



RESEARCH ARTICLE

Mastitisli sığır sütlerinden *Enterococcus durans* ve *Enterococcus hirae*'nin izolasyon ve identifikasyonu

Elif Kaya^{1,a}, Süheyla Türkyılmaz^{2*b}

¹Aydın Adnan Menderes Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye

²Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Geliş:13.08.2017, Kabul: 17.10.2018

* sturkyilmaz@adu.edu.tr

^aORCID: 0000-0003-1900-037X, ^bORCID: 0000-0002-1363-4534

Isolation and identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* from mastitic cattle milks

Eurasian J Vet Sci, 2019, 35, 1, 37-43

DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2019.220

Öz

Amaç: Bu çalışmada, çok yüksek 16S rRNA benzerliği nedeniyle birbiriyle sıklıkla karıştırılan *Enterococcus durans* ve *Enterococcus hirae*'nin mastitisli sığır süt örneklerinden izolasyon ve identifikasyonu ayrıca izolatların antibiyotik dirençlilik profillerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışma materyalini 620 klinik veya subklinik mastitisli süt örneği oluşturdu. Enterokok izolasyonu klasik konvansiyonel yöntemler ve selektif besiyerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Cins ve tür düzeyinde identifikasyonlar polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile doğrulandı. Sekiz antimikrobiyal ajana karşı direnç disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular: Çalışmada %15.2 (94/620) oranında *Enterococcus spp.* izole edilirken; bunların %9.6'sının (9/94) *Enterococcus hirae* ve %5.3 (5/94)'ünün *Enterococcus durans* olduğu belirlendi. Toplam 14 izolataın ampicilin, penisilin, vankomisin, siprofloksasin ve kloramfenikole duyarlı oldukları belirlendi. Ancak izolatların %57.1'i (8/14) tetrasiklin, %42.9'u (6/14) eritromisin, %21.4'ü (3/14) gentamisin dirençliydi.

Öneri: *Enterococcus durans* ve *Enterococcus hirae* gibi klinik önemleri gittikçe artan enterokok türlerinin identifikasyonunda tür spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) faydalı olduğu sonucuna varıldı. *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* dışındaki enterokok türlerine de önem verilmeli ve antimikrobiyal direncin izlenmesi yalnızca bu iki ana tür ile kısıtlanmamalıdır. Bu iki enterokok türünün virulens faktörleri ve antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi üzerine yapılacak olan çalışmaların bu mikroorganizmaların patojenizlerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, mastitis, polimeraz zincir reaksiyonu

Abstract

Aim: In this study, it was aimed to isolation and identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* which are frequently mixed with each other due to very high 16S rRNA similarity from mastitis cow milk samples and also to determine antibiotic resistance profiles of isolates.

Materials and Methods: The study material was consisted of 620 clinical or subclinical mastitis milk samples. Enterococci isolation was performed using conventional microbiological methods and selective agars. Identifications based on genus and species were also confirmed by polymerase chain reaction (PCR). Resistance against to eight antimicrobial agents was investigated by the disk diffusion method.

Results: In the study 15.2% (94/620) *Enterococcus spp.* isolated; 9.6% (9/94) of them which were *Enterococcus hirae* and 5.3% (5/94) were *Enterococcus durans*. A total of 14 isolates were found to be susceptible to ampicillin, penicillin, vancomycin, ciprofloxacin and chloramphenicol. 57.1% (8/14), 42.9% (6/14) and 21.4% (3/14) were resistant to tetracycline, erythromycin and gentamycin, respectively.

Conclusion: It has been concluded that the polymerase chain reaction using species-specific primers is useful for the identification of frequently isolated enterococci from mastitic cattle milk samples. More attention should be paid to enterococci species other than *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and the monitoring of antimicrobial resistance should not be restricted to these two main species. Studies on the identification of virulence factors and antibiotic resistance genes of these two enterococci are thought to contribute to a better understanding of the pathogenesis of these microorganisms.

Keywords: *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans*, mastitis, polymerase chain reaction



Giriş

Enterokoklar, sadece hastane enfeksiyonlarının önde gelen sebeplerinden değil aynı zamanda antimikrobiyal direncin yaygınlaştırılmasında ve sürdürülmesinde ciddi role sahip olmaları açısından da önemli bakterilerdir (Baele ve ark 2000). Son on yılda, enterokokların neden olduğu nozokomiyal enfeksiyonların sayısında güçlü bir artış olmuştur. Klinik vakaların çoğundan *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) ve *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) sorumlu olmakla birlikte; *Enterococcus durans* (*E. durans*) ve *Enterococcus hirae* (*E. hirae*) enfeksiyonları için artan bir insidans rapor edilmiştir (Nam ve ark 2010, Erbaş ve ark 2016, Wu ve ark 2016).

Enterokok türlerinin doğal yaşam alanları insan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarıdır. Bununla birlikte, diğer doğal yaşam alanları dışında pek çok yerde örneğin hayvansal gıdalarda ve sularda bulunabilirler (Franz ve ark 1999). *E. durans*, preruminant buzağular ve genç tavuklar hariç, evcil hayvanların bağırsak florasında çok nadir görülürken; *E. hirae* çeşitli evcil hayvan türlerinde bağırsak florasında sıklıkla görülür (Devriese ve ark 1987). *E. hirae* civcivlerde septisemi ve beyinde fokal nekroza, papağanlarda da septisemiye neden olabilir. *E. hirae* veya *E. durans*'ın yavru fareler, taylor ve sıpalar, kedi/köpek yavruları, danalar, tavuklar ve süten kesilmemiş yavru domuzlardaki bağırsak hastalıkları ile ilişkili oldukları bildirilmiştir (Devriese ve ark 2002).

Enterokok türleri arasında yüksek fenotipik ve biyokimyasal benzerlikler ile anormal fenotipleri olan suşların varlığı bu bakteri türünün biyokimyasal yöntemler kullanılarak identifikasyonunu zorlaştırmaktadır. D-alanine: D-alanine ligase (*ddl*) genlerinin (Evers ve ark 1994) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması, rRNA sekansına dayalı test (Devriese ve ark 2002), *groES* geninin (Tsai ve ark 2005) doğrudan dizilmesi, ticari olarak temin edilebilen API 20 S şeritleri (BioMerieux) gibi pek çok sistem enterokok türlerinin tanımlanması için kullanılmıştır (Daly ve ark 1991), ancak bu sistemler ağırlıklı olarak klinik izolatların %90'ından fazlasını oluşturan *E. faecalis* ve *E. faecium*'un tanımlanmasına odaklanmıştır. Birçok laboratuvar enterokokları tür düzeyinde rutin olarak tanımlayamadığı için *E. durans* ve *E. hirae*

gibi diğer türler sıklıkla gözden kaçmaktadır.

Enterokoklar uzama faktörünü (elongation factor, EF-Tu) kodlayan *tuf* genini hedefleyen primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR ile cins düzeyinde başarılı bir şekilde tespit edilmektedir (Ke ve ark 1999). Uzama Faktörü EF-Tu'yu kodlayan *tuf* geni, peptid zinciri oluşumunda yer alır ve bakteriyel genomun vazgeçilmez bir unsurudur (Grunberg-Manago 1996). Bu özellikler onu tanısal amaçlı bir seçim hedefi haline getirmiştir. *tuf* geninin hedef sekans olarak görev yaptığı PZR tabanlı testler ilk olarak *Mycoplasma fermentans* (Berg ve ark 1999) ve *Mycoplasma pneumoniae* (Luneber ve ark 1993) için geliştirilmiş olmakla birlikte; bu genin enterokokları da cins düzeyinde mükemmel hassasiyet ve kabul edilebilir özgünlükte tespit edebildiği bildirilmektedir (Ke ve ark 1999). Bununla birlikte, süperoksit dismutaz (*sodA*) geni de *E. durans* ve *E. hirae* gibi farklı enterokok türlerini belirleyebilmek için potansiyel bir hedef olarak tanımlanmıştır (Jackson ve ark 2004). Bu identifikasyon, Gram pozitif koklarda manganaze bağlı süperoksit dismutazı kodlayan *sodA* geninin iç kısmını kullanarak gerçekleştirilmektedir (Poyart ve ark 2000).

Enterokok türlerinin biyokimyasal yöntemler kullanılarak yapılan identifikasyonları oldukça zor ve zaman alıcıdır. Bununla birlikte, *E. hirae* ve *E. durans*'ı %98'den fazla 16S rRNA benzerliği nedeni ile birbirinden fenotipik özelliklerine göre ayırtmak daha da güçtür. *E. hirae*, melibiyoz ve sukrozdan asit üretirken, *E. durans* her iki test için negatif olarak kabul edilmektedir (Devriese ve ark 2002). Tüm bu nedenlerden dolayı, bu iki bakterinin identifikasyonu rutin teşhis laboratuvarlarında genellikle yapılmamaktadır. Bu çalışmada, çok yüksek 16S rRNA benzerliği nedeniyle birbiriyle sıklıkla karıştırılan *E. durans* ve *E. hirae*'nin mastitisli sığır süt örneklerinden izolasyon ve identifikasyonu ayrıca izolatların antibiyotik dirençlilik profillerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na son iki yıl içerisinde getirilen ve çeşitli çalışmalar için toplanmış olan 59 klinik ve

Tablo 1. Kullanılan primerler dizileri, amplikon uzunlukları, hedef genleri

Primer	Sekans (5'-3')	Amplikon uzunluğu (bp)	Hedef Gen	Kaynak
Ent1	TACTGACAAACCATTCATGATG	112	<i>tuf</i>	Ke ve ark 1999
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
DU1	CCTACTGATATTAAGACAGC	295	<i>sodA</i>	
DU2	TAATCCTAAGATAGGTGTTTG			Jackson ve ark 2004
HI1	CTTTCTGATATGGATGCTGTC	187	<i>sodA</i>	
HI2	TAAATCTTCTTAAATGTTG			



Tablo 2. Kullanılan antibiyotikler, disk içerikleri, yorumları ve izolatların antibiyotik duyarlılık ve direnç durumları

Antimikrobiyal ilaç	Disk içeriği	Yorum		SONUÇ		
		S ≥	R ≤	S N (%)	I N (%)	R N (%)
Penisilin						
1 Ampisilin	10 µg	17	16	14 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2 Penisilin	10 IU	15	14	14 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Glikopeptid						
3 Vankomisin	30 µg	17	14	14 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Makrolit						
4 Eritromisin	15 µg	23	13	7 (50.0)	1 (7.2)	6 (42.9)
Tetrasiklin						
5 Tetrasiklin	30 µg	19	14	5 (35.7)	1(7.2)	8 (57.1)
Kinolon						
6 Siprofloksasin	5 µg	21	15	14(100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Fenikol						
7 Kloramfenikol	30 µg	18	12	14 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Aminoglikozid						
8 Gentamisin	120 µg	6	10	10 (71.4)	1(7.2)	3 (21.4)

263 subklinik mastitisli olmak üzere toplam 322 inekten alınan 620 süt örneği kullanıldı. Çalışmada süt örnekleri veteriner hekimler tarafından alındı. Alınan süt örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara getirip ekimleri hemen yapıldı. Klinik mastitis teşhisi meme loblarının fiziksel muayenesi ile (meme loblarında şişkinlik, sıcaklık, ağrı, kızarıklık ya da sulu, kanlı, pıhtılı süt vs.) yapılırken, subklinik mastitis teşhisinde Kalifornia Mastitis Testi (CMT) kullanıldı. CMT ile pozitif reaksiyon (1+, 2+, 3+) veren ineklerin sütleri çalışmaya dahil edildi. Çalışmadaki ineklerin hepsi laktasyon döneminde olup, son bir ayda antibiyotik tedavisi almamış Holştayn ırkı ineklerdi.

Referans suşlar

Çalışmada enterokokların cins düzeyinde belirlenmesinde pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu, negatif kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. İzolatlarının tür düzeyinde belirlenmesinde pozitif kontrol olarak *E. durans* ve *E. hirae* sekanslanmış saha izolatları kullanıldı.

Besiyerleri

Süt örneklerinden selektif olarak *Enterococcus spp.*'nin izolasyonu amacıyla Chromocult® Enterococci Broth (EB) (Merck), BBLTM Enterococcosel Agar (EA) (BD), suşların pasajlanmasında Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (Merck), organizmaların tuz toleranslarını tespit etmek için %6.5 NaCl

içeren Nutrient Broth (NB) (Oxoid), antibiyotik duyarlılık testinde Nutrient Broth (NB) ve Mueller Hinton Agar (MHA), suşların saklanması için %20 gliserinli Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Merck) kullanıldı.

Primerler

Çalışmada kullanılan tüm primerlerin, dizileri, ampikon büyüklükleri, hedef genleri, kaynakları Tablo 1.'de verilmiştir.

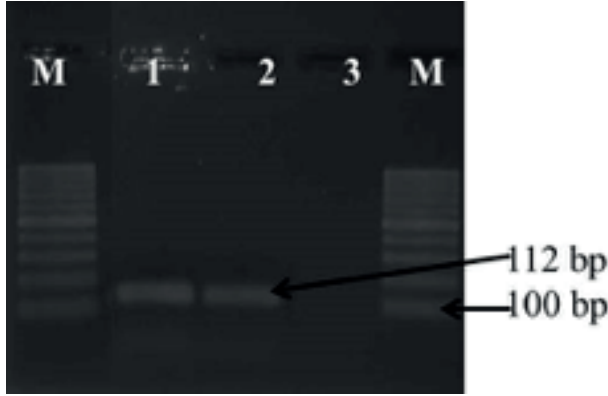
Antibiyotik diskleri

Çalışmada izolatların antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesinde ampisilin (Oxoid, 10 µg), penisilin (Oxoid,10 IU), vankomisin (Oxoid,30 µg), eritromisin (Oxoid,15 µg), tetrasiklin (Oxoid,30 µg), siprofloksasin (Oxoid,5 µg), kloramfenikol (Oxoid,30 µg), gentamisin (Oxoid,120 µg) disklerinden faydalandı. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, disk içerikleri, yorumları Tablo 2'de gösterilmiştir.

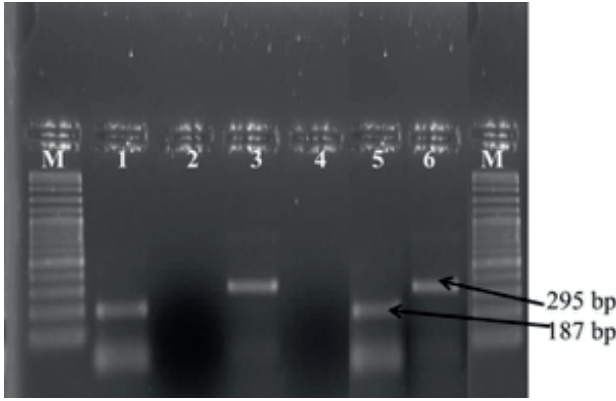
Enterokok izolasyonu

Mastitisli sığırlardan alınan süt örnekleri laboratuvara getirildikten sonra, ilk olarak EB öze dolusu inokule edildiler. Buyyonlar aerobik koşullarda 37°C'de, besiyerinin parlak sarı rengi mavi-yeşil renge dönüşüncüye kadar, yaklaşık 24-72 saat bekletildi. Mavi-yeşil renk olan buyyonlardan bir öze dolusu alınarak selektif EA besiyerine ekimleri yapıldı. Besiyeri 37°C'de aerobik koşullarda 24-48 saat inkube edildi. Sü-





Şekil 1. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü 1: *Enterococcus spp.* saha izolatu 2: Pozitif kontrol (112 bp, *E. faecalis* ATCC 29212) 3: Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)



Şekil 2. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü 1: *E. hirae* saha izolatu (187 bp) *Enterococcus spp.* saha izolatu 2: Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) 3: *E. durans* saha izolatu (295 bp) 4: Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) 5: Pozitif kontrol *E. hirae* sekanslanmış saha izolatu (187 bp) 6: Pozitif kontrol *E. durans* sekanslanmış saha izolatu (295 bp) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

renin sonunda üreyen siyah, koyu kahverengi koloniler *Enterococcus spp.* yönünden şüpheli kabul edilerek, incelenmek üzere tekrar EA'a pasajlandı (Herkmen ve Türkyılmaz 2016).

İdentifikasyon

Enterokokların cins düzeyinde ayrımı için ekilen selektif besiyerinde siyah, koyu kahverengi üreyen enterokok şüpheli kolonilere Gram boyama, %6.5 tuz içeren NB'da üreme ve katalaz testleri yapıldı (Quinn ve ark 2004). Gram pozitif kok şeklinde görülen, %6.5 tuz içeren NB'da üreyebilen ve katalaz negatif olan kolonilerin identifikasyonları için EA pasajları yapıldı ve 37°C'de 24-48 saat inkube edildi. Süre sonunda şüpheli koloniler moleküler yöntemler kullanılarak identifiye edilinceye kadar -20°C'de %20 gliserinli BHIB içerisinde saklandı. Elde edilen enterokok şüpheli izolatları cins düzeyinde ve bunlar içerisindeki *E. durans* ve *E. hirae* izolatlarını da tür düzeyinde identifiye edebilmek için spesifik primer çiftleri kullanılarak PZR yapıldı.

DNA izolasyonu

Enterokok izolatlarından genomik DNA izolasyonu ticari bir

kiti (InstaGene Matrix, Almanya) kullanılarak üretici firmasının önerdiği şekilde gerçekleştirildi. İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometre ile yapıldı. Spektrofotometrede DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorbansları (OD260 ve OD280) hesaplandı ve OD260/OD280 oranı 1.8-2.0 arasında olan DNA'ların saf olarak değerlendirilip PZR'da kullanıldı (Sambrook ve ark 1989).

PZR

Fenotipik olarak enterokok olarak değerlendirilen izolatların identifikasyonları PZR ile yapıldı. PZR koşullarının optimizasyonundan sonra enterokok cinsine özgü *tuf*, *E. durans* ve *E. hirae*'ye özgü *sodA* gen sekansını oluşturan primer çiftleri kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri, ampikon uzunlukları, hedef genleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tüm PZR reaksiyonlarında bir örnek için PZR amplifikasyonu 30 µl toplam hacminde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, magnesium klorür (MgCl₂) 2 mM, dNTP 0.2 mM, primer (her biri için) 0.4 pmol, Taq DNA polymerase 1.5 U ve 2 µl hedef DNA olacak şekilde gerçekleştirildi. DNA amplifikasyonu termal döngü cihazında (Boeco, Germany); 94°C'de 3 dak. başlangıç denatürasyonu takiben; 30 siklus 94°C'de 15 sn. denatürasyon, 55°C (*tuf*) ve 57°C (*sodA*) 15 sn. bağlanma, 72°C 30 sn. uzama ve 72 °C'de 7 dak. son uzama ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrasında elde edilen ampikonlar Safe View (ABM, Kanada) ilave edilmiş %2'lik agaroz jel elektroforezde yürütüldü. Bu genlere özgü DNA bantları UV transiluminatör yardımıyla görüntülenerek değerlendirildi.

Antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi

Genotipik olarak *E. durans* ve *E. hirae* olduğu doğrulanan izolatları Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI 2014)'nün önerdiği şekilde Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılık testi yapıldı. Bunun için izolatlar NB'da canlandırıldıktan sonra brohtaki bakteri kültürü %0.9'luk NaCl içinde 0.5 McFarland (1×10⁸ kob/ml) bulanıklığına eşit olacak şekilde ayarlandı. 1×10⁸ kob/ml konsantrasyondaki bakteriden 0,1 ml alınarak sıvayla besiyerine yayıldı. Besiyeri kurduktan sonra antibiyotik diskleri agar yüzeyi ile temas edecek şekilde ve aralarındaki mesafe 24 mm'den yakın olmayacak biçimde petrilere yerleştirildi. Daha sonra 35±2°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir izolat için disk etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülerek CLSI'nin belirlediği değerlendirme kriterleri esas alınarak sonuçlar yorumlandı.



Bulgular

Bu çalışmada 620 mastitisli süt örneğinin incelenmesi sonucunda EA'da referans suşla (*E. faecalis* ATCC 29212) benzer görünümü olan bakteri kolonileri seçildi. Klasik biyokimyasal testler uygulandıktan sonra toplamda %15.2 (94/620) enterokok şüpheli izolat elde edildi.

Enterokok cinsine özgü *tuf* gen sekansını oluşturan primer çifti ve 94 enterokok şüpheli izolatın DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen amplifikasyon işlemi sonrasında 112 bp uzunluğunda ampikon elde edilerek, klasik yöntemler ile izolasyonu yapılmış olan bakterilerin hepsinin, genotipik olarak da enterokok türü olduğu doğrulandı. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 1'de gösterilmiştir.

E. durans ve *E. hirae*'ye özgü *sodA* gen sekansını oluşturan primer çifti ve 94 enterokok izolatının DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen amplifikasyon işlemi sonrasında izolatların %9.6 (9/94)'sı *E. hirae* ve %5.3 (5/94)'ü *E. durans* olarak tanımlandılar. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 2'de gösterilmiştir.

Çalışmada moleküler olarak *E. durans* ve *E. hirae* olduğu tespit edilen toplam 14 izolatın 8 antibiyotiğe karşı dirençliliklerinin agar disk difüzyon yöntemi ile incelenmesi sonucunda izolatların hepsinin ampisilin, penisilin, vankomisin, siprofloksasin ve kloramfenikol duyarlı oldukları belirlenirken; izolatların %57.1 (8/14)'i tetrasiklin, %42.9 (6/14)'ü eritromisin, %21.4 (3/14)'ü gentamisin dirençliydi. İzolatların antibiyotik duyarlılık ve direnç durumları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tartışma

E. durans suşları insan kanında sıklıkla β -hemolitik etkinlik gösterdiği için (Devriese ve Pot 1995) bu türe bağlı septisemik enfeksiyonlardan önemli bir tehdit olarak algılanmaktadır. Bu nedenle, enfeksiyona neden olan enterokok suşlarının doğru bir şekilde tespit edilmesi önemlidir. Ne yazık ki, fenotipik özelliklere dayalı otomatik sistemler, nadiren karşılaşılan enterokok türlerinin tanımlanmasında genellikle iyi sonuç vermezler. Daha önce yapılan çalışmalarda *E. durans*'a ait suşların konvansiyonel testlerle tanımlanmasında hatalar bildirilmiştir (Singer ve ark 1996, Tsakris ve ark 1998). RAPD-PCR, SARA-PCR (Knijff ve ark 2001) ya da SDS-PAGE gibi moleküler yöntemlerin daha güvenilir olduğu fakat aynı zamanda zahmetli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bu testler, incelenecek çok sayıda suşu içeren sayısal analizle kümelenebilir. Amplifikasyon, klonlama ve gen sekanslama (Ozawa ve ark 2000) ve tRNA intergenik spacer PCR (Baele ve ark 2000) gibi daha yeni ancak pahalı ve zaman alıcı teknikler de bildirilmiştir. Öte yandan, cins ve türlere özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR, enterokok izolatlarının hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasını

sağlayan değerli bir yöntemdir. Bu çalışmada, artan klinik önemi olan *E. durans* ve *E. hirae*'nin mastitisli sığır sütlerindeki görülme sıklığını belirleyebilmek için tür spesifik primerler ile identifikasyon yapılmıştır. Tür spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR'in özellikle fenotipik testlerle ayırt edilmesi zor türlerin tanımlanması için gerekli karmaşık moleküler kümeleme teknikleri ve klasik mikrobiyolojik testlerin yerini almaya başlayacağı düşünülmektedir.

Yurdumuzda ve dünyada mastitislere neden olan bakterileri belirleyebilmek amacı ile yapılmış çalışmalarda çalışmanın yapıldığı bölgeye göre farklı izolasyon oranları bildirilmiştir. Diyarbakır'da %3.73 *E. faecalis* izasyonu bildirilirken (Yeşilmen ve ark 2012); Kırıkkale'de enterokok izolasyon oranı %4.22 olarak rapor edilmiş ve bunların %33.3'ünün *E. faecium*, %33.3'ünün *E. hirae*, %22.2'sinin *E. faecalis*, %11.1'inin *E. solitarius* olduğu tespit edilmiştir (Macun ve ark 2011). Afyon'da enterokok izolasyon oranının %10.9 olduğu, bunların %53.4'ünün *E. faecalis* ve %18.6'sının da *E. faecium* olduğunu saptanmıştır (Kuyucuoğlu 2011). Aydın'da enterokok izolasyon oranı %15.6 olduğu, bunlardan %11.7'sinin *E. hirae* ve %7.5'inin *E. durans* olduğu rapor edilmiştir (Erbaş ve ark 2016). Kore'de toplam 105 enterokok izolasyonu yapılmış ve bunların %44.8'i *E. faecalis*, %37.1 *E. faecium*, %5.7 *E. gallinarum*, %5.7 *E. avium*, %4.8, *E. hirae* ve %1.9'unun *E. durans* olduğu bildirilmiştir (Nam ve ark 2010). Uganda'da yapılan bir çalışmada ise sığır sütlerinden izole edilen 16 enterokokun %25'i *E. hirae* ve %6.25'i *E. durans* olarak tanımlandılar (Kateete ve ark 2013). Çin'de 2016 yılında yapılan bir çalışmada, mastitis tanısı konulan süt sığırlarından toplanan 280 süt örneğinde enterokokların yaygınlığı incelenmiş, 60 enterokok izole ve tanımlandılar; bu 60 izolatın %68.3'ü *E. hirae*, %25.0'i *E. faecium*, %3.3'ü *E. mundtii* ve *E. durans* olarak bildirilmiştir (Wu ve ark 2016). Tüm bu çalışmalardan enterokokların mastitis etiolojisinde rol oynadıkları ve nadir görülen *E. durans* ve *E. hirae*'nin klinik önemlerinin veteriner sahada da artmaya başladığı söylenebilir.

Mastitislerin tedavisindeki başarı uygulanan antibiyotiğe, antibiyotiğin uygulanma şekline ve süresine bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada *E. durans* ve *E. hirae* izolatlarımız %57.1 tetrasiklin, %42.9 eritromisin, %21.4 gentamisin direnci gösterdi. Kore de yapılan bir çalışmada ise *E. hirae* ve *E. durans* izolatlarının %82.9'unun penisiline dirençli olduğu bildirilirken; %14.9'unun ampisilin ve vankomisine, %6.4'ünün tetrasikline, %25.5'inin siprofloksasine dirençli olduğu tespit edilmiştir (Wu ve ark 2016). Yapılan çalışmalarda mastitislerde izole edilen etkenlerin tedavisinde kullanılacak antibiyotiklerin direnç durumunda farklılıklar gözlenmektedir. Bu farklılıkların bölgesel suş dağılımından ve daha önce yapılan bilinçsiz ve yanlış tedavilerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızdaki, enterokok izolatlarının hepsinin ampisiline duyarlı olduğu bulgusu, sığır mastitisi ile ilgili yapılan daha





önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Tenhagen ve ark 2006, Nam ve ark 2010). Genellikle ampisilinin enterokok enfeksiyonlarını tedavi etmek için tercih edilen ilaçlardan birisidir (Guiney ve Urwin 1993).

Bu çalışmada en düşük oranda gentamisin direnci belirlendi. İzolatların %21.4'ü gentamisine yüksek seviyeli (120 µg) dirençli idi. Bu çalışmadaki gentamisin direnci Çin'de (%55) (Wu ve ark 2016) bildirildiği kadar yüksek olmasa da gentamisin dirençli enterokok izolatlarının izlenmesi gerekmektedir. Gentamisin dirençli izolatlar daha önce tanımlanmış ve muhtemelen klinik veya komensal bakterilerden süttten izole edilen enterokoklara gen transferi ihtimali olabileceği bildirilmiştir (Lopes ve ark 2005).

Kore'de yapılan bir çalışmada (Nam ve ark 2010) *E. hirae* ve *E. gallinarum* izolatlarında *E. faecium* ve *E. faecalis* kadar yüksek direnç görülmüştür. Kore'deki bu çalışmada, izolatlar vankomisine orta derecede dirençli olan iki *E. hirae* suşundan sadece birinin ampisiline direnç gösteren izolat olduğu dikkat çekicidir. Bu türe ait izolatların ayrıca penisilin, tetrasiklin ve eritromisin'e karşı da dirençleri yüksektir. *E. hirae*'nin hayvanlarda enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir ve bu mikroorganizma insanlardan alınan klinik izolatlarda nadiren görülür (Park ve ark 2000) özellikle sığırlarda nispeten daha yaygın oldukları için bu türe daha fazla dikkat edilmelidir (Anderson ve ark 2008). Bu çalışmada elde edilen toplam 14 izolatın ampisilin, penisilin, vankomisin, siprofloksasin, ve kloramfenikole duyarlı oldukları belirlenmekle birlikte; izolatlarda %57.1'i tetrasiklin, %42.9'u eritromisin, %21.4'ü gentamisin dirençli tespit edilmesi bu antibiyotiklere karşı direncin artık oluşmaya başladığının bir işareti olarak değerlendirildi.

Öneriler

Sonuç olarak, laboratuvarlarda genellikle identifikasyonları göz ardı edilen *E. hirae* ve *E. durans* gibi enterokok türlerinin klinik olarak önemlerinin artmaya başladığını, şimdilik *E. faecium* ve *E. faecalis* kadar yüksek antimikrobiyal dirençli olmasalar da zamanla tehlikeli olabileceklerini söyleyebiliriz. Dahası, tavuklara in vitro vankomisin direnci transferinin *E. durans*'tan *E. faecium*'a (Cercenado ve ark 1995), *E. hirae*'den *E. faecalis*'e ve *E. faecium*'a (Robredo ve ark 1999) mümkün olduğunun gösterildiği yayınların ortaya çıkması bu iki bakterinin de önemini artırmıştır. Özellikle insan hekimliğinde önemli kabul edilen antibiyotiklere karşı direnç geni taşıyan bu türler, potansiyel halk sağlığı tehdididir. *E. faecium* ve *E. faecalis* dışındaki enterokok türlerine de daha fazla dikkat edilmeli ve antimikrobiyal direncin izlenmesi yalnızca bu iki ana türe kısıtlanmamalıdır. Bu iki enterokok türünün virulens faktörleri ve antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi üzerine yapılacak olan çalışmaların bu mikroorganizmaların patogenezlerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma ilk isim yazarın Yüksek Lisans Tez'inden özetlenmiş olup; proje Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No: VTF-15072) desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Anderson JF, Parrish TD, Akhtar M, Zurek L, Hirt H, 2008. Antibiotic resistance of enterococci in American bison (*Bison bison*) from a nature preserve compared to that of enterococci in pastured cattle. *Appl Environ Microbiol*, 74, 1726-1730.
- Baele M, Baele P, Vaneechoutte M, Storms V, Butaye P, Devriese LA, Verschraegen G, Gillis M, Haesebrouck F, 2000. Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol*, 38,4201-4207.
- Berg S, Luneberg E, Frosch M, 1996. Development of an amplification and hybridization assay for the specific and sensitive detection of *Mycoplasma fermentans* DNA. *Mol Cell Probes*, 10,7-14.
- Cercenado E, Unal S, Eliopoulos CT, Rubin LG, Isenberg HD, Moellering RC, Eliopoulos GM, 1995. Characterization of vancomycin resistance in *Enterococcus durans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 36, 821-825.
- CLSI, 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first edition: informational supplement. CLSI document, M100-S21. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Devriese LA, Van de Kerckhove A, Kilpper BR, Schleifer KH, 1987. Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *Int J Sys Bacteriol*, 37, 257-259.
- Devriese LA, Pot B, 1995. The genus *Enterococcus*. In: Wood BJB, Holzapfel WH, The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman & Hall, London, pp: 326-367.
- Devriese LA, M. Vancanneyt P, Descheemaeker M, Baele HW, Van Landuyt B, Gordts P, Butaye J, Haesebrouck F, 2002. Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *J Appl Microbiol*, 92, 821-827.
- Daly JA, Clifton NL, Seskin KC, Gooch WM, 1991. Use of rapid, nonradioactive DNA probes in culture confirmation tests to detect *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, and *Enterococcus spp.* from pediatric patients with significant infections. *J Clin Microbiol*, 29, 80-82.
- Erbaş G, Parın U, Türkyılmaz S, Uçan N, Öztürk M, Kaya O, 2016. Distribution of antibiotic resistance genes in *Enterococcus spp.* isolated from mastitis bovine milk. *Acta Vet Beograd*, 66, 336-346.
- Evers S, Reynolds PE, Courvalin P, 1994. Sequence of the vanB and *ddl* genes encoding D-alanine: D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene*, 140, 97-102.
- Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME, 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol*, 47,



- 1-24.
- Grunberg-Manago M. 1996. Regulation of the expression of aminoacyl tRNA synthetases and translation factors, p. 1432-1457. In Neidhardt FC, Curtiss, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikof WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE, *Escherichia coli* and Salmonella: cellular and molecular biology, 2nd ed., vol. 2. ASM Press, Washington, D.C.
- Guiney M, Urwin G, 1993. Frequency and antimicrobial susceptibility of clinical isolates of enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 12, 362-366.
- Herkmen TB, Türkyılmaz S, 2016. Mastitisli sığırlardan izole edilen *Enterococcus faecium* izolatlarında *gelE*, *esp* ve *Efa_{afm}* genlerinin varlığının incelenmesi. *Kocatepe Vet J*, 9, 54-60.
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB, 2004. Use of a genus and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. *J Clin Microbiol*, 42, 8, 3558-3565.
- Kateete DP, Kabugo U, Baluku H, Nyakarahuka L, Kyobe S, Okee M, Najjuka CF, Joloba ML, 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. *PLoS ONE*, 8, e63413.
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG, 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol*, 37, 3497-3503.
- Knijff, E, Dellaglio F, Lombardi A, Biesterveld S, Torriani S, 2001. Development of the specific and random amplification (SARA)-PCR for both species identification of enterococci and detection of the *vanA* gene. *J Microbiol Methods* 43, 233-239.
- Kuyucuoğlu Y, 2011. Antibiotic resistances of enterococci isolated from bovine subclinical mastitis. *Eurasian Vet Sci*, 27, 4, 231- 234.
- Lopes MFS, Ribeiro T, Abrantes M, Figueiredo MJJ, Tenreiro R, CrespoMT, 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int J Food Microbiol*, 103, 191-198.
- Luneberg E, Jensen JS, Frosch M, 1993. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction and non-radioactive hybridization in microtiter plates. *J Clin Microbiol*, 31, 1088-1094.
- Macun HC, Yağcı İP, Ünal N, Kalender H, Sakarya F, Yıldırım M, 2011. Kırıkkale'de belirlenen subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve antibiyotik direnç durumu. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 8, 83-89.
- Nam HM, Lim SK, Moon JS, Kang HM, Kim JM, Jang KC, Kim JM, Kang MI, Joo YS, Jung SC, 2010. Antimicrobial resistance of enterococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. *Zoonoses and Public Health*. 57, 59-64
- Ozawa Y, Courvalin P, Galimand M, 2000. Identification of enterococci at the species level by sequencing of the genes for D-alanine: D-alanine ligases. *Syst Appl Microbiol*, 23, 230-237.
- Poyart C, Quesnes G, Trieu-Cuot P, 2000. Sequencing the gene encoding manganese dependant superoxyde dismutase for rapid species identification of enterococci. *J Clin Microbiol*, 38, 415-418.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR, 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby-Year Book Europe Limited, Lynton House, London, England pp: 40-190.
- Robredo B, Singh KV, Baquero F, Murray BE, Torres C 1999. From *vanA* *Enterococcus hirae* to *Enterococcus faecium*: a study of feed supplementation with avorparcin and tylosin in young chickens. *Antimicrob. Agents Chemother*, 43, 1137-1143.
- Sambrook J, Fritsch EF, Shuman HA, 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp: 3520.
- Singer DA, Jochimsen EM, Gielerak P, Jarvis WR, 1996. Pseudo-outbreak of *Enterococcus durans* infections and colonization associated with introduction of an automated identification system software update. *J Clin Microbiol*, 34, 2685-2687.
- Tenhagen BA, Koster G, Wallmann J, Heuwieser W, 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci*, 89, 2542-2551.
- Tsakris A, Woodford N, Pournaras S, Kaufmann, M, Douboyas J, 1998. Apparent increased prevalence of high level aminoglycoside-resistant *Enterococcus durans* resulting from false identification by a semiautomated software system. *J Clin Microbiol*, 36, 1419-1421.
- Tsai JC, Hsueh PR, Lin HM, Chang HJ, Ho SW, Teng LJ, 2005. Identification of clinically relevant enterococcus species by direct sequencing of *groES* and spacer region. *J Clin Microbiol*, 43:235-241.
- Wu X, Hou S, Zhang Q, Ma Y, Zhang Y, Kan W, Zhao X, 2016. Prevalence of virulence and resistance to antibiotics in pathogenic enterococci isolated from mastitic cows. *J Vet Med Sci*, 78(11): 1663-1668.
- Yeşilmen S, Özyurtlu N, Bademkiran S, 2012. Diyarbakır yöresinde subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg* 1, 24-29.

