T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNEK SÜTLERİNDEN *ENTEROCOCCUS* SPP.'LERİN İZOLASYONU VE İZOLATLARIN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE İDENTİFİKASYONU

Hazırlayan
Tekin KEÇECİ

Danışman
Doç. Dr. Kadir Semih GÜMÜŞSOY

Yüksek Lisans Tezi

Şubat 2012
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNEK SÜTLERİNDEN *ENTEROCOCCUS* SPP.'LERİN İZOLASYONU VE İZOLATLARIN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE İDENTİFİKASYONU

Hazırlayan
Tekin KEÇECİ

Danışman
Doç. Dr. Kadir Semih GÜMÜŞSOY

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-10-3088 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Şubat 2012
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Tekin KEÇECİ

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"İnek Sütlerinden *Enterococcus* spp.'lerin İzolasyonu ve İzolatların Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle İdentifikasyonu" adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Tekin KEÇECİ

Danışman
Doç.Dr.K.Semih GÜMÜŞSOY

Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr.Fuat AYDIN

Doç.Dr.K.Semih GÜMÜŞSOY danışmanlığında **Tekin KEÇECİ** tarafından hazırlanan **"İnek Sütlerinden *Enterococcus* spp.'lerin İzolasyonu ve İzolatların Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle İdentifikasyonu"** konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Mikrobiyoloji** Anabilim Dalı'nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

10 / 02 / 2012

JÜRİ

İmza

Danışman : Doç. Dr. K.Semih GÜMÜŞSOY .....

Üye : Prof. Dr. Fuat AYDIN .....

Üye : Doç. Dr. Ayşe GENCAY .....

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../..../.....

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde bana rehberlik eden ve her konuda desteklerini esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fuat AYDIN'a, Danışman hocam Sayın Doç. Dr. Kadir Semih GÜMÜŞSOY'a, Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Seçil ABAY'a ve Sayın Arş. Gör. Harun HIZLISOY'a, teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca yetişmemde en büyük katkıları olan anneme, babama ve her zaman varlıklarını yanımda hissettiğim her konuda bana yardımcı ve destek olan eşim B. Beste KEÇECİ'ye ve kızım Bilge Duru KEÇECİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tekin KEÇECİ

Nevşehir, Şubat 2012

İNEK SÜTLERİNDEN *ENTEROCOCCUS* SPP.'LERİN İZOLASYONU VE İZOLATLARIN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE İDENTİFİKASYONU

Tekin KEÇECİ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Şubat 2012

Danışman: Doç. Dr. Kadir Semih GÜMÜŞSOY

KISA ÖZET

Bu çalışmada inek sütlerinden konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle *Enterococcus*'ların izolasyonu ve identifikasyonu amaçlandı. Bu çalışma kapsamında 50 adet sağlıklı, 50 adet klinik ve 50 adet subklinik mastitisli inek memesinden süt örnekleri CMT testi ile skorlanarak steril tüplere alındı. Ayrıca 50 adet sokak sütü de çalışma kapsamında değerlendirildi. İzolasyon amacı ile süt örneklerinden sırasıyla Chromocult Enterococci Broth, m-Enterococcus Selective Agar, Bile-Aesculin-Azide Agar ve Blood Agar'a ekim yapıldı. Fenotipik izolasyon için üreyen kolonilerin morfolojileri ve Gram boyamadan yararlanıldı. İzolatların moleküler yöntemle identifikasyonu PZR yöntemiyle gerçekleştirildi. Fenotipik yöntemlerle sağlıklı inek sütlerinden 12 (% 24), klinik mastitisli sütlerden 21 (% 42), subklinik mastitisli sütlerden 15 (% 30) ve sokak sütlerinden ise 9 (% 18) *Enterecoccus* spp. izole edildi. Genotipik yöntem ile yapılan inceleme sonucu 84 *Enterecoccus* spp. izolatının 57 (% 67,85)'si *Enterecoccus faecalis* olarak identifiye edildi. Bu çalışmada, inek sütlerinde önemli düzeyde bulunan ve hastalıklara neden olan Enterekokların insan ve hayvan sağlığı açısından da önemli olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Enterecoccus* spp., İnek, Mastitis, PZR

ISOLATION OF *ENTERECOCCUS* SPP. S FROM CATTLE MILK AND IDENTIFICATION OF ISOLATES WITH PHENOTYPIC AND GENOTYPIC METHODS

Tekin KEÇECİ

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Veterinary Microbiology

M.Sc. Thesis, February 2012

Supervisor: Assoc. Prof. Kadir Semih GÜMÜŞSOY

ABSTRACT

The aim of the study is to isolate and identify the *Enterococcus* from the cow's milk through conventional and molecular methods. Within the scope of this study, milk samples from the breasts of 50 units healthy, 50 units clinical and 50 units subclinical cows with mastitis have been collected into tubes and have been scored with a CMT test. In addition, in order to detect fecal contamination, 50 units street milk have been understudy. Within the purpose of the isolation, milk samples, respectively, have been planted to Chromocult Enterococci Broth, m-Enterococcus Selective Agar, Bile-Aesculin-Azide Agar and Blood Agar. For the Phenotypic isolation, breeding colonies morphology and Gram staining have been used. Molecular analysis of the isolates has been performed by PZR method. With the Phenotypic methods, from the normal cows 12 units milk (24%), clinical milk with mastitis 21 units (42%), subclinical 15 units (30%) and street milk 9 units (18%) *Enterecoccus* spp. has been isolated. Genotypic method has been evaluated and out of 84 units *Enterecoccus* spp. isolates 57 units (67,85%) have been identified as *Enterococcus faecalis*. In this study it has been concluded that *Enterococcus* which exit at significant levels in cow's milk and which can cause disease may also be important in terms of human and animal health.

Keywords: *Enterecoccus* spp., Cattle, Mastitis, PZR

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

İÇ KAPAK i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI iii
KABUL VE ONAY SAYFASI iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER viii
KISALTMALAR xii
TABLOLAR LİSTESİ xiv

1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 4
2.1. YAPISAL ve BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER 4
2.1.1. Hücre Duvarı 5
2.1.1.1. Teikoik Asit 5
2.2. ÜREME ÖZELLİKLERİ 5
2.3. ANTİBİYOTİK DİRENCİ 6
2.3.1. İntrinsik Direnç 6
2.3.1.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotiklere İntrinsik Direnç 7
2.3.1.2. Aminoglikozid Grubu Antibiyotiklere İntrinsik Direnç 7
2.3.2. Kazanılmış Direnç 8
2.3.2.1. Penisilinlere Karşı Kazanılmış Direnç 9
2.3.2.2. Aminoglikozid Grubu Antibiyotiklere Kazanılmış Yüksek Düzeyde Direnç 10
2.3.2.2.1. Streptomisine Karşı Kazanılan Yüksek Düzeyde Aminoglikozid Direnci 10
2.3.2.2.1.1. Ribozomal Mutasyonla Kazanılan Direnç 10
2.3.2.2.1.2. Enzimatik Yoldan Kazanılan Direnç 11
2.3.2.2.2.Gentamisine Karşı Yüksek Düzeyde Aminoglikozid Direnci 11

Sayfa no

2.3.2.3 Glikopeptid Antibiyotiklere Direnç 12
2.3.2.3.1.Van A Tipi Direnç 13
2.3.2.3.2. Van B Tipi Direnç....13
2.3.2.3.3. Van C Tipi Direnç....13
2.3.2.3.4.Van D Tipi Direnç 13
2.4. PATOJENİTE VE VİRULANS....14
2.4.1. Sitolizin....14
2.4.2. Feromonlar....14
2.4.3. Agregasyon Maddesi 14
2.4.4. Lipoteikoik Asit 14
2.4.5. AS 48....15
2.5. ENTEROKOK TÜRLERİNİN GRUPLANDIRILMASI 15
2.5.1. Grup 1....15
2.5.2. Grup 2....15
2.5.3. Grup 3....15
2.5.4. Grup 4 15
2.5.5. Grup 5....15
2.6. ENTEREKOKLARDAN KAYNAKLANAN HASTALIKLAR....17
2.6.1. İnsanlarda Enterokoklarla Gelişen Enfeksiyon Hastalıkları....17
2.6.1.1. Üriner Sistem Enfeksiyonları 17
2.6.1.2. Endokardit....18
2.6.1.3. Bakteriyemi 18
2.6.1.4. Karın İçi Ve Pelvik Enfeksiyonlar....18
2.6.1.5. Yara Ve Yumusak Doku Enfeksiyonları....19
2.6.1.6. Menenjit....19
2.6.1.7. Pediatrik Enfeksiyonlar....19
2.6.2. Hayvanlarda Enterokoklarla Gelişen Enfeksiyon Hastalıkları 19
2.6.2.1. Mastitis....19

Sayfa no

3.GEREÇ VE YÖNTEM 21
3.1. GEREÇ....21
3.1.1. Numunelerin Toplanması 21
3.1.2 California Mastitis Testi (CMT)....21
3.1.3. Standart Suş 22
3.1.4. Enterococcus spp. İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar 22
3.1.4.1. Chromocult Enterococci Broth (Merck 1.10294) 22
3.1.4.2. Enterococcus Selective Agar (Fluka 38259)....22
3.1.4.3. Bile-aesculin-azide Agar (Coccosel agar, BioMeireux) 23
3.1.4.4. Blood Agar Base (Merck 1.10886) 23
3.1.4.5. Gram Boyama Seti (GBL 5026 / 01, 02, 03, 04) 23
3.1.4.6. Brucella Broth (Fluka B3051) 24
3.1.5. Primerler....24
3.2. YÖNTEM 25
3.2.1. Örneklerin Toplanması 25
3.2.2. California Mastitis Testi (CMT)....25
3.2.3. Enterococcus spp. İzolasyonu 26
3.2.3.1. Fenotipik Yöntemler 26
3.2.3.1.1. Chromocult Enterococci Broth (Merck 1.10294)....26
3.2.3.1.2. Enterococci Selective Agar ve Bile Eskulin Agar....26
3.2.3.1.3. Blood Agar Base (Merck 1.10886) 27
3.2.3.1.4. Gram Boyama....27
3.2.3.1.5. Brucella Broth 27
3.2.3.2. Genotipik Yöntemler....27
3.2.3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Enterokokların Saptanması....27
3.2.3.2.1.1. DNA Ekstraksiyonu 27
3.2.3.2.1.2. Enterecoccus spp. identifikasyonu için PZR....28
3.2.3.2.1.3. Agaroz Jel Elektroforez....29
3.2.3.2.1.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması 29
3.2.3.2.1.3.3. Görüntüleme İşlemi 29
3.2.3.2.1.3.2. Elektroforez İşlemi 29

Sayfa no

4. BULGULAR....30
4.1. CMT TEST SONUÇLARI....30
4.2. FENOTİPİK TEST SONUÇLARI....31
4.2.1. Chromocult Enterococci Broth....31
4.2.2. m-Enterococcus Selective Agar ve Bile-Aesculin Agar....32
4.2.3. Blood Agar Base....33
4.2.4 Gram Boyama....34
4.3. GENOTİPİK ANALİZ SONUÇLARI....35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ....36
6.KAYNAKLAR....41
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR

AAC : Asetil Transferaz
AAD : Adenil Transferazlar
AAC-6' : 6' Asetiltransferaz
ABD : Anabilim Dalı
ANT : Nükleotidil Transferazlar
APH : Fosfo Transferazlar
ARA : Arabinoz
ARG : Arginin
°C : Santigrad Derece
CMT : California Mastitis Test
CNA : Colombia Colistin-Nalidixic Acid Agar
DNA : Deoksiribonükleik Asit
lt : Litre
MİK : Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
mRNA : Messenger Ribonükleik Asit
MOT : Motilitiy
MAN : Mannitol
µl : Mikrolitre
MRSA : Metisilin Resistance *Staphylococcus aureus*
MRSE : Metisilin Resistance *Staphylococcus epidermidis*
NAGA : N-Asetil Glikoz Amin
NAMA : N-Asetil Muramik Asit
Nm : Nanometre
NNIS : National Nosocomial Infections Surveillance System
PBP : Penisilin Bağlayan Protein
PEA : Phenylethyl Alchol Agar
PIG : Pigment
Ph : Power of Hydrogen

PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis
Pmol : Pikomol
PYR : Pirolidonil Beta-Naftilamid
PYU : Piruvat
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAF : Raffinoz
RT : Room Temperature
SBL : Sorbitol
SOR : Sorboz
Spp. : Species Plural For Species
SUC : Sükroz
TBE : Tris-Borat EDTA
TEL : Tellürit
UV : Ultraviole
Van : Vankomisin
VRE : Vankomisin Resistance Enterococcus

TABLO VE RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Enterokok türlerinin gruplara ayrılması ve fenotipik özellikleri.....16
Tablo 3.1. Primer dizilimleri.....25
Tablo 4.1. CMT Test Sonuçları.....30
Tablo 4.2. Chromocult Enterococci Broth Ekim Sonuçları 31
Tablo 4.3. 154 *Enterococcus* spp.'nin m-Enterococcus Selective Agar ve Bile-Aesculin-Azide Agar'a ekim sonuçları……..……..……..32
Tablo 4.4. Blood Agar Base Ekim Sonuçları.....33
Tablo 4.5. Gram Boyama Sonuçları.....34
Tablo 4.6. Genotipik Analiz Sonuçları.....35

Resim 4.1. CMT testi ile pozitif ve negatif sonuç veren süt numuneleri 31
Resim 4.2. Chromocult Enterococci Broth'a yapılan ekim sonrasında besiyerindeki (+++) pozitifliğe ait görüntü.....32
Resim 4.3. Bile-Aesculin-Azide Agar da besiyeri siyah hale veren pozitif suşa ait görüntü.....33
Resim 4.4. Kanlı Agara pasajlanan kolonilerin görüntüleri.....34
Resim 4.5. Elektoroforez sonucu elde edilen bantların görüntüsü (% 1,5 'lik Agaroz Jel) 35

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İnek sütü bilinen en önemli hayvansal protein kaynaklarından biridir. Ülkemizde yılda yaklaşık olarak 12 milyon ton süt üretilmekte bu sütün % 85'i inek sütünden temin edilmektedir. Süt kendine has kokusu, aroması ve tadıyla önemli bir besin kaynağı olması yanında süt endüstrisinin temel maddesini oluşturmaktadır.

Yıllardan beri çeşitli yollarla değişik ürünlere dönüştürülen süt, çeşitli kimyasal ve mikrobiyolojik analizlere tabii tutularak süt endüstrisinde kullanılıp peynir, yoğurt, ayran, pastörize süt ve benzeri olarak sofralarımızdaki yerini almaktadır.

Yüksek süt verimli hayvanların süt üretimine olan önemli katkısı meme sağlığı, süt hijyeni ve ahır hijyeni gibi konuların önem kazanmasına neden olmuştur. Özellikle meme yangısı anlamına gelen mastitisin oluşumunda etkili olan bu üç faktör çiftliklerde sürü yönetiminin temelini oluşturmaktadır.

Başta meme sağlığı olmak üzere sağım hijyeni ve ahır hijyeni gibi konularda alınacak tedbirler sütün kalitesinin artmasına, uzun ömürlü ve sağlıklı olmasına katkıda bulunacaktır.

Mastitisin etiyolojisinde bakteriyel etkenler ilk sırayı oluşturur. Mastitise neden olan bakteriyel patojenler kaynağına göre çevresel ve bulaşıcı olarak iki grupta incelenir. Bulaşıcı patojenler arasında *Staphylococcus* spp.ve *Streptococcus* spp., çevresel etkenleri arasında ise *Escherichia coli* ve *Enterococcus* spp. yer almaktadır.

Süt ineği yetiştiriciliğinin temel sorunlarından biri olan mastitis, ekonomik kayıplara yol açan önemli bir hastalıktır. Bir inek için harcanan ilaç ve tedavi masrafı 200 TL'yi bulmakta ülke çapında ise bu rakam 50 milyon TL'ye ulaşmaktadır.

Diğer yandan günlük 20 lt süt veren bir hayvanın mastitis olduğunu düşünülürse antibiyotikten dolayı 20 günlük sütün atılması, süt kalitesindeki değer kaybı, süt ineklerinde meydana getirdiği verim düşüklüğü, sütün satış değerindeki azalma, meme kaybı, ilaç ve tedavi giderleri, hayvanların elden çıkarılması veya sonunda sepsis sonucu hayvanın ölmesi hem işletmeye hem de ülke ekonomisine büyük kayıplar getirmektedir.

Ülkemizde yaygın olarak tüketilen sokak sütleri kontrolsüz ve hijyenik olmayan koşullarda satılmaktadır. Sokakta satılan sütler halk sağlığı açısından tehdit oluşturmaktadır. Satıcıların bilinçsiz olması, sağılan sütün kötü şartlarda saklanması, sağlıksız bidonlarda taşınması ve hava ile uzun süre temas etmesi, satıcıların sağlık muayenelerinin düzenli yapılmaması gibi etmenler sütün kontamine olmasına neden olmaktadır. Bu şartlarda elde edilen sütlerin birde pastörize edilmeden, aseptik şartlarda tüketime sunulması özellikle çocuklarda ve yaşlılarda önemli derecede hastalıklara davetiye çıkarmaktadır. Diğer taraftan pek çok zoonoz hastalığın da yayılmasına sebep olmaktadır.

Ülkemizde süt fabrikaları belli sanayi bölgelerinde yoğunlaşmış vaziyettedir. Süt işletmelerinin köy ve kasabalarda dağınık olması ülke genelinde sütün toplanmasını, fabrikalara ulaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Özellikle köylerdeki süt toplayıcıların soğutucusu olmayan araçlarla süt toplaması, sütün kontaminasyon ve bozulma riskini arttırmaktadır. Özellikle sağım, depolama, dolum esnasında alet, makine, ekipman ve insanlardan kaynaklanan fekal kontaminasyon önem arz etmektedir. Bütün bu faktörler sütün memeden çıktıktan sonra tüketilene kadar geçirmiş olduğu zorlu safhaları kısaca özetlemektedir.

Enterokokların çeşitli antibiyotiklere direncinin giderek artış göstermesi ve özellikle Vankomisine dirençli Enterokokların artışı önemlerini artırmaktadır. Özellikle son yıllarda Avrupa'da çeşitli hayvan yemlerinde büyüme faktörü olarak bir glikopeptid olan Avoparsin kullanımı, Vankomisine dirençli *Enterococcus* suşlarının hayvanlardan besin zinciri yoluyla insanlara yayılmasına yol açmıştır. Ancak Avoparsin kullanımının çeşitli Avrupa ülkelerinde yasaklanmasından sonra Van A tipi Vankomisine dirençli

Enterococcus suşlarının izolasyonunda azalma saptandığı belirtilmektedir.

Bu çalışmada *Enterococcus* spp.'nin mastitisli inek memelerindeki mastitis oluşumundaki rolü ve türlerin konvansiyonel yöntemler kullanılarak dağılımlarının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bununla birlikte ülkemizde halen kontrolsüz bir şekilde satılan sokak sütlerindeki Enterokokkal fekal kontaminasyon düzeyinin saptanması da hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. YAPISAL ve BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER

Enterococcus'lar Gram (+), katalaz (-), oksidaz (-), fakültatif anaerobik, spor oluşturmayan, hareketsiz, diplokok ya da zincir görünümündeki bakterilerdir. Doğal çevreleri insan ve hayvanların bağırsak sistemleri olmasına rağmen, toprakta, suda, bitki ve böceklerde de bulunurlar.

Önceleri *Streptococcus* cinsi içinde yer alan ve Lancefield serolojik D grubuna ait olan bu cins, fekal *Streptococcus* olarak kabul edilmekteydi. 1984 yılında DNA-DNA hibritleşme ve 16S RNA sekans çalışmaları sonucunda *Streptococcus faecium* ve *Streptococcus faecalis* türlerinin diğer streptoklardan önemli derecede farklı olduğu tespit edilmiş ve Schleifer ve Balz tarafından *Enterococcus* cinsi olarak ayrılmıştır. Daha sonra bu cins içindeki bakteriler *E. faecalis, E. faecium, E. durans, E. avium, E. casseliflavus, E. malodoratus, E. hirae, E. gallinarum, E. mundtii, E. raffinosus, E. pseudoavium, E. flavescens, E. dispar, E. sulfureus, E. saccharolyticus, E. columbae, E. cecorum, E. gilvus, E. pallens, E. seriolicida, E. solitarius ve E. sulfureus* gibi çesitli türlere ayrılmışlardır (1- 4).

2.1.1. Hücre Duvarı

Gram pozitifler bakterilerden olan Enterokok'ların hücre duvarı yapısı iki ana kimyasal yapıdan oluşmaktadır.

2.1.1.1. Teikoik Asit

Peptidoglikan tabakasına dağılmış antijenik özelliğe sahip olan teikoik asit, poliribitol veya poligliserol fosfat moleküllerinden oluşmuş lineer polimer yapıya sahiptir. Peptidoglikan tabakasındaki N-asetil muramik asit (NAMA) molekülüne fosfodiester bağıyla kovalent olarak birleşmiştir. Teikoik asidin antijenik determinantları oluşturmada katkıları oldukça fazladır. Diğer yandan kuvvetli polar ve negatif yüklü dış yüzey karakteri oluşturmada da etkinliği vardır. Kalınlığı bakteri türüne göre değişmekle birlikte yaklaşık 10-12 nm arasındadır. Teikoik asit bulunduğu yere göre iki kısma ayrılır. Bunlar hücre duvarı ve membran teikoik asitleridir (5, 6).

Duvar teikoik asitleri, Gram pozitiflerde peptidoglikan tabakasına bağlanmış olup temel yapısında poliribitol fosfat veya poligliserol fosfat bulunur. Membran teikoik asitleri ise sitoplazmik membranın dış yüzeyinde lokalize olmuştur. Membran teikoik asitlerinde gliserol fosfat yapı hakim durumdadır. Gram pozitif bakterilerde teikoik asit yapısına fosfodiester bağıyla bağlanmış olan ikinci antijenik yapı peptidoglikan tabakasıdır. Bu tabaka bakteriye şekil, elastikiyet, sağlamlık kazandırır. Yapısında N-asetil glikoz amin (NAGA) ve N-asetil glikoz amin (NAMA) bulunur (7, 8).

Gram Pozitiflerin hücre duvarında bulunan teikoik asit ve peptidoglikan ile protein yapılarının bakterilerin tür spesifik antijenik maddelerini ve virulanslarını sağlamada önemli etkinliği vardır. Hücre duvarını kaybeden bakterilerde, antijenik karakterler ve virulans büyük ölçüde zayıflar. Ökaryotik hücre duvarının gergin yapıları selüloz ve benzeri bileşiklerden kaynaklanırken, eubakterilerde peptidoglikandan oluşmaktadır. Ökaryotik hücreler ile eubakteriler arasındaki bu kimyasal kompozisyon farklılıkları, penisilin gibi ilaçların seçici özelliklerinin oluşmasını sağlar (9).

2.2. ÜREME ÖZELLİKLERİ

Enterokoklar fakültatif anaerob mikroorganizmalardır. Optimal 35 °C ve pH 7.6'da iyi ürerler. Ancak çoğu türleri 10 °C ve 45 °C 'de ve pH 9.6'da üreyebilirler. İzolasyon için kan ilave edilmiş uygun bir kanlı agar (triptik soy agar, brain heart infüzyon agar) kullanılabilir. Hemolizi göstermek için besiyerine % 5 koyun kanı eklenir. İzolasyon

için çeşitli besiyerleri kullanılabilir. *Enterecoccus faecalis*'in hemoliz karakteri kullanılan kanın cinsine göre değişir. Koyun kanlı besiyerinde genellikle hemoliz oluşturmazlar. At ya da tavşan kanı içeren besiyerlerinde bazı suşları hemoliz oluşturabilir (10, 11).

Colombia colistin-nalidixic acid agar (CNA) ve phenylethyl alchol agar (PEA) gibi seçici besiyerleri Enterokokların izolasyonunu sağlar (10, 11). Gram negatif bakterileri içeren örnekler için Bile-Aesculin Azide Agar, Selective Enterococcus Agar, Enterococcosel Agar ve diğer Azid içeren besiyerleri kullanılabilir. 35 - 37 °C de 18 - 24 saatlik inkubasyondan sonra kanlı agarda 0,5 - 1 mm çapında, keskin sınırlı, düzgün yüzeyli, gri-beyaz koloniler oluşur. Koloniler alfa, beta veya nonhemolitik olabilir (12). Ayrıca pH 9.6'da, % 40 safra tuzu içeren besiyerinde üreyebilirler. Fakültatif anaerop bakterilerdir. Sitokrom enzimleri olmadığından katalaz negatiftirler. Glikozdan gaz oluşturmazlar. Kanlı jelozda enterokok kolonileri büyükçe, gri, parlak, buğulu görünümde olup alfa, beta hemolitik ya da non-hemolitiktirler. *E. cecorum, E. columbae* ve *E. saccharolyticus* dışında kalan tüm kökenler pirolidonil beta-naftilamid (PYR) maddesini hidrolize *E. flavescens, E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* gibi bazı kökenler hareketlidirler. *E. faecalis, E. faecium*'un tersine % 0.04 tellürit içeren ortamda ürer ve agarda siyah koloniler yaparlar. Bu özellikleri enterokokları tanımlamada yeterli ise de, daha az rastlanan *Lactococcus, Aerococcus, Pediococcus* ve *Leuconostoc* türleri gibi bazı Gram pozitif, katalaz negatif koklarda da benzer özellikler bulunur. *Lactococcus* ve *Aerococcus* türleri grup D antiserumu ile reaksiyon vermemeleri; *Pediococcus* ve *Leuconostoc* türleri de PYR negatif olmaları ile enterokoklardan ayrılırlar (13).

2.3. ANTİBİYOTİK DİRENCİ

Enterokokların çeşitli antibiyotiklere direnç mekanizmaları iki grupta incelenebilir:

2.3.1. İntrinsik Direnç

İntrinsik direnç terimi türlerin tümünde bulunan kromozomal direnci ifade eder. Penisilinlere, klindamisine, sefalosporinlere ve düşük düzeyde olmak üzere aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı kalıtsal olarak *Enterecoccus* suşlarında bulunan dirençtir.

2.3.1.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotiklere İntrinsik Direnç

Enterokokların beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç göstermeleri karakteristik özellikleridir. Bu tip direnç özellikle PBP 5 olmak üzere *Enterecoccus*'ların Penisilin bağlayan proteinlerinin beta-laktam antibiyotikleri için kalıtsal olarak düşük afiniteye sahip olmasından meydana gelmektedir. PBP 5, Solomon adalarında izole edilmiş ve hiçbir antibiyotikle karşılaşmamış *Enterecoccus* suşlarında bile tespit edilmiştir (14).

İnvitro testlerde *E. faecalis* için penisilinin ortalama MİK değeri 2 - 8 mg / lt arasındadır. Bu değer birçok *Streptococcus* için olan ortalama MİK değerinden 10 - 100 kat daha büyüktür. *E. faecium* suşları *E. faecalis* suşlarına oranla penisiline daha dirençli bulunmakta, ortalama MİK değeri 16 - 32 mg / lt arasında değişmektedir. Ampisilinin *E. faecalis* için MİK değeri 1 - 4 mg / lt arasındadır ve penisilin için olan MİK değerinden bir dilüsyon daha aşağıdadır. Yarı sentetik ve penisilinaza dirençli beta-laktamlara da direnç oldukça yüksek bulunmuştur. Bu yüksek MİK değerine ek olarak *Enterecoccus*'lar tipik olarak beta-laktamlara karşı toleranslıdırlar, yani mutad tedavi dozunda beta-laktam grubu antibiyotikler Enterokoklara karşı bakterisidal değil bakteriyostatik etki gösterirler (14).

Genellikle sefalosporinler Enterokoklara karşı penisilinden daha az etkilidir ve mevcut sefalosporinlerin hiçbirisi klinikte enterokoklara karşı kullanılmamalıdır (15).

2.3.1.2. Aminoglikozid Grubu Antibiyotiklere İntrinsik Direnç

Aminoglikozid antibiyotikler, bakteri ribozomlarının 30S alt birimlerine irreversibl bir şekilde bağlanarak ribozomlarda protein sentezini inhibe ederler ve mRNA'nın taşıdığı genetik kodun yanlış okunmasına neden olurlar. Streptomisin sadece 30S alt birimine bağlandığı halde diğerleri ilave olarak 50S alt birimine bağlanırlar (16).

Düşük düzey aminoglikozid direnci tüm *Enterococcus* türlerinin karakteristik bir özelliğidir. Burada 2 mekanizma söz konusudur. Birincisi enterokok bakteri duvarının bu antibiyotiklere karşı geçirgenliğinin az olması; ikincisi yalnızca *E. faecium*'da görülen kromozomal olarak kodlanan bir enzim tarafından aminoglikozid antibiyotiğinin enzimatik inaktivasyonudur (17).

Enterecoccus faecalis için streptomisin ve kanamisin ortalama MİK değeri 250 mg / lt dolayında, gentamisin ve tobramisin için ise 8 - 64 mg / lt arasındadır. Direncin nedeni Enterokok bakteri duvarının bu antibiyotiklere karşı geçirgenliğinin düşük olmasıdır. Aminoglikozid antibiyotikler, beta-laktam antibiyotik ya da vankomisin gibi hücre duvar sentezini engelleyen bir antibiyotikle kombine biçimde verilecek olursa zedelenen hücre duvarından aminoglikozid antibiyotikler daha kolay geçeceğinden aminoglikozid MİK değerlerinde önemli düşüşler elde edilir. Enterokoklara karşı beta-laktam ya da glikopeptid antibiyotikler ile aminoglikozid antibiyotik kombinasyonunun sinerjistik olmasının sebebi de bu mekanizmadır (18).

Enterecoccus faecalis kökenlerinde yüksek düzeyde aminoglikozid direnci yoksa penisilin ile aminoglikozid antibiyotikleri arasında sinerjizm görülür. *E. faecium* kökenlerinde ise yüksek düzey aminoglikozid direnci bulunmasa da penisilin ile sadece gentamisin ve streptomisin sinerjistik etkili olabilir. Çünkü *E. faecium* kökenleri intrinsik olarak tobramisin, netilmisin, kanamisin ve sisomisini modifiye eden 6' asetiltransferaz (AAC-6') enzimini oluştururlar. AAC 6' enzimi aac(6')-Ii geni tarafından kodlanır (17, 19).

Bu durumda yüksek düzey aminoglikozid direnci olmamakla beraber (MÎK < 2000 mg / lt) hücre duvarına etkili antibiyotikler ile sayılan bu 4 aminoglikozid arasındaki sinerji bozulmaktadır (15, 17, 20).

Enterokoklarda beta-laktam ve aminoglikozid antibiyotiklerine olan intrinsik direncin yanı sıra klindamisin ve linkomisine karşı da düşük düzeyde bir direnç mevcuttur (15, 20, 21).

Trimetoprim-sulfametoksazol in vitro olarak etkin gözükmesine rağmen, Enterokoklar ekzojen folinik asit dihidrofolat ve tetrahidrofolatı kullanma yeteneğindedirler ve bu nedenle antibiyotik in vivo olarak etkili olmamaktadır (15, 22, 23).

2.3.2. Kazanılmış Direnç

Antimikrobiyal ajanlara karşı kazanılan direnç ya mevcut DNA'da bir mutasyon veya yeni DNA alımı ile olur. Yeni DNA alımı transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon yolu ile olur. Transformasyon dışındaki diğer iki mekanizma ile bu mikroorganizmalar çeşitli antibiyotiklere direnç kazanırlar. Enterokoklarda 3 tip konjugatif transfer sistemi tespit edilmiştir (17).

Bunlardan birincisi dar alanlı plazmidleri içerir ve şimdiye kadar sadece *E. faecalis* 'de saptanmıştır. Konjugatif transfer sisteminin ikincisini oluşturan geniş alanlı plazmidler enterokok türleri, streptokok türleri, *Staphylococcus aureus*, Laktobasiller, *Bacillus subtilis, Listeria monocytogenes* ve diğer mikroorganizmalar arasında transfer edilebilirler.

Enterokoklardaki yeni tanımlanan üçüncü konjugatif sistem ise konjugatif transpozonlardır. Konjugatif transpozonlar alıcı ve verici hücreler arasında hareket edebilen ekstra kromozomal DNA parçacıklarıdır. Anlatılan bu mekanizmalar ile Enterokoklarda kloramfenikol, eritromisin, tetrasiklin, florokinolonlar ve klindamisine karşı yüksek düzey rezistansın yanı sıra yüksek düzey aminoglikozid direnci, beta-laktamaz yapımı veya diğer mekanizmalarla gelişen yüksek düzey penisilin direnci ve glikopeptid antibiyotiklere direnç kazanılması mümkündür.

2.3.2.1. Penisilinlere Karşı Kazanılmış Direnç

Enterokok kökenlerinin beta-laktamaz oluşturarak penisilinlere yüksek düzey direnç geliştirdiklerini gösteren çalışmalara karşın, bu mikroorganizmalarda penisilin direncinin gelişmesinin temel yolu olarak PBP'lerde oluşan değişiklikler kabul edilmektedir.

Enterokoklarda beta-laktamaz sentezi ilk kez 1983 yılında Murray ve Mederski-Samoraj tarafından bildirilmiştir (24).

Beta-laktamaz sentezi aminoglikozidler ile beta-laktam antibiyotikleri arasındaki sinerjistik etkinin kaybolmasına neden olur. Çoğu vakada penisilinaz aktivitesi yüksek düzey gentamisin direncine de neden olan bir plazmid üzerinde bulunmuştur. Bu enzim penisilin, ampisilin, üreidopenisilinler daha az oranda da karbenisilin ve tikarsilini inaktive edebilir. Nafsilin, sefalosporinler ve imipenem bu enzime dayanıklıdır. Beta-laktamaz geni klonlanmış ve DNA dizisi tespit edilmiştir. DNA dizisi Stafilokoklardan elde edilen Beta-Laktamaz geni DNA dizisi ile %90'dan fazla benzerlik gösterir (25).

Patterson ve ark. (26), beta-laktamaz yapan 6 enterokok suşunda plazmidleri genetik yönden incelemişler ve Stafilokoklardan elde edilen beta-laktamaz geninin probuyla *Enterecoccus* plazmidlerini hibridize etmişlerdir. Bu ve buna benzer çalışmalar *E. faecalis* 'de bulunan beta-laktamaz genleri ile Stafilokoklardan bulunan beta-laktamaz genlerinin ortak bir genden orijin almış olabileceğini düşündürmektedir.

Buna rağmen Enterokoklardaki beta-laktamazlar ile S. aureus'daki beta-laktamazların ekspresyonunda bazı farklılıklar vardır. Mesela *Enterecoccus* beta-laktamazı konstitütif olarak sentezlenir ve hücreye bağlı olarak bulunur. Stafilokoklarda ise indüklenebilir ve hücre dışı alana salgılanır (21).

Beta-laktamaz üreten suşların direnci inokulum etkisi yüzünden rutin disk duyarlılık testleri ile tespit edilemez. Disk diffuzyon testindeki gibi düşük inokulumlarda suşlar duyarlı, 107 KOB / ml gibi yüksek inokulumlarda ise dirençli bulunurlar (15, 20, 21, 27).

Kromozomal beta-laktamaz direnci başka suşlara düşük oranda aktarılırken plazmid ile kodlanan beta-laktamaz genleri başka suşlara yüksek oranda aktarılabilmektedir (28).

Düşük afiniteli PBP'lerin (özellikle PBP 5) aşırı üretiminin penisilin direncine neden olduğu gösterilmiştir (29).

Oster ve arkadaşları 1990 yılında yaptıkları bir çalışmada izole ettikleri Enterokok suşlarının % 9'unu ampisiline dirençli olarak bulmuşlar ve bu direnci PBP'lerde affinite azalmasına bağlamışlardır (30).

Ancak bazı yüksek düzeyde ampisiline dirençli suşlarda artan ampisilin direnci düşük afiniteli PBP'ler ile doğru orantılı olarak bulunmamıştır. Bu durum başka mekanizmaların da olabileceğini düşündürmektedir (31).

2.3.2.2. Aminoglikozid Grubu Antibiyotiklere Kazanılmış Yüksek Düzeyde Direnç

Enterokoklarda yüksek düzeyde aminoglikozid antibiyotik direnci de görülebilir. Bu tür direnç gösteren bakterilerde duvar sentezini inhibe eden bir antibiyotik ile aminoglikozid antibiyotik kombinasyonundan elde edilen sinerjistik etki kaybolmuştur.

2.3.2.2.1. Streptomisine Karşı Kazanılan Yüksek Düzeyde Aminoglikozid Direnci

Streptomisine karşı kazanılan yüksek düzeyde aminoglikozid direnci iki farklı mekanizma ile meydana gelebilir:

2.3.2.2.1.1. Ribozomal Mutasyonla Kazanılan Direnç

Aminoglikozidler bakteri ribozomunun 30S alt ünitesine özgül bağlanma bölgelerinden bağlanıp protein sentezini engelleyerek etkili olurlar. Ribozomlarda bu alt birim 21 protein ve tek bir 16S RNA molekülünden oluşmaktadır. Bir ribozomal proteinde oluşan tek bir aminoasit değişikliği o ribozomun antibiyotiğe düşük affinite

göstermesine yol açmaktadır. Ribozomun 30S alt biriminde bulunan S12 proteininde 42'nci pozisyonda bulunan lizin yerine asparajinin girmesi streptomisinin ribozomlara bağlanmasını engeller (32).

Gentamisin ve kanamisin gibi diğer aminoglikozidler de bu hedefe ortak olurlar, fakat bu dirençten etkilenmezler. Muhtemelen böyle aminoglikozidler 30S subuniti üzerinde birçok bölgeye bağlanmakta, bu durumda tek bir aminoasit mutasyonundan çok az etkilenmektedirler (17).

2.3.2.2.1.2. Enzimatik Yoldan Kazanılan Direnç

Plazmid vasıtası ile kodlanan ve aminoglikozidi modifiye edebilen bir enzim olan 6 adeniltranferaz (AAD 6) enzimi ile olmaktadır. Dirençten sorumlu olan bu enzim streptomisinin 6-hidroksil pozisyonunu adeniller ve streptomisin için spesifiktir. Bu enzim varlığında sadece streptomisine karşı yüksek düzeyde direnç gelişmektedir (33).

2.3.2.2.2.Gentamisine Karşı Yüksek Düzeyde Aminoglikozid Direnci

Gentamisine karşı yüksek düzeyde dirençli Enterekok suşları ilk olarak 1979 yılında Paris'de izole edilmiştir. Yüksek düzey gentamisin dirençli Enterekoklar bu tarihten itibaren hızla tüm dünyada yayılmış ve çok ağır seyirli enfeksiyonlara sebep olmuştur (17, 34).

Bu kazanılmış direncin yayılımı konjugatif plazmid ve transpozonlar tarafından Aminoglikozidleri modifiye eden enzimleri kodlayan genlerin transferi ile olmuştur (35).

Aminoglikozidlere karşı kazanılan dirençte en sık gözlenen ve en önemli mekanizma sentezlenen enzimlerle bu aminoglikozidlerin inaktive edilmesidir. Bu tür direnç duyarlı suşlara transfer edilebilir ve bu nedenle hızla yayılır.

Aminoglikozid modifiye eden enzimler 3 gruba ayrılabilir. Bu enzimler: Asetiltransferazlar, fosforilazlar, nükleotidil transferazlardır.

Asetil transferazlar (AAC) : Asetil Koenzim A'dan bir aminogrubuna asetat transferini katalizler. Bu grup enzimler yanlızca Deoksistreptamin içeren aminoglikozidleri modifiye ettiğinden streptomisine karşı etkisizdirler.

Adenil transferazlar -nükleotidil transferazlar- (AAD veya ANT) : ATP veya diğer nükleotidleri substrat gibi kullanan ve onları hidroksil gruplarına bağlayan enzimlerdir.

Fosfo transferazlar (APH): Hidroksil gruplarına fosfat moleküllerini bağlar. Aminoglikozidleri modifiye eden enzimler daima plazmidlerle kodlanırlar ve konstitütif enzimlerdir. aminoglikozid modifiye edici enzimler Enterekokların yanı sıra Stafilokoklarda da gösterilmiştir.

Yüksek düzey gentamisin direncine neden olan enzim 6' asetiltransferaz-2" fosfotransferaz enzim kompleksi olup streptomisin hariç klinik kullanımda olan tüm aminoglikozidlere (gentamisin, tobramisin, amikasin ve netilmisin) yüksek düzeyli direncin ortaya çıkmasında etkilidir. Bu enzim kompleksini kodlayan aac 6' -aph 2" geni plazmidler ve transpozonlar yolu ile Enterekoklar ve Stafilokoklar arasında geniş dağılım göstermektedirler (17, 33).

Önceleri *Staphylococcus* ve *E. faecalis*'de bulunan aac 6'-aph 2" geni daha sonra *E. faecium, E. casseliflavus, E. raffinosus, E. avium, Streptococcus mitis* ve *Streptococcus agalactiae*'da da identifiye edilmiştir (17).

Tüm aminoglikozidlere yüksek düzey dirençli *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları dünyada artan sıklıkta görülmekte ve böyle suşlarla olan endokardit gibi ciddi enfeksiyonlarda klinik başarısızlığa neden olmaktadırlar (15).

2.3.2.3 Glikopeptid Antibiyotiklere Direnç

Glikopeptid antibiyotikler olan vankomisin ve teikoplanin, Gram pozitif bakterilerin hücre duvarını oluşturan peptidlerin terminal D-alanil-D-alanin dizisine bağlanarak transglikozilasyon reaksiyonunu ve peptidoglikan oluşumunu inhibe ederler. Bu şekilde bakteri duvar sentezi engellenmiş olur (36).

Enterekoklarda glikopeptid antibiyotiklere direnç ilk kez 1988 yılında Uttley ve arkadaşları tarafından bildirilmiş ve daha sonra tüm dünyada hızla yayılmıştır (37).

Türkiye'de ise ilk vankomisine dirençli enterokok suşu Antalya'da saptanmış olup 1998 yılında Vural ve arkadaşları tarafından ANKEM kongresinde sunulmuştur (38).

Enterekoklarda glikopeptid antibiyotik direnci bakterinin sadece vankomisin ya da hem vankomisin hem de teikoplanine dirençli olması, direncin indüklenebilir ve diğer bakterilere geçirilebilir olup olmamasına göre 4 fenotipte incelenir. Bunlar: Van A, Van B, Van C ve Van D olarak bilinmektedir (39, 40, 41).

2.3.2.3.1.Van A Tipi Direnç

En sık karşılaşılan fenotiptir. Çoğunlukla *E. faecium*'da görülmekle beraber *E. faecalis* ve nadiren *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* ve *E. raffınosus*'da da görülebilir. Bakteri hem vankomisin hem de teikoplanine karşı indüklenebilir yüksek düzey direnç gösterir. Dirence neden olan membran proteini bakteri ancak vankomisin varlığında üretilirse sentezlenir. Bu proteinin sentezini Van A geni sağlar. Bu gen plazmid ve transpozonlar üzerinde olduğundan bu direnç diğer enterokok türlerine kolaylıkla transfer edilebilir.

2.3.2.3.2. Van B Tipi Direnç

Glikopeptid dirençli Enterekoklarda bu fenotipte değişen düzeyde vankomisin direnci vardır ancak teikoplanine duyarlıdırlar. Vankomisin tarafından indüklenebilir bir dirençtir. teikoplanin ise indükleyemez. Ancak vankomisinle indüklenen kökenler teikoplanine de direnç gösterirler. Bu tür direnç sıklıkla *E. faecalis* ve *E. faecium*'da görülmekle beraber nadiren *E. casseliflavus* ve diğer *Enterecoccus* suşlarında da bulunabilir. Direnç Van B membran proteini sebebiyle oluşur. Van B geni plazmid veya daha sıklıkla kromozom üzerinde bulunur. Son zamanda konjugasyonla transfer edildiği görülmüştür (15, 39, 41).

2.3.2.3.3. Van C Tipi Direnç

Van A ve Van B tipi dirençlerin her ikisi de kazanılmış dirençlerdir. Oysa üçüncü fenotip olan Van C, *E. gallinarum, E. casseliflavus* ve *E. flavescens* 'de görülen yapısal, indüklenemez, transfer edilemez bir dirençtir. Van C tipi dirence sahip Enterekoklarda düşük düzey vankomisin direnci vardır. Teikoplanine ise duyarlıdırlar. Van C geninin kodladığı Van C membran proteini nedeniyle oluşur. Bu genler transfer edilemezler (42).

2.3.2.3.4.Van D Tipi Direnç

Son zamanlarda ve yalnızca *E. faecium*'da tanımlanmıştır. Teikoplanine düşük düzey direncin de görüldüğü vankomisin direncini içerir (42).

Vankomisin dirençli Enterekoklarda vankomisin + aminoglikozid kombinasyonu ile sinerjistik sonuç elde edilemez, invitro koşullarda Enterekoklardan, Stafilokoklara vankomisin direnç genlerinin aktarılabilmiş olması bu genlerin klinik izolatlarda da aktarılabileceği olasılığını düşündürür. İşte vankomisin direncinin en korkulan yanı

dirençten sorumlu genlerin metisilin dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) ve *Staphylococcus epidermidis*'e (MRSE) aktarılma olasılığıdır (39, 43).

2.4. PATOJENİTE VE VİRULANS

Enterekoklar düşük virulanslı mikroorganizmalar olmalarına karşın toplum kaynaklı ve özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli etkenlerdir. *E. faecalis* ve *E. faecium*'un bazı suşları tarafından üretilen sitolizin insan ve hayvan eritrositleri için hemolizin aktivitesi gösterir. *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri tarafından üretilen agregasyon maddesinin enterokokların kalp kapakları ve renal hücrelere bağlanmasını kolaylaştırdığı bilinmektedir. Ayrıca *E. faecalis*'te görülen biyofilm oluşumu bu mikroorganizmaların üriner sisteme, vasküler kateterlere ve kalp kapaklarına kolonize olmasını kolaylaştırmaktadır (44).

Yukarıda bahsedilen virulans faktörleri şunlardır:

2.4.1. Sitolizin

E. faecalis ve *E. faecium*'un bazı suşlan tarafından üretilir. İnsan, tavşan, at ve sığır eritrositleri için hemolizin aktivitesi gösterir. Koyun eritrositlerine etkisizdir ve bazı ökaryotik hücreler için toksiktir (45).

2.4.2. Feromonlar

E. faecalis'de bulunur. Suşlar arasında plazmid DNA'sının konjugatif transferini kolaylaştıran ve organizma tarafından salınan küçük peptidlerdir. Bu moleküller nötrofiller için kimyasal olarak çekici olduklarından enfeksiyonlarda inflamatuvar cevabı artırırlar (46).

2.4.3. Agregasyon Maddesi

E. faecalis ve *E. faecium*'da bulunur. Alıcı ve verici hücreler arasında feromon cevabını kolaylaştırır. Arg-Gly-Asp motiflerine bağlanarak renal tübüler hücrelere bağlanmayı güçlendirir (47).

2.4.4. Lipoteikoik Asit

Enterokokların D grubu antijenini oluşturur. Tümör nekroz faktör ve interferon salınmasına neden olarak immun cevabın düzenlenmesini sağlar (46).

2.4.5. AS 48

Bazı *E. faecalis* şuşlarında bulunan Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin pek çoğuna karşı litik aktivite gösteren bir bakteriyosindir. Bazı *E. faecalis* şuşlarında jelatinaz ve hyaluronidaz gibi hücre dışı enzimler de üretilmektedir (46).

2.5. ENTEROKOK TÜRLERİNİN GRUPLANDIRILMASI

Enterekoklar mannitol, sorbitol ve sorboz içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmalarına ve arginini hidroliz etmelerine göre beş gruba ayrılırlar (Tablo 1) (45).

2.5.1. Grup 1

E. avium, E. malodoratus, E. raffinosus, E. pseudoavium ve E. saccharolyticus'dan oluşur. Bu kökenlerin hepsi karbonhidratlı her üç sıvı besiyerinde asit oluşturur, fakat arginini hidrolize etmezler.

2.5.2. Grup 2

E. faecalis, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* ve *E. gallinarum'*dan oluşur. Bu gruptaki kökenler arginini hidrolize ederler, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişik reaksiyon verirler.

2.5.3. Grup 3

E. durans, E. hirae, E. dispar ve *E . faecalis* ile *E. faecium*'un mannitol negatif varyantları bu grubu oluşturur. Bu grup üyeleri mannitol, sorboz ve sorbitol içeren sıvı besiyerlerinin hiçbirisinde asit oluşturmazlar, fakat arginini hidrolize ederler.

2.5.4. Grup 4

E. sulfureus ve *E. cecorum* bu grupta bulunmaktadır. Her iki Enterekok türü mannitol ve sorboz içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmaz ve arginini hidrolize etmezler. Sorbitol içeren sıvı besiyerinde ise *E. cecorum* asit oluştururken *E. sulfureus* asit oluşturmaz.

2.5.5. Grup 5

E. casseliflavus, E. gallinarum ve *E. faecalis*'ın arginini hidrolize etmeyen varyantları ile *E. columbae* bu grupta bulunur. Bu gruptaki kökenler arginini hidrolize etmezler, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişik reaksiyon verirler.

Tablo 2.1 : Enterokok türlerinin gruplara ayrılması ve fenotipik özellikleri (45).

Türler	**MAN**	**SOR**	**ARG**	**ARA**	**SBL**	**RAF**	**TEL**	**MOT**	**PIG**	**SUC**	**PYU**
Grup l											
E. avium	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
E. malodoratus	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
E. raffinosus	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
E. pseudoavium	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
E. saccharolyticus	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
Grup 2											
E. faecalis	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
E. faecium	+	-	+	+	v	v	-	-	-	+	-
E. casseliflavus	+	-	+	+	v	+	_*	+	+	+	v
E. mundtii	+	-	+	+	v	+	-	-	+	+	-
E. gallinarum	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
Grup 3											
E. durans	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E. hirae	-	-	+	-	-	v	-	-	-	+	-
E. dispar	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
E . faecalis var.	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
E. faecium var.	-	-	+	+	-	v	-	-	-	+	-
Grup 4											
E. sulfureus	* -	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
E. cecorum	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Grup 5											
E. casseliflavus	+	-	-	+	v	+	v	+	+	+	v
E. gallinarum	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
E. faecalis	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
E. columbae	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+

MAN: mannitol; SOR: sorboz; ARG: arginin; ARA: arabinoz; SBL: sorbitol; RAF: raffinoz; TEL: % 0.04 tellürit; MOT: hareketlilik; PIG: pigment; SUC: sükroz; PYU: piruvat, +: > % 90 pozitif, -: <% 10 pozitif, -* veya +* : nadir istisnalar (reaksiyonlarda < % 3 oranında sapma görülebilir.), v: değişken

2.6. ENTEREKOKLARDAN KAYNAKLANAN HASTALIKLAR

2.6.1. İnsanlarda Enterokoklarla Gelişen Enfeksiyon Hastalıkları

İnsanlardaki Enterokokal enfeksiyonların genellikle endojen kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar özellikle dirençli Enterokok türlerinin hastadan hastaya veya kolonize hastane personeli tarafından hastalara bulaştırılabileceğini göstermiştir (48). Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalarda insan ve hayvan orijinli VRE izolatları arasında genetik geçiş olabileceği belirtilmektedir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ve hastanede uzun süre yatanlarda, özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda ve daha önceden antibiyotik kullanımı olanlarda enterokok enfeksiyonlarına eğilim artmaktadır. Enterekoklar nozokomiyal enfeksiyonların sorumlusu olarak 3. sırada yer almaktadır (49, 50, 51). Özellikle Avrupa'da et üretimini artırmak amacıyla büyütme faktörü olarak glikopeptid bir antibiyotik olan avoparsin yoğun olarak kullanılmıştır. Avoparsin kullanımı VRE suşlarının hayvanlardan insanlara geçişine yolaçmıştır. İlk olarak 1995'te Danimarka'da Enterekoklarda avoparsin ve vankomisine direnci kodlayan genin hayvanlarda gösterilmesi üzerine avoparsin yasaklanmıştır (52, 53). Broyler rasyonlarına gerek büyütme, gerekse tedavi ve koruyucu amaçlı olarak katılan antibiyotikler, antimikrobiyal dirençli *Enterococcus* spp.'nin selektif seçilmesine neden olmaktadır. Enterekoklar sahip oldukları antimikrobiyal dirençli genlerini, plazmid ve transpozonlar aracılığı ile ekosistem içerisinde, insanlar için patojen olan *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* spp. ve *Streptococcus* spp. gibi Gram pozitif bakterilere transfer edebildikleri ortaya konulmuştur (54).

2.6.1.1. Üriner Sistem Enfeksiyonları

Üriner sistem enfeksiyonları Enterekokların yol açtığı klinik hastalıkların en sık görülen tipidir ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen Enterekokların en sık kaynağı idrar kültürleridir (55). Enterokokların etken olduğu üriner sistem enfeksiyonlarının çoğu nozokomiyaldir ve çoğunlukla üriner kateterizasyon ile birlikte bulunur. Özellikle yapısal bozukluğu veya tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonu olan hastalarda sıktır (56). Enterekoklarda hastanede yatmayan genç, sağlıklı kadınlarda komplike olmamış sistit gibi üriner enfeksiyonların % 5'inden azını oluşturur (57).

2.6.1.2. Endokardit

Enterekoklar viridens *Streptococcus*'lar ve *Staphylococcus aureus*'dan sonra üçüncü en sık rastlanan infektif endokardit etkenidir (58). Enterekoklar bakteriyel endokarditlerin % 5 - 15'ini oluştururlar (55). Enterecoccus endokarditi süt çocuklarında nadirdir. Erkeklerde ve 50 yaş üzeri populasyonda daha sıktır. Sıklıkla etken *E. faecalis*'dir. Vakaların çoğunda altta yatan bir kalp kapak hastalığı veya prostetik kapak bulunmakla beraber, Enterekoklar normal kapaklarda da infeksiyona yol açabilirler. İlaç bağımlılarında % 5 - 53 oranında etken olabildikleri gösterilmiştir (56, 58). Hastalık cerrahi yolla ya da manipülasyonlarla gastrointestinal sistemden veya çoğunlukla da genitoüriner infeksiyon ve genitoüriner bölgeye tıbbi girişim uygulanmasından kaynaklanır. En sık aort ve mitral kapak tutulur. Enterokoklar genellikle subakut bakteriyel endokardite neden olurlar (55).

2.6.1.3. Bakteriyemi

Enterokok bakteriyemisi enterokok endokarditinden daha sık görülen bir enfeksiyondur ve sıklığı giderek artmaktadır. Endokardit hastane dışı kaynaklı enterokok bakteriyemilerinin 1/3'ünde görülürken nozokomiyal bakteriyemilerde endokardit oranı % 1'in altındadır (56). Nozokomiyal enterokok bakteriyemileri genellikle polimikrobiyaldir ve sıklıkla üriner sistem enfeksiyonlarından ve karın içi infeksiyonlardan kaynaklanır. Pelvik sepsis yaralar (özellikle termal yanıklar, dekübitus ülserleri veya diyabetik ayak enfeksiyonları), intravenöz veya intraarteriyal kateterizasyon veya kolanjit diğer giriş yollarını oluşturmaktadır (55).

2.6.1.4. Karın İçi Ve Pelvik Enfeksiyonlar

Enterokoklar karın içi ve pelvik enfeksiyonlarda sıklıkla miks aerob ve anaerobik floranın bir parçası olarak bulunurlar. Ancak bu enfeksiyonlarda ki rolü tartışmalıdır. Bu enfeksiyonlarda çoğu zaman Enterokoklara etkisi olmayan antimikrobik ilaçlarla yapılan tedavi ile başarılı sonuç almak mümkün olmuştur (55, 58). Bununla birlikte enterokokların nefrotik sendrom ya da sirozlu hastalar ile ayaktan sürekli periton diyalizi gören hastalarda peritonit yaptığı, akut salpenjit, peripartum maternal enfeksiyonlar (endometrit gibi) ile sezeryan sonrası apseye neden oldukları bilinmektedir (55, 56).

2.6.1.5. Yara Ve Yumusak Doku Enfeksiyonları

Enterokoklar nadiren selülit veya diğer derin doku enfeksiyonlarına yol açarlar. Sıklıkla cerrahi yara enfeksiyonları, dekübitus ülserleri ve diyabetik ayak enfeksiyonlarında alınan klinik örneklerden Gram negatif basil ve anaerob bakteriler ile birlikte izole edilebilirler. Ancak bu olgularda Enterekoklar klinik önemini değerlendirmek, karın içi apselerinde olduğu gibi zordur (55).

2.6.1.6. Menenjit

Enterekoklar menenjiti genellikle santral sinir sisteminde anatomik bir defekt, önceden geçirilmis beyin ameliyatı ya da kafa travması gibi predispozan faktörlerin varlığında görülür (55, 58). Ayrıca bakteriyemi düzeyi yüksek olan endokardit ve neonatal sepsisli hastalarla, AIDS ve akut lösemi gibi immunsüprese hastalarda bazen Enterokoklara bağlı menenjitler görülebilmektedir (59). Neonatal dönem dışında enterokokal menenjit çok nadir görülür ve bu dönemde olgular genellikle epidemiler şeklinde ortaya çıkar. Erişkinlerde bildirilen olguların çoğu enterokokal endokarditi veya üriner sistem infeksiyonu olan, beyin cerrahisi ile ilgili girişim uygulanan ya da immun sistemi baskılanmış hastalardır. Enterokokal menenjit olgularında serebrospinal sıvıda her zaman pleositoz bulunmayabilir (60).

2.6.1.7. Pediatrik Enfeksiyonlar

Bakteriyolojik olarak konfirme edilmiş neonatal sepsis ve menenjit olgularının % 13'ünde Enterekokların etken olduğu bildirilmiştir. Düşük doğum ağırlığı, erken doğum, uzun süreli non-umbilikal santral venöz kateterizasyon, bağırsak rezeksiyonu veya diğer abdominal cerrahi girişimler, uzun süreli hospitalizasyon ve sefalosporin grubu antibiyotik tedavileri yenidoğan yaş grubunda enterokokal sepsis gelişimi için önemli risk faktörleridir (60).

2.6.2. Hayvanlarda Enterokoklarla Gelişen Enfeksiyon Hastalıkları

2.6.2.1. Mastitis

Süt ineği yetiştiriciliğinin temel sorunlarından biri olan mastitis, ekonomik kayıplara yol açan bir hastalıktır (1, 2).

Mastitis, pek çok nedene bağlı ortaya çıkan meme bezi enfeksiyonudur. Hastalığın etiyolojisinde bakteriyel etkenler ilk sırayı oluşturur. Mastitise neden olan bakteriyel patojenler kaynağına göre çevresel ve bulaşıcı olarak iki grupta incelenir. Bulaşıcı patojenleri *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae* ve *Streptococcus dysgalactiae*; çevresel etkenleri *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* ve *Enterecoccus* spp. oluşturur (3).

Enterekoklar geniş bir konakçı dağılımına sahiptirler. Hayvanların sindirim sisteminde yerleşik doğal flora bakterisi olan bu etkenler, özellikle sağım hijyenine dikkat edilmediği ve altlık temizliğinin düzenli yapılmadığı durumlarda memeleri kolaylıkla enfekte ederek mastitise neden olmaktadırlar. Meme başından giren Enterokoklar meme kanalı boyunca yerleşip kolonize olurlar ve meme bezinde enfeksiyona ilişkin klinik bulgular meydana getirirler (4, 5).

Enterokok etkenleri tek başlarına mastitis oluşturabilmelerine rağmen mastitis olgularından genellikle streptokokkal etkenlerle birlikte izole edilmektedirler. Bu nedenle enterokok nedenli mastitisler sıklıkla streptokok mastitisleri ile karıştırılmaktadır (61-64).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Numunelerin Toplanması

Çalışma kapsamında Nevşehir yöresinde ki küçük ve büyük ölçekli işletmelerden Mart 2011 – Nisan 2011 tarihleri arasında süt numuneleri toplandı. Numuneler 50 adet sağlıklı, 50 adet klinik ve 50 adet subklinik mastitisli inek memesinden CMT solusyonu ile skorlanarak alındı. Ayrıca fekal kontaminasyonun tespiti amacı ile 50 adet sokak sütü de çalışma kapsamında değerlendirildi. Örnekler steril 50 ml'lik tüplere alınarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuarına soğuk zincirde getirildi ve aynı gün içinde bakteriyolojik ekimleri gerçekleştirildi.

3.1.2 California Mastitis Testi (CMT)

Anyonik Deterjan	100 ml
Bromocresol Purple (BCP)(1/300	50 ml
Distile Su	900 ml

Bromocresol Purple (BCP) tozundan 100 ml için 0,333 gr hassas terazide tartılarak 900 ml distile su içersinde eritildi. Hazırlanan solusyon içerisine 100 ml anyonik deterjan eklenerek CMT solusyonu kullanıma hazır hale getirildi.

3.1.3. Standart Suş

Araştırmada fenotipik ve genotipik analizlerde pozitif kontrol suş olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kullanıldı.

3.1.4. *Enterococcus* spp. İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

3.1.4.1. Chromocult Enterococci Broth (Merck 1.10294)

Peptone Mixture	8,6 g/lt
Sodium Chloride	6,4 g/lt
Sodium Azide	0,6 g/lt
5-Bromo-4-Cloro-3İndolyl-B-D Glukopyranosid	0,04 g/lt
Tween 80	2,2 g/lt

Dehidre besi yeri 36 gr olacak şekilde hassas terazide tartılarak 1000 ml distile su içerisinde eritildi. Besi yeri ağzı vidalı steril tüplere 5 ml olacak şekilde konuldu. Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi. Tüpler kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

3.1.4.2. Enterococcus Selective Agar (Fluka 38259)

Tyriptose	20 g/lt
Yeast Extract	5 g/lt
D(+) – Glukose	2 g/lt
Disodium Hydrogen phosfate monohydrate	4 g/lt
Sodium Azide	0,4 g/lt
2,3,5 Trifenyltetrazolium Chloride	0,1 g/lt
Agar	10 g/lt

Dehidre besi yeri 42 gr olacak şekilde hassas terazide tartılarak 1000 ml distile su içerisine konularak benmaride 60 ºC'de 30 dk eritildi. Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi. Besiyeri 55 °C'de steril ortam sağlanarak steril petrilere dökülerek kurumaya bırakıldı. Petriler kullanılıncaya kadar + 4 °C'de saklandı.

3.1.4.3. Bile-aesculin-azide Agar (Coccosel agar, BioMeireux)

Enzymatic Digest of Casein	25 g/lt
Yeast Enriched Meat Peptone	9,5 g/lt
Oxbile	1 g/lt
Sodium Chloride	5 g/lt
Sodium Citrate	1 g/lt
Ferric Ammonium Citrate	0,5 g/lt
Esculin	1 g/lt
Sodium Azide	0,2 g/lt
Agar	14 g/lt

Dehidre besi yeri 56,65 gr olacak şekilde 1000 ml distile su içerisinde eritildi. Otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edildi. Besi yeri 55°C'de steril petrilere döküldü. Petriler kullanılıncaya kadar + 4 °C'de saklandı.

3.1.4.4. Blood Agar Base (Merck 1.10886)

Nutrient substrate	20,0 g/lt
NaCl	5,0 g/lt
Agar-agar	15,0 g/lt

Dehidre besiyeri 39.5 g olacak şekilde 1000 ml. distile su içinde 1-2 dk kaynatılarak tümüyle çözündürüldü ve otoklavda 121 ºC'de 15 dk steril edildi. Bazal besiyeri 45 oC'ye soğutuldu ve üzerine steril defibrine koyun kanı % 5 oranında ilave edildi. Besiyeri 55 ° C'de steril petrilere döküldü. Tüpler kullanılıncaya kadar + 4 °C'de saklandı.

3.1.4.5. Gram Boyama Seti (GBL 5026 / 01, 02, 03, 04)

Hucker Kristal Moru Çözeltisi	(5026 / 01)
Crystal Violet	1 g
Distile Su	100 ml
Burke İyot Çözeltisi (5026 / 02)	
İyot	1 g
Potasyum İyodür	2 g
Distile Su	100 ml

Denatüre alkol aseton solusyonu (5026 / 3)

Aseton	50 ml
Alkol (% 96)	50 ml

Safranin Çözeltisi (5026 / 4)

Safranin	1 g
Distile Su	100 ml

3.1.4.6. Brucella Broth (Fluka B3051)

Casein Enzymic Hydrolysate	10 g/l
Peptic Digest of Animal Tissue	10 g/l
Yeast Extract	2 g/l
Dextrose	10 g/l
Sodium Chloride	5 g/l
Sodium bisulphite	0,1 g/l

Dehidre besiyeri 2,52 gr olacak şekilde 90 ml distile su içinde eritildi ve üzerine 10 ml gliserol eklendi. Karışım iyice karıştırılıp homojen hale getirildi. Cryotüpler içerisine 0,5 ml hazırlanan Brucella Broth solusyonundan konuldu. Otoklavda 121 ºC'de 15 dk sterilize edildi. Tüpler kullanılıncaya kadar + 4 °C'de saklandı.

3.1.5. Primerler

Çalışmada kullanılan primer dizilimleri Tablo 2'de verilmiştir. Genus spesifik PZR çalışmasında 2.5 pmol rrs primerleri, 5 pmol ddl *(E. faecalis)* primerleri ve 1.25 pmol ddl *(E. faecium)* primerlerinden kullanıldı. Hedef DNA 5 µl olacak şekilde hazırlandı.

Tablo 3.1: Primer dizilimi (65).

DNA bölgesi	Büyüklük	Primer dizisi
ddl *(E. faecalis)*	941 bp	forward-5'-ATCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG-3' reverse-5'-ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT-3'
ddl *(E. faecium)*	658 bp	forward-5'-TTGAGGCAGACCAGATTGACG-3' reverse-5'-TATGACAGCGACTCCGATTCC-3'
rrs (16S rDNA)	320 bp	forward-5'-GGATTAGATACCCTGGTAGTCC-3' reverse-5'-TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC-3'

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Örneklerin Toplanması

Çalışma kapsamında 50 adet sağlıklı, 50 adet klinik ve 50 adet subklinik mastitisli inek memesinden süt örnekleri toplandı. Fekal kontaminasyonların tespiti amacı ile 50 adet sokak sütü de çalışma kapsamında değerlendirildi.

California Mastitis Testi ayıracı ile skorlanan süt numuneleri alınmadan önce inek memeleri sıcak su ile yıkanıp kağıt havlu ile kurulandı. Memeler % 70'lik alkol ile dezenfekte edildi. İlk sağım sütü dezenfektanlı kova içine sağıldı. Süt örnekleri steril tüpler içerisine aseptik şekilde alındı. Daha sonra soğuk zincirde ERÜ Veteriner Fak. Mikrobiyoloji ABD laboratuvarına getirilerek besi yerlerine bakteriyolojik ekimleri gerçekleştirildi.

3.2.2. California Mastitis Testi (CMT)

Test için ineklerden CMT kabına her bir memeden 2 ml süt alınıp ve üzerine CMT ayıracı damlatılarak sonuç skorlandırıldı. Güvercin grisi renkte, tortusuz süt örnekleri normal kabul edildi. Jelleşme ve mavi mor renge dönen örnekler ise CMT ayıracının temin edildiği firmanın kullanım kılavuzuna göre 1 zayıf pozitif (+), 2 belli pozitif (++) ve 3 güçlü pozitif (+++) kabul edildi. Bir pozitif (+) olan sütler subklinik mastitis, 2 (++) ve 3 (+++) pozitif olan sütler ise klinik mastitisli olarak değerlendirildi. Dört ayrı kategoride sınıflandırılan sütlerden 50'şer adet süt örneği toplandı.

3.2.3. *Enterococcus* spp. İzolasyonu

Bakterilerin izolasyonu amacı ile süt örnekleri 5 ml olacak şekilde Chromocult Enterococci Broth (Merck 1.10294)'a ekilerek 37 ºC'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Mavi-yeşil renge dönen tüpler bir artı (+)'dan dört artı (++++)'ya kadar skorlandı. Derecelendirme sonucunda pozitif olan besi yerlerinden steril öze ile 0.1 ml alınarak m-Enterococcus Selective Agar ve Bile-Aesculin-Azide Agar (Coccosel agar, BioMehrieux)'a ekilip 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi.

Bile-Aesculin-Azide Agar'da etrafında siyah hale olan koloniler ve m-Enterococcus Selective Agar'da pembe-kırmızı renkli kolonilerden kanlı agara pasajlandı. Moleküler analiz öncesi kanlı agarda üreyen kolonilerde hazırlanan preparatlar Gram boyama ile boyanarak Gram pozitif olanlar tespit edildi. Gram pozitif Enterekok koloniler kanlı agardan steril plastik özeler ile sıyrılarak cryotüpler içersinde saklanmak üzere homojenize edildi. Örneklerin tamamı Genus spesifik PCR ile tiplendirilmek üzere – 20 ºC'de donduruldu.

3.2.3.1. Fenotipik Yöntemler

3.2.3.1.1. Chromocult Enterococci Broth (Merck 1.10294)

California Mastitis Testi solusyonu ile skorlanan süt örneklerinin tamamı Chromocult Enterococci Broth (Merck 1.10294) bulunan besi yerlerine 0,5 ml olacak şekilde otomatik pipetle ekildi. 37 ºC'de 48 saat inkubasyona tabi tutuldu. İnkubasyon sonrasında mavi yeşil renk veren tüpler bir artıdan (+), dört artıya (++++) kadar derecelendirilerek numaraları kaydedildi.

3.2.3.1.2. Enterococci Selective Agar ve Bile Eskulin Agar

Chromocult Enterococci Broth (Merck 1.10294)'da skorlanan ve mavi yeşil renge dönen pozitif koloniler steril öze ile 0,1 ml alınarak m-Enterococcus Selective Agar ve Bile-Aesculin-Azide Agar (Coccosel agar, BioMehrieux) içeren besi yerlerine ekilerek 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi. Bile-Aesculin-Azide Agar Enterekoklar ile StreptokoklarIN ayrımında kullanılan bir besi yeridir. Streptokoklar eskulinli besi yerlerinde üretmemeleri ile Enterekoklardan ayrılmaktadır. Bile-Aesculin-Azide Agar'da etrafında siyah hale olan koloniler ve m-Enterecocci Selective Agar'da pembe parlak koloniler şeklindeki üremeler Enterekok olarak pozitif kabul edildi.

3.2.3.1.3. Blood Agar Base (Merck 1.10886)

Bile-Aesculin-Azide Agar'da siyah hale olan koloniler ile m-Enterecocci Selective Agar'daki pembe parlak kolonilerden kanlı agara pasaj yapıldı. 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi. Üreyen kolonilerden hazırlanan preparatlar Gram boyama işlemine tabi tutuldu.

3.2.3.1.4. Gram Boyama

Kanlı Agar'dan bir öze dolusu kültür alındı. Temiz bir lam üzerindeki fizyolojik tuzlu su ile homojenize edildi. Preparat havada kurutulduktan sonra üç kez alevden geçirilerek tespit işlemi gerçekleştirildi. Preparat kristal moru çözeltisi (GBL 5026/01) ile 2-3 dakika boyandı. Boya dökülerek distile su ile yıkandı. Daha sonra iyot solusyonu (GBL 5026/02) ile 1-2 dakika boyandı. Boya dökülerek distile su ile yıkandı. Preparatın üzerine damla damla denatüre alkol çözeltisi (GBL 5026/03) damlatılarak dekolore edildi. Distile su ile yıkandı ve safranin çözeltisi (GBL 5026/04) ile 30 saniye boyandı. Preparat distile su ile yıkandı ve kurutuldu. İmmersiyon objektifte incelendi (64).

3.2.3.1.5. Brucella Broth

Kanlı agardan izole edilen ve Gram boyama sonucu Gram pozitif olduğu tespit edilen koloniler içerisinde 500 µl Brucella Broth bulunan cyrotüpler içerisinde homojenize edildi.

3.2.3.2. Genotipik Yöntemler

3.2.3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Enterokokların Saptanması

Goga ve ark. (65) tarafından bildirilen protokole göre PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapıldı.

3.2.3.2.1.1. DNA Ekstraksiyonu

Enterekok DNA ekstraksiyonu için Vivantis Gf -1 Bacterial DNA extraksiyon User's Guide DNA ekstraksiyonu protokolü aşağıdaki şekilde uygulandı.

1. 6000 devirde 5 dk santrifüj edilip RT (Room Temperatüre)'de üstteki sıvı aktarıldı.

2. 100 µl Buffer RL pelletin üstüne eklenip yeniden süspanse edildi.

3. 20 µl lizozim eklenerek karıştırılıp 37 ºC'de 20 dk beklendi.

4. 10000 G'de 3 dk santrifüj edilip üst sıvı atıldı.

5. 180 µl buffer R2 eklendi ve 20 µl proteinaz K ilave edilerek karıştırıldı. Benmaride 60 ºC'de 20 dk su banyosunda inkube edilip karıştırıldı.

6. 20 µl RNase ilave edilip 37 ºC' de inkubasyona tabi tutuldu.

7. 440 µl buffer BG ilave edilip karıştırılıp birkaç kez tüp alt üst edildi.

8. 60 ºC'de 10 dk inkübe edildi.

9. 1 dk soğuması beklenip 200 µl absolute etanol eklenerek hızlıca karıştırıldı.

10. Colon tüplere aktarılıp 10000 G'de 1 dk santrifüj edildi.

11. 750 µl wash buffer eklenip 10000 G'de 1 dk santrifüj edildi.

12. Sıvı dolu colon tüplere yerleştirildi.

13. 10000 G'de 1 dk santrifüj edildi.

14. Colon 1,5 ml santrifüj tüplerine alındı.

15. 50 -100 µl elution buffer steril distile su colonun üstüne döküldü.

16. 2 dk bekleyip 10000 G'de 1 dk santrifüj edildi.

17. DNA'sı üreyen koloniler Genus spefisik PZR ile tiplendirilmek üzere % 10-15 gliserinli TSB'de -20 ºC'de donduruldu.

3.2.3.2.1.2. *Enterococcus* spp. identifikasyonu için PZR

Enterecoccus spp. identifikasyonu için yapılan PZR tekniğinde Goga ve ark. (65)'nın, bildirdiği metot kullanıldı.

Genus spefisik PZR için reaksiyon karışımının total hacmi 25 µl olarak hesaplandı. PZR karışımı 10 x PCR buffer, 1,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTP karışımı, 0,625 U Taq DNA polymerase ve 2,5 pmol rrs primerinden hazırlandı. Hedef DNA 5 µl kullanıldı. Çalışmada kullanılacak primer dizilimi Tablo 2'de gösterildi.

DNA amplifikasyonu amacıyla Thermoycler'a yüklenen örnekler 94 °C'de 5 dk ön denatürasyon ve ardından 35 siklus 94 °C'de 1 dk, 54 °C'de 1 dk, 72 °C'de 1 dk ve son olarak da 72 °C'de 10 dk final uzatma ile sonlandı. PZR ürünleri % 1,5'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulup, ardından görüntülendi (65).

3.2.3.2.1.3. Agaroz Jel Elektroforez

3.2.3.2.1.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

Amplifikasyon sonrasında oluşan ürünlerin değerlendirilmesi için % 1,5'luk agaroz jel hazırlandı. Agaroz jel hazırlanırken tampon solüsyon olarak 0,5 x TBE (Tris-Borat EDTA) tamponu kullanıldı. Agaroz 50 ml TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritildikten sonra, 3 µl ethidium bromid ilave edilerek, jel elektroforez tablasına döküldü. Beş mm kalınlığında dökülen agaroz üzerine elektroforez tarağı takılarak, jelin katılaşması için 30 dakika beklenildi. Bu süre sonunda taraklar jele zarar vermeden çıkartıldı (66).

3.2.3.2.1.3.2. Elektroforez İşlemi

Jel elektroforez tablası elektroforez tankına yerleştirildikten sonra, elektroforez tankının içerisine TBE tampon solüsyonu jelin 1 mm üstüne gelecek kadar ilave edildi. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 5 µl alınarak, 1 µl 6x loading dye ile karıştırıldı. Bu karışımın hepsi jele yüklendi. DNA örnekleri 110 V, 500 mA, 1 saat 10 dk elektroforez işlemine tabi tutuldu (66).

3.2.3.2.1.3.3. Görüntüleme İşlemi

Jeldeki örnekler bilgisayarlı UV transillüminatör kutusu içine yerleştirilerek görüntülendi ve fotoğrafları çekilerek termal printerden kopyaları alındı (66).

4. BULGULAR

4.1. CMT TEST SONUÇLARI

Değerlendirmeye esas 200 adet süt numunesinden 50 adedi negatif (-), 50 adedi 1 zayıf pozitif (+), 50 adedi 2 belli pozitif (++) ve 3 güçlü pozitif (+++), 50 adedi ise sokak sütü olarak değerlendirildi. Bir pozitif (+) olan sütler subklinik mastitis, 2 (++) ve 3 (+++) pozitif olan sütler ise klinik mastitisli olarak değerlendirildi.

Tablo 4.1. CMT Test Sonuçları

Numune	**Numune Sayısı**	**CMT Pozitif Numune Sayısı (%)**
İnek Sütü	200	100 (% 50)



Resim 4.1: CMT testi ile pozitif ve negatif sonuç veren süt numuneleri

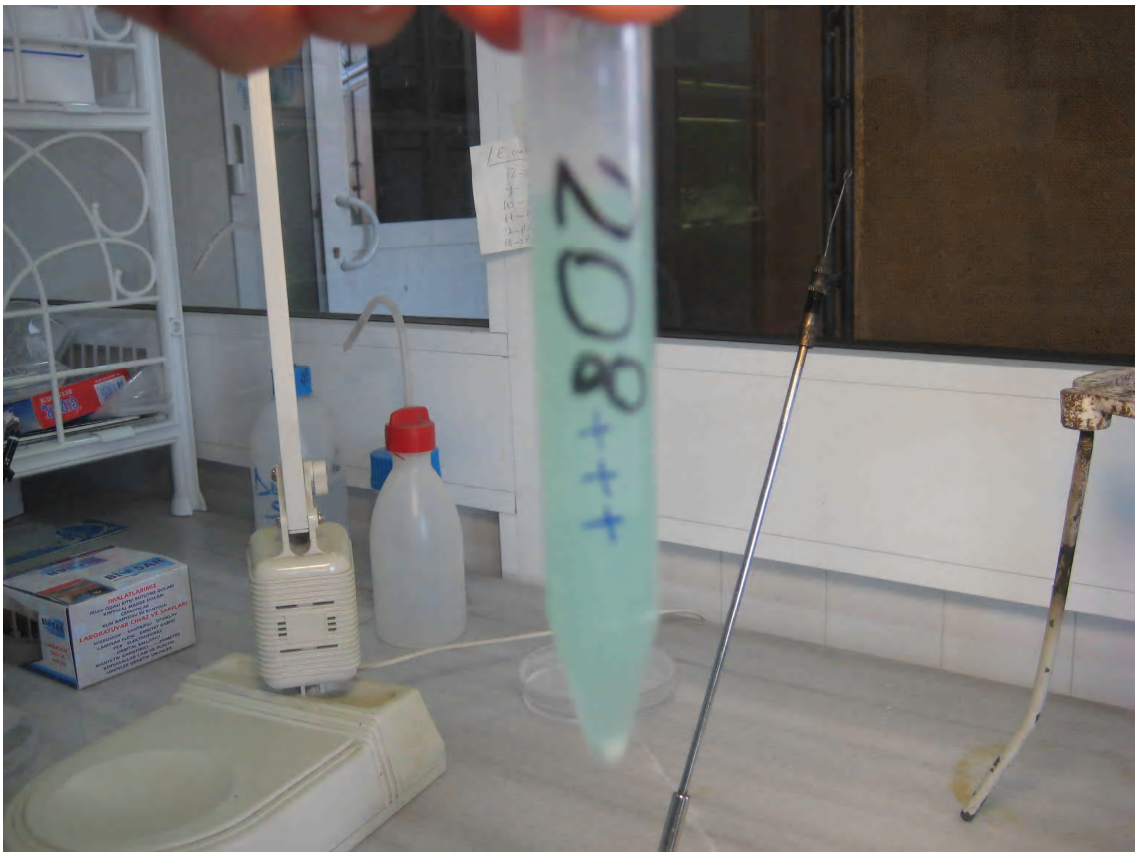
4.2. FENOTİPİK TEST SONUÇLARI

4.2.1. Chromocult Enterococci Broth

Toplam ekim yapılan 200 adet süt örneğinden 46 (% 23)'sı negatif (0), 71 (% 35,5)'i bir pozitif (+), 40 (% 20)'ı iki pozitif (++), 20 (% 10)'si üç pozitif (+++), 23 (% 11,5)'ü dört pozitif (++++) olarak değerlendirildi. Toplamda Chromocult Enterococci Broth (Merck 1.10294) besiyerine ekimi yapılan 200 süt örneğinden 154 (% 77)'ü pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 4.2. Chromocult Enterococci Broth ekim sonuçları

Numune	**Numune Sayısı**	**Chromocult Enterococci Broth Besi Yerinde Üreme Gözlenen Numune Sayısı (%)**
İnek Sütü	200	154 (% 77)



Resim 4.2: Chromocult Enterococci Broth'a yapılan ekim sonrasında besiyerindeki (+++) pozitifliğe ait görüntü

4.2.2. m-Enterococcus Selective Agar ve Bile-Aesculin Agar

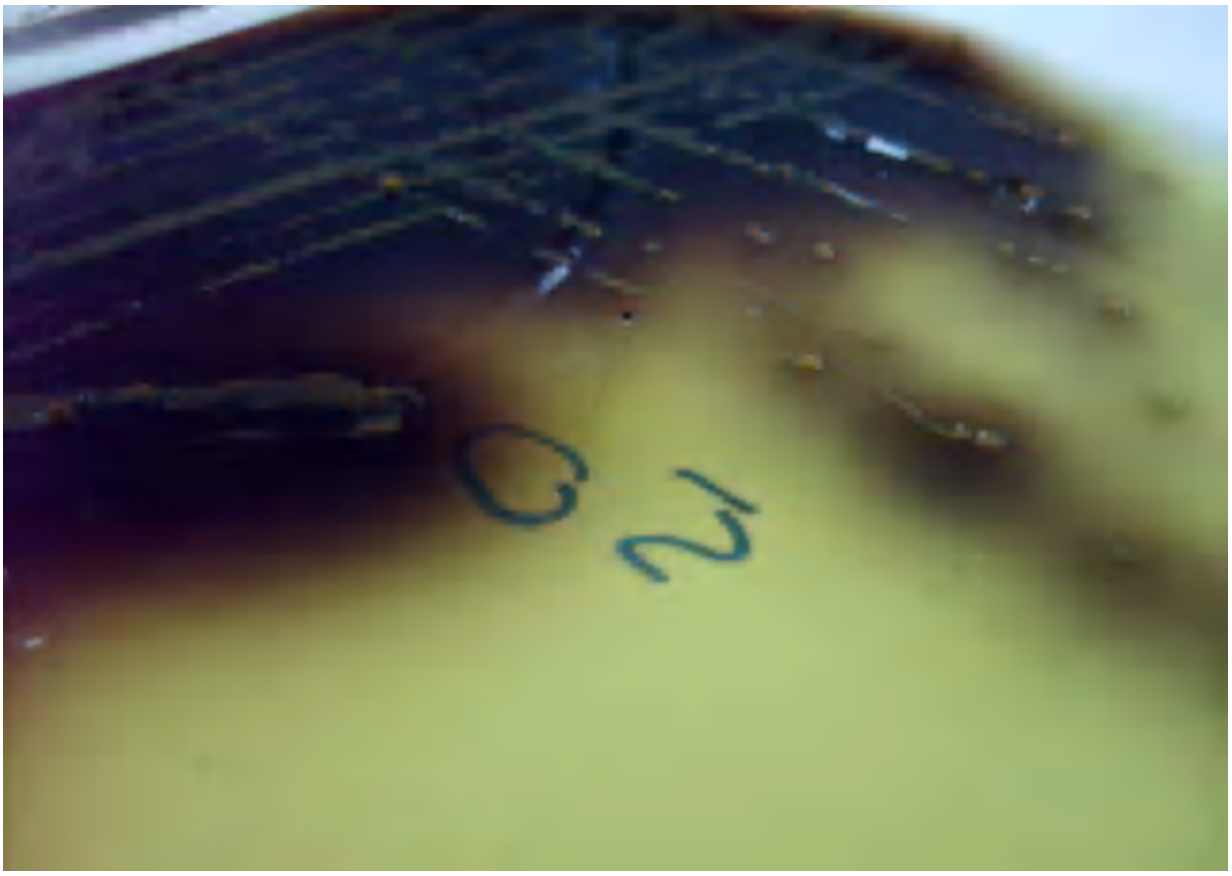
Chromocult Enterococci Broth (Merck 1.10294) besi yerinden ekimi yapılan 154 örnekten 135 adedi (% 87,66) m-Enterococcus Selective Agar ve Bile-Aesculin-Azide Agar besi yerlerinde pozitif reaksiyon verdi.

Tablo 4.3. 154 *Enterococcus* spp.'nin m-Enterococcus Selective Agar ve Bile-Aesculin-Azide Agar'a ekim sonuçları

Numune	Numune Sayısı	BEA* ve ESA**'da Üreme Gözlenen Pozitif Örnek Sayısı (%)
Enterococcus spp.	154	135 (% 87,66)

*: Bile-Aesculin-Azide Agar

**: m-Enterococcus Selective Agar



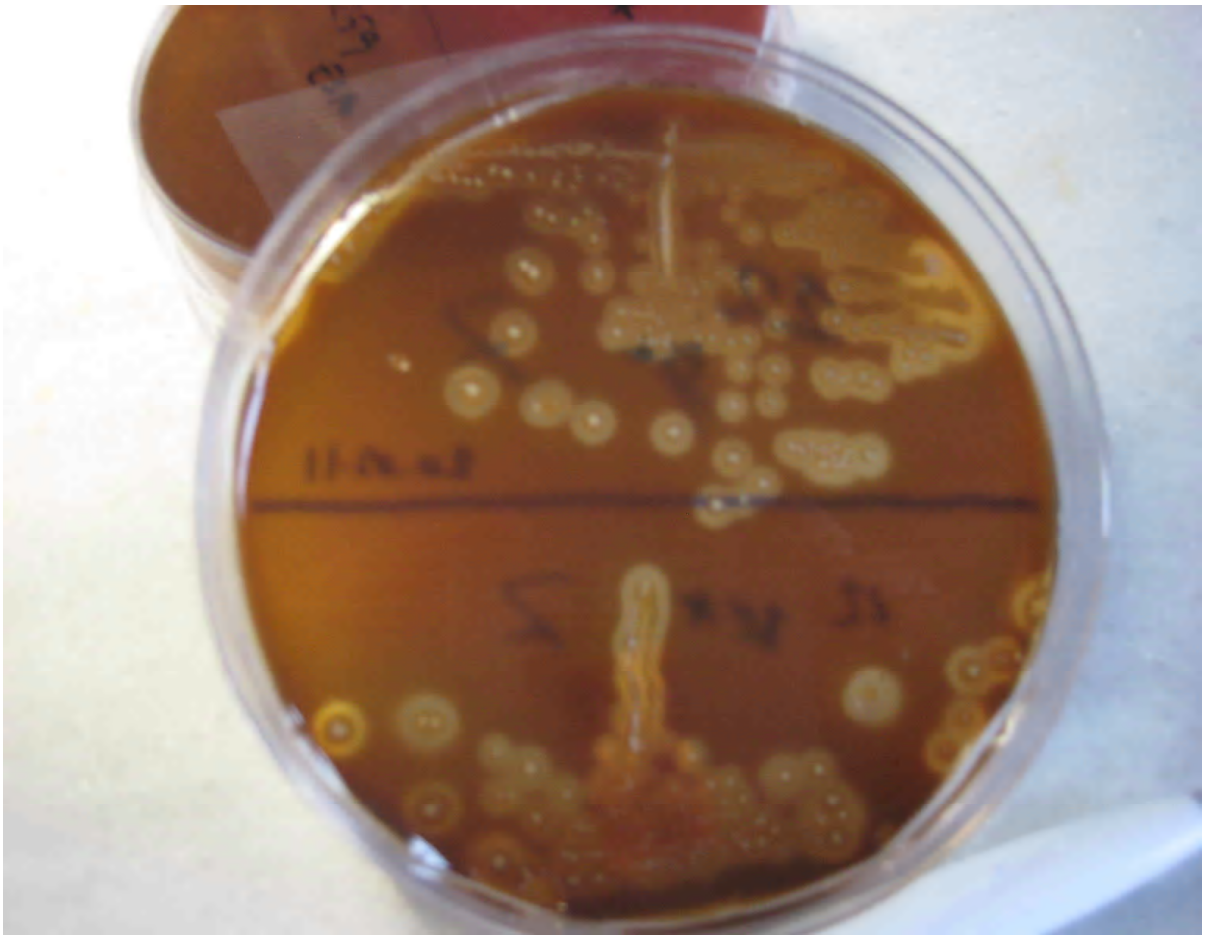
Resim 4.3: Bile-Aesculin-Azide Agar'da siyah hale veren pozitif suşa ait görüntü

4.2.3. Blood Agar Base

m-Enterococcus Selective Agar ve Bile-Aesculin-Azide Agar'da pozitif reaksiyon veren 135 örneğin kanlı agara pasajı yapıldı. Bu örneklerin inkubasyonundan sonra izole edilen koloniler Gram boyama işlemine tabi tutuldu.

Tablo 4.4. Blood Agar Base Ekim Sonuçları

Numune	**Numune Sayısı**	**Üreme Gözlenen Pozitif Numune Sayısı (%)**
Enterococcus spp.	135	135 (% 100)



Resim 4.4: Kanlı agara pasajlanan kolonilerin görüntüleri

4.2.4 Gram Boyama

Gram boyama işlemine tabi tutulan 135 örnekten 84 adedi (% 62,22) Gram pozitif kok olarak tespit edildi.

Tablo 4.5. Gram Boyama Sonuçları

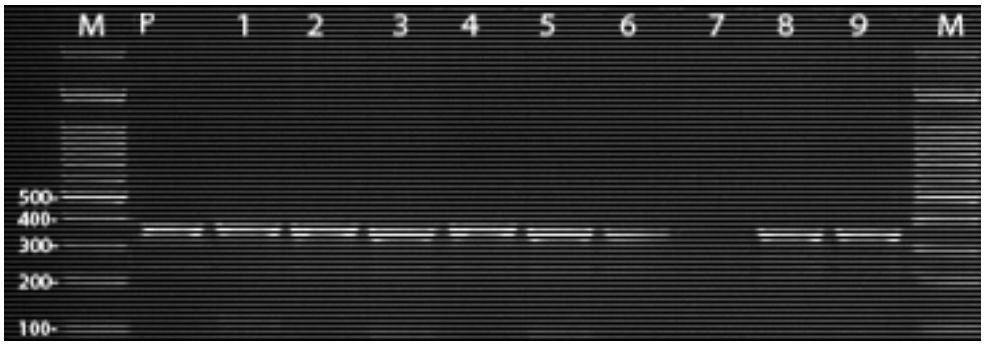
Numune	Numune Sayısı	Gram Boyamada Gözlenen Pozitif Numune Sayısı (%)
Enterococcus spp.	135	84 (% 62,22)

4.3. GENOTİPİK ANALİZ SONUÇLARI

Fenotipik testler ile *Enterecoccus* spp. olarak adlandırılan 84 *Enterococcus* spp. izolatının moleküler analizinde (PZR) 57 (% 67,85)'si *Enterecoccus faecalis* olarak identifiye edildi. Kalan 27 izolat ise *Enterococcus* spp. olarak adlandırıldı.

Tablo 4.6. Genotipik Analiz Sonuçları

İzolat Sayısı	*Enterecoccus faecalis* (%)
84	57 adet (% 67,85)



Resim 4.5: Jel Elektoroforez sonucu elde edilen bantların görüntüsü (% 1,5 'lik Agaroz Jel) M: Marker (100 bp DNA ladder.), P: Pozitif kontrol (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212), Pozitif örnek: 1-6-8-9, Negatif örnek 7.(Steril distile su)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yakın zamanlara kadar enterokok enfeksiyonlarının, insanların kendi floralarından endojen olarak kaynaklandığı düşünülmekteydi. Ancak son zamanlarda, enterokoklar hastane enfeksiyon patojeni olarak adlandırılmaya başlanmıştır. Vankomisin, sefalosporin ve aminoglikozid gibi antibiyotiklerin sık kullanımı nazokomiyal enterokok enfeksiyonlarındaki artış ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (44).

Antimikrobiyal direnç, dünyada ve ülkemizde giderek önem kazanmaktadır. İlk antibiyotiğin kullanımından bugüne kadar birçok hastalığın tedavisinde başarılar elde edilmiştir. Fakat bakterilerdeki direnç konusu zamanla önemli bir problem olmaya başlamıştır (67).

Enterokoklara bağlı hastane enfeksiyonlarının sıklığı NNISS (National Nosocomial Infections Surveillance System) bildirimine göre 1986-1989 yılları arasında % 12 ile ikinci sırada bulunmaktadır. Yine aynı bildirime göre Enterokoklar erişkin hastaların yara ve idrar yolu enfeksiyonlarında ikinci, bakteriyemilerinde üçüncü sıklıkla izole edilmektedir (68).

Ülkemizde Enterokoklara bağlı hastane enfeksiyonlarının sıklığı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 1983 yılında % 10,7 ile üçüncü, 1994 yılında ise % 6 ile altıncı sırada tespit edilmiştir. Yine Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde de 1991 yılında Enterokokların sebep olduğu hastane enfeksiyonu sıklığı % 3, 1995 yılında ise % 4 oranı ile yedinci sırada bulunmuştur (69).

Engin (70), yaptığı çalışmada Eylül 1998 - Temmuz 1999 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli servislerinde tedavi gören hastalara streptomisin, gentamisin ve vankomisin uygulaması sonucunda dirençli fekal enterokok kolonizasyonun prevalansını araştırmıştır. Bu amaçla hastanenin çeşitli servislerinde yatan ve özellikle yoğun antibiyoterapi gören 115 hastadan dışkı örneği alınmış, kültürü yapılan suşların % 59'u *E. faecium*, % 27'si *E. faecalis*, % 9'u *E. durans*, % 2'si *E. avium*, % 1'i *E. casseliflavus*, % 1'i *E. raffinosus* ve % 1'i de *E. hirae* olarak identifiye etmiştir.

Ayrıca, Enterokoklarda disk difüzyon yöntemiyle gentamisin ve streptomisin diskleri kullanılarak aminoglikozid direncini araştırmış ve suşların % 16'sında gentamisin ve % 38'inde streptomisin direnci bulmuştur. Diğer antibiyotiklere direnci disk difüzyon yöntemiyle araştırmış ve penisiline % 48, ampisiline % 36, imipeneme % 40, siprofloksasine % 26, norfloksasine % 16, nitrofurantoine % 6 ve tetrasikline ise % 46 oranında direnç bulmuştur (70).

Enterokokal infeksiyonlar içerisinde *E. faecalis* ile oluşan infeksiyonların oranı diğer türlere göre 10 kat fazladır. Ancak son yıllarda, vankomisine dirençli Enterokok (VRE)'ların ortaya çıkması nedeniyle bu oran gittikçe düşmüş ve *E. faecium* izolatları ön plana çıkmaya başlamıştır. Avrupa'da hayvanlarda büyümeyi arttırıcı olarak kullanılan ve bir glikopeptid türevi olan avoparsin'in kullanımının vankomisin direncinin artmasına neden olduğu kabul edilmektedir (71).

Mete (72), Denizli'de yaptığı çalışmada 111 besiciden dışkı örneği ve 72 sığırdan dışkı ve rektal svab örneklerinde vankomisine dirençli Enterokokların varlığını araştırmıştır. Besicilerden alınan numunelerde 96 ve sığırlardan 65 enterokok suşu izole etmiştir. Besicilerden izole edilen 96 suş; *E. faecalis* 38 (% 39,6), *E. faecium* 27 (% 28,1), *E. raffinosus* 8 (% 8,3), *E. durans* 7 (% 7,3), *E. hirae* 7 (% 7,3), *E. avium* 5 (% 5,2), *E. pseudoavium* 3 (% 3,1) ve *E.dispar* 1 (%1) olarak identifiye edilmiştir. Sığırlardan izole edilen 65 suş ise 21 (% 32,3) *E. faecalis*, 16 (% 24,6) *E. faecium*, 9 (% 13,8) *E. durans*,

5 (% 7,7) *E. hirae*, 4 (% 6,2) *E. avium*, 4 (% 6,2) *E. pseudoavium*, 3 (% 4,6) *E. raffinosus* ve 3 (% 4,6) *E. dispar* olarak identifiye edilmiştir. Besicilerden izole edilen suşların antibiyotik dirençlilikleriyle ilgili yapılan incelemede 96 suşta; %2,1 ampisilin, %8,3 penisilin, %42,7 sefaklor, %78,6 siprofloksasin, %32,3 sefalotin ve %34 tetrasikline karşı direçlilik bulunmuştur.

Sığırlardan izole edilen enterokok suşlarında % 10,8 ampisilin, % 10,8 sefaklor, % 15,3 siprofloksasin ve % 23,1 sefalotine karşı dirençlilik bulunmuştur. Sığırlardan izole edilen enterokok suşlarında penisilin ve tetrasikline karşı dirençlilik saptanamamıştır.

Ülkemizde sokaklarda satılan sütler halk sağlığı açısından önemli bir hastalık kaynağıdır. Sağıldıktan sonra tüketilinceye kadar ki geçen süreçte; ineklerdeki sağlık problemleri, çevresel etmenler ve satıcıdan kaynaklanan nedenlere bağlı olarak süt kontamine olabilmektedir.

Altun ve ark. (73), 150 sokak sütü, 109 UHT süt ve 41 pastörize süt olmak üzere toplam 300 numuneyi çalışmaya almışlardır. Tüm sokak sütü örneklerinde ml'de 100.000 ve üzeri değerlerde toplam bakteri saptanmıştır. UHT sütlerde izole edilen mikroorganizma sayısı ise en fazla ml'de 10 koloni olarak saptanmıştır. Pastörize sütlerin tümünde ise Gram pozitif sporlu basiller ml'de en fazla 200 koloni olarak belirlenmiştir.

Araştırıcılar sokak sütlerinde ciddi anlamda halk sağlığını tehdit eden mikrobiyolojik flora bulunmasından dolayı bu sütlerin satışının kesinlikle durdurulması gerektiğini vurgulamışlardır. Bu etkenlerin insanlara bulaşmasında süt ve süt ürünleri etkili olabileceği düşünülmektedir.

Araya ve ark. (74), tüketime sunulan 105 adet çiğ süt örneğinde yaptıkları incelemede, sütlerin % 38'inde *Enterococcus* spp. izole etmişlerdir. Bu suşların tür düzeyinde dağılımı ise % 71 *E. faecalis*, % 19 *E. faecium*, % 4 *E. durans*, % 4 *E. gallinarum* ve % 2 *E. avium*'dur.

Pitkala ve ark. (75), Finlandiya'da 2001 yılında inek sütlerinde mastitis etkenleri üzerine yaptıkları çalışmada 12661 örnekten 4237 bakteri saptamışlar ve bununda % 1,2'sinin *Enterococcus* spp. olduğunu tespit etmişlerdir.

Goga ve ark. (65), İtalya'da inek sütlerinde *Enterococcus* spp. izole etmek için yaptıkları mikrobiyolojik çalışmalarda 13 örneğin 7'sinde (% 53) *E. faecalis* ve 35 örneğin 27'sinde (% 77) *E. faecium* tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda incelediğimiz 50 sokak sütünün 9 (% 18)'unda ve 50 sağlıklı sütün 12 (% 24)'sinde *Enterecoccus faecalis* izole edilmiştir. Bulduğumuz sonuçlar Araya ve ark. (74) ve Goga ve ark. (65)'nın çalışmalarıyla paralellik göstermektedir. Pitkala ve ark. (75)'nın buldukları sonuçtan ise elde ettiğimiz değerin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunu da aldığımız numune sayısı ile araştırıcılarının incelemeye aldıkları numune sayısı arasındaki farklılıktan ileri geldiği düşünülmektedir. Ayrıca süt numunelerinin toplandığı bölgede kanalizasyon sistemi gibi çevresel problemlerin bulunması da elde ettiğimiz sonuçlar üzerinde etkili olabileceği kanısına varılmıştır.

Sokak sütlerinde araştırmacıların bildirdiği yüksek değerdeki *Enterecoccus* spp. bulguları fekal kontaminasyonun önemi daha belirginleştirmektedir.

Ülkemizde son zamanlara kadar mastitisli inek sütünden izole edilen enterekok türleri gerektiği gibi değerlendirilemediği için gereken önemi kazanamamış ve çoğunlukla *Staphylococcus* ve *Streptococcus* enfeksiyonlarıyla birlikte değerlendirilmiştir. Ancak yakın zamanlardaki çalışmalar ışığında yapılan değerlendirmelerde özellikle mastitis enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotiklerin etki spektrumunda Enterekoklara da rastlanmaktadır.

Dünyada enterokokların normal sütlerdeki prevalansına ve mastitteki rollerine ilişkin yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Peterson-Wolfe ve ark. (76), memeden direkt olarak aseptik şartlarda aldıkları 81 adet sütten 28 *E. faecium* ve 14 *E. casseliflavus* saptamışlardır. Doğum sonrası alınan süt örneklerinden 9 *E. faecium*, 5 *E. casseliflavus* ve 2 *E. faecalis* izole etmişlerdir. Klinik mastitisli süt örneklerinden 21 *E. faecium*, 1 *E. casseliflavus* ve 1 *E. faecalis* bulmuşlardır. Toplamda memeden izole edilen 102 adet örneğin *Enterococcus* spp. dağılımı 68 *E. faecium*, 29' *E. casseliflavus* ve 5 *E. faecalis* olarak saptanmıştır.

Devrise ve ark. (77) Belçika'da yaptıkları çalışmalarda subklinik mastitisli ineklerden aldıkları 248 adet süt örneğinde 61 *E. faecalis*, 3 *E. faecium*, 1 *E. durans* ve 1 *E. hirae* olarak saptamışlardır. Bu toplamda identifiye edilen bakterilerin % 26'sını oluşturmaktadır.

Çalışmamızda 50 subklinik mastitisli sütte 15 (% 30) *Enterecoccus faecalis*. izole edilmiştir. Elde ettiğimiz bu bulgu Devrise ve ark. (77)'nın bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada 135 pozitif örnekten 84 (% 62,22) *Enterococcus* spp. izole edilmiştir. Araştırıcıların elde ettikleri bulgularla sonuçlarımız karşılaştırıldığında çalışmamızda izolasyon oranının yüksek çıkmasını örneklerin farklı mastitis dönemlerinde alınmış olmasına ve sokak sütlerinin de çalışma kapsamında incelenmesine bağlamaktayız.

Ayrıca diğer hayvan türlerinde de konu ile ilgili yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Cortes ve ark. (78), İspanya'da sağlıklı 222 adet keçiye ait sütlerden izole ettikleri Enterokok türlerinden % 32,3 *E. faecium*, % 22 *E. hirae* ve % 27,6 *E. faecalis* saptamışlardır.

Enterokokların penisilinler, aminoglikozidler ve glikopeptidler gibi birçok antibiyotik grubuna karşı direnç kazanmaları onlarla yapılacak mücadeleyi ve korunma yöntemlerinin önemini bir kat daha artırmaktadır. Diğer yandan ahır ve sağım hijyenine dikkat edilmesi, meme sağlığına önem verilerek belli dönemlerde meme testleri uygulanması hem hastalıkları önleyecek hem de hayvanların süt verimi kaybını önleyecektir. Diğer yandan sokak sütlerinin satışına sınırlama getirilmesi ve bunların belirli periyotlarda da kontrollerinin yapılması halk sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Genotipik yöntem ile yapılan inceleme sonucu 84 adet *Enterococcus* spp. izolatının 57 (% 67,85)'si *Enterococcus faecalis* olarak identifiye edildi. İncelemeye alınan sütlerden izole edilen *Enterococcus faecalis* suşlarının genotipik identifikasyon oranları ise sağlıklı inek sütlerinden 12 (% 24), klinik mastitisli sütlerden 21 (% 42), subklinik mastitisli sütlerden 15 (% 30) ve sokak sütlerinden ise 9 (% 18)' dur.

Sonuç olarak diğer araştırıcıların elde ettiği sonuçlarla paralellik gösteren bulgular elde edilmiş ve inek sütlerindeki *Enterococcus* spp. varlığı saptanmıştır. Özellikle mastitis tedavilerinde kullanılan antibiyotiklerin enterokokları da içine alacak şekilde etki spektrumunun ve farmakalojik özelliklerinin geliştirilmesi vankomisin dirençli enterokokların çoğalmasını engellemek adına büyük önem taşımaktadır. Hastalıklarla mücadele için en önemli silahın koruyucu hekimlik, sürü yönetimi, ahır hijyeni, meme sağlığı ve hijyeni olduğu unutulmamalıdır.

6. KAYNAKLAR

1. Arda M.Temel Mikrobiyoloji, Medisan Yayınları, Ankara 2006; 27-34.
2. Baştan A. Meme hastalıkları. Medisan Yayınevi, Birinci Baskı, Ankara, 2003, 27-82.
3. Akan M. Enterekok Enfeksiyonları. In: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar), N Aydın, J Paracıkoğlu (Ed) , İlke Emek Yayınları, Ankara. 2006, 27-29.
4. Mannu L, Paba A, Daga E, at al. Comparison of incidence of virulence determinants and antibiotics resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. Int. J. Food. Microbiol. 2003, 88, 291- 304.
5. Petersson-Wolfe, A study of the occurance, 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.
6. Çetinkaya Y, Faik P.MayhalI G. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev 2000; 13, 686, 707.
7. French GL. Enterococci and vancomycin resistance. Clin infect Dis 1998;7, 75, 83.
8. Alaçam E. Meme Hastalıkları, 1. Baskı,. Editörler: Alaçam E., Şahal M., Medisan Yayınevi, Ankara, 1997, 389-420.
9. Kayser H, Bienz A, Eckert J, Lindenmann J, Tıbbi Mikrobiyoloji, İmmunoloji, Bakteriyoloji, Mikoloji, Viroloji, Parazitoloji, (Çev: Küçüker Anğ M., Tümbay E., Anğ Ö.), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1997; 84-87
10. Koneman EW, Ailen SD, Janda WM, Schrechenberger PC, Winn WC Jr. The Gram-positive cocci. Part II: Streptococci, Enterococci and streptococcus-likebacteria Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, Philadelphia; JB Lippincott, 1997:577-677.
11. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. Am J Med. 1997; 102, 284, 293

12. Facklam RR, Sahm DF, Murray PR, at al. Manual of clinical microbiology. Washington: ASM .1999: 297-305.
13. Teixeira LA, Facklam RR. Enterococcus. In: Murray PR, Baron EJ. Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds). Manual of Clinical Microbiology. Eighth edition, Washington. ASM Pr es. pp: 422-433, 2003.
14. Ünal S., Gram pozitif bakterilerde değişik antibiyotiklere direnç mekanizmaları. in: Akalın HE (ed). Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve antibiyotik duyarlılık testleri. Pfizer İlaçları A.Ş 1992:36-44.
15. Moellering RC Jr. Enterococcus species, Streptococcus bovis and leuconostoc species. in: Man Jell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Fourth edition, New York: Churchill Livingstone, 1995:1826-1835.
16. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Beşinci baskı, Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti,1989:717-737.
17. Simjee S, Gill MJ. Gene transfer, gentamicin resistance and enterococci. J Hosp Infect 1997;36:249-259.
18. Moellering RC Jr, Weinberg AN. Studies on antibiotic synergism against enterococci. II. Effect of various antibiotics on the uptake of ^{14}C-labeled streptomycin by enterococci. J Clin Invest 1971;50:2580-2584.
19. Costa Y, Galimand M, Leclercq R, Duval J, Courvalin P. Characterization of the chromosomal aac (6 ')-Ii gene specific for Enterococcus faecium. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:1896-1903.
20. Murray BE. Enterococci. in: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds). Infectious Diseases. Second edition, Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1998:1723-1730.
21. Murray BE. The life and times of the enterococcus.Clin Microbiol Rev 1990;3:46-65.
22. NCCLS Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Ninth Informational Supplement. NCCLS document M100-S9. NCCLS, Pennsylvania 1999.
23. Korten V. Enterokok infeksiyonları, in: İliçin G, Ünal S, Biberoğlu K, Akalın S, Süleymanlar G (eds). Temel İç Hastalıkları. Birinci baskı, Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti. 1996:2173-2175.
24. Murray BE, Mederski-Samoraj B. Transferable (3-lactamase, a new mechanism for in vitro penicillin resistance in Streptococcus faecalis. J Clin Invest 1983;72:1168-1171.
25. Murray BE, Mederski-Samoraj B, Foster SK, Brunton JL, Harford P. in vitro studies of plasmid-mediated penicillinase from Streptococcus faecalis suggest a staphylococcal origin. J Clin Invest 1986;77:289-293
26. Patterson JE, Wanger A, Zscheck KK, Zervos MJ, Murray BE. Molecular epidemiology of Mactamase-producing enterococci. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:302-305.

27. Wade JJ, Uttley AHC. Resistant enterococci-mechanisms, laboratory detection and control in hospitals. J Clin Pathol 1996;49:700-703.
28. Rice LB, Eliopoulos GM, Wennersten C, Goldmann D, Jacoby GA, Moellering RC Jr. Chromosomally mediated p-lactamase production and gentamicin resistance in Enterococcusfaecalis. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:272-276.
29. Fontana R, Aldegheri M, Ligozzi M, Lopez H, Sucari A, Satta G. Overproduction of a low-affınity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in Enterococcus faecium. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:1980-1983.
30. Nicoletti G, Stefani S. Enterococci: Susceptibility patterns and therapeutic options. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14(suppl l):33-37.
31. Gökahmetoğlu S, Sümerkan B. Eşel D, Karagöz S. Kan kültürlerinden izole edilen enterokok suşlarmın Vankomisin ve yüksek düzey aminoglikozid dirençlerinin araştırılması. ANKEM Dergisi 1999;13:57-62,
32. Gür D. Aminoglycoside grubu antibiyotiklere karşı dirençte rol oynayan mekanizmalar, in: Akalın HE (ed). Antibiyotiklere Direnç Mekanizmalan ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri. Pfizer İlaçları A.Ş. 1992:21-26.
33. Leclercq R, Dutka-Malen S, Brisson-Noel A, at al. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. Clin Infect Dis 1992;15:495-501.
34. Patterson JE, Zervos MJ. High-level gentamicin resistance in enterococcus: Microbiology, genetic basis and epidemiology. Rev Infect Dis 1990;12:644-652.
35. Mederski-Samoraj BD, Murray BE. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. J Infect Dis 1983;147:751-757.
36. Çetinkaya Y. Ünal S. Glikopeptid antibiyotikler, Vankomisin ve teikoplanin. Flora 1997; 2 (ek):3-14.
37. Uttley AHC. Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet 1988;1:57-58.
38. Vural T, Şekercioğlu AO, Öğünç D ve ark. Vankomisine dirençli Enterococcus faecium susu. ANKEM Derg 1999;13:1-4.
39. Moellering RC Jr. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Infect Dis 1998;26:1196-1199.
40. Rice LB, Bonomo RA. Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. in: Lorian V (ed). Antibiotics in Laboratory Medicine. Fourth edition, Baltimore: Williams&Wilkins. 1996:453-501.
41. Woodford N., Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. J Med Microbiol 1998;47:849-862.
42. Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. VanD-type glycopeptide-resistant Enterococcus faecium BM 4339. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2016-2018.

43. Babacan F. Çoğul dirençli enterokok enfeksiyonları: Klinik uygulamalarda olanaklarımız nelerdir? in: Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S (eds). 3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler, Kuşadası. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını 1997:378-385.
44. Schleifer K.H., Balz R. 1984. Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 34:31– 34
45. Facklam RR, Teixeria LM. Enterococcus. in: Collier L, Balows A, Sussman M (eds). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Vol 2 (Systematic Bacteriology). 9th edition, London: Edvvard Arnold, 1998:669-682.
46. Moellering RC Jr. Emergence of enterococcus as a significant pathogen. Clin Infect Dis 1992;14:1173-1178.
47. Koneman EW, Ailen SD, Janda WM, at al., Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth edition. Philadelphia: Lippincott Co, 1997:597-621,837-839.
48. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. Am J Med. 1997; 102:284-293.
49. Barza M. potentiai mechanisms of increased disease in human from antimicrobial resistance in food animals. Mechanisms of increased disease CID 2002; 34(Suppl 3):126-130
50. Kühn I, İversen A, Burman LG, at al., Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment example of an ongoing project within the European research programme. Int J Antimicrobial Agents 2000; 14: 337-342.
51. Söyletir G, Çerkçioğlu N: Streptokok infeksiyonları. Topçu AW, Söyletir G, Doganay M (eds): înfeksiyon Hastalıkları. İstanbul: Nobel Tıp Kilabevleri Ltd Şti.1996:334.
52. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. Emerg. Infect. Dis 1998; 4:239-249.
53. Şener S, Yıldırım M. Hayvanlarda antibiyotik kullanımı ve insan sağlığıyla ilgili sonuçları. ANKEM Dergisi 2002; 16:216-222
54. Leclerg R, Courvalin P (1996). Emerging problems with enterococcal infections. Cur. Opin. Infect. Dis.,9: 115- 119.
55. Acar N, Berkem R, Kurt Ö, Akan Ö. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlannda enterokok identifikasyon modelleri. Flora 1996;1:36-39.
56. Barton AL, Doern GV. Selective media for deteeting gastrointestinal carriage of vancomyein-resistant enterococci. Diagn Microbiol Infect Dis 1995;23 (abst):l 19-122.

57. Bayer AS, Seidel JS, Yoshikawa TT, at al., Group D enterococcal meningitis: Clinical and therapeutic considerations with report of three cases and review of the literatüre. Arch Intern Med 1976;136:883-886.
58. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. Yedinci baskı, İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, 1992:228-234.
59. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İkinci baskı, İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 1995:504-520.
60. Böyle JF, Soumakis S A, Rendo A, at al., Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomyein-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1993;31:1280-1285.
61. Mannu L, Paba A, Daga E, at al.,Comparison of incidence of virulence determinants and antibiotics resistance between, 2003, 15-16
62. Petersson-Wolfe, CS: A study of the occurance, 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
63. 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, OH USA 2003.
64. Bilgehan H. Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları, Barış Yayınları, Bornova 1994: 188-211.64
65. Cenci Goga B.T., Aquilanti L., Osimani A., at al., İdentification with Multiplex PCR Assay of Enterococcus Species Isolated from Dairy Products in Umbria, İtaly.Veterinary Research Communications, 27 Suppl.1 2003 671-67
66. Sambrook J and Russell DW, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001.
67. Aavorn Jl, Barrett Jf, Davey Pg, at al. Antibiotic resistance : synthesis ecommendations by expert policy groups. World Health Organisation. 2001 p :81-82
68. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Majör trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Am J Med 1991;91(suppl 3B):72-75.
69. Korten V. Hastane infeksiyonları. in: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları. Birinci baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 1996:281-288.
70. Engin A., Hastanede yatan hastaların dışkılarından elde edilen Enterekok cinsi bakterilerde Vankomisin, yüksek düzeyde Aminoglikozid ve diğer antibiyotiklere direncin araştırılması, Uzmanlık Tezi, T.C. İstanbul Ü. Cerrahpaşa Tıp. Fak. Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyöz Hast. ABD, İstanbul,2000,77

71. Basustaoğlu A. , Aydoğan H.: Enterokoklar. Infeksiyon Hastaliklari Serisi. 5:45-60, 2002.
72. Mete E. Besicilerde Vankomisine dirençli Enterekok araştırılması, Uzmanlık Tezi, T.C. Pamukkale Ü. Tıp.Fak. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, Denizli, 2003, 62
73. Altun B., Besler T., Ünal S., Ankara'da Satılan Sütlerin Değerlendirilmesi, Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi, Ankara, 2002;11;2;,51.
74. Araya M, Davidovich G, Arias ML, at al., Identification of Enterococcus sp. isolated from raw milk samples coming from the metropolitan area of Costa Rica and evaluation of its antibiotic sensibility pattern] bArch Latinoam Nutr. 2005, 55(2):161-6
75. Pitkala A., Haveri M., Pyorala S., at al., Bovine Mastitis in Finland 2001, Prevalence, Distribution of Bacteria ve Antimicrobial Resistance Helsinki, Finland. American Dairy Science Association Finland 2001, 87: 2433-2441
76. Peterson-Wolfe C.S., Adams S., Wolf S.L., at al.,. Genomic Typing of Enterococci Isolated From Bovine Mammary Glands and Envorimental Sources. Ohio U.S.A. American Dairy Science Association, 2008, 91:615-619
77. Devriese L.A., Hommez J., Laevens H., at al., Identificatıon of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. Merelbeke, Belgium. Veterinary Microbiology 70 (1999) 87-94
78. Cortes C., De la Fuente R., Contreras A., at al.,.Occurence and Preliminary Study of Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Dairy Goats in Spain. Madrid, Spain. İnternational Journal of Food Microbiology 2006, 110:100-103.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

Tarih: 13.04.2011 **Toplantı Sayısı:** 4 **Karar No:** 11/36

Etik kurul toplantısı **13.04.2011** tarihinde Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul **Prof.Dr.Zübeyde GÜNDÜZ** Başkanlığı'nda gerçekleştirilmiştir.

Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	
Zübeyde Gündüz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof.Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Davut Bayram	Öğrt.Gör.Dr.	Veteriner Fakültesi	
Coşkun Tez	Doç. Dr.	Fen Fakültesi	
M. Betül Aycan	Yrd. Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi(Farmakoloji)	Katılmadı
Ahmet Öztürk	Öğrt.Gör.Dr		
Serap Altuntaş Eroğlu	Avukat		Katılmadı
Halil Tekiner	Eczacı		Katılmadı

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Doç.Dr.K.Semih GÜMÜŞSOY tarafından yapılan " İnek Sütlerinden Enterokokların İzolasyonu ve İzolatların Moleküler Analizi "adlı araştırması incelenerek çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

AS[illegible]IR
Etik Kurul Sekreteri
Birgül Özinar

Tarih : 13.04.2011

Etik Kurul Başkanı İmzası

Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr.Zübeyde GÜNDÜZ

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Tekin KEÇECİ
Uyruğu: Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 12 Mayıs 1976, Gülşehir
Medeni Durumu: Evli
Tel: 0 384 311 24 51
GSM: 0 532 647 58 95
email: tekinkececi@hotmail.com
Yazışma Adresi: Gıda Tarım ve Hayvancılık
İlçe Müdürlüğü Acıgöl / NEVŞEHİR

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Fırat Üniversitesi Vet. Fak.	2002
Lise	Pınarbaşı Lisesi	1995

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2007- Halen	Tarım Bakanlığı Nevşehir İl Müd.	Veteriner Hekimi
2003- 2007	Tekin Keçeci Veteriner Kliniği	Veteriner Hekimi

YABANCI DİL

İngilizce