir protein olan *esp*, esas olarak *E. faecalis*'in hücre yüzeyinde yer alır. Bakteriyi, konağın bağışıklık sisteminden koruduğu düşünülen *esp*, enterokokların üriner sistemde persistansı, kolonizasyonu ve artmış virulensi ile ilişkili bulunmuştur (Shankar ve ark. 2002, Bittencourt de Marques ve Suzart 2004, Vankerckhoven ve ark. 2004, Seno ve ark. 2005, Sood ve ark. 2008). *esp*'nin klinik kaynaklardan olduğu gibi gıda ve çevresel izolatlarda (Eaton ve Gasson 2001, Semedo ve ark. 2003, Abriouel ve ark. 2008, McGowan-Spicer ve ark. 2008) da bulunduğu gösterilmiştir. *efaAfs*, *gelE* ve *esp* genlerinin klinik izolatlar kadar çevresel ve su örneklerinde de sıklıkla bulunmasının, bu virulens genlerinin patojeniteye katkısı olduğunu düşündürmektedir (Lanthier ve ark. 2010a). Bu çalışmada da *efaAfs*, *gelE* ve *esp* genleri mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarında ilk dört sırada izole edilen genlerdir ve bu sonuç yukarıda bildirilen diğer çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Kromozomal *hyl* geni tarafından kodlanan ve özellikle *E. faecium* tarafından sentezlenen *hyl*, hyalüronik asidi etkileyerek doku hasarına yol açmakta, bağ dokusunun mukopolisakkarid kısmını depolimerize etmekte, böylece enterokokların olduğu kadar toksinlerinin de konak dokusunda yayılmasını kolaylaştırmaktadır (Fisher ve Phillips 2009). Ancak *hyl*'nin insan idrar yolu infeksiyonlarında patogeneziindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır (Billström ve ark. 2008, Fisher ve Phillips 2009). Hemolizin, insan, tavşan ve at eritrositlerini parçalayan ve birçok Gram-pozitif bakteriye karşı bakterisidal olan bir toksindir (Vergis ve ark. 2002, Fisher ve Phillips 2009). Hemolizin, hem ökaryotik hem de

prokaryotik hücrelerde lizise neden olmasından dolayı daha çok sitolizin olarak adlandırılır (Shankar ve ark. 1999, Klibi ve ark. 2007, Hallgren ve ark. 2009). Hemolizin genleri (*cyl*), genellikle feromona duyarlı plazmidler üzerinde taşınırlar; ancak patojenite adaları içinde bakteriyel kromozoma da entegre olabilirler (Vankerchoven ve ark. 2004, Seno ve ark. 2005, Klibi ve ark. 2007, Fisher ve Phillips 2009). Sitolizin gen varlığı sulara oldukça düşük (% 0.4) olarak (Lanthier ve ark. 2010a) bildirilirken; gıdalarda (% 44.0) ve tıbbi izolatlarda (*cylA* % 44.0, *cylM* ve *cylB* % 56.0) yüksek olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarında sitolizin genleri olan *cylA* (% 1.8), *cylB* (% 0.0) ve *cylM* (% 1.8) incelenen on bir virulens geni içerisinde en düşük oranda tespit edilen genler oldu. Çevresel faktörlerin de gen ekspresyonuna etkisi olduğu bilinmektedir (Finlay ve Falkow 1997).

Virulens faktörlerinin yaygınlığı ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, çalışılan örneklerin kaynağına (klinik, fekal veya çevresel), enterokokların tür dağılımına ve çalışmanın yapıldığı ülkelere göre değişkenlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada (Lanthier ve ark. 2010a) sulara 1558 *Enterococcus* sp.'ünde virulens determinantlarının dağılımını incelemişler: sırasıyla *ccf* (% 55.9), *eep* (% 29.7), *cpd* (%29.5), *efaAfs* (% 28.5), *gelE* (% 18.2) ve *cob* (%17.8) ve diğer virulens determinantlarının (*aggA* ve *esp*) izolatların % 10'undan azında görüldüğünü ve yalnızca 7 (% 0.4) izolatın *cylABM* genleri taşıdığı bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada (Eaton ve Gasson 2001) gıda izolatlarında sırası ile *cpd* (% 100.0), *efaAfs* (% 89.0), *gelE* (% 78.2), *aggA* (% 67.0), sitolizinler (%44.0) ve *esp* (%33.0) genleri belirlenmiş; aynı çalışmada tıbbi izolatlarda ise *cpd* ve *efaAfs* (% 100.0), *gelE* (% 89.0), *aggA* (% 78.0), *cylM* ve *cylB* (% 56.0) ve *cylA* ve *esp* (% 44.0) genlerinin varlığı bildirilmiştir. Bittencourt de Marques ve Suzart (2004) ise tıbbi izolatlarda benzer bir şekilde *efaAfs*, *eep* (% 58.9), *esp* (% 57.9), *gelE* (% 45.3), *aggA* (% 36.8), *cylA* (% 16.8), *cylM* ve *cylB* (% 14.7). Bu çalışmada ilk dört sırayı alan virulens genleri olan *efaAfs*, *cpd*, *gelE* ve *esp*'nin yukardaki diğer çalışmalarda da yüksek oranlarda tespit edildiği görülmektedir.

## 5. SONUÇ

Aydın yöresinde enterokokların mastitislerin etiyolojisinde önemli rol oynadığı, bu etkenlerin cins ve tür düzeyinde identifikasyonlarının yapılmasında spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR yönteminin fazla sayıda izolatın, kısa sürede identifikasyonlarının yapılabilmesine imkan vermesi sebebi ile faydalı bulunmuştur.

Enterokokların virulens faktörleri üzerine yapılacak olan her çalışma, bu mikroorganizmanın patogenezinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Bu çalışmada, virulens genlerinin incelenmesi sonucunda sırası ile adezyon geni olan *efaAfs* (% 94.6) en sık tespit edilen virulens geni oldu. Cinsiyet hormon genlerinden *cpd* ikinci en yüksek izole edilen gen (% 91.0) olurken; bunu jelatinazı kodlayan gen *gelE* (% 87.5) izledi. Enterokokal hücre duvar yüzey protein geni olan *esp* (% 51.7) dördüncü sırada belirlenirken; beş ve altı sıralarda yine cinsiyet hormone genleri *ccf* (% 42.8) ve *cob* (% 10.7) genleri bulundu. Bazı virulens genlerinin varlığı (*eep*, *aggA* ve sitolizin genleri) % 10'un altında idi. Herhangi bir virulens geni taşımayan izolat mevcut değildi. Yirmiüç virulens genotip sayısı ile izolatların çok farklı virulens gen profiline sahip oldukları görüldü. Sekiz virulens genini birlikte taşıyan bir (12 nolu izolat) ve yedi virulens genini birlikte taşıyan iki (17 ve 19 nolu izolatlar) izolatın bulunması dikkat çekici idi. Bu çalışma, Aydın yöresinde mastitisli sığır sütlerinden izole edilmiş olan *E. faecalis* suşlarının çok sayıda virulens genine sahip olması sebebi ile izolatların yüksek patojenite potansiyeline sahip olduklarını, bu suşların hayvansal kaynaklardan insanlara bulaşma ve bulaştıklarında ise infeksiyon oluşturabilme potansiyellerinin olduğunu gösterdi. Enterokok türlerinin artan önemi ve özellikle antibiyotiklere direncin artan sıklığı dikkate alındığında, enterokokların invazifliği ve hastalığın şiddeti ile ilişkili virulens faktörlerin tanımlanması ve bu virulens faktörlerinin antibiyotiklerle ilişkilerinin ortaya konması, konusunda daha geniş kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

## ÖZET

### Mastitisli Sığır Sütlerinden İzole Edilen *Enterococcus faecalis* Suşlarının Virülens Genlerinin İncelenmesi

Bu çalışmada, mastitisli sığır süt örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* suşlarının potansiyel virülens geninin (jelatinaz [*gelE*]), adezyonla ilgili protein [*EfaAfs*], enterokokal yüzey proteini [*esp*] sitolizinler [*cylA*, *cylM*, *cylB*], cinsiyet hormonları [*cpd*, *cob*, *ccf*], agregasyon faktörü [*aggA*], hormon salınımını arttıran yüzey proteini [*eep*]) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile incelenmesi amaçlandı. Çalışmada materyal olarak, 600 mastitisli sığır sütünden izole edilen 56 *E. faecalis* izolatu kullanıldı. Enterokok izolasyonu, selektif besiyerinde gerçekleştirildikten sonra, cins ve tür düzeyinde identifikasyon yine PZR ile gerçekleştirildi. Virülens geni taşımayan enterokok izolatu mevcut değilken, izolatların % 1.8'inin sekiz, % 3.6'sının yedi virülens genine sahip olduğu belirlendi. *efaAfs* geninin en yüksek oranda görülen (% 94.6) virülens geni olduğu ve bunu *cpd* (% 91.0), *gelE* (% 87.5), *esp* (% 51.7), *ccf* (% 42.8), *cob* (% 10.7), *eep* (% 8.9), *aggA* (% 7.1), *cylA* ve *cylM* (% 1.78) takip ettiği saptandı. İzolatlarının hiçbirinde *cylB* geni belirlenmedi. Sonuç olarak bu çalışma, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının yüksek patojenite potansiyeline sahip oldukları, bu suşların hayvansal kaynaklardan insanlara bulaşma ve bulaştıklarında ise infeksiyon oluşturabilme potansiyellerinin olduğunu gösterdi. Enterokokların invazifliği ve hastalığın şiddeti ile ilişkili virülens faktörlerin tanımlanması ve bu virülens faktörlerinin antibiyotiklerle ilişkilerinin ortaya konması, konusunda daha geniş kapsamlı araştırmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

## SUMMARY

### Investigation of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Mastitic Bovine Milk

In this study, it was aimed to investigate the potential virulence genes (gelatinase [*gelE*]), adhesion-associated protein [*EfaAfs*], enterococcal surface protein [*esp*], cytolytins [*cylA*, *cylM*, *cylB*], sex pheromones [*cpd*, *cob*, *ccf*], aggregation substance [*aggA*], enhanced expression of pheromone [*eep*]) of *Enterococcus faecalis* strains isolated from mastitic bovine milk samples with polymerase chain reaction (PCR). A total of 56 *E. faecalis* isolates, which were previously isolated from 600 mastitic bovine milk samples were used as material. After the isolation of enterococcus in selective media, identifications based on genus and species were also performed with PCR. 1.8 % and % 3.6 of the strains harbored eight and seven virulence determinant, while there was no enterococci enterococcal isolate having virulence gene. The *efaAfs* gene was the predominant (% 94,6) virulence gene among the enterococci investigated followed by *cpd* (% 91,0), *gelE* (% 87,5), *esp* (% 51,7), *ccf* (% 42,8), *cob* (% 10,7), *eep* (% 8,9), *aggA* (% 7,1), *cylA* and *cylM* (% 1,78). None of the strains harbored *cylB* gene. Finally, it can be said that *E. faecalis* strains isolated from mastitic bovine milk have high pathogenicity and have zoonotic contamination risk and have high infection capability in humans. It is thought that further studies should be conducted on the definition of virulence factors related to severity of the infection and expending traits of enterococcus and their relationships with some kind of antibiotics should also be revealed.



## KAYNAKLAR

**Aaestrup F, Butaye P, Witte W** Nonhuman reservoirs of Enterococci. 55-100. In: Gilmore MS (Ed) The Enterococci (Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance), 2002, ASM Press, USA.

**Abriouel H, Omar NB, Molinos AC, Lopez RL, Grande MA, Martinez-Viedma P, Ortega E, Canamero MM** Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. Int J Food Microbiol 2008; 123: 38–49.

**Akan ÖA.** Enterokok türlerinin mikrobiyolojisi. Ed: Ünal S, Vahapoğlu H. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. 2004, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. Türkiye.

**Aktaş G, Derbentli Ş.** Vankomisine dirençli enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. İnfeksiyon Derg 2009; 23: 201-9.

**An FY, Sulavik MC, Clewell DB.** Identification and characterization of a determinant (*eep*) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1. J Bacteriol 1999; 181Ç 5915–21.

**Anderesson MD.** DNA 6X Loading Dye. Cancer Center. Erişim Adresi: <http://www.mdanderesson.org/education-and-research/departments-programs-and-labs/labs/dent-laboratory/protocols/dna-6x-loading-dye.html>. Erişim Tarihi: 02.06.2011.

**Atlas RM.** Handbook of Microbiological Media, Third Edition, 2004, USA.

**Baştan A.** İneklerde Meme Hastalıkları. Hatipoğlu Basımve Yayım San. Tic. Ltd. Şti., 2002, Ankara, Türkiye.

**Bensalah F, Flores MJ, Mouats A.** A rapid PCR based method to distinguish between *Enterococcus* species by using degenerate and species-specific *sodA* gene primers. Afr J Biotechnol 2006; 5: 607-702.

**Billström H, Lund B, Sullivan A, Nord CE.** Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. Int J Antimicrob Agents 2008; 32: 374-7.

**Bittencourt de Marques EB, Suzart S.** Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. J Med Microbiol 2004; 53: 1069–73.

**Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, Zervos MJ.** Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 2474–7.

**Coque TM, Arduino RC, Murray BE.** High-level resistance to aminoglycosides: comparison of community and nosocomial fecal isolates of enterococci. Clin Infect Dis 1995; 20; 1048–51.

**Coque TM, Willems RJJ, Fortuń J, Top J, Diz S, Loza E, Cantoń R, Baquero F.** Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish University Hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance. Antimicrob Agent Chemother 2005; 49: 2693-700.

**Clewell DB, An FY, Flannagan SE, Antiporta M, Dunny GM.** Enterococcal sex pheromone precursors are part of signal sequences for surface lipoproteins. Mol Microbiol 2000; 35: 246–7.

**Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, Baldassarri L.** Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. J Med Microbiol 2004; 53: 13–20.

**Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG.** Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 686-707.

**Denham EL, Ward PN, Leigh JA.** Lipoprotein signal peptides are processed by *lsp* and *eep* of *Streptococcus uberis*. *J Bacteriol* 2008; 190: 4641–7.

**Devriese LA, Laurier L, Herdt P, Haesebrouck.** Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. *J Appl Bacteriol* 1992; 72: 29–31.

**Devriese LA, Hommez J, Laevens H, Pot B, Vandamme P, Haesebrouck F.** Identification of aesculinhydrolyzing Streptococci, Lactococci, Aerococci and Enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet Microbiol* 1999; 70: 87-94.

**Devriese L, Baele M, Butaye P.** The genus enterococcus: taxonomy. *Prokaryotes*. 2006; 4: 163-74.

**Diker KS, Akan M, Çarlı T, Yardımcı H, Şen A, Ülgen M, Sareyyupoglu B, Çetin C** Veteriner Mikrobiyoloji ve Epidemiyoloji. T.C. Anadolu Üniversitesi Yayını No: 2317. Açıköğretim Fakültesi Yayını No: 1314, 2011, Eskişehir, Türkiye.

**Di Rosa R, Cecchini R, Bertuccini L, Penni A, Ghenardi G, Dicuanzo G, Venditti M, Baldassari L.** Clinical significance of slime production in *Enterococcus* sp. *Clin Microbiol Infect* 2000; 1: 154.

**Dupre I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA.** Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol* 2003; 52: 491-8.

**Eaton TJ, Gasson MJ.** Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1628-35.

**Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R.** Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 39-42.

**Ember JA, Hugli TE.** Characterisation of the human neutrophil response to sex pheromones from *Streptococcus faecalis*. *Am J Pathol* 1989; 134: 797–805.

**Facklam RR, Teixeria LM.** *Enterococcus*. In: Collier L, Bolows A, Sussman (eds). Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. Vol: 2 (Systematic Bacteriology). Ed: Edward Arnold, 9th edition. 1998, London, England.

**Finlay, B. B., and S. Falkow.** Common themes in bacterial pathogenesis revisited. *Microbiol Mol Rev* 1997; 61: 136–69.

**Fisher K, Phillips C.** The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009; 155: 1749-57.

**Frankenberg L, Brugna M, Hederstedt L.** *Enterococcus faecalis* Heme-Dependent Catalase. *J Bacteriol*. 2002; 184: 6351–6.

**Franz CM, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NM, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH.** Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4385–9.

**Franz C, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH.** *Enterococci* in foods--a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 105-22.

**Franzetti L, Pompei M, Scarpellini M, Galli A.** Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus* sp. of different origins. *Current Microbiol* 2004; 49: 255–60.

**French GL.** Enterococci and vancomycin resistance. *Clin Infect Diss* 1998; 27: 75–83.

**Galli D, Lottspeich F, Wirth R.** Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol Microbiol* 1990; 4: 895–904.

**Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR.** Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, 1994, Washington, USA.

**Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB.** Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1- encoded cytolysin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol* 1994; 176: 7335–44.

**Gunter K.** Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 123-31.

**Gültekin M.** Enterokoklar: Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenezi. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara 2004: 121-40.

**Haas W, Shepard BD, Gilmore MS.** Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* 2002; 415: 84–7.

**Hallgren D, Hanberger H, Hossain A, Nilsson M, Svenson E, Nilsson LE.** Activity of common and new antimicrobial agents against enterococci at intensive care units in Sweden. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 127.

**Hallgren A, Claesson C, Saeedi B, Monstein HJ, Hanberger H, Nilsson LE.** Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol* 2009; 299: 323-32.

**Hardie JM, Whiley RA.** Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Appl Microbiol* 1997; 83: 1-11.

**Hugas M, Garriga M, Aymerich MT.** Functionality of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 223-33.

**Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB.** High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. J Clin Microbiol 1987; 25: 1524–8.

**Ike Y, Clewell DB, Segarra RA, Gilmore MS.** Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. J Bacteriol 1990; 172: 155–63.

**İşleroğlu H, Yıldırım Z, Demirpençe Y, Yıldırım M.** Enterokoklar: biyokimyasal, fizyolojik ve fonksiyonel özellikleri ile patojenitesi. Akademik Gıda 2008;6: 16-26.

**Jayarao BM, Dore JJE, Oliver SP.** Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA Streptococcus and Enterococcus species of bovine origin. J Clin Microbiol 1992; 30: 2235- 40.

**Jett BD, Jensen HG, Atkuri RV, Gilmore MS.** Evaluation of therapeutic measures for treating endophthalmitis caused by isogenic toxin-producing and toxin-nonproducing *Enterococcus faecalis* strains. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995; 36: 9-12.

**Kalina AP.** The taxonomy and nomenclature of *enterococci*. Int J Syst Bacteriol 1970; 20: 185-9.

**Karagöz G.** Uzmanlık Tezi. Yoğun bakım ünitesinde vankomisin dirençli enterokok taşıyıcılığının araştırılması. Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, 2005, İstanbul, Türkiye.

**Kayaoğlu G, Orstavik D.** Virulence factors of *Enterococcus faecalis*. Relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15: 308-20.

**Kawalec M, Kaminska T, Hryniewicz W.** Evaluations of vitek GPS-514 cards in detection of vankomisin and HLAR in enterococci. Clin Microbiol Infect 2000; 6: 172.

**Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG.** Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3497–3503.

**Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W.** Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 269–90.

**Klein G.** Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastro-intestinal tract. Review. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 123-31.

**Klibi N, Ben Slama K, Saenz Y.** Detection of virulence factors in high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from a Tunisian hospital. *Can J Microbiol* 2007; 53: 372-9.

**Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Procop G, Woods G.** Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Co 2005.

**Konrad J, Mayer K, Kneifel W.** Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* sp. 1. Media for isolation and enumeration. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 147-64.

**Kuyucuoğlu Y** Antibiotic resistances of enterococci isolated from bovine subclinical mastitis. *Eurasian J Vet Sci* 2011; 27: 231- 4.

**Lanthier M, Scott A, Zhang Y, Cloutier M, Durie D, Henderson VC, Wilkes G, Lapen DR, Topp E.** Distribution of selected virulence genes and antibiotic resistance in *Enterococcus* species isolated from the South Nation River drainage basin, Ontario, Canada. *J Appl Microbiol* 2010a; 110: 407–21.

**Lanthier M, Scott A, Lapen D, Zhang Y, Topp E.** Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* sp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals and birds, and wildlife. *Can J Microbiol* 2010b; 56: 715–29.

**Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, Embden JV, Willems RJL.** A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of enterococcus faecium and associated with epidemicity. J Bacteriol 2004; 186: 672-82.

**Lowe AM, Lambert PA, Smith AW.** Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. Infect Immun 1995; 63: 703–6.

**Mäkinen PL, Clewell DB, An F, Mäkinen KK.** Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ('gelatinase') from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). J Biol Chem 1989; 264: 3325-34.

**McDonald TJ, McDonald JS** Streptococci isolated from bovine intramammary infections. Am J Vet Res 1976; 37: 377-81.

**McGowan-Spicer LL, Fedorka-Cray PJ, Frye JG, Meinersmann RJ, Barrett JB, Jackson CR.** Antimicrobial resistance and virulence of *Enterococcus faecalis* isolated from retail food. J Food Prot 2008; 71: 760–9.

**Moellering JC.** *Enterococcus* species. In: Mandell G. L, ve ark (Eds). Principles and Practise of Infectious Diseases, 5th Ed. NewYork: Churcill Livingstone; 2000; 2147-56.

**Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M.** Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 513–22.

**Murray BE, Singh KV, Ross RP, Don Heath J, Dunny GM, Weinstock MG.** Generation of restriction map of *Enterococcus faecalis* OG1 and investigation of growth requirements and regions encoding biosynthetic function. J Bacteriol 1993; 175: 5216-23.

**Murray BE.** Diversity among multidrug-resistant enterococci. Emerg Infect Dis 1998; 4: 37-47.

**Nam HM, Lim SK, Moon JS, Kang HM, Kim JM, Jang KC, Kang MI, Joo YS, Jung SC** Antimicrobial resistance of Enterococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. Zoonoses Public Health. DOI: 10.1111/J.1863-2378.2009.01307x.



**Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G.** Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. J Antimicrobial Chemother 2004; 54: 232-5.

**Özmen TS, Celebi Keskin A, Açık L, Temiz A.** Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. J Appl Microbiol 2010; 109: 1084-92.

**Özmen TS, Temiz A.** Gıda kaynaklı enterokokların gıda ve insan sağlığı yönünden önemi. Gıda 2011; 36: 303-10.

**Park YK, Koo HC, Kim SH, Hwang SY, Jung WK, Kim JM, Shin S, Kim RT, Park YH** The analysis of milk components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw milk in Korea. J Dairy Sci 2007; 90: 5405–14.

**Petersson-Wolfe CS, Wolf SL, Hogan JS.** In vitro growth of enterococci of bovine origin in bovine mammary secretions from various stages of lactation. J Dairy Sci 2007; 90: 4231-46.

**Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M.** *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and ‘star’ in posttreatment disease. Endodontic Topics 2003; 6: 135–59.

**Sambrook J, Fritsch EF, Shuman HA.** Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.

**Semedo T, Santos MA, Lopes MF, Figueiredo Marques JJ, Barreto Crespo MT, Tenreiro R.** Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: a common trait in the genus? Syst Appl Microbiol 2003; 26: 13–22.

**Seno Y, Kariyama R, Mitsuhashi R, Monden K, Kumon H.** Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. Acta Med Okayama 2005; 59: 79-87.

**Sghir A, Antonopoulos D, Mackie RI.** Design and evaluation of a lactobacillus group-specific ribosomal RNA-targeted hybridization probe and its application to the study of intestinal microecology in pigs. *Syst Appl Microbiol* 1998; 21: 291-6.

**Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS.** Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; 67: 193–200.

**Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore M. S.** Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycinresistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 2002; 417: 746– 50.

**Smith KL, Hogan JS.** Environmental mastitis caused by species of *Streptococcus* and *Enterococcus*: Risk factors and control. Ohio Agricultural Research and Development Center The Ohio State University Wooster, USA. [http://cals.arizona.edu/extension/dairy/conference/proceedings/environmental\\_mastitis.pdf](http://cals.arizona.edu/extension/dairy/conference/proceedings/environmental_mastitis.pdf) accessed 2003.

**Sillanpa J, Prakash VP, Nallapareddy SR, Murray BE.** Distribution of genes encoding MSCRAMMs and pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 896-901.

**Singh KV, Coque TM, Weinstock GM, Murray BE.** In vivo testing of an *Enterococcus faecalis efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 21: 323–31.

**Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A.** Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res* 2008; 128: 111-21.

**Su YA, Sulavik MC, He P, Makinen KK, Makinen P, Fiedler S, Wirth R, Clewell DB.** Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun* 1991; 59: 415–20.

**Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson G, Collins MD, Dore J.** Direct rDNA community analysis reveals a myriad of novel bacterial lineages within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4799-4807.

**Svec P, Devriese LA, Sedlacek I, Baele M, Vancanneyt M, Haesebrouck F, Swings J, Doskar J.** *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evolution Microbiol* 2001; 51: 1567-74.

**Temiz A.** Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınevi. Ankara. 2000, Sayfa: 291.

**Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N.** Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 2622–36.

**Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W.** Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 2006; 89: 2542–51.

**Trotter KM, Dunny GM.** Mutants of *Enterococcus faecalis* deficient as recipients in mating with donors carrying pheromone-inducible plasmids. *Plasmid* 1990; 24: 57-67.

**Turner PC, McLennan AG, Bates AD, White MRH.** Moleküler biyoloji önemli notlar. Nobel Yayın 2004; 613:346 s.

**Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umopathy BL.** Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27: 301-5.

**Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel H, Lopez RL, Ortega E, Canamero MM, Galvez A.** Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 2648–52.

**Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C.** Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence

determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol 2004; 42: 4473-9.

**Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M.** Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. Appl Environ Microbiol 2008; 74: 4247-55.

**Vergis EN, Shankar N, Chow JW.** Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. Clin Infect Dis 2002; 35: 570-5.

**Vilela MA, Souza SL, Palazzo ICV, Ferreira JC, Morais Jr MA, Darini ALC, Morais MMC.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2006 101: 716-9.

**Watts JL.** Characterization and identification of Streptococci isolated from bovine mammary glands. J Dairy Sci 1988; 71: 1616-24.

**Wells CL, Moore EA, Hoag JA, Hirt H, Dunny GM, Erlandsen SL.** Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. Infect Immun 2000; 68: 7190-4.

**Wolfgang DR, Jayarao BM, Pillai SR, Sawant AA, Burns CM, Hutchinson LJ.** Farm management practices that influence the number and type of Streptococci and Streptococci-like organisms in dairy herds. The Pennsylvania State University. University Park, PA, USA <http://vbs.psu.edu/ext/focus-areas/mastitis/bulk-tank-milk/Resources/Farm%20Management%20Practices.pdf> accessed 08.09.2009

## ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Bandırma'da doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini Bandırma'da tamamladı. Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde 2008 yılında lisans eğitimi tamamladı. 2010 yılında askerlik hizmetini yerine getirdi. 2011 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca yardımlarını benden esirgemeyen, danışman hocam Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ' a, sahip olduğu engin bilgi ve tecrübelerini Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki öğrencilerle ve öğretim üyeleriyle paylaşan daima ışık olan ADÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, çalışmalarımda desteğini gördüğüm Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA ve diğer Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne, tezim için materyal toplamama yardımcı olan Uzm.Vet. Hek. Seyhan KAYNARCA'ya, tez sürecim boyunca manevi desteğini eksik etmeyen birlikte keyifli zamanlar geçirdiğim çalışma arkadaşlarım Dr. Erman ORYAŞIN ve Biyolog Mehmet ÖZTÜRK'e, her zaman yanımda olduklarını gösteren, hayatı güzelleştiren dostlarım Ece KURT, Ali AKGÜL, Erdiñ ASLAN, Ferhat GENÇ'e, tüm hayatım boyunca her kararımda arkamda olan, desteklerini bir an olsun düşünmeden sunan, her zaman başarı ve mutluluğumu isteyen ve bunun için elinden geleni yapan annem Filiz YILDIZ, babam Raşit YILDIZ, abim Tolga YILDIZ'a, ayrıca diğer aile fertleri Yüksel KAŞIKÇI ve Aydoğın KAŞIKÇI'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.