



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MİK-YL-2015 -0005

**MASTITİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN  
*ENTEROCOCCUS FAECIUM* SUŞLARINDA *GELE*, *ESP* VE  
*EFAAFM* GENLERİNİN VARLIĞININ İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Tuğçe Bahar HERKMEN

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

AYDIN-2015

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MİK-YL-2015 -0005

**MASTITİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN  
*ENTEROCOCCUS FAECIUM* SUŞLARINDA *GELE*, *ESP* VE  
*EFAAFM* GENLERİNİN VARLIĞININ İNCELENMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tuğçe Bahar HERKMEN**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ**

**AYDIN-2015**

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

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğrencisi Tuğçe Bahar HERKMEN tarafından hazırlanan **“MASTITİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS FAECIUM* SUŞLARINDA *GELE*, *ESP* VE *EFAAFM* GENLERİNİN VARLIĞININ İNCELENMESİ”** başlıklı tez, 18/08/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

**Unvanı, Adı ve Soyadı :**

**Kurumu :**

**İmzası:**

Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

ADÜ, Veteriner Fakültesi

Yrd. Doç. Dr. Fulya OCAK

CBÜ, Fen Edebiyat Fakültesi

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

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Enterokoklar insan ve hayvanların normal bağırsak florasında mevcut olan mikroorganizmalar olup dışkıda bol miktarda bulunurlar. Enterokokların, birçok antimikrobiyal ajana karşı doğal veya kazanılmış direnç göstermeleri nedeniyle, son yıllarda önemleri gittikçe artmıştır. Enterokokların patojenitelerinin düşük olmasına rağmen özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli etkenlerdir. Bu durum virulens genlerine olan ilgiyi arttırmaktadır.

Enterokoklarda pek çok virulens genin varlığı bilinmektedir. Bunlardan en önemlileri: jelatinaz (*gelE*), enterokokal yüzey proteini (*esp*), hücre duvar adezinleri (*efaA*; *efaAfs* ve *efaAfm*: sırası ile *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları tarafından serumda sentezlenen hücre duvar adezinleri)'dir. Plazmidler tarafından aktarılmayan jelatinaz hemoglobin ve diğer biyoaktif bileşenleri parçalayan proteazdır. Değişik yapıdaki bakteriyel yüzey proteinlerini ise *esp* geni kodlar. Bakterinin konak immun sistemden kaçmasını kolaylaştıran hücre duvarı ile ilgili bir proteindir. *efaA* ise hücre duvar adhesini olarak fonksiyon görür ve klinik örneklerde sıkça bulunduğu bilinmektedir.

Enterokokların patojenitelerine, sahip oldukları çeşitli virülens faktörlerinin önemli katkıları olduğu bilinmektedir. Yapılan daha önceki çalışmalar incelendiğinde, özellikle klinik ve çevresel örneklerden elde edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının virulens genlerinin incelenmesi üzerine odaklanmış oldukları görülmüştür. Yurdumuzda da mastitisli sığır sütlerinden izole edilmiş olan *E. faecium* suşlarının önemli virulens genlerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada Türkiye'de mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecium* suşlarının önemli virulens genlerinden olan *gelE*, *esp* ve *efaAfm* genlerinin varlığının moleküler yöntemler kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır. Enterokokların insan sağlığı için potansiyel patojen olması nedeniyle, incelenen virulens özelliklerin insan orijinli suşlarla karşılaştırılması açısından temel bilgi sağlama potansiyeli taşımaktadır.

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (VTF 15003 no'lu proje) tarafından desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

|  | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| <b>KABUL VE ONAY</b> .....                                       | i            |
| <b>ÖNSÖZ</b> .....   | ii           |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....   | iii          |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....                                   | vi           |
| <b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....                                     | vii          |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....  | 1            |
| 1. 1. Enterokokların Tarihçesi.....                              | 2            |
| 1. 2. Sınıflandırma.....   | 2            |
| 1. 3. Mikrobiyolojik Özellikler.....                             | 3            |
| 1. 3. 1. Üreme Özellikleri.....                                  | 4            |
| 1. 3. 2. Genom Özellikleri.....                                  | 6            |
| 1. 3. 3. Genetik Bilgi Transferi.....                            | 6            |
| 1. 4. Virulens Faktörler.....                                    | 7            |
| 1. 4. 1. Jelatinaz.....  | 8            |
| 1. 4. 2. Enterokokal Yüzey Proteini.....                         | 8            |
| 1. 4. 3. Hücre Duvar Adezinleri.....                             | 9            |
| 1. 4. 4. Cinsiyet Hormonları.....                                | 9            |
| 1. 4. 5. Agregasyon Faktörü.....                                 | 9            |
| 1. 4. 6. Sitolizinler.....                                       | 10           |
| 1. 4. 7. Hormon Salınımını Arttıran Protein.....                 | 10           |
| 1.5. Antibiyotik Direnci.....                                    | 11           |
| 1. 5. 1. Enterokoklarda Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları..... | 11           |
| 1. 6. Epidemiyoloji.....   | 13           |
| 1. 7. Enterokokların Önemi.....                                  | 14           |
| <b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....                                  | 17           |
| 2.1. Gereçler.....   | 17           |
| 2.1.1. İzolasyon Örnekleri.....                                  | 17           |
| 2.1.2. Referans Suşlar.....                                      | 17           |
| 2. 1. 3. Besiyerleri, Ayıraç ve Solusyonlar.....                 | 17           |
| 2. 1. 3. 1. Besiyerleri.....                                     | 17           |

|  |    |
|--|----|
| 2. 1. 3. 1. 1. Chromocult® Enterococci Broth .....                             | 18 |
| 2. 1. 3. 1. 2. Chromocult® Enterococci Agar .....                              | 18 |
| 2. 1. 3. 1. 3. Brain Hearth Infusion Agar .....                                | 19 |
| 2. 1. 3. 1. 4. Brain Hearth Infusion Broth.....                                | 19 |
| 2. 1. 3. 1. 5. Brain Hearth Infusion Broth .....                               | 19 |
| 2. 1. 3. 1. 6. %6.5 NaCl içeren Nutrient Broth .....                           | 19 |
| 2. 1. 3. 2. Ayıraç ve Solusyonlar.....   | 20 |
| 2. 1. 3. 2. 1. %3'lük Hidrojen Peroksit .....                                  | 20 |
| 2. 1. 3. 2. 2. TBE ( Tris-HCl, EDTA, Glukoz) Solüsyonu.....                    | 20 |
| 2. 1. 3. 2. 3. Gel Loading Buffer (6X).....                                    | 20 |
| 2.1.4. PZR.....  | 20 |
| 2.1.4.1. Kullanılan Cihazlar.....  | 20 |
| 2.1.4.2. MgCl <sub>2</sub> , Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer, dNTP Set ..... | 21 |
| 2.1.4.3. Primer.....   | 21 |
| 2. 1. 4. 4. Agarose Jel Hazırlanışı.....                                       | 21 |
| 2. 1. 4. 5. Marker.....  | 22 |
| 2. 1. 4. 6. Etidium Bromür.....  | 22 |
| 2.2. Yöntem.....   | 22 |
| 2.2.1. Örneklerin alınması.....  | 22 |
| 2. 2.1.1. Süt Örnekleri.....   | 22 |
| 2.2.2. Enterokok İzolasyonu.....   | 22 |
| 2.2.3. Enterokok İdentifikasyonu.....  | 23 |
| 2.2.3.1. Katalaz Testi.....  | 23 |
| 2.2.3.2. %6,5 NaCl'de Büyüme.....  | 23 |
| 2.2.3.3. <i>E. faecium</i> suşlarının identifikasyonu.....                     | 23 |
| 2.2.3.3.1. DNA İzolasyonu.....   | 24 |
| 2.2.3.3.2. DNA'nın Elektroforezi.....  | 24 |
| 2.2.3.3.3. DNA'nın Saflık Kontrolü ve Miktar Tayinleri.....                    | 24 |
| 2.2.4. PZR.....  | 25 |
| 2.2.4.1. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi.....                    | 26 |
| 2.2.4.2. Yürütme.....  | 27 |
| 2.2.4.3. Görüntüleme ve Değerlendirme.....                                     | 27 |
| 2.2.5. Sekans Analizi.....   | 27 |

|   |    |
|---|----|
| <b>3. BULGULAR.....</b>                       | 28 |
| 3.1. İzolasyon.....                           | 28 |
| 3.2. PZR.....                                 | 29 |
| 3. 2. 1. <i>Enterococcus</i> sp.....          | 29 |
| 3. 2. 2. <i>E. faecium</i> .....              | 29 |
| 3. 2. 3. Virulens genlerinin incelenmesi..... | 30 |
| 3. 2. 3. 1. <i>gelE</i> .....                 | 30 |
| 3. 2. 3. 2. <i>esp</i> .....                  | 31 |
| 3. 2. 3. 3. <i>efaAfm</i> .....               | 32 |
| <b>4. TARTIŞMA.....</b>                       | 35 |
| <b>5. SONUÇ .....</b>                         | 38 |
| <b>ÖZET.....</b>                              | 39 |
| <b>SUMMARY.....</b>                           | 40 |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                         | 41 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                          | 51 |
| <b>TEŞEKKÜR.....</b>                          | 52 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Çizelge 1. 1. Enterokokların sınıflandırılması.....   | 2            |
| Çizelge 1. 2. Enterokok cinsi içerisinde yer alan türler.....   | 2            |
| Çizelge 1. 3. Enterokok identifikasyon şeması.....  | 3            |
| Çizelge 1. 4. Fenotipik özelliklerine göre enterokok türlerinin sınıflaması.....                                | 5            |
| Enterokok ve benzeri türlerin belli başlı fenotipik özellikleri.....  | 3            |
| Çizelge 1. 5. Enterokoklarda önemli virulens genleri ve virulensde genin rolü.                                  | 8            |
| Çizelge 2. 1. Kullanılan primerlerler, dizileri, amplikon büyüklükleri,<br>kaynakları ve kullanım amaçları..... | 21           |
| Çizelge 2. 2. Mastermiksin hazırlanma oranları.....   | 25           |
| Çizelge 2. 3. <i>Enterococcus</i> sp. PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....                        | 25           |
| Çizelge 2. 4. <i>E. faecium</i> PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....                              | 26           |
| Çizelge 2. 5. <i>gelE</i> virulens geninin PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı..                      | 26           |
| Çizelge 2. 6. <i>esp</i> virulens geninin PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı...                      | 26           |
| Çizelge 2. 7. <i>efaAfm</i> virulens geninin PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre<br>diyagram.....               | 26           |
| Çizelge 3.1. <i>E. faecium</i> izolatlarının taşıdığı virulens genleri .....                                    | 33           |
| Çizelge 3. 2. <i>E. faecium</i> izolatlarının taşıdıkları virulens genotipleri.....                             | 33           |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 3. 1. Ekim yapılmamış EB.....   | 28           |
| Şekil 3. 2. Enterococcus sp. PZR elektroforez görüntüsü.....                      | 29           |
| Şekil 3. 3. <i>E. faecium</i> PZR elektroforez görüntüsü.....                     | 29           |
| Şekil 3. 4. <i>E. faecium</i> sekans sonucu.....                                  | 30           |
| Şekil 3. 5. Virulens gen PZR ( <i>gelE</i> ).....                                 | 30           |
| Şekil 3. 6. Virulens gen PZR ( <i>esp</i> ).....                                  | 31           |
| Şekil 3. 7. <i>esp</i> geni sekans sonucu.....                                    | 31           |
| Şekil 3. 8. Virulens gen PZR ( <i>efaAfm</i> ).....                               | 32           |
| Şekil 3. 9. <i>efaAfm</i> geni sekans sonucu .....                                | 32           |
| Şekil 3.10. <i>E. faecium</i> izolatlarının taşıdıkları virulens genotipleri..... | 34           |

# 1. GİRİŞ

Meme dokusunun yangısı olarak bilinen mastitis hem süt salgısında fiziksel ya da kimyasal hem meme dokusunda patolojik değişikliklerin şekillenmesiyle karakterizedir (Baştan 2002). Mastitis sebebi olan bakteriyel patojenler kaynağına göre bulaşıcı ve çevresel etkenler olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Bulaşıcı patojen etkenler *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* ve *Staphylococcus aureus* çevresel etkenler ise *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* ve enterokoklardır (Hardie ve Whiley 1997, Franzetti ve ark. 2004).

Enterokoklar her yerde ve hemen her zaman bulunabilen mikroorganizmalardır. Ekosistem içinde bitkilerde, gıdalarda, sulara, toprakta, hayvanların/insanların deri, gastrointestinal ve ürogenital sistemlerinin doğal florasında bulunur. Oportünistik patojendirler ve beslenme, bakım şartlarının uygun olmadığı hayvanlarda septisemi, üriner sistem infeksiyonu, diyare ile endokarditlere sebep olmaktadır (Facklam ve ark. 1998). Hayvanlarda ise sporadik infeksiyonlar oluşturur. Bunlardan en önemlileri kahverengi yumurtacılar da neden oldukları amiloid artropati ve sığırlarda subklinik mastitistir (Diker ve ark. 2011).

İnsandan insana bulaşma yeteneğı olduğu bilinen hayvansal kökenli enterokoların özellikle subklinik mastitisli süt ve süt ürünleri ile insanlara bulaştığı bildirilmektedir (Tenhagen ve ark. 2006). Ayrıca enterokoklar antibiyotik direnç genleri taşımaları açısından da önemlidir. Hayvanlarda ve insanlarda diğer patojen ve komensal bakterilere de antibiyotik direnç genlerini aktarabilir ve antibiyotik direncinin artmasına sebep olabilirler (Murray 1990, Klare ve ark. 2003).

## 1. 1. Enterokokların Tarihçesi

Enterokok ismi ilk kez Thiercelli tarafından 1889 yılında, bakterinin bağırsak kökenli olduklarını belirtmek için kullanılmıştır (Murray 1990). Andrewes ve Holder 1906 yılında *Streptococcus faecalis*'i, Orla-Jensen ise 1919 yılında *Streptococcus faecium*'u tanımlamıştır (Koneman ve ark. 1992). 1937 yılında Sherman'ın sınıflamasıyla streptokok türleri dört grupta incelenmişlerdir. Bunlar: piyojenik, viridans, laktik ve enterokoklardır. 1984 yılında Bergey's Manual'de enterokokların ayrı bir cins olarak sınıflandırılması gerektiği bildirilmiştir. Böylece daha önceden, hücre duvarı antijen yapısına göre Lancefield tarafından D-grubu streptokoklar grubunda gösterilen enterokokların, D-grubu streptokoklardan ayrı bir cins olduğu belirlenmiştir (Moellering 1995).

## 1. 2. Sınıflandırma

1984 yılında *Enterococcus* cinsinin adının konulmasından sonra, streptokoklardan ayrı bir cins olarak kabul edilen enterokoklar (Çizelge 1. 1) içerisine *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinin dâhil edilmesi ile birlikte, günümüzde enterokok cinsinde en az 34 farklı tür bildirilmiştir (Çizelge 1.2) (Facklam ve Teixeira 1998).

Çizelge 1. 1. Enterokokların sınıflandırılması

| Alem  | Bakteri             |
|-------|---------------------|
| Bölüm | Firmicutes          |
| Sınıf | Bacilli             |
| Takım | Lactobacillales     |
| Aile  | Enterococcaceae     |
| Cins  | <i>Enterococcus</i> |

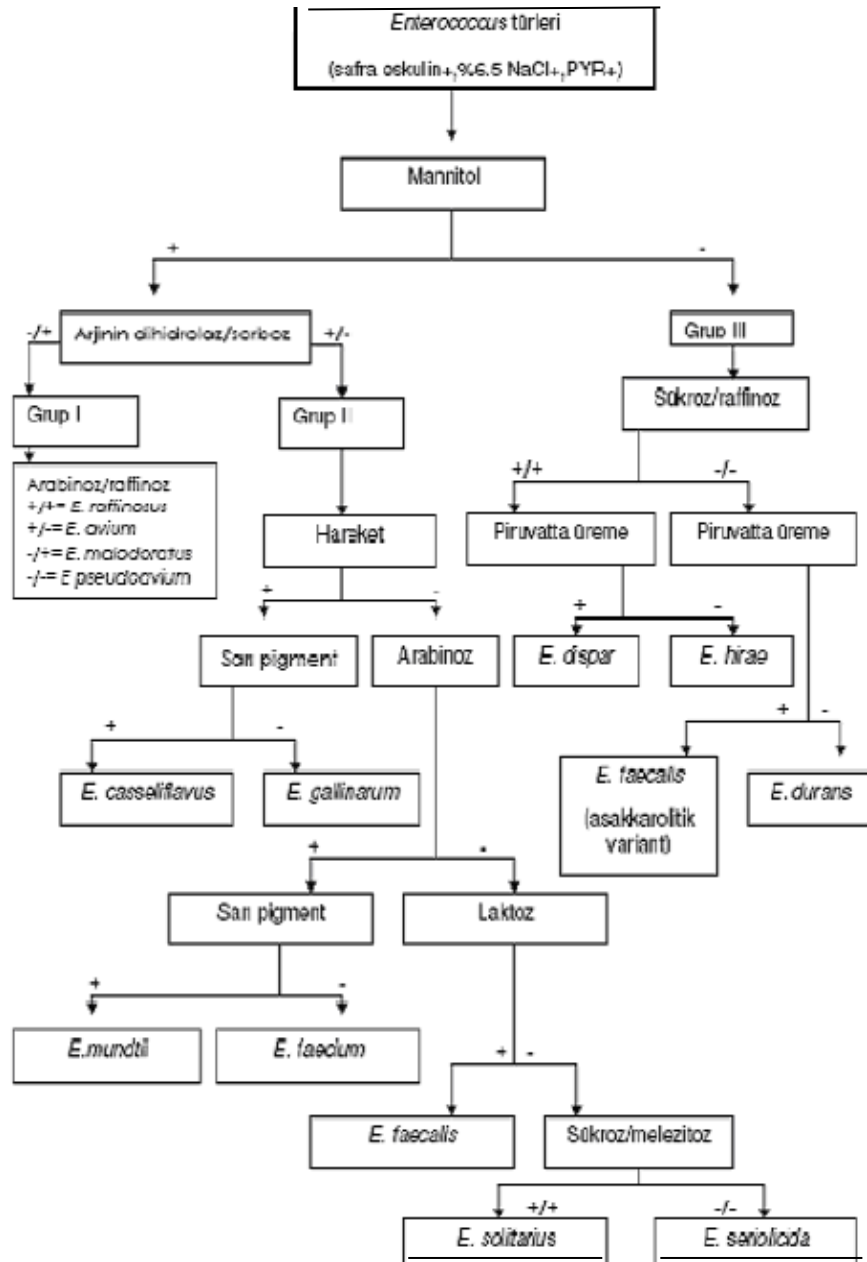
Çizelge 1. 2. Enterokok cinsi içerisinde yer alan türler

|                         |                          |                           |                  |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------|
| <i>E. aquimarinus</i>   | <i>E. faecalis</i>       | <i>E. pallens</i>         | <i>E. durans</i> |
| <i>E. asini</i>         | <i>E. faecium</i>        | <i>E. phoeniculicola</i>  |                  |
| <i>E. avium</i>         | <i>E. gallinarum</i>     | <i>E. pseudoavium</i>     |                  |
| <i>E. caccae</i>        | <i>E. gilvus</i>         | <i>E. raffinosus</i>      |                  |
| <i>E. canintestini</i>  | <i>E. haemoperoxidus</i> | <i>E. ratti</i>           |                  |
| <i>E. canis</i>         | <i>E. hermanniensis</i>  | <i>E. saccharolyticus</i> |                  |
| <i>E. casseliflavus</i> | <i>E. hirae</i>          | <i>E. silesiacus</i>      |                  |
| <i>E. cecorum</i>       | <i>E. italicus</i>       | <i>E. sulfureus</i>       |                  |
| <i>E. columbae</i>      | <i>E. malodoratus</i>    | <i>E. termitis</i>        |                  |
| <i>E. devriesei</i>     | <i>E. moraviensis</i>    | <i>E. thailandicus</i>    |                  |
| <i>E. dispar</i>        | <i>E. mundtii</i>        | <i>E. villorum</i>        |                  |

### 1. 3. Mikrobiyolojik Özellikler

Enterokoklar Gram pozitif, sporsuz ve yaklaşık 1 µm çapında koklardır. Mikroskopta kok yapıları, çiftler halinde veya kısa zincir olarak görülür. Morfolojik özelliklerine göre streptokoklardan ayrılması zordur. Fakültatif anaerob bakterilerdir. Katalaz negatiftir, fakat bazı kökenlerinde 'pseudo catalase' ürettiği görülmüştür (Diker ve ark. 2011).

Çizelge 1. 3. Enterokok identifikasyon şeması



### 1. 3. 1. Üreme özellikleri

Enterokoklar %6,5 NaCl'lü ortamda, 10-45°C'de üreyebilen, 60°C'de 30 dakika canlı kalabilen ve eskülini hidrolize edebilen etkenlerdir. Ayrıca %40 safra tuzu içeren besiyerinde ve 9,6 pH'da üreyebilmektedir. Sitokrom enzimleri bulunmadığından katalaz olumsuzdurlar. Glikozdan gaz yapabilirler. Kanlı agarda enterokok kolonileri gri, büyük, parlak, buğulu görünümde olup çok farklı şekillerde (alfa, beta hemolitik ya da non) hemoliz yapabilirler. Bazı türler (*E. cecorum*, *E. columbae* ve *E. saccharolyticus*) dışında kalan tüm türler PYR (pirolidonil betanaftilamid)'yi hidrolize etmektedir. Bazı türleri (*E. casseliflavus*, *E. flavescens* ve *E. gallinarum*) hareketlidir. Bazı türleri *E. faecalis*, *E. faecium*'un tersine %0,04 tellürit içeren ortamda üremekte ve agarda siyah koloniler meydana getirmektedirler. Bu özellikleri enterokoklar için ayırd edici olmakla birlikte, daha az rastlanan bazı türlerin (*Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Aerococcus*) Gram pozitif, katalaz negatif koklarda da benzer özellikleri bulunmaktadır. *Aerococcus* ve *Lactococcus* türleri grup D antiserumu ile reaksiyon vermemeleri; *Leuconostoc* ve *Pediococcus* türleri de PYR testi olumsuz olmaları ile enterokok cinsinden farklı özellik taşımaktadırlar (Teixeira ve ark. 2003).

Gram negatif bakterilerin de bulunduğu karışık kültürlerden izole edilmeleri için selektif besiyeri olarak azid içeren Enterococose agar, Columbia-Kolistin-Nalidiksik asit agar (CNA), safra-eskulinazid agar, veya fenil etil alkol agar (PEA) kullanılabilir (Winn ve ark. 2006). Selektif besiyerlerinin içerdikleri kimyasal maddelere bağlı olarak koloni rengi de farklı olabilir. Örneğin tetrazolium tuzları içeren agarda kolonilerin ortasında tuğla kırmızısı renk oluşur ancak safra-Eskulin-Azid agar gibi eskulin içeren agarda koloniler siyah bölge ile çevrelenmiş, gri-beyaz koloniler olarak görülebilir (Facklam ve ark. 1998).

Enterokokların bazal metabolik faaliyetleri için çeşitli vitaminlere (B1, B6 ve B12) nükleik asit bazları ve bir karbon kaynağına ihtiyaçları vardır Enterokokların karbon metabolizması, solunum, iyon transportu, pirimidin ve folat yolları, stres cevapları ve reaktif oksijen türleri metabolizmaları oldukça farklı özellik taşıması sebebi ile dikkat çekicidir (Facklam ve ark. 1998).

Enterokoklar sorboz, mannitol, sorbitol içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmalarına ve arginini hidrolize etmelerine göre beş farklı grupta incelenmektedir:

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

**Grup 2:** Bu grupta *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. haemoperoxidus*, *E. mundtii* ve *E. gallinorum* bulunur. Bu gruptaki türler arginini hidrolize eder, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluşturur, sorbozdan asit oluşturmaz ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler.

**Grup 3:** Bu grupta *E. villorum*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. ratti* ve *E. faecalis* ile *E. faecium*'un mannitol negatif varyantları bulunur. Bu gruptaki türler D antijeni içermez, arginini hidrolize eder, fakat mannitol, sorboz ve sorbitol içeren sıvı besiyerlerinin hiçbirisinde asit oluşturmaz.

**Grup 4:** Bu grupta *E. sulfurens*, *E. asini*, *E. phoeniculicola* ve *E. cecorum* yer almaktadır. Bunlar mannitol ve sorboz içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmaz ve arginini hidrolize etmez. Sorbitol içeren sıvı besiyerinde ise *E. cecorum* asit oluştururken, *E. sulfureus* asit oluşturmaz.

**Grup 5:** Bu grupta *E. columbae*, *E. canis*, *E. moraviensis* bulunur. Bu gruptaki türler arginini hidrolize etmez, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluşturur, sorbozdan asit oluşturmaz ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verir (Facklam 1998). Fenotipik özelliklerine göre enterokok türlerinin sınıflaması Çizelge 1. 4.'de gösterilmiştir (Koneman ve ark. 2005).

**Çizelge 1. 4.** 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. hirae</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 dâhil edilmiştir

### 1. 3. 2. Genom Özellikleri

Hastane infeksiyonlarında en sık izole edilen türler olan *E. faecalis* ve *E. faecium*'un bazı suşlarının detaylı tam genom dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Enterokokların G+C içeriği % 37-45 arasında bulunmaktadır. *E. faecium* genomu 2.928.706 bp büyüklüğündedir. Genomda toplam G+C oranı ise %37,8'dir (Tendolkar ve ark. 2003).

### 1. 3. 3. Genetik Bilgi Transferi

*E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının virulansına, ilaç direnci ile ilgili genetik bilgi transferinin yapılmasına katkı sağlayan pek çok transpozon, patojenite adası, plazmid, integre plazmid geni ve faj bölgesi, fazla sayıda insersiyon dizileri bulunmuştur (Facklam ve ark. 1998).

Enterokoklarda üç farklı sınıf (RCR, Inc18 plazmid) plazmid bulunmaktadır. RCR ve Inc18 plazmidleri pek çok cinste replike olabilirken, feromon responsive plazmid replikasyonu sadece enterokoklarla, özellikle de *E. faecalis*'de bulunmaktadır. Plazmidi bulunmayan alıcı suşlar ekstraselüler feromon sentezleyerek, verici hücre dış yüzeyinde agregasyon faktör (AF) denilen protein yapıda maddenin oluşumunu katkı sağlar. AF alıcı hücrenin yüzeyine bağlanır, alıcı ile verici hücrenin yakınlaşması sonucu plazmid değişimi meydana gelir. Feromon ile indüklenmiş transfer plazmid geçişini oldukça ( $10^5$ - $10^6$  kat kadar) arttırmaktadır (Facklam ve ark. 1998, Tendolkar ve ark. 2003).

Enterokoklar ayrıca konjugatif transpozonlar ile de genetik bilgi değişimi yapabilir. Bunun için hücrelerin birbirine temas etmesi gereklidir. Transpozonlar genellikle antimikrobiyal ilaçlara (tetrasiklin, eritromisin, gentamisin, kanamisin ve diğer aminoglikozidler) direnç genlerini yapılarında bulundurlar. Konjugatif transpozon Tn916, *E. faecalis*'lerde tetrasiklin direncini kodlarken; Tn1546 vankomisin direncini kodlayan *VanA* gen kümesini, Tn1547, Tn1549 ve Tn 5382 *VanB* operonunu, Tn5281 yüksek düzey gentamisin direncinden sorumlu *aac(6')* *Ieaph(2')* *Ia* genini taşır. Transpozonlar çok geniş bir konak spektrumuna sahip olmakla birlikte enterokoklar ile birlikte diğer bazı bakterilerde (streptokoklar, laktokoklar, diğer Gram pozitif) mevcuttur (Facklam ve ark. 1998, Tendolkar ve ark. 2003).

## 1. 4. Virulens Faktörleri

Enterokoklar insan ve hayvanların sindirim sistemlerinde kommensal bulunan etkenler olmalarına rağmen, belirli koşullarda barsak dışı bölgelere yayılarak çeşitli infeksiyonlara neden olabilirler. Enterokokların antibiyotik dirençleri ve virulansla ilişkili yeni genetik materyal kazanabilme yetenekleri onları daha virulan yapar ve konakta farklı bölgelere kolonizasyonuna alışılmışın dışında infeksiyon oluşturmaya katkı sağlamaktadır. Ancak kolay genetik bilgi transferi, bu etkenin virulansından sorumlu tek neden değildir. Yapılan çalışmalarda enterokokların çok farklı virulens faktörleri tespit edilmiştir (Upadhyaya ve ark. 2009).

Mikroorganizmaların virulansı genomlarında mevcut olan patojenite adaları (PI) denilen özel yapılara ve plazmidlerde kodlanan virulans genleri ile ilişkilidir. Enterokokların sahip oldukları PI ilk olarak 1980'de hastane infeksiyonlarına sebep olan çoklu ilaç direnci bulunan *E. faecalis*'te tanımlanmıştır. G+C oranı %32,2, büyüklüğü aşağı yukarı 150 kb olan bu PI; enterokokal yüzey proteini, sitolizin ve agregasyon faktörü gibi bazı virulans genlerinin yanı sıra transpozonlar, transkripsiyonel regülatörler ve proteinleri kodlayan genlerin yer aldığı 129 özel gen bölgesini (ORF) taşımaktaydı (Tendolkar ve ark. 2003, Shankar ve ark. 2006, Upadhyaya ve ark. 2009). Bu PI'nin tespitinden yaklaşık iki yıl kadar sonra *E. faecium* suşlarında *E. faecalis*'dekinden farklı olan başka bir PI bildirilmiştir. *E. faecium* klinik izolatlarında enterokokal yüzey proteini geninin belirlenmesi bu türdeki patojenite adası için bir önemli bir gösterge olduğu düşünülmektedir. Farklı VRE izolatlarındaki PI dizilerinin incelenmesi ile yüksek derecede dizi benzerliklerinin bulunduğu ve spesifik gen bölgelerin değişen sıklıkta delesyona uğradıkları tespit edilmekle birlikte bu mikroorganizmaların virulens düzenleme yeteneği kazanabildikleri de görülmüştür. Diğer taraftan bu çalışmalarda PI'larının en az üçte birinin konjugatif bir plazmidin kromozoma integrasyonu ile oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca PI larda fonksiyonu tam olarak hala bilinmeyen 18 ORF bölgesi kodlanmaktadır. Kommensal enterokokların PI'lerinde bu ORF bölgeleri gösterilememiş, bu nedenle de, bunların enterokokların hastane ortamında yaşamasına veya hastalık geçişine veya patogeneze katkı sağladıkları kanısına varılmıştır (Upadhyaya ve ark. 2009). Enterokokların en önemli virulans faktörleri Çizelge 1. 5.'de özetlenmiştir:



**Çizelge 1. 5.** Enterokoklarda önemli virulens genleri ve virulensde genin rolü

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

#### 1. 4. 1. Jelatinaz

Enterokoklarda jelatinaz enziminin tespit edilmesi ilk kez 1964 te *E. faecalis* suşlarında bildirilmiştir. Jelatinaz enzimi üretiminin inhibisyonunun, doku kültüründe kemik rezorbsiyonunu azalttığı 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 bildirilmiştir (Portenier ve ark. 2003).

#### 1. 4. 2. Enterokokal Yüzey Proteini (*esp*)

İlk kez *E. faecalis*'de bildirilmiş olan bu büyük yüzey proteininin kompleks bir yapısı mevcuttur. Karboksi ucu hücre duvarına tutunmayı kolaylaştırmakta, proteinin iç kısmında ise tekrarlayan ünitelerden oluşan ve moleküle uzayıp kısalabilme özelliği kazandıran bir bölge bulunmaktadır. Bu proteinin etkenin bağışık yanıttan kaçışını kolaylaştırdığı sanılmaktadır

(Sayiner ve ark. 2008). Yüksek moleküler ağırlığa sahip, *esp* 153 kb büyüklüğündeki bir patojenite adasında yer alan *esp* geni tarafından kodlanır. Konjugasyonla enterokok izolatları arasında kolaylıkla nakledilebilir. *esp*, salgına yol açan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında tespit edildiğinden, epidemik suşları gösteren bir belirteç olduğu kabul edilmektedir (Oancea ve ark. 2004, Coque ve ark. 2005). *esp*, bakteriyemi ve endokardit ile ilişkili suşlarda genellikle daha yüksek oranlarda tespit edilirken, gaita kökenli izolatlarında daha az belirlenmiştir (Kayaoğlu ve Orstavik 2004, Upadhyaya ve ark. 2009).

### **1. 4. 3. Hücre Duvar Adezinleri**

Endokardit vakalarından izole edilen *E. faecalis* suşlarında ilk kez bildirilmiştir. Hücre duvar adezin proteini olan *EfaA*, *efaA* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu proteinin aminoasit dizisi, streptokokal adheziner olarak bilinen bazı proteinlerle %55-60 benzerliği bulunmaktadır. *EfaA*, mangan transport sistemi için önemli bir protein reseptörüdür. Bakateilerin hayatta kalabilmesi ve çoğalması için mangan gerekir ve *efaA* mangandan fakir ortamda fazla miktarda sentezlendiği bildirilmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik 2004).

### **1. 4. 4. Cinsiyet Hormonları**

Bazı enterokoklar suşları tarafından sentezlenen küçük peptitlerdir. Suşlar arası plazmid DNA'sının konjugasyonunu denetler. Nötrofiller için kemotaktik olduklarından enfeksiyonlarda inflamatuvar cevabı artırır (Sayiner ve ark. 2008). Bazı seks feromonları nötrofiller için kemotaktiktir ve doku hasarına neden oldukları bildirilmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik 2004).

### **1. 4. 5. Agregasyon Faktörü**

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 ile indüklenen bir adezin olan agregasyon faktörü alıcı ve verici bakterilerin birleşmesine katkıda bulunarak plazmid transferini sağlamaktadır. Ayrıca bazı çalışmalarda, renal tübüler hücrelere bağlanmayı güçlendirdiği bildirilmiştir (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).

#### 1. 4. 6. Sitolizinler

Sitolizin ya da hemolizin, özellikle *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında bulunabilen, tavşan, insan, at, sığır eritrositlerini hemoliz eden hemolizinler virülansta rol oynar. Bakteriyosin olarak çok sayıda Gram pozitif bakteriyi etkileyebilen toksik aktivitesi ile de işlev gördüğü gösterilmiştir. Ayrıca immün sistem üzerinde polimorfonükleer lökositlere ve makrofaj üzerine tahrip edici etkisi olduğu dolayısıyla direkt doku harabiyeti yaptığı da gösterilmiştir (Sayiner ve ark. 2008). Sitolizin, hemolitik özellik taşımaktadır. Sitolizin kodlayan gen bölgesi bakteriyel kromozoma entegre olarak ya da plazmid üzerinde bulunabilir. Toksinin at ve insan kanı içeren agarlarda hemolitik aktiviteye sahip olması, koyun eritrositlerinde ise etkili olmayışı klinik laboratuvarında tanımlanması açısından önemli bir özelliktir (Sayiner ve ark. 2008).

#### 1. 4. 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 yöntemlerle çok kolay belirlenebilen yukarıda bahsedilen en önemli virulens faktörlerinin dışında kapsül, hücre duvarı polisakkaritleri, lipoteikoik asit, süperoksitler, hyaluronidaz ve AS-48, MSCRAMM Ace (Microbial surface komponent recognizing adhesive matrix molecule adhesin of kollagen from enterococci) başka virulens faktörlerinin de varlığı bildirilmektedir (Tendolkar ve ark. 2003).

## **1. 5. Antibiyotik Direnci**

Hastane infeksiyonlarına neden olan enterokokların neden oldukları infeksiyonlar, hastanın yoğun antibiyotik kullanımı sonucu bağırsak florasında bulunan duyarlı suşların ortadan kaybolması sonucu antibiyotik dirençli, sitolitik toksin oluşturabilen ve pek çok virülans özelliklerine sahip suşların bağırsak florasına hakim olması ile başlar. Bu suşlar translokasyonla endojen kökenli çevreye yayılarak da duyarlı hastalarda ekzojen infeksiyonların oluşmasını sağlar. Bu suşlarda görülen antibiyotik direnci suşların intestinal florada seçilip çoğalmalarını sağlarken, jelatinaz ve sitolitik toksin gibi diğer bazı virulens faktörleri de doku invazyonunu kolaylaştırarak patojeniteye katkı sağlamaktadır (Klare ve ark. 2003).

### **1. 5. 1. Enterokoklarda Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları**

Antimikrobiyal direnç denilince bir bakterinin antimikrobiyal bir ajanının üremesini durdurucu veya öldürücü etkisine karşı koyabilme yeteneği anlaşılmaktadır. Direnç gelişimi ve yayılımı çoğunlukla uygun olmayan antibiyotik kullanımı ile ilişkilendirilmekle birlikte, 1940'lı yıllarda antibiyotiklerin kullanılmadığı bazı adalarda toprak ve dışkı örneklerinde tetrasiklin ve streptomisin antibiyotiklerine dirençli bakterilerin mevcut olduğu belirlenmiştir. Bunun sonucunda da antibiyotik direncinin sadece yaygın antibiyotik kullanımının bir neticesi olmadığı, bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamına devam edebilmek için kullandığı bir savunma mekanizmasının parçası olduğu düşünülmektedir (Yüce 2001). Bununla birlikte; antibiyotiklerin yoğun şekilde kullanılmasıyla yıllar içinde çoğul dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmış ve bunlarla oluşan infeksiyonların sağaltımında büyük problemler oluşmuştur. Günümüzde tüm dünyada hızla yeni ilaçlar geliştirilmekte iken, bunlara süratle direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonlar da bildirilmektedir (Yüce 2001). Enterokoklarda antibiyotik direnç mekanizmaları yaygın olarak iki şekilde açıklanabilmektedir:

### **a. İntrensek (Doğal/Kromozomal) Direnç**

İntrensek direnç, enterokok türlerinin çoğunda ya da tümünde doğal olarak kromozomlarda kodlanmış bir özelliktir. Bazı antibiyotikler için gözlenen yapısal direnç mekanizmaları tipik olarak bazı *Enterococcus* türlerine veya cinslerine özeldir (Teixeira ve ark. 2007). Düşük düzeyde klindamisin direnci ve düşük düzeyde aminoglikozid direnci enterokoklardaki intrensek direncin en tipik örnekleridir. Polimiksine, sefalosporinlere, penisilinaz dirençli semisentetik penisilinlere, aztreonama direnç ve florokinolonlara sınırdı duyarlılık da enterokokların karakteristik özelliğidir. Penisilinaz dirençli semisentetik penisilinlerin yanı sıra enterokokların diğer penisilinlere duyarlılığı da azalmıştır. Enterokoklar üzerine tek başına bakterisidal etkili antibiyotik bulunmaması enterokok kaynaklı endokardit tedavisinde tek ilaç kullanıldığında başarısızlığa neden olur. *E. faecium* beta-laktam grubu antibiyotiklere doğal olarak daha dirençli olmasının yanında aminoglikozid direncinde de türe özgü farklılık gösterir (Menteş ve Balcı 2007).

### **b. Kazanılmış Direnç**

Kazanılmış direnç, intrensek dirençten daha değişkendir, mevcut DNA'daki plazmid, mutasyon ya da transpozon üzerindeki bir genetik elemanın kazanımıyla ortaya çıkmaktadır (Frazzon ve ark. 2010).

Enterokoklar ayrıca edindikleri değişik genetik özellikler ile kloromfenikol, tetrasiklin, makrolid, streptograminler ve linkozamid, aminoglikozidler, glikopeptitler, beta laktamlar ve son olarak da kinolonlar gibi değişik antibiyotik gruplarına direnç kazanmaktadır. Enterokoklarda geçtiğimiz son birkaç dekad içerisinde ortaya çıkan kazanılmış antibiyotik direncinde, özellikle yüksek düzey aminoglikozid direnci, beta laktamlar ve glikopeptidlere direnç artan oranlarda bildirilmektedir. Hücre duvarına etkili ajanlara dirençli olan ya da yüksek düzey aminoglikozid direncine sahip izolatlar kombinasyon tedavisinin sinerjistik etkisine direnç gösterecekleri için daha da ciddi problem olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Dolayısıyla bu grup antimikrobiyal ajana karşı direnç durumunun belirlenmesi, antibiyotik kombinasyonları ile sinerji elde edilip edilmeyeceğini göstermesi bakımından tedavi stratejisini belirlemeye yardımcı olacaktır. Bir veya birden fazla aminoglikozide yüksek düzeyli direnç gösteren enterokok izolatları artan sıklıkla bildirilmektedir (Teixeira ve ark. 2007, Channaiah ve ark. 2010).

Enterokok türlerinde vankomisin direnci, tedavide bir sorun olarak ilk kez Batı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerinde ortaya çıkmış ve bildirilmiştir. Bunu takiben vankomisine dirençli enterokok izolasyonu yaygın ve değişik coğrafi bölgelerden sürekli olarak bildirilmiştir. Vankomisine dirençli enterokok suşları genotipik ve fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılır. Enterokoklarda larda üç tanesi daha sık olmak üzere altı tip glikopeptid direnci saptanmıştır. Bunlar VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG'dir. VanD, VanE, VanG fenotiplerinin epidemiyolojik önemi tam olarak anlaşılammıştır. Bilinen fenotipler arasında sadece VanC intrensek olma özelliğine sahiptir. VanA ve VanB tipi direnç *E. faecium* ve *E. faecalis*'te tanımlanmış olup kazanılmış dirençlerdir (Menteş ve Balcı 2007, Radhouani ve ark. 2010).

Glikopeptide dirençli enterokokların sayılarının artmasıyla birlikte bu türler dünya çapında önemli bir problem olarak ortaya çıkmaktadır (Ke ve ark. 1999). Glikopeptidler immun sistemi zayıf ya da bastırılmış bireylerde birçok enfeksiyona karşı en son çare olarak kullanılan antibiyotiklerdir. Günümüzde enterokok cinsi bakteriler Amerika'da ikinci en sık hastane enfeksiyonu yapan bakteri olarak bildirilmektedir (Klein ve ark. 2003). Enterokok enfeksiyonlarda klinik izolatların büyük çoğunluğunu *E. faecalis* izolatları oluştururken daha az bir kısmını ise *E. faecium* oluşturmaktadır (Lu ve ark. 2002, Erdem ve ark. 2004). Bu bakteriler klinik uygulamalarda kullanılan birçok antibiyotiğe karşı dirençlidirler (Lukasova ve Sustackova 2003).

## 1. 6. Epidemiyoloji

Enterokoklar, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinin üyeleridir. Doğada; toprak, su, bitki, kuşlar, böcekler ve memelilerde yaygın olarak bulunur (Belgacem ve ark. 2010). Konakçı dağılımı oldukça geniştir. Bağırsak içerisinde özellikle de orta bağırsak bölümünde yüksek düzeylerde bulunabilirler ( $10^5$ - $10^7$  bakteri/g). Ayrıca topraktan, besin maddelerinden, yüzey sulardan ve lağım sularından izole edilebilirler (Diker ve ark. 2011). Bu nedenle sularındaki fekal kontaminasyonun belirlenebilmesi amacı ile indikatör mikroorganizma olarak kabul edilirler. İnsan dışkısında *E. faecalis* ( $10^5$ - $10^7$  cfu/gr), *E. faecium*'dan ( $10^4$ - $10^5$  cfu/gr) daha fazladır, ancak özellikle hastane enfeksiyonlarında *E. faecium* daha fazla izole edilmektedir (Fisher ve Phillips 2009, Hizaji ve ark. 2009).

Enterokoklar fırsatçı patojen oldukları için insanlarda enfeksiyona yol açan her bir türün insidansı insan gastrointestinal sistemdeki varlığının bir yansıması olacaktır. Bu bölge hastalıklara neden olan suşların önemli bir kaynağı olarak kabul edilir. Bakteriler enfeksiyon yapmak üzere buldukları yerden başka bir bölgeye göç edebilir, ayrıca başka konaklara ya da çevreye yayılabilirler. Enterokoklar değişik hayvan türlerinde bulunabilirler de başka kaynaklarda farklı enterokok türlerinin bulunması, dağılımın insanlardan daha farklı olduğunu göstermektedir. Enterokokların dışkıda yoğun olarak bulunmaları, kimyasal ve fiziksel koşullara dayanıklılıkları ile buldukları ortamda canlılıklarını sürdürmeleri nedeniyle gıda, süt ve kullanım suyunun hijyenik özelliklerini belirlemede ve dışkı kontaminasyonunun saptanmasında bir belirteç olarak kullanılmasına yol açar (Teixeira ve ark. 2007).

### **1. 7. Enterokokların Önemi**

Enterokoklar oldukça geniş konakçı dağılımına sahiptirler. Hayvanların sindirim sisteminde doğal flora bakterisidirler ve özellikle altlık temizliğinin düzenli yapılmadığı, sağım hijyenine dikkat edilmediği durumlarda memeleri kolaylıkla enfekte ederek mastitis sebepleri olurlar. Meme başından giriş yapan enterokoklar meme kanalı boyunca yerleşerek kolonize olmaktadır. Bunun sonucunda da meme bezinde enfeksiyona ilişkin olarak klinik bulgular meydana getirmektedirler (Mannu ve ark. 2003, Petersson-Wolfe 2006). Enterokoklar tek başlarına mastitis oluşturabilmelerine karşılık mastitis olgularından genellikle streptokoklar ile birlikte izole edilmektedirler. Bu sebeple enterokokal kökenli mastitisler sıklıkla streptokokal kökenli mastitisler ile karıştırılmaktadır (Smith ve Hogan 2003). Yapılan izolasyon çalışmalarında, mastitislerden farklı oranlarda (%6-42) enterokok izolasyonunun gerçekleştirildiği görülmektedir (McDonald ve McDonald 1976, Petersson - Wolfe 2006). Çevresel epidemiyolojiye sahip olan enterokok etkenleri, insanlarda nozokomial enfeksiyonlarda önemli bir problem haline gelmelerine karşın epidemiyolojileri konusunda bilgiler yetersizdir (Petersson-Wolfe 2006).

Enterokokların insan sağlığı açısından önemi özellikle hastane enfeksiyonlarından izole edilen suşlarda antibiyotik direncidir. Başta vankomisin olmak üzere diğer antibiyotiklere dirençli enterokoklara bağlı enfeksiyonların tedavisi problem oluşturmaktadır. Enterokoklarda vankomisin direnci, kanatlılarda avoparsin kullanımıyla ilişkili olarak artmış ve bu yem katkısı büyütme faktörünün yasaklamasından sonra vankomisin dirençli enterokokların azaldığı gözlenmiştir (Diker ve ark. 2011). Enterokok kökenli enfeksiyonlar

içerisinde *E. faecalis* sebebi ile oluşan infeksiyonların oranı diğer türlere göre çok daha fazla olmasına karşın, vankomisine dirençli enterokok türlerinin ortaya çıkması sebebiyle bu oran gittikçe düşmüş ve *E. faecium* izolatları ön plana çıkmıştır (Basustaoglu ve ark. 2002).

Enterokok cinsi bakteriler, gıdaların normal floralarının da bir parçası oldukları için, sadece kötü hijyen koşullarının göstergesi değildirler (Giraffa 2002, Karataş 2005). Bu bakteriler birçok gıdada doğal olarak bulunan ve çeşitli gıdaların fermentasyonunda rol oynayan önemli mikroorganizmalardır. Özellikle bazı fermente et ürünlerinin ve bazı peynir çeşitlerinin mikrofloralarının önemli bir kısmını oluştururlar (Giraffa 2003, Karataş 2005). Diğer yandan enterokok cinsinde bulunan bakteriler, genel olarak fekal çevrelerde yoğunlukla bulunmalarına karşın, gıdaların üretim aşamalarında hijyenik olmayan koşullar sebebiyle de ortaya çıkarlar (Giraffa 2003). Bunun yanı sıra çevresel ve intestinal kontaminasyonla da et ve süt gibi çiğ gıdalarda kolonize olabilirler. pH, sıcaklık ve tuza karşı oluşturdukları direnç sebebiyle, gıda üretimi aşamalarında canlı kalarak son ürünü de kontamine edebilmektedirler. Bu sebeple gıdalarda bulunmaları kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir (Hugas 2003, Karataş 2005).

Enterokok türlerinin sahip olduğu antibiyotik dirençliliği, virulens faktörleri ve genetik değişkenlikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, suşlar arasında konakçı orijinine göre farklılıkların mevcut olduğu, antibiyotik direnç mekanizması ve virulens gen özellikleri yönünden farklı mekanizmalarla bu özellikleri kazandıkları belirtilmiştir (Charles ve ark. 2001, Petersson-Wolfe ve ark. 2007). İnsandan insana da bulaşma yeteneği olduğu bilinen hayvansal kökenli enterokoların özellikle subklinik mastitisli süt ve süt ürünleri ile insanlara bulaştığı bildirilmektedir (Tenhagen ve ark. 2006). Meydana gelen infeksiyonlarda, *E. faecium*, antibiyotiklere karşı *E. faecalis*'ten daha dirençli olmasıyla dikkat çekmekte ve patojenik *E. faecium*'un çok çabuk antibiyotik direnç mekanizması geliştirebilmesinin ve bu özelliğini transfer edebilme kabiliyetinin sağlık açısından önemli bir risk olduğu düşünülmektedir (Lund ve ark. 2002).

Enterokokların patojenitelerine, sahip oldukları çeşitli virulens faktörlerinin önemli katkıları olduğu bilinmektedir. Yapılan daha önceki çalışmalar incelendiğinde, özellikle klinik ve çevresel örneklerden elde edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının virulens genlerinin incelenmesi üzerine odaklanmış oldukları görülmüştür. Yurdumuzda da mastitisli sığır sütlerinden izole edilmiş olan *E. faecium* suşlarının önemli virulens genlerinin incelendiği bir



Çalışma bulunmamaktadır. Bu alışmada, Aydın yoresindeki mastitisli sığır süt örneklerinden izole edilen *E. faecium* suşlarının önemli virulens genlerinden olan jelatinaz, enterokokal yüzey proteini ve *E. faecium* hücre duvar adezin genlerinin varlığının moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Enterokokların insan sağlığı için önemli bir patojen olduğu düşünüldüğünde, incelenen bu virulens genlerinin yöremizdeki suşlarda varlığı ve yaygınlığının belirlenebilmesi bu suşların patojeniteleri hakkında temel bilgi sağlama potansiyeli taşımaktadır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2. 1. Gereç

#### 2. 1. 1. İzolasyon Örnekleri

Çalışmada son iki yılda, Aydın İl sınırları içerisinde özel sektöre ait süt sığırcılığı yapılan 38 işletmedeki 242 inekten, uzman bir veteriner hekim tarafından alınmış olan, 600 mastitisli süt materyal olarak 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, 2–8 yaşlı, Holştayn ırkı, fiziksel muayenede meme loblarında anormallik bulunan (şişkinlik, sıcaklık, ağrı, kızarıklık ya da sulu, kanlı, pıhtılı süt gibi) ve CMT ile pozitif reaksiyon veren ineklerin sütleri alındı. Materyal alınan işletmelerin hepsinde makine ile sağım yapılmıyordu.

#### 2. 1. 2. Referans suş

Pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (*gelE* geni pozitif) (Lanthier ve ark. 2010a), negatif kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

#### 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 BBLTM 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    |
| Sodyum 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, 500 µl 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'a %6,5 NaCl ilavesi yapılarak çözülmüş, 5 ml 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 2015).

## 2. 1. 4. PZR

### 2. 1. 4. 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. 4. 2. MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer, dNTP Set

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

#### 2. 1. 4. 3. Primerler

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

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

| Primer                             | Dizi (5’-3’)                                      | Ampikon Uzunluğu (bp) | Kaynak               |
|------------------------------------|---|-----------------------|----------------------|
| Ent1<br>Ent2                       | TACTGACAAACCATTCATGATG<br>AACTTCGTCACCAACGCGAAC   | 112                   | Ke et al. 1999       |
| FAC11<br>FAC21                     | GAGTAAATCACTGAACGA<br>CGCTGATGGTATCGATTCAT        | 1.091                 | Vilela ve ark. 2006  |
| <i>gel</i> EF<br><i>gel</i> ER     | ACCCCGTATCATTGGTTT<br>ACGCATTGCTTTTCCATC          | 419                   | Eaton ve Gasson 2001 |
| <i>esp</i> F<br><i>esp</i> R       | TTGCTAATGCTAGTCCACGACC<br>GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA | 933                   | Shankar ve ark. 1999 |
| <i>efa</i> AfmF<br><i>efa</i> AfmR | AACAGATCCGCATGAATA<br>CATTTCATCATCTGATAGTA        | 735                   | Eaton ve Gasson 2001 |

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

Agarose (Sigma)..... 1 ve 1,5 g  
TBE (0,5 X)..... 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.

#### **2. 1. 4. 5. Marker**

Marker olarak 100 bp (Vivantis ve Fermentas marka) kullanıldı.

#### **2. 1. 4. 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:** Süt örnekleri alınırken, her meme lobu su ve sünger yardımı ile temizlenip kurulandı. Sonra %70'lik alkol ile temizlendi. Eller sabunlandıktan sonra eldiven giyildi. Meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak amacı ile ilk birkaç ml süt boşa sağılıp (Baştan 2002) steril enjektörler içine en az 3-5 ml miktarda süt alındı. Alınan tüm materyaller 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 laboratuvara getirildikten sonra, ilk olarak selektif enterokok M buyyona öze dolusu inokule edildiler. Buyyonlar aerobik koşullarda 37°C'de, besiyerinin parlak sarı rengi mavi-yeşil renge dönüşüncüye kadar, yaklaşık 24-72 saat, bekletildi. Renk değişimi besiyerinde enterokok üremesinin göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Mavi-yeşil renk olan buyyonlardan bir öze dolusu alınarak selektif 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 şüpheli kabul edilerek, incelenmek üzere tekrar 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 şüpheli koloniler moleküler yöntemler kullanılarak identifiye edilinceye kadar -20°'de %20 gliserinli BHIB içerisinde saklandı.

**2. 2. 3. 1. Katalaz Testi:** 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>) ayrıştırır. 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 büyümeleri 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. 3. 3. *E. faecium* suşlarının identifikasyonu

Elde edilen enterokok şüpheli izolatlarından *E. faecium* suşlarını tanımlamak için spesifik primer çifti kullanılarak PZR yapıldı.



### **2. 2. 3. 3. 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 kültür 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. 3. 3. 2. DNA’nın Elektroforezi**

Agaroz jel elektroforezi, 5µg/ml etidyum bromid’li %1 agaroz içeren mini jelde gerçekleştirildi. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde TBE tamponu kullanıldı 5 µl DNA solüsyonu, 2 µl yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 50 V’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. 3. 3. 3. DNA’nın Saflık Kontrolü ve Miktar Tayinleri**

İzolatlardan elde edilen genomik DNA’lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezi 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 absorbansları 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;  $DNA(\mu g/ml) = OD260 \times \text{Seyreltme Oranı} \times 50$  formülü ile hesaplandı (Turner ve ark. 2004).

## 2. 2. 4. PZR

Tüm PZR reaksiyonlarında master mikler 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 polymerase 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         |
| TOPLAM                    |                           | 300           |

Mastermikler hazırlandıktan sonra 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 28'er µl hazırlanan mastermiksten ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklendi ve ağzıları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı sırası ile *Enterococcus* sp. için Çizelge 2. 3.'de, *E. faecium* için Çizelge 2. 4.'de, virulens genlerinin tespiti için sırası ile Çizelge 2. 5. (*gelE*), Çizelge 2. 6. (*esp*) ve Çizelge 2.7.'de (*efaAfm*) gösterilmiştir.

**Çizelge 2. 3.** *Enterococcus* sp. PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

| Basamak                | Döngü Sayısı | Sıcaklık (°C) | Süresi |
|------------------------|--------------|---------------|--------|
| Başlangıç Denatürasyon | 1            | 95            | 4 dk   |
| Denatürasyon           | 35           | 95            | 30 sn  |
| Bağlanma               |              | 55            | 30 sn  |
| Uzama                  |              | 72            | 30 sn  |
| Son Uzama              | 1            | 72            | 10 dk  |

**Çizelge 2. 4.** *E. faecium* PZR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı

| Basamak                | Döngü Sayısı | Sıcaklık (°C) | Süresi |
|------------------------|--------------|---------------|--------|
| Başlangıç Denatürasyon | 1            | 95            | 5 dk   |
| Denatürasyon           | 35           | 95            | 30 sn  |
| Bağlanma               |              | 53            | 30 sn  |
| Uzama                  |              | 72            | 90 sn  |
| Son Uzama              | 1            | 72            | 15 dk  |

**Çizelge 2. 5.** *gelE* virulens geninin PZR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı

| Basamak                | Döngü Sayısı | Sıcaklık (°C) | Süresi |
|------------------------|--------------|---------------|--------|
| Başlangıç Denatürasyon | 1            | 95            | 5 dk   |
| Denatürasyon           | 35           | 95            | 30 sn  |
| Bağlanma               |              | 54            | 30 sn  |
| Uzama                  |              | 72            | 30 sn  |
| Son Uzama              | 1            | 72            | 15 dk  |

**Çizelge 2. 6.** *esp* virulens geninin PZR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı

| Basamak                | Döngü Sayısı | Sıcaklık (°C) | Süresi |
|------------------------|--------------|---------------|--------|
| Başlangıç Denatürasyon | 1            | 95            | 5 dk   |
| Denatürasyon           | 35           | 95            | 45 sn  |
| Bağlanma               |              | 56            | 45 sn  |
| Uzama                  |              | 72            | 60 sn  |
| Son Uzama              | 1            | 72            | 15 dk  |

**Çizelge 2. 7.** *efaAfm* virulens geninin PZR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı

| Basamak                | Döngü Sayısı | Sıcaklık (°C) | Süresi |
|------------------------|--------------|---------------|--------|
| Başlangıç Denatürasyon | 1            | 95            | 5 dk   |
| Denatürasyon           | 35           | 95            | 30 sn  |
| Bağlanma               |              | 50            | 30 sn  |
| Uzama                  |              | 72            | 60 sn  |
| Son Uzama              | 1            | 72            | 15 dk  |

#### 2. 2. 4. 1. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

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. 4. 2. Yürütme**

Hazırlanan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 100V 400A akımda 45 dakika yürütüldü.

#### **2. 2. 4. 3. Görüntüleme ve Değerlendirme**

Yüz voltda 45 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.

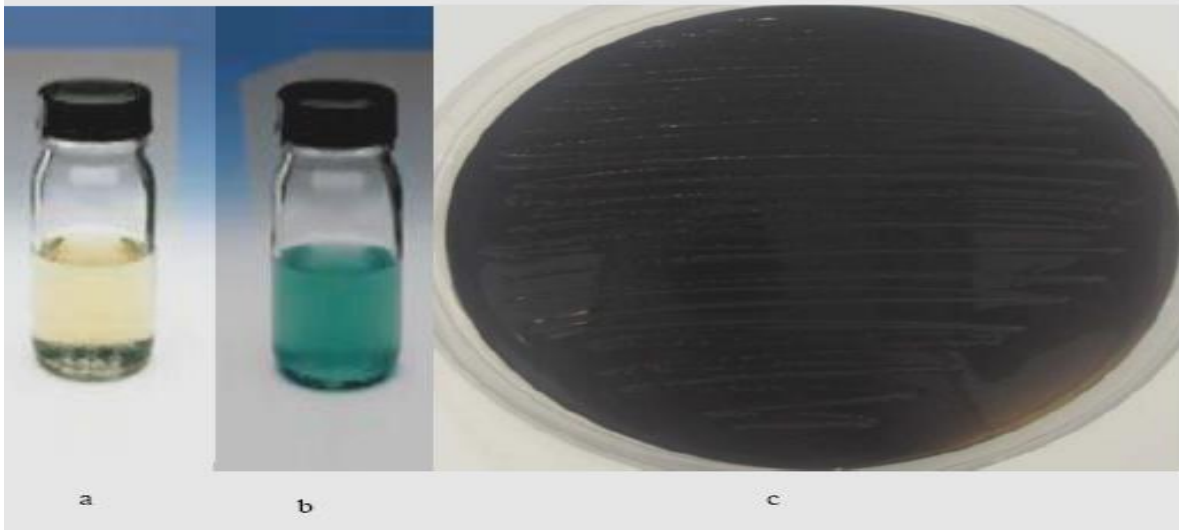
#### **2. 2. 5. Sekans Analizi**

Saha izolatlarımızda *E. faecium* suşları ile *esp* ve *efaAfm* virülens genleri varlığını belirlemek için, uygun primerler kullanılarak çoğaltılan bakteri DNA'larından bazıları pozitif kontrol olarak kullanmak amacı sekans analizine tabi tutuldular. Bunun için elde edilen amplikonlar sekans analizleri için ticari bir firmaya (Macrogen, Hollanda) gönderildi. Firma saflaştırmayı takiben ABI Primse cihazı ile sekans analizini gerçekleştirdi. *E. faecium*, *esp* ve *efaAfm* amplikonları sekanslanarak ile 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.

### 3. BULGULAR

#### 3. 1. İzolasyon

Bu çalışmada 600 mastitisli süt örneği incelendi. Chromocult® Enterococci Agar'da referans suşla (*E. faecalis* ATCC 29212) benzer görünümü (Resim 3. 1.) olan bakteri kolonileri seçilerek toplamda 96 *Enterococcus* sp. şüpheli izolat elde edildi.

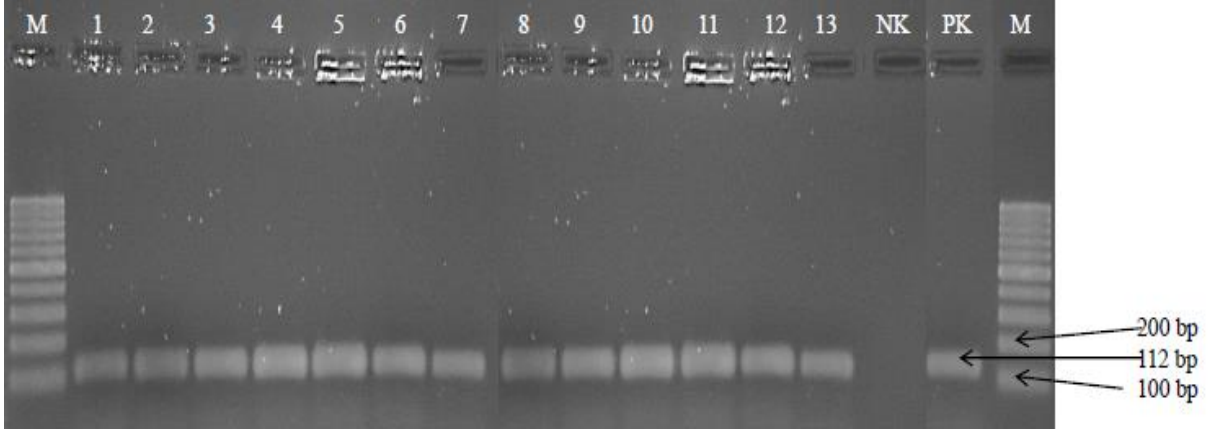


**Şekil 3. 1:** a. Ekim yapılmamış EB b. EB'da *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun görünümü c. EA'da *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun görünümü

Bu izolatların Gram pozitif kok görünümünde olup %6,5 tuzlu NB'da üreyip, katalaz negatif oldukları doğrulandıktan sonra incelemeye dahil edildiler.

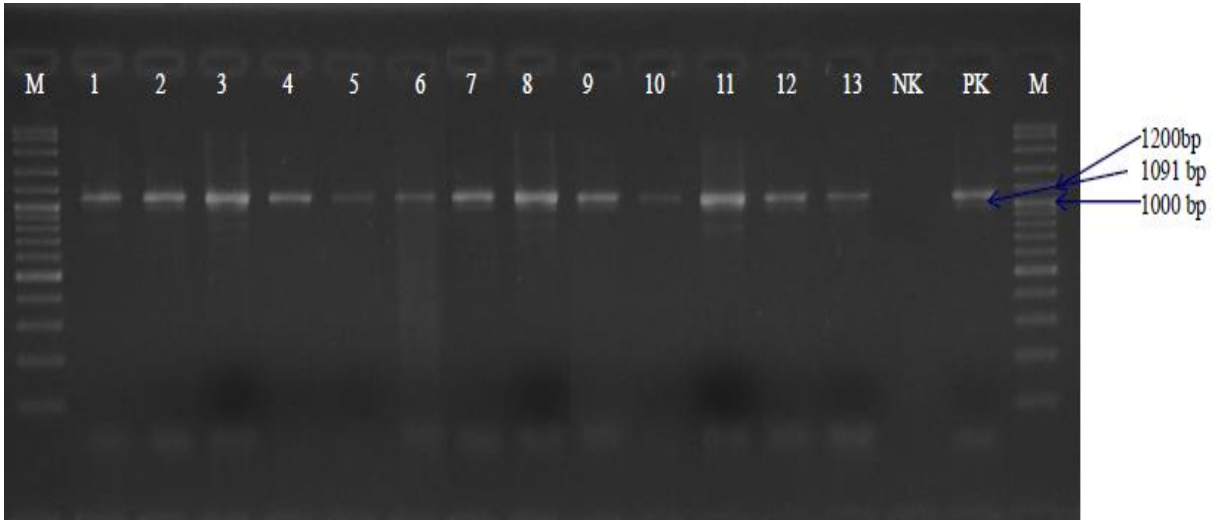
### 3. 2. PZR

**3. 2. 1. *Enterococcus* sp.:** Doksan altı enterokok şüpheli suşun DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında 112 bp uzunluğunda ampikon elde edilen 96 izolatın hepsinin *Enterococcus* sp. olduğu doğrulandı (Resim 3. 2.).



**Şekil 3. 2.** *Enterococcus* sp. PZR elektroforez görüntüsü **1-13:** *Enterococcus* sp. saha izolatları **PK:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) **NK:** Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 100 bp DNA ladder (Vivantis)

**3. 2. 2. *E. faecium*:** Doksan altı *Enterococcus* sp. DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında 1091 bp uzunluğunda ampikon elde edilen 13 izolatın (%13,5) *E. faecium* olduğu belirlendi (Resim 3. 3.).



**Şekil 3. 3.** *E. faecium* PZR elektroforez görüntüsü **1-13:** *E. faecium* saha izolatları **PK:** Pozitif kontrol (Sekanslanmış saha suşu) **NK:** Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 100 bp DNA ladder (Vivantis)

*E. faecium* saha izolatlarından bir tanesi sekanslandı ve sekans sonucu *E. faecium* olduğu belirlenen bir izolat pozitif kontrol suşu olarak kullanıldı (Resim 3. 4.).

| Accession                         | Description  | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|-----------------------------------|--|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|
| <a href="#">AJUP01000007.1</a>    | Enterococcus faecium ICT-FF178 Scaffold177, whole genome shotgun | 534       | 1004        | 94%            | 2e-147  | 96%       |
| <a href="#">NZ_ABSC01000055.1</a> | Enterococcus faecium F1674 Contig0055, whole genome shotgun s    | 534       | 1004        | 94%            | 2e-147  | 96%       |
| <a href="#">NZ_ABRY01000057.1</a> | Enterococcus faecium F1636 Contig0058, whole genome shotgun s    | 534       | 1004        | 94%            | 2e-147  | 96%       |
| <a href="#">NZ_ABQ01000017.1</a>  | Enterococcus faecium F1071 Contig0017, whole genome shotgun s    | 534       | 1004        | 94%            | 2e-147  | 96%       |
| <a href="#">NZ_AC2201000070.1</a> | Enterococcus faecium D34458F cont1.70, whole genome shotgun s    | 534       | 1004        | 94%            | 2e-147  | 96%       |
| <a href="#">ACOB01000040.1</a>    | Enterococcus faecium TC 6 cont1.40, whole genome shotgun sequ    | 534       | 1004        | 94%            | 2e-147  | 96%       |
| <a href="#">NZ_ACOS01000109.1</a> | Enterococcus faecium F1039 contig0110, whole genome shotgun s    | 523       | 966         | 94%            | 4e-144  | 94%       |
| <a href="#">NZ_AGAY01000070.1</a> | Enterococcus faecium 1.331.501 cont1.70, whole genome shotgun s  | 523       | 966         | 94%            | 4e-144  | 94%       |
| <a href="#">AEQV01000044.1</a>    | Enterococcus faecium F4457 Contig 303, whole genome shotgun se   | 518       | 966         | 94%            | 2e-142  | 95%       |

Şekil 3. 4. *E. faecium* sekans sonucu

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

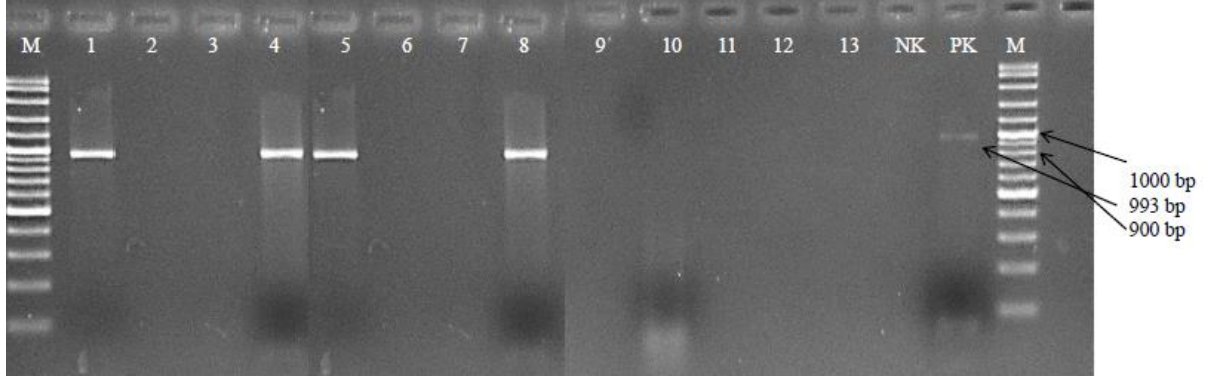
**3. 2. 3. 1. *gelE*:** İzole ve identifiye edilen 13 *E. faecium* suşu DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında 419 bp uzunluğunda ampikon elde edilen 4 izolatın (%30,75) *gelE* geni pozitif olduğu belirlendi (Resim 3. 5.).



Şekil 3. 5. Virulens gen PZR (*gelE*) 1-4. *gelE* geni taşıyan saha izolatları **PK**: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) **NK**: Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M**: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

*E. faecalis* ATCC 29212 suşu incelediğimiz virulens genlerinden *gelE* geni pozitifdir (Lanthier ve ark. 2010a).

**3. 2. 3. 2. esp:** İzole ve identifiye edilen 13 *E. faecium* suşu DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında 993 bp uzunluğunda ampikon elde edilen 4 izolatın (%30,75) *esp* geni pozitif olduğu belirlendi (Resim 3. 6.).



**Şekil 3. 6.** Virulens gen PZR (*esp*) **1-4-5-8:** *esp* geni taşıyan saha izolatları **PK:** Pozitif kontrol (*E. faecalis esp* geni pozitif saha izolatı) **NK:** Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 100 bp DNA ladder (Vivantis)

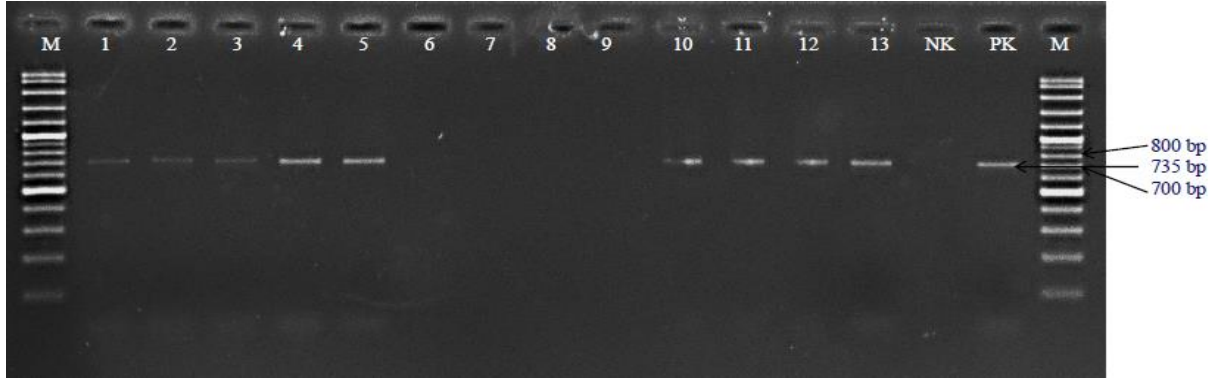
*esp* geni taşıyan pozitif kontrol suşu elimizde bulunmadığından, geçmiş yıllarda izole etmiş olduğumuz *E. faecalis* saha izolatlarından bir tanesi sekanslandı. Sekans sonucu *esp* geni pozitif olduğu belirlenen bu izolat PZR'da pozitif kontrol olarak kullanıldı (Resim 3. 7.).

| Accession                  | Description  | Max score | Total score | Query coverage | E value |
|----------------------------|--|-----------|-------------|----------------|---------|
| <a href="#">AF034779.1</a> | Enterococcus faecalis surface protein precursor, gene, complete cds  | 1351      | 1351        | 87%            | 0.0     |
| <a href="#">AY032999.1</a> | Enterococcus faecalis putative pathogenicity island, partial sequenc | 1351      | 1351        | 87%            | 0.0     |
| <a href="#">AF454824.1</a> | Enterococcus faecalis pathogenicity island, complete sequence        | 1351      | 1351        | 87%            | 0.0     |
| <a href="#">AF329367.1</a> | Enterococcus faecalis putative pathogenicity island, partial sequenc | 1351      | 1351        | 87%            | 0.0     |
| <a href="#">CP002491.1</a> | Enterococcus faecalis 67, complete genome                            | 1334      | 1334        | 87%            | 0.0     |
| <a href="#">JF826520.1</a> | Enterococcus faecalis strain 954 enterococcal surface protein (esp)  | 1330      | 1330        | 86%            | 0.0     |
| <a href="#">CP003351.1</a> | Enterococcus faecium Aus0004, complete genome                        | 1232      | 1232        | 86%            | 0.0     |
| <a href="#">AY322150.1</a> | Enterococcus faecium isolate F300 pathogenicity island, partial sequ | 1232      | 1232        | 86%            | 0.0     |
| <a href="#">AY322499.1</a> | Enterococcus faecium isolate F734 putative enterococcal surface pr   | 1232      | 1232        | 86%            | 0.0     |

**Şekil 3. 7.** *esp* geni sekans sonucu



**3. 2. 3. 3. efaAfm:** İzole ve identifiye edilen 13 *E. faecium* suşu DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında 735 bp uzunluğunda amplicon elde edilen 9 izolattın (%69,2) *efaAfm* geni pozitif olduğu belirlendi (Resim 3. 8.).



**Şekil 3. 8.** Virulens gen PZR (*efaAfm*). **1-2-3-4-5-10-11-12-13:** *efaAfm* geni pozitif saha izolatları **PK:** Pozitif kontrol (*E. faecium* pozitif saha izolatı) **NK:** Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 100 bp DNA ladder (Vivantis)

*efaAfm* geni taşıyan pozitif kontrol suşu elimizde bulunmadığından, izole etmiş olduğumuz bir *E. faecium* saha izolatlarından bir tanesi sekanslandı. Sekans sonucu *efaAfm* geni pozitif olduğu belirlenen bu izolat PZR'da pozitif kontrol olarak kullanıldı (Resim 3. 9.).

| Description  | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                  |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecium NRRL B-2354, complete genome</a>   | 1158      | 1158        | 96%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">CP004063.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecium DO, complete genome</a>  | 1158      | 1158        | 96%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">CP003583.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecium Aus0004, complete genome</a>   | 1158      | 1158        | 96%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">CP003351.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecium Aus0085, complete genome</a>   | 1153      | 1153        | 96%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">CP006620.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecium EfmC (efmC) and EfmB (efmB) genes, complete cds; and EfmA (efmA) gene, partial cds</a> | 1018      | 1018        | 96%         | 0.0     | 95%   | <a href="#">AF097414.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecium T110, complete genome</a>  | 942       | 942         | 96%         | 0.0     | 93%   | <a href="#">CP006030.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecium strain FH 99 cell wall adhesins (efaAfm) gene, partial cds</a>                         | 933       | 933         | 94%         | 0.0     | 93%   | <a href="#">FJ609170.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecium Efafm (efafm) gene, complete cds; and unknown gene</a>                                 | 782       | 782         | 77%         | 0.0     | 94%   | <a href="#">AF042288.1</a> |

**Şekil 3. 9.** *efaAfm* geni sekans sonucu

*E. faecium* izolatlarının taşıdığı virulens genlerinin toplu sunumu Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3. 1.** *E. faecium* izolatlarının taşıdığı virulens genleri

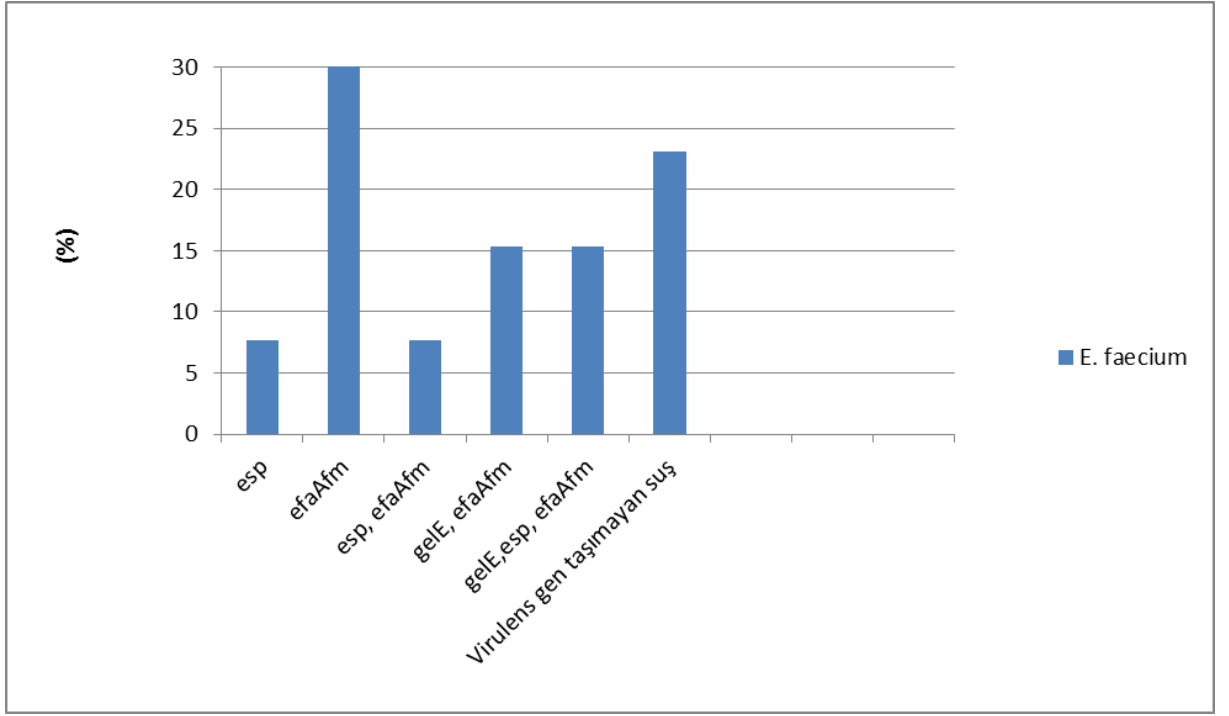
|                   | <i>gelE</i> | <i>esp</i> | <i>efaAfm</i> | Pozitif virulens gen/genleri (sayısı) |
|-------------------|-------------|------------|---------------|---------------------------------------|
| 1                 | +           | +          | +             | <i>gelE, esp, efaAfm</i> (2)          |
| 2                 | +           | -          | +             | <i>gelE, efaAfm</i> (2)               |
| 3                 | +           | -          | +             | <i>gelE, efaAfm</i> (2)               |
| 4                 | +           | +          | +             | <i>gelE, esp, efaAfm</i> (2)          |
| 5                 | -           | +          | +             | <i>esp, efaAfm</i> (1)                |
| 6                 | -           | -          | -             | - (0)                                 |
| 7                 | -           | -          | -             | - (0)                                 |
| 8                 | -           | +          | -             | <i>esp</i> (1)                        |
| 9                 | -           | -          | -             | - (0)                                 |
| 10                | -           | -          | +             | <i>efaAfm</i> (1)                     |
| 11                | -           | -          | +             | <i>efaAfm</i> (1)                     |
| 12                | -           | -          | +             | <i>efaAfm</i> (1)                     |
| 13                | -           | -          | +             | <i>efaAfm</i> (1)                     |
| <b>Toplam (%)</b> | 4<br>30,7   | 4<br>30,7  | 9<br>69,2     |                                       |

Toplam 13 *E. faecium* izolatının virulens genlerinin incelenmesi sonucunda sırasıyla 9 (%69,2) suşun *efaAfm*, 4 (%30,7) suşun *gelE*, 4 (%30,7) suşun *esp* genlerini taşıdıkları tespit edildi. Herhangi bir virulens geni taşımayan üç (%23,0) izolat bulunmaktaydı (Çizelge 3. 1.). İzolatların virulens genotiplerinin dağılımı ise Çizelge 3.2. ve Resim 3.10'da gösterilmiştir.

**Çizelge 3. 2.** *E. faecium* izolatlarının taşıdıkları virulens genotipleri

| Genotip sayısı | Virulens gen sayısı | Virulens gen/genleri     | İzolat sayısı | (%)  |
|----------------|---------------------|--------------------------|---------------|------|
| 1              | 1                   | <i>esp</i>               | 1             | 7,7  |
| 2              | 1                   | <i>efaAfm</i>            | 4             | 30,7 |
| 3              | 2                   | <i>esp, efaAfm</i>       | 1             | 7,7  |
| 4              | 2                   | <i>gelE, efaAfm</i>      | 2             | 15,4 |
| 5              | 3                   | <i>gelE, esp, efaAfm</i> | 2             | 15,4 |
| Toplam         |                     |                          | 10            | 76,9 |

Toplamda beş virulens genotipi mevcuttu. Bir virulens geni taşıyan 5 (%38,4), iki virulens geni taşıyan 3 (%23,0), üç virulens geni taşıyan 2 (%15,3) izolat mevcuttu (Çizelge 3. 2.).



Şekil 3.10. *E. faecium* izolatlarının taşıdıkları virulens genotiplerinin dağılımı

## 4. TARTIŞMA

Klinik ve subklinik mastitis vakalarının teşhisi ve kontrolü için hastalığa sebep olan patojenlerin doğru şekilde izolasyonu ve tanımlanması oldukça önemlidir. Laboratuvarlarda, mastitis etkeni bakteriyel patojenlerin izolasyonu ve tanımlanması için, genellikle bu etkenlerin fenotipik özelliklerinin belirlenmesine dayanan biyokimyasal testlerle sonuca varılmaktadır. Ancak; yalnızca biyokimyasal testlerle etkenin tanımlanması, mastitise sebep olan enterokok gibi bazı bakteri cinsleri açısından zor olduğu için, bu şekilde identifikasyonları güç olan etkenler için moleküler doğrulama gerektirdiği bildirilmektedir (Devriese ve ark. 1999, Bensalah ve ark. 2006). Bu çalışmada, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecium* suşlarının bazı önemli virulens genlerinin varlığının moleküler yöntemler kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için ilk aşamada mastitisli sütlerden izole edilen enterokok suşları klasik konvansiyonel yöntemlerle bu bakteri cinsi için selektif besiyerleri kullanılarak izole edilmiş ve bu izolatların cins ve tür düzeyinde doğrulamaları moleküler yöntemler kullanılarak daha pratik ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Mastitise neden olan *E. faecium* suşlarının identifikasyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar farklılık göstermektedir. Yurt dışında yapılan çalışmalarda izolasyon oranları çok farklı olmakla birlikte; %6-71 arasında değiştiği görülmektedir. Örneğin; izole edilen enterokok suşları içerisinde *E. faecium* izolasyon oranını Watts (1988) %46,6, Jayarao ve ark. (1991) %6,94, Devriese ve ark. (1999) %6, Tenhagen (2006) %45,2, Petersson-Wolfe ve ark. (2007b) %71, Nam ve ark. (2009) %37,1, Wolfgang ve ark. (2009) %22,2 olarak bildirmişlerdir. Yurdumuzda bu konu ile ilgili olarak fazla çalışma bulunmamakla birlikte; bu çalışmalardan birinde Afyon'da *E. faecium* izolasyon oranı %18,6 (Kuyucuoğlu 2011), Ankara'da ise %81,3 olarak (Cengiz ve ark. 2011) belirtilmiştir. Bu çalışmada ise %13,5 oranında *E. faecium* identifiye edilmiştir. Çalışmalar arasındaki izolasyon oranının değişkenlik göstermesi; izolasyon yapılan bölgelerin farklı olmasından kaynaklanabileceği gibi kullanılan izolasyon/identifikasyon yöntemlerinin de değişik olmasından da kaynaklanabilmektedir. Çalışmamızda özellikle enterokoklar için kullanılan selektif sıvı ve katı besiyerleri kullanılarak izolasyon gerçekleştirilmiş, izole edilen enterokoklar moleküler olarak cins ve tür düzeyinde identifikasyonlarını yapmak için de

birçok çalışmada olduğu gibi moleküler yöntemler kullanılmıştır (Bensalah ve ark. 2006, Nam ve ark. 2009).

Enterokoklar insan ve hayvan gastrointestinal sisteminin doğal üyesidirler. Enterokokların doğal olarak direnç gösterdikleri sefalosporinlerin sık olarak kullanıldığı 1970'li yıllardan beri hastane infeksiyonu sebepleri arasında oranı giderek artış göstermektedirler (Berzeg 2005). Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, direnç genlerini içeren plazmidlerin veya transpozon kazanılmasıyla ya da mutasyonlarla meydana gelmektedir. Enterokok türlerinin antibiyotik direnciyle alakalı konularda yapılan pek çok sayıdaki araştırmaya rağmen, patojenite mekanizmaları ve virulens faktörleri konularında yapılan çalışmalar yetersiz kalmıştır (Vergis ve ark. 2002). Yurdumuzda da mastitise sebep olan *E. faecium* suşlarının potansiyel virulens faktörlerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda enterokokların önemli virulens faktörleri arasında yer alan; jelatinaz, enterokokal yüzey proteini ve *E. faecium*'un adezyonla ilgili proteininin yöremizdeki mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecium* suşları arasındaki varlığı ve yaygınlığı yine moleküler yöntemler kullanılarak incelenmiştir.

Kromozomal *gelE* geni tarafından kodlanan jelatinaz enzimi kollajen, jelatin, hemoglobin gibi bir çok küçük peptidleri hidrolize eden ve hayvan modellerinde endoftalmit ve endokardit olgularını şiddetlendiren hücre dışı bir çinko-endopeptidazdır (Vankerckhoven ve ark. 2004, Klibi ve ark. 2007, Fisher ve Phillips 2009). Kommensal *E. faecium* suşlarıyla kıyaslama yapıldığında klinik *E. faecium* izolatlarında *gelE* pozitifliğinin daha sık saptandığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Waar ve ark. 2002, Creti ve ark. 2004). Ayrıca, sebze kaynaklı *E. faecium* izolatlarının %45,5'inde, su kaynaklı izolatların %33,3'ünde *gelE* geninin bulunduğunu, klinik kaynaklı izolatların ise hiçbirisinde *gelE* geni saptanmadığını gösteren ilginç bir çalışma da bulunmaktadır (Abriouel ve ark. 2008). Gülhan ve ark. (2005) yapmış oldukları çalışmada hayvansal ve insan orjinli örneklerden izole edilen enterokok suşlarında jelatinaz oluşumunu araştırmışlar, izolatlarının %20,5'inin, *E. faecium* suşlarının ise %14,3'ünün jelatinaz ürettiğini tespit etmişlerdir. Torlak (2013), yaptığı çalışmada ise gıda örneklerinden (tavuk, kıyma, çiğ süt, dondurma, peynir) izole edilen 100 enterokok izolatının %10'unun jelatinaz ürettiğini; bu 10 izolatın, 4'ünün (%13,3) *E. faecium* olduğunu bildirmişlerdir. Klinik örneklerden (kan, idrar) ise izole edilen 101 enterokok izolatın ise 15'i nde (%14,9) jelatinaz saptanmıştır ve bu izolatların 4'ünü (%8,9) *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Ekstrasellüler jelatinazı kodlayan *gelE* geni sulardan (Lanthier ve ark.

2010a), gıda ve klinik izolatlardan (Eaton ve Gasson 2001, Semedo ve ark. 2003, Creti ve ark. 2004) izole edilen *E. faecium* suşlarında sıklıkla bulunduğu bildirilmekte; ancak, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokokların jelatinaz oluşumları hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Semedo ve ark. 2003). Bu çalışmada ise yöremizdeki mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 13 *E. faecium* suşlarının %30,7'sinde *gelE* geni varlığı tespit edilmiştir.

Kromozomal *esp* geni tarafından kodlanan ve hücre duvarı ile ilişkili bir protein olan *esp*, 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, Upadhyaya ve ark. 2009). Yapılan çalışmalar incelendiğinde genellikle medikal ya da gıda kaynaklı izolatlarda bu gen varlığının incelendiği görülmektedir. Örneğin; *E. faecium* klinik izolatlarında *esp* geni pozitifliğini Eaton ve Gasson (2001) %78, Hallgren ve ark. (2009) %71, Baylan ve ark. (2011) %6,5 olarak tespit etmişlerdir. Genellikle *esp*'yi kodlayan genlerin gıda kaynaklı enterokok izolatlarına oranla klinik enterokok izolatlarında daha yüksek sıklıkla bulunduğu belirlenmiştir (Eaton ve Gasson 2001). Aynı zamanda gıda kaynaklı *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında da *esp* geni bulunma sıklığı farklılık göstermektedir. *E. faecium* suşlarında *esp* genine nadiren rastlanırken, *E. faecalis* suşlarında bu oran daha yüksektir (Eaton ve Gasson 2001, Franz ve ark. 2001). Bu çalışmada ise yöremizdeki mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 13 *E. faecium* izolatının %30,7'sinde *esp* geni varlığı tespit edilmiştir.

*efaAfm*'nin, enterokokların yüzeylere yapışmasını yani adezyonunu sağladığı bildirilmekle birlikte; infeksiyon yapma gücü halen kesin olarak bilinmemektedir (Belgacem ve ark. 2010). Soheili ve ark (2014) yapmış oldukları çalışmada 79 klinik izolatın, 29' unu *E. faecium* olarak tespit etmiş ve bu 29 suşun hepsinde *efaAfm* geni saptanmıştır. Tuncer ve Inoğlu (2013), peynirde yaptıkları çalışmada 21 *E. faecium* izolatında %75 oranında *efaAfm* pozitif gen tespit etmişlerdir. Jiemenez ve ark. süt örnekleri ile yaptıkları çalışmalarda *efaAfm* tespit edememişken, Eaton ve Gasson (2001) ise yaptıkları çalışmalarda *efaAfm* gen oranını gıdalar da %82 olarak saptarken, klinik izolatlarda %100 olarak tespit etmişlerdir. *E. faecium*'un hücre duvarı adezinlerinden olan ve bakterinin konak hücrelerine yapışmasından sorumlu olan virulens geni *efaAfm*, bu çalışmamızda mastitisli sığır süt izolatlarının % 69,2'sinde tespit edilerek en çok belirlenen virulens geni olmuştur.

## 5. SONUÇ

Bu çalışmada Aydın yöresinde mastitislerin etiolojisinde *E. faecium*'un önemli (%13,5) rol oynadığı belirlenmiştir.

Mastitis etiolojisinde önem kazanan enterokokların daha ileri tekniklerle ve daha güvenilir bir şekilde identifikasyonlarının yapılabilmesi, süt sığırcılığı ekonomisine de katkı sağlayacaktır. Enterokokların cins ve tür düzeyinde identifikasyonlarının yapılmasında spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonunun kullanımının fazla sayıda izolata, kısa sürede identifikasyonlarının yapılabilmesine imkan vermesi sebebi ile faydalı olduğu ve rutin teşhiste kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

Enterokokların virulens faktörleri üzerine yapılacak olan her çalışma, bu mikroorganizmanın patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada, toplamda incelenen 13 *E. faecium* izolata virulens genlerinin incelenmesi sonucunda sırasıyla 9 (%69,2) suşun *efaAfm*, 4 (%30,7) suşun *gelE*, 4 (%30,7) suşun *esp* genlerini taşıdıkları tespit edildi. Herhangi bir virulens geni taşımayan üç (%23,0) izolat bulunmaktaydı. Toplamda beş virulens genotipi mevcuttu. Bir virulens geni taşıyan 5 (%38,4), iki virulens geni taşıyan 3 (%23,0), üç virulens geni taşıyan 2 (%15,3) izolat mevcuttu. Çalışmamız enterokokların insan sağlığı için önemli potansiyel patojenlerden olmaları nedeniyle incelenen virulens özelliklerinin insanlardan izole edilen suşlarla karşılaştırılması açısından temel bilgi sağlama potansiyeli taşımaktadır.

Yurdumuzda veteriner sahada mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecium* suşlarının virulens genlerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Tüm hijyenik uygulamalara rağmen, mastitis probleminin sürmesi, saha izolatlarının virulens faktörlerinin incelenmesinin önemini göstermektedir ve aşıların da dahil olduğu kontrol programlarının geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmadan sağlanan bilgilerin kullanılması özellikle enterokokların neden olduğu mastitis koruma programlarının düzenlenmesine katkı sağlayacaktır.

## ÖZET

### Mastitisli Sığır Sütlerinden İzole Edilen *Enterococcus faecium* Suşlarında *gelE* ve *esp* Genlerinin Varlığının İncelenmesi

Bu çalışmada, mastitisli sığır süt örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecium* suşlarının potansiyel virülens genlerinden olan jelatinaz (*gelE*), enterokokal yüzey proteini (*esp*) ve adezyonla ilgili protein (*EfaAfm*)'in polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile incelenmesi amaçlandı. Çalışmada materyal olarak 600 mastitisli sığır sütü kullanıldı. Enterokokların izolasyonu, klasik konvansiyonel yöntemlerle selektif besiyerleri kullanılarak gerçekleştirildi. İzolatların cins ve tür düzeyinde identifikasyonları PZR ile yapıldı. Doksan altı *Enterococcus* sp. izolatu içerisinde 13 *E. faecium* (%13,5) belirlendi. Toplam 13 *E. faecium* izolatının virülens genlerinin incelenmesi sonucunda sırasıyla 9 (%69,2) suşun *efaAfm*, 4 (%30,7) suşun *gelE*, 4 (%30,7) suşun *esp* genlerini taşıdıkları tespit edildi. Herhangi bir virülens geni taşımayan üç (%23,0) izolat bulunmaktaydı. Toplamda beş virülens genotipi mevcuttu. Sonuç olarak bu çalışma, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecium* suşlarının yüksek patojenite potansiyeline sahip oldukları gösterdi. Bu suşlar hayvansal kaynaklardan insanlara bulaşabilir ve bulaştıklarında ise infeksiyon oluşturabilirler. *E. faecium* ile ilişkili diğer virülens faktörlerin tanımlanması, bu virülens faktörlerinin antibiyotiklerle ilişkilerinin ortaya konması konusunda daha geniş kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *E. faecium*, mastitis, *gelE*, *esp*, *efaAfm*



## SUMMARY

### **Investigation of the Presence of *gelE* and *esp* Genes in *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Mastitic Bovine Milk**

In this study, it was aimed to investigate the potential virulence genes gelatinase (*gelE*), adhesion-associated protein (*EfaAfm*) and enterococcal surface protein (*esp*) of *Enterococcus faecium* strains isolated from mastitic bovine milk samples with polymerase chain reaction (PCR). A total of 600 mastitic bovine milk samples were used as material. Enterococci isolation were performed with classic methods by using the selective media. Identifications based on genus and species were also performed with PCR. Only 13 (13,5%) isolates were determined as *E. faecium* in 96 *Enterococcus* sp. It was determined that 9 (69,2%), 4 (30,7%) and 4 (30,7%) isolate carrying *efaAfm*, *gelE*, and *esp* genes, respectively. There were three (23,0%) isolates have no virulence genes. Totally, there were 5 virulence genotypes. Finally, it can be said that *E. faecium* strains isolated from mastitic bovine milk have high pathogenity 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 *E. faecium* and their relationships with some kind of antibiotics should also be revealed.

**Keywords:** *E. faecium*, mastitis, *gelE*, *esp*, *efaAfm*

## KAYNAKLAR

Abriouel H, Omar NB, Molinos AC. 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. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 123: 38-49.

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. *Journal of Bacteriology* 1999; 181: 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](http://www.mdanderesson.org/education-and-research/departments-programs-and-labs/labs/dent-laboratory/protocols/dna-6x-loading-dye.html).

Erişim Tarihi: 02.02.2015.

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

Basustaoğlu A, Aydoğan H. Enterokoklar. *İnfeksiyon Hastalıkları Serisi* 2002; 5: 45-60.

Baştan A. *İneklerde Meme Hastalıkları*, Hatipoğlu Basım ve Yayım San. Tic. Ltd. şti. Ankara, 2002.

Baylan O, Nazik H, Bektore B, Citil BE, Turan D, Ongen B, Özyurt M, Açıkel CH, Haznedaroğlu T. The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary *enterococcus* isolates. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2011; 45: 430-445.

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. *African Journal of Biotechnology* 2006; 5: 607-702.

Belgacem ZB, Abriouel H, Omar NB, Lucas R, Martinez-Canamero M, Galvez A, Manai M. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic

*Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. Food Control 2010; 21: 462–470.

Berzeg D. Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen Enterokok Suşlarında Antibiyotik Direnci, Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci Ve E Test İle Vankomisin Mik Değerlerinin Değerlendirilmesi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, 2005.

Cengiz S, Tekin O, Akan M. Mastitislerden izole edilen enterokokların moleküler tiplendirilmesi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2011; 58: 17-20.

Channaiah LH, Subramanyam B, McKinney LJ, Zurek L. Stored-product insects carry antibiotic-resistant and potentially virulent enterococci. FEMS Microbiology Ecology 2010; 74: 464-471.

Charles MAPF, Albrecht BMS, Nuham KY, Marc V, Jean S, Wilhelm HH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. Applied and Environmental Microbiology 2001; 67: 4385-4389.

Coque TM, Willems RJL, Fortuñ J, Top J, Diz S, Loza E, Cantoñ 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. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005; 49: 2693-2700.

Creti R, Imperi M, Bertuccini L. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. Journal of Medical Microbiology 2004; 53: 13-20.

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. Veterinary Microbiology 1999; 70: 87-94.

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, Eskişehir, Türkiye, 2011.

Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied Environmental Microbiology* 2001; 67: 1628-1635.

Erdem İ, Çiçek-Şentürk G, Yücesoy-Dede B, Yükselkoçdoğan F, Yüksel S, Karagül E. In vitro effect of levofloxacin and vancomycin combination against aminoglycosid-resistant enterococci. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004; 20: 92-94.

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

Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009; 155:1749-1757.

Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied Environmental Microbiology* 2001; 67: 4385-4389.

Franzetti L, Pompei M, Scarpellini M, Galli A. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. of different origins. *Current Microbiology* 2004; 49: 255–260.

Frazzon APG, Gama BA, Hermes V, Bierhals CG, Pereira RI, Guedes AG, d'Azevedo PA, Frazzon J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet(M)* and *tet(L)* genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2010; 26: 365–370.

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

Giraffa G. Enterococci from food. *FEMS Microbiology Reviews* 2002; 26: 163-171.

Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 2003; 88: 215-222.

Gülhan T, Aksakal A, Ekün İH, Savaşan S, Boynukara B. Virulence factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from humans and pets. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences* 2005; 30: 477-482.

Gültekin M. Enterokoklar: Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenezi. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, Ankara, 2004; 121-140.

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 *E. faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *International Journal of Medical Microbiology* 2009; 299: 323-332.

Hardie JM, Whiley RA. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology* 1997; 83: 1-11.

Hijazi N, Elmanama AA, Al-Hindi A. Vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and non-hospitalized individuals in Gaza City. *Journal of Public Health*. 2009; 17: 243-249.

Hugas, M, Garigga M, Aymerich MT. Functionality of Enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 2003; 88: 223-233.

Jayarao BM, Oliver SP, Matthews KR, King SH. Comparative evaluation of Vitek gram-positive identification system and API Rapid Strep system for identification of *Streptococcus* species of bovine origin. *Veterinary Microbiology* 1991; 26: 301-308.

Karataş A. Beyaz peynir ve fermente sucuklardan *Enterococcus faecium*'un izolasyonu ve tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2005; 67-71.

Kayaoğlu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2004; 15: 308-320.

Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron M. Development of a PCR assay for rapid detection of *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 3497-3503.

Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology* 2003; 88: 269–290.

Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* 2003; 88: 123-131.

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. *Canadian Journal of Microbiology* 2007; 53: 372-379.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Enterococcus* species. In: Koneman EW (ed.) *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fourth edition, Philadelphia: Lippincott Company 1992; 440-446.

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.

Kuyucuoğlu Y. Antibiotic resistances of enterococci isolated from bovine subclinical mastitis. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences* 2011; 27: 231- 234.

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. *Journal Applied Microbiology* 2010a; 110: 407–421.

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. *Canadian Journal of Microbiology* 2010b; 56: 715–29.

Lu HZ, Weng XH, Li H, Yin YK, Pang MY, Tang YW. *Enterococcus faecium*-related outbreak with molecular evidence transmission from pigs to humans. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 913-917.

Lukasova J, Sustackova A. Enterococci and antibiotic resistance. *Acta Veterinaria Brno* 2003; 72: 315-323.

Lund B, Adamsson I, Edlund C. Gastrointestinal Transit Survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. *International Journal of Food Microbiology* 2002; 77: 109-115.

Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Dupre I, Sechi LA. Comparison of incidence of virulence determinants and antibiotics resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology* 2003; 88: 291-304.

McDonald TJ, McDonald JS. *Streptococci* isolated from bovine intramammary infections. *American Journal of Veterinary Research* 1976; 37: 377-81.

Menteş GÖ, Balcı İ. Yoğun bakım, onkoloji, hemotoloji hastalarında gastrointestinal sistemde kolonize olan enterokok türleri ve vankomisine direnç profilleri. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2007; 41: 585-589.

Moellering RC. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis*, and *Leuconostoc* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Fourth edition, *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone Company. 1995; 1826-1835.

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.

Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiological Review* 1990; 3: 46-65.

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* 2009; 57: e59-64.

Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G. Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004; 54: 232-235.

Petersson-Wolfe, CS. A study of the occurrence, phenotypic and genotypic diversity and both in vitro and in vivo growth response of *Enterococcus* spp. isolated from bovine origin. Ohio State University, USA, 2006.

Petersson-Wolfe CS, Wolf SL, Hogan JS. In vitro growth of *Enterococci* of bovine origin in bovine mammary secretions from various stages of lactation. *Journal of Dairy Sciences* 2007; 90, 4246-4231.

Petersson-Wolfe CS, Adams S, Wolf SL, Hogan JS. Genomic typing of *Enterococci* isolated from bovine mammary glands and environmental sources. *Journal of Dairy Sciences* 2007b; 91: 615–619

Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis*—the root canal survivor and ‘star’ in post treatment disease. *Endodontic Topics* 2003; 6: 135–159.

Radhouani H, Poeta P, Pinto L, Miranda J, Coelho C, Carvalho C, Rodrigues J, Lopez M, Torres C, Vitorino R, Domingues P, Igrejas G. Proteomic characterization of vanA-containing *Enterococcus* recovered from Seagulls at the Berlengas Natural Reserve, W Portugal. *Proteome Science* 2010; 8: 48.

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



Sayiner HS. Antibiyotik duyarlılıkları ve kolonize hastalıklarda risk faktörlerinin değerlendirilmesi. Ok Meydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği. Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2008.

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? Systematic and Applied Microbiology 2003; 26: 13–22.

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. Infection and Immunity 1999; 67: 193–200.

Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Nature 2002; 417: 746-750.

Shankar N, Baghdayan AS, Willems R, Hammerum AM, Jensen LB. Presence of pathogenicity island genes in *Enterococcus faecalis* isolates from pigs in Denmark. Journal of Clinical Microbiology 2006; 44: 4200-4203.

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, 2003.

Soheili S, Ghafourian S, Sekawi Z, Neela V, Sadeghifard N, Ramli R, Hamat RA. Wide distribution of virulence genes among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates. Scientific World Journal 2014; Article ID 623174, 6 pages.

Temiz A. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara 2000; 291.

Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. Cellular Molecular Life Sciences 2003; 60: 2622–2636.

Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. Journal of Dairy Sciences 2006; 89: 2542–2551.

Teixeira LA, Facklam RR. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. Eighth edition, Washington. ASM Press. pp: 2003; 422-433.

Teixeira LM, Siqueira-Carvalho MG, Facklam RR. *Enterococcus*, pp: 430-42. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, ASM Press, Washington DC.

Torlak FÖ. Klinik ve gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus*'ların virulans faktörleri ve antibiyotik dirençlilikleri, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2013.

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

Tuncer Y, Inoğlu ZN. Safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish tulum cheese. Journal of Safety 2013; 33: 369-377.

Turner PC, Mclennan AG, Bates AD, White MRH. Moleküler Biyoloji Önemli Notlar. Nobel Yayın 2004; 613:346.

Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umapathy BL. Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. Indian Journal of Medical Microbiology 2009; 27: 301-305.

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*. Journal of Clinical Microbiology 2004; 42: 4473-4479.

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*. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 35: 570-575.

Vilela, MA, Souza, SL, Palazzo ICV, Ferreira JC, Morais Jr MA, Darini ALC, Morais MMC. Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. *Mem. Inst. The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2006; 101: 716-719.

Waar K, Muscholl-Silberhorn AB, Willems RJ, Slooff MJ, Harmsen HJ, Degener JE. Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. *Journal of Infectious Diseases* 2002; 185: 1121-1127.

Watts JL. Characterization and identification of *Streptococci* isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Sciences* 1988; 71: 1616-1624.

Winn W, Stephan A, Janda W, Koneman EW, Procop G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of diagnostic Microbiology*. Baltimore Philadelphia. Lippincott Williamsa Wilkins, USA, 2006.

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, 2009.

Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Dergisi* 2001; 14: 41-46.

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğretim eğitimini İstanbul'da, lise eğitimini İzmir'de bitirdi. Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde 2011 yılında lisans eğitimi tamamladı. 2013 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ' a, çalışmalarımnda her an desteklerini gördüğüm başta ADÜ Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Şükrü KIRKAN ve diğer tüm öğretim üyelerine, tez sürecim boyunca desteklerini eksik etmeyen arkadaşlarıma ve tüm hayatım boyunca her kararımnda arkamda olan, desteğini bir an olsun düşünmeden sunan, her zaman başarı ve mutluluğumu isteyen ve bunun için elinden geleni yapan sevgili anneme sonsuz teşekkür ederim.