

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**SİĞİR MASTİTİSLERİYLE İLİŞKİLİ *AEROCOCCUS*  
*VIRIDANS* TÜRÜNÜN MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE  
ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

Mehmet Ali OKLAY  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17049 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2018

## KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Mehmet Ali OKLAY tarafından hazırlanan “**Sığır Mastitisleriyle İlişkili *Aerococcus viridans* Türünün Moleküler İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi**” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/09/2018

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Şükrü KIRKAN ADÜ .....

Üye : Prof. Dr. K. Serdar DİKER ADÜ .....

Üye : Prof. Dr. Mehmet AKAN AÜ .....

### ONAY:

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

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde büyük emekleri olan değerli danışman hocam Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, tüm Mikrobiyoloji ABD öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında birlikte çalışıp birlikte öğrendiğimiz tüm yüksek lisans ve doktora öğrencilerine çok teşekkür ederim.

Zor günlerimde destek olan ve her zaman varlıklarıyla kendimi güçlü hissetmemi sağlayan aileme çok teşekkür ederim.



# İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| KABUL VE ONAY  | i    |
| TEŞEKKÜR   | ii   |
| İÇİNDEKİLER  | iii  |
| RESİMLER DİZİNİ  | v    |
| TABLolar DİZİNİ  | vi   |
| ÖZET   | vii  |
| ABSTRACT   | viii |
| 1. GİRİŞ   | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER  | 3    |
| 2.1. <i>Aerococcus</i> Türleri   | 3    |
| 2.2. <i>Aerococcus</i> Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri                     | 4    |
| 2.3. <i>Aerococcus</i> Türlerinin Virulans Mekanizması                         | 6    |
| 2.4. <i>Aerococcus</i> Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonları              | 7    |
| 2.5. Klinik ve Subklinik Mastitis Vakalarında <i>Aerococcus</i> Türleri        | 9    |
| 2.6. <i>Aerococcus</i> Türlerinde Antibiyotik Direnci                          | 11   |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM   | 14   |
| 3.1. Gereç   | 14   |
| 3.1.1. Besiyerleri ve Ayıraçlar  | 14   |
| 3.1.1.1. Besiyerleri   | 14   |
| 3.1.1.1.1. Blood Agar (Merck 1. 10886)   | 14   |
| 3.1.1.1.2. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129)                            | 15   |
| 3.1.1.1.3. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (% 20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225) | 15   |
| 3.1.1.1.4. Trypton Soya Broth (TSB) (Oxoid CM 129)                             | 15   |
| 3.1.2. Kaliforniya Mastitis Test Ayraç (Immucell®)                             | 15   |
| 3.1.3. Primerler   | 16   |
| 3.2. Yöntem  | 16   |
| 3.2.1. Örneklerin Alınması   | 16   |
| 3.2.2. <i>Aerococcus</i> sp. İzolasyonu  | 17   |
| 3.2.3. <i>Aerococcus</i> sp. Mikroskopisi                                      | 17   |
| 3.2.4. <i>Aerococcus</i> sp. Konvansiyonel İdentifikasyonu                     | 17   |
| 3.2.4.1. Katalaz Testi   | 17   |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.5. <i>Aerococcus</i> sp. VITEK MS (MALDI-TOF MS) ile İdentifikasyon                        | 18 |
| 3.2.6. <i>Aerococcus</i> İzolatlarının Genotipik İdentifikasyonu                               | 19 |
| 3.2.6.1. DNA Ekstraksiyonu   | 19 |
| 3.2.6.2. PCR   | 19 |
| 3.2.6.2.1. <i>Aerococcus</i> sp 16S rRNA PCR Aşaması   | 19 |
| 3.2.6.2.2. <i>Aerococcus viridans</i> tür spesifik PCR Aşaması                                 | 20 |
| 3.2.6.3. PCR Ürün Jel Elektroforezi  | 21 |
| 3.3. Antibiyogram  | 22 |
| 4. BULGULAR  | 23 |
| 4.1. Konvansiyonel Yöntemler ile <i>Aerococcus</i> sp. İzolasyon Bulguları                     | 23 |
| 4.2. VITEK MS (MALDI-TOF MS) ile <i>Aerococcus viridans</i> İdentifikasyon Bulguları           | 23 |
| 4.3. <i>Aerococcus</i> sp. 16S rRNA ve Tür Spesifik PCR ile Genotipik İdentifikasyon Bulguları | 24 |
| 4.4. Antibiyogram Bulguları  | 27 |
| 5. TARTIŞMA  | 30 |
| 6. SONUÇ ve ÖNERİLER   | 34 |
| KAYNAKLAR  | 35 |
| ÖZGEÇMİŞ   | 41 |

## RESİMLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Resim 1.</b> VITEK MS Slaytı.....  | 18 |
| <b>Resim 2.</b> 16S rRNA spesifik primerler ile yapılan PCR elektroforez görüntüsü..... | 25 |
| <b>Resim 3.</b> Tür spesifik primerler ile yapılan PCR elektroforez görüntüsü.....      | 25 |



## TABLULAR DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| <b>Tablo 1.</b> <i>Aerococcus</i> türlerinin biyokimyasal özellikleri.....   | 6  |
| <b>Tablo 2.</b> <i>Aerococcus</i> spp. 16S rRNA primerleri.....  | 16 |
| <b>Tablo 3.</b> <i>Aerococcus viridans</i> tür spesifik primerleri.....  | 16 |
| <b>Tablo 4.</b> Mastermiks hazırlanma oranları.....  | 20 |
| <b>Tablo 5.</b> <i>Aerococcus</i> sp. 16S rRNA PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....                                   | 20 |
| <b>Tablo 6.</b> Mastermiks hazırlanma oranları.....  | 21 |
| <b>Tablo 7.</b> <i>Aerococcus viridans</i> tür spesifik geni PCR işlemlerine ait<br>ısıl döngü ve süre diyagramı.....                  | 21 |
| <b>Tablo 8.</b> VITEK AST-P641 kartında yer alan antibiyotikler, konsantrasyonları ve raporlanabilir<br>aralıkları.....                | 22 |
| <b>Tablo 9.</b> VITEK MS (MALDI-TOF MS) identifikasyon sonuçları.....  | 24 |
| <b>Tablo 10.</b> PCR ile İdentifiye Edilen <i>Aerococcus viridans</i> türleri.....   | 26 |
| <b>Tablo 11.</b> <i>A. viridans</i> izolatlarının MIC düzeyindeki sonuçları.....   | 27 |
| <b>Tablo 12.</b> CLSI standart MIC değerleri.....  | 28 |
| <b>Tablo 13.</b> Araştırmamızda izole edilen <i>Aerococcus viridans</i> suşlarının antibiyogram sonuçlarının<br>değerlendirilmesi..... | 28 |
| <b>Tablo 14.</b> Araştırmamızda izole edilen <i>A. viridans</i> suşlarının antibiyogram sonuçlarının yüzde<br>değerleri.....           | 29 |

## ÖZET

### SIĞIR MASTİTİSLERİYLE İLİŞKİLİ *AEROCOCCUS VIRIDANS* TÜRÜNÜN MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

**Oklay MA. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2018.**

*Aerococcus* türleri çevrede saprofitik olarak bulunabildiği gibi birçok insan ve hayvan infeksiyonlarından da izole edilmiştir. Sığırlarda klinik ve subklinik mastitis vakalarında da tespit edildiği bildirilmiştir. *Streptococcus* ve *Staphylococcus* türleri ile olan benzerliği bilinmekte ve bu nedenle hatalı teşhisler neden olabilmektedir. Araştırmamız için Aydın ilindeki çiftliklerden klinik mastitis tespit edilmiş 100 inekten süt numunesi toplanmıştır. Numuneler soğuk zincirle Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına getirilmiştir. 16S rRNA geninin dizilimine yönelik genotipik identifikasyon ve otomatize ileri identifikasyon sistemi olan MALDI-TOF MS ile birlikte, klinik ve subklinik mastitisli sığırlardan 15 adet (%15) *Aerococcus viridans* identifikasyonu yapılmıştır. Ayrıca Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) belirleme yöntemine dayalı olarak yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde izolatların Siprofloksasin, Tigesiklin ve Trimetoprim-Sulfometoksazol'e % 100, Vankomisin'e %87, Eritromisin'e % 80, Tetrasiklin'e % 67, Penisilin ve Linezolid'e % 53.3 oranlarında duyarlı; Nitrofurantoin'e %93 ve Teikoplanin'e % 53.3 oranlarında dirençli olduğu saptanmıştır. Elde edilen bölgesel verilerin, ileride yapılacak araştırmalarda *A. viridans* etkeninin sığırlarda mastitis hastalığındaki rolünün aydınlatılması açısından ışık tutması umulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Sığır, *Aerococcus viridans*, 16S rRNA, Mastitis, İdentifikasyon.



## ABSTRACT

### MOLECULAR IDENTIFICATION OF *AEROCOCCUS VIRIDANS* ASSOCIATED WITH BOVINE MASTITIS AND DETERMINATION OF ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITIES

**Oklay MA. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Department of Microbiology, Master Thesis, Aydın, 2018.**

*Aerococcus* species are saprophytic in the environment as well as many human and animal infections. It has also been reported to be detected in clinical and subclinical mastitis cases in cattle. The similarity with *Streptococcus* and *Staphylococcus* species is known and may lead to misdiagnosis of *Aerococcus* species. In this research, 100 milk samples were collected from the farms in Aydın where clinical and subclinical mastitis was detected. The samples were brought to Adnan Menderes University Veterinary Faculty Microbiology Department by cold chain. A total of 15 (15%) *Aerococcus viridans* isolates were identified from clinical and subclinical mastitis cows with MALDI-TOF MS which is an automated identification system, and genotypic identification were performed by the targeting the 16S rRNA gene. In the antimicrobial susceptibility tests based on Minimal Inhibitor Concentration (MIC), the isolates were 100% sensitive to ciprofloxacin, tigecycline and trimethoprim-sulfomethoxazole, 87% sensitive to vancomycin, 80% sensitive to erythromycin, 67% sensitive to tetracycline, Sensitive to 53.3% to Penicillin and Linezolid; 93% resistant to Nitrofurantoin and 53.3% resistant to Teikoplanin. It is predicted that the obtained regional data will shed light on the role of *A. viridans* in pathogenesis of mastitis disease in the cattle for future studies.

**Keywords:** Cattle, *Aerococcus viridans*, 16S rRNA, Mastitis, Identification.

# 1. GİRİŞ

*Aerococcus* cinsi, başta karakteristik tetrad görünümü ile streptokoklardan farklı bazı Gram pozitif, mikroaerofilik, katalaz negatif, kok şekilli organizmaları gruplandırmak için Williams ve arkadaşları tarafından 1953 yılında oluşturulmuştur. Bu cins içerisinde sadece *Aerococcus viridans* bulunmaktaydı ve hücrel morfolojisinden dolayı bu türün pediokoklara streptokoklardan daha benzer olduğu düşünölmekteydi. *Aerococcus viridans* ile ıstakoz patojeni "Gaffkya homari" arasında benzerlikler de gözlemlenmiş ve bunların artık tek bir türe ait olduğu belirlenmiştir. *Aerococcus urinae*, *Aerococcus christensenii*, *Aerococcus urinaehominis* ve *Aerococcus sanguinicola* olmak üzere dört diğer *Aerococcus* türü insan kaynaklı olarak tanımlanmıştır. Karşılaştırmalı 16S rRNA gen sekansı çalışmaları bu genişletilmiş *Aerococcus* cinsinin katalaz negatif Gram pozitif koklar arasında güçlü bir grup oluşturduğunu ve tarihsel olarak ilişkili olduğu *Streptococcus* ve *Pediococcus* gibi diğer cinslerden filogenetik olarak farklı olduğunu göstermiştir (Vos ve ark, 2009).

*Aerococcus* ilk olarak Williams ve arkadaşları tarafından 1953'te küçük kümeler halinde üreyen, katalaz negatif, gram pozitif kok ve *Aerococcus viridans*'ın tip izolatu olarak tanımlandıktan sonra yaklaşık 35 yıl kadar, insan aerokoksik infeksiyonları hakkında az sayıda rapor yayınlanmıştır. Ancak, enfektif endokarditis (EE) ve idrar yolları infeksiyonları (İYE) vakalarında *Aerococcus* benzeri organizmalar (ALO) olarak adlandırılan *A. viridans* dışındaki aerokoklara da rastlanmıştır. Bu *Aerococcus* benzeri organizmalardan daha sonra farklı aerokok türü olan *A. urinea* ayrılmıştır. *Aerococcus urinae* (Aguirre ve Collins, 1992) ve *A. sanguinicola* (Lawson ve ark, 2001), genellikle insan infeksiyonlarından izole edilmektedir. *Aerococcus christensenii* (Collins ve ark, 1999) ve *Aerococcus urinaehominis* (Lawson ve ark, 2001) insanlardan da izole edilmiş ancak bu türler insan infeksiyonlarının nadiren tespit edilmektedir.

Aerokoklar, çok çeşitli ortamlardan izole edilebilmektedir. *Aerococcus viridans* genellikle saprofitiktir ve hava, toz, bitki örtüsü, toprak ve deniz ürünlerinde bulunmaktadır. Türler, üst solunum yollarında ve normal insanların derisindeki floranın bir parçası olarak da bulunabilir (Rasmussen, 2013).

*Aerococcus*, sekiz türden oluşan bir cins olup, *Aerococcus urinae* ve *Aerococcus sanguinicola* belirlenmiş insan patojenleridir. Aerokoklar, streptokok veya stafilokok olarak kolaylıkla tanımlanamayan gram pozitif koklardır ve tanımlanmaları zor olduğu için

aerokoksik infeksiyon vakaları gözden kaçmaktadır. Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyonu süresince kütle spektrometrisinin (MALDI-TOF MS) kullanıma girmesiyle, klinik mikrobiyologlar aerokokların tanımlanması için hızlı ve doğru bir metoda ulaşmışlardır.

*Aerococcus* cinsi bakterilerin, uzun süredir insan infeksiyonlarında nadir olarak görüldüğü kabul edilmektedir. Bununla birlikte, son bulgular hem *Aerococcus urinae* hem de *Aerococcus sanguinicola*'nın, idrar yolu infeksiyonlarının (İYE) ve enfektif endokardit (EE) gibi invaziv infeksiyonların daha yaygın bir nedeni olabileceğini düşündürmektedir (Ibler ve ark, 2008; Shelton-Dodge ve ark, 2011) . Bakteriler mikrobiyologlar tarafından benzer koloni morfolojisine sahip alfa hemolitik streptokoklar, benzer mikroskopik görünümüleri olan stafilokoklar veya kısmen benzer antibiyotik direnci mekanizmalarına sahip enterokoklar gibi yanlış tanımlanabilirler (Cattoir ve ark, 2010). Biyokimyasal reaksiyonlara dayanan ve yaygın olarak kullanılan bazı teşhis sistemleri, aerokokları kolayca tanımlayamamakta ve bu bakterilerin yanlış tanımlanmasına neden olmaktadır. Yeni teşhis araçları üretildikçe, aerokoklar giderek daha fazla tanımlanacak ve büyük olasılıkla önemli insan patojenleri olarak tanınacaktır (Rasmussen, 2013).

Sığır mastitisi, süt kalitesi ve miktarını azaltması ve meme bezlerinin dokusunda yangı oluşması ile karakterize bir hastalıktır. Sıklıkla bakteri, virüs ve mantarları içeren mikrobik infeksiyonlardan kaynaklanmaktadır (Bradley, 2002; Wellenberg ve ark, 2002).

Woodward ve arkadaşları tarafından 1987 yılında yapılan bir çalışmada *A. viridans*'ın, meme derisi üzerinde bulunan diğer bakteriler ile birlikte mastitis patojenlerine karşı önleyici etkilerini bildirmiştir. Bununla birlikte, Slovakya'da yapılan bir çalışmada klinik ve subklinik mastitis vakalarından 12 *A. viridans* suşu izole edildiği için sığır mastitislerinde önemli rol oynadıkları iddia edilmiştir. Bu izolatlarda moleküler DNA tabanlı yöntemlerle belirgin bir genetik değişkenlik saptanamadığı, ancak antibiyotiklere karşı direncin büyük değişkenlik gösterdiği vurgulanmıştır (Spakova ve ark, 2012). Organik gübre üreten çiftlikler ilk olarak Minnesota'da inşa edilmiştir (Barberg ve ark, 2007). Bu tip bakım sistemleri, inek refahı ve dışkıların geri dönüşümü için Japonya'daki süt çiftliklerinde kullanılmıştır (Saishu ve ark, 2015).

*Aerococcus* cinsi bakteriler *Staphylococcus* ve *Streptococcus* cinsi bakterilere fenotipik olarak benzemektedir ve bu da patojenin yanlış tanımlanmasına ve dolayısıyla *Aerococcus* infeksiyonlarının gözden kaçmasına neden olabilmektedir (Rasmussen, 2013).

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Aerococcus* Türleri

Cins sıralamasındaki tanımlamanın aksine, aerokokların tür seviyesinde fenotipik olarak tanımlanması sorun oluşturmamaktadır. Şu anda tanımlanmış olan tüm türler, geleneksel ve API test sistemleri kullanılarak kolayca tanımlanabilmektedir.

- *Aerococcus viridans*. Williams, Hirsch ve Cowan 1953, Yeşil renk üreten viridans grubu. DNA G + C içeriği (mol%): rapor edilmemiştir. Standart Suş: ATCC 11563, CCM 1914, CCUG 4311, CIP 54.145, DSM 20340, HAMBİ 1583, LMG 17931, NBRC 12219, NCAIM B.01070, NCTC 8251. GenBank erişim numarası (16S rRNA geni): M58797.
- *Aerococcus christensenii*. Collins, Rodriguez Jovita, Hutson, Ohlén ve Falsen 1999, christensenii Danimarkalı mikrobiyolog Jens J. Christensen'in adını aldı. DNA G + C içeriği (mol%): 38.5 (Tm). Tip soy: UW06, CCUG 28831, CIP 106115. GenBank erişim numarası (16S rRNA geni): Y17005.
- *Aerococcus sanguinicola*. Lawson, Falsen, Truberg Jensen ve Collins 2001, DNA G + C içeriği (mol%): rapor edilmemiştir. Standart Suş: CCUG 43001, CIP 106533, JCM 11549. GenBank erişim numarası (16S rRNA geni): AJ276512.
- *Aerococcus urinae*. Aguirre ve Collins 1992, adını idrarla ilgili olmasından almıştır. *Aerococcus urinea*'nın iki biyotipi, eskülin hidrolize etme yeteneklerine bağlı olarak tanımlanmaktadır (Christensen ve ark. 1997). DNA G + C içeriği (mol%): bilinmiyor. Standart Suş: E2, ATCC 51268, CCUG 29291, CCUG 29564, CCUG 34223, CCUG 36881, CIP 104688, DSM 7446, NBRC 15544, NCFB 2893, NCIMB 702893, NCTC 12142. GenBank erişim numarası (16S rRNA geni): M77819.
- *Aerococcus urinaehominis* Lawson, Falsen, Ohlén and Coillins 2001. Urinaehominis, organizmanın ilk izole edildiği insan idrarından adını almıştır. DNA G + C içeriği (mol%): rapor edilmemiştir. Standart Suş: CCUG 42038B, CIP 106675. GenBank erişim numarası (16S rRNA geni): AJ278341.
- *Aerococcus urinaeequi*. Giovanna Felis, Sandra Torriani ve Franco Dellaglio 2005. *Pediococcus urinaehominis* olarak bilinen bakterinin tekrar isimlendirilmesiyle

oluşturulmuştur. DNA G + C içeriği (mol%): % 39.5 mol. Standart suş: ATCC 29723, CCUG 28094, CIP 103442, LMG 13989, DSM 20341, NCIMB 701636.

- *Aerococcus vaginalis*. Tohno ve arkadaşları 2014. DNA G + C içeriği (% mol): % 44.7 mol *Aerococcus* türleri arasında gözlenen aralıkta bulunmaktadır (% 37.5-48.4 mol). Standart suş: strain BV2, JCM 19163, DSM 27293.
- *Aerococcus suis*. Vela ve arkadaşları 2007. Standart suş: CCUG 52530, CECT 7139, JCM 18035, strain 1821/02, DSM 21500

## 2.2. *Aerococcus* Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri

Bakteriler ovoid şekillidir (1-2 mm çapında) ve tetrad veya küme görünümüne yol açan dik açılı iki düzlemde bölünürler; Bazıları çiftler veya tek şekilde de gözlemlenebilir. Alfa-hemolitiklidir. Gram pozitif ve hareketsizdir. Spor formasyonu yoktur. Fakültatif olarak anaerobiktir. Katalaz negatiftir. Oksidaz negatiftir. % 6.5 NaCl' de üreyebilir. MRS brothda gaz oluşturmaz. Glikozdan ve diğer bazı karbonhidratlardan asit oluşturulur. Hippurat çoğu suş tarafından hidroliz edilir. Lösin aminopeptidaz ve  $\beta$ -glukuronidaz üretilebilir veya üretmeyebilir. Arginin çoğu suş tarafından deamine edilmez ve üreaz üretilmez. Voges-Proskauer-negatiftir. Vankomisin'e duyarlıdır (Vos ve ark, 2009).

Aerokoklar, kanlı agarda  $\alpha$ -hemolitik reaksiyon oluşturur ve 37 ° C'de 24 saat inkubasyondan sonra küçük (genellikle 1 mm veya daha az), pigmentsiz koloniler oluşturur (bazı *Aerococcus viridans* suşları tarafından sarı pigment üretimi dışında).

Aerokoklar genelde kısa zincirler şeklinde görülen *Aerococcus christensenii* hariç kümeler halinde ve tetradlar halinde Gram pozitif koklardan oluşur. Fakültatif anaerobiktirler; *Aerococcus christensenii* anaerobik koşulları tercih eder. *Aerococcus* katalaz negatiftir, ancak bazı suşlar zayıf bir katalaz pozitif aktivitesi gösterebilir. Sitokrom enzimleri yoktur. *Aerococcus viridans*'ın büyümesi için pantotenik asit, nikotinic asit ve biyotin gereklidir ya da eklenmesi üremeyi olumlu yönde uyarır; Guanin veya başka bir pürin baz da gereklidir. Amino asitler *Aerococcus viridans*'ın büyümesi için gereklidir, ancak kesin olarak tanımlanmamıştır. Tüm aerokoklar % 6.5 NaCl'de ürer ve *Aerococcus viridans* % 10 NaCl'de üremektedir. Suşların üreme sıcaklıkları farklıdır. *Aerococcus urinae* suşlarının birçoğu 45°C' de ürerken *A. viridans*' ın birçok suşu üreyememektedir. *A. urinae* ve *A. viridans* suşları 10°C'de üreyemediği bildirilmesine rağmen sonraki çalışmalarda üreyebildiği gösterilmiştir (Rasmussen ve ark, 2013).

*Aerococcus viridans* suşlarının çoğu ve *Aerococcus sanguinicola* pozitif bile-  
eskülin reaksiyonu verirken, *Aerococcus urinae* bile-esculin negatiftir. *Aerococcus urinae*,  
*Aerococcus urinaehominis*, *Aerococcus sanguinicola* ve *Aerococcus viridans* suşlarının  
azınlığı  $\beta$ -glukuronidaz üretir. *Aerococcus urinae*, lösin aminopeptidaz üretir, ancak  
pirolidonil aminopeptidaz üretmemektedir. Aksine, *Aerococcus sanguinicola*, hem lösin  
aminopeptidaz hem de pirolidonil aminopeptidaz için pozitifdir. Günümüzde tanımlanmış  
*Aerococcus* türlerinin hiçbiri, alanil-fenilalanin-prolin arilamidaz, glisil triptofan  
arilamidaz,  $\beta$ -mannosidaz, N-asetil- $\beta$ -glukosaminidaz veya üreaz aktivitesi  
göstermemektedir. Aerokoklar, jelatini hidroliz etmez ve nitriti nitrit'e indirgemez.

*Aerococcus viridans* ve *Aerococcus christensenii*'nin hücre duvarı mureini, l-lisine  
dayanmaktadır. *Aerococcus viridans*' ta poliaminler bulunmamaktadır.

*Aerococcus* cinsi filogenetik olarak farklı olmakla birlikte, benzer cinslerden ayırt  
etmeye yarayan fenotipik özellikler oldukça azdır. Örneğin, cins *Aerococcus viridans* ile  
sınırlandırıldığında, mikroskopik görünüm, arginin dehidrolaz (ADH), pirolidonil  
arilamidaz (PYRA), lösin aminopeptidaz (LAP), vankomisin duyarlılığı ve 45 ° C'de  
büyüme gibi testler, kıyaslanan cinslerden ayırt edici uygulamalardır. Örneğin *Aerococcus*  
*urinae*, LAP üretir, PYRA negatiftir ve 45 ° C'de yetişir; oysa *Aerococcus viridans* buna  
zıt sonuçlar vermektedir. Tetrad / küme şeklinde mikroskopik görüntü aerokokları diğer  
çoğu katalaz negatif Gram pozitif koklardan ayırmaktadır. Aerokoklar, konvansiyonel  
testler kullanılarak *Pediococcus*, *Alloiococcus* ve *Gemella* gibi diğer zincir şeklinde  
olmayan Gram pozitif koklardan ayırdedilebilir. Örneğin, aerokoklar vankomisinin duyarlı  
olmasından dolayı pediokoklardan farklıdır. Buna karşılık, pediokoklar bu antibiyotiğe  
dirençlidir. Alloiokoklar (birkaç istisnai suşları hariç) anaerobik olarak ürememektedir ve  
thioglukonat broth ve kanlı agar gibi yaygın kullanılan besi yerlerinde de ürememektedir.  
Benzer şekilde *Gemella*, % 6.5 NaCl'de üremeyerek çoğu aerokok türünden ayrılmaktadır.

Lawson ve arkadaşlarının 2001 yılında yapmış oldukları çalışmalara dayanan  
*Aerococcus* türlerinin biyokimyasal tanımlanması için önerilen bir plan Tablo 1'de  
verilmektedir. Güvenilir biyokimyasal tanımlama oldukça karmaşıktır ve oldukça titiz bir  
çalışma gerektirir buna rağmen sonuçlar her zaman genetik yöntemlerle tam anlamıyla  
uyumluluk göstermemektedir (Grude ve ark, 2003).

**Tablo 1.** *Aerococcus* türlerinin biyokimyasal özellikleri

| Biyokimyasal Testler | <i>A. viridans</i> | <i>A. christensenii</i> | <i>A. sanguicola</i> | <i>A. urinae</i> | <i>A. ureahominis</i> |
|----------------------|--------------------|-------------------------|----------------------|------------------|-----------------------|
| Maltoz               | D*                 | -                       | +                    | -                | +                     |
| Mannitol             | D                  | -                       | -                    | +                | -                     |
| Ribose               | D                  | -                       | +                    | D                | D                     |
| Sucrose              | D                  | -                       | +                    | +                | +                     |
| Trehalose            | D                  | -                       | +                    | -                | -                     |
| Esculin              | +                  | -                       | +                    | D                | +                     |
| PYRA                 | +                  | -                       | +                    | -                | -                     |
| LAP                  | -                  | +                       | +                    | +                | -                     |
| BE                   | D                  | -                       | D                    | -                | -                     |
| NaCl %6,5            | +                  | -                       | +                    | +                | +                     |
| Hippurate            | D                  | +                       | +                    | +                | +                     |
| VP                   | -                  | +                       | -                    | -                | -                     |

D\*: Değişken. Rasmussen, 2013'ten modifiye edilmiştir.

### 2.3. *Aerococcus* Türlerinin Virülans Mekanizması

*Aerococcus viridans*, çevrede bulunan ve başlangıçta havadan izole edilmiş bir bakteridir (Williams ve ark, 1953). Diğer *Aerococcus spp.*'ler insan vücudunun normal steril bölgelerinden (Lawson ve ark, 2001) veya vajinadan (Collins ve ark, 1999) izole edilmiştir. Bu türler için normal yaşam alanı bilinmemekle birlikte, aerokoklar tavukların normal bağırsak florasında bulunur ve insan bağırsak florasında buldukları düşünülmektedir. *Aerococcus viridans* hakkında yayınlanan bir çalışma, bu türün normal floranın diğer türleriyle rekabet eden bir bakteri olduğunu ve bakteriyosin üretebileceğini belirtmiştir (Wise ve Siragusa, 2007). Aerokokların virülans mekanizmaları hakkında çok az şey bilindiği için, farklı *Aerococcus spp.*'lerin genomlarının bilinmeyen virülans faktörlerinin varlığını ortaya koyan çalışmalar önem kazanmaktadır (Rasmussen, 2013).

#### 2.4. *Aerococcus* Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonları

Saishu ve arkadaşlarının 2015 yılında yayınlamış olduğu çalışmada süt örneklerinden bakterileri izole etmek için, 100 µl süt, %5 defibrine koyun kanlı heart infüzyon agar, desoksikolat hidrojen sülfat laktoz agar ve manitol salt agarlı agarlara ekim yapmışlardır. Saf kültürden üreyen koloniler alınmış ve biyokimyasal özellikleri API20E, API20Staph ve API20Strep kullanılarak incelenmiştir. *Aerococcus viridans*, önce API20Strep kullanılarak belirlemiş ve hedef 16S rRNA değişken bölgeleri PCR ile doğrulanmışlardır. Gübreye bağlı örneklerden bakterileri izole etmek için, işlenmiş gübre ve altlık numunelerinden 100 µl PBS içinde 10 misli seyreltilerek kanlı agar petripleri üzerine yayılmıştır.

Moreno ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada Sao Paulo Eyaletinde (Brezilya) yer alan üç domuz sürüsünden alınan idrar örnekleri, daha ileri testlere tabi tutulmuş olan ve *Aerococcus* olduğu düşünülen 22 suşun izolasyonu sağlanmıştır. İdrar yolu infeksiyonu düşündüren idrar örnekleri, dipstik testi tarama sonuçlarına dayanarak seçilmiştir. İdrar numuneleri (10 ml), 4000 g'da 10 dakika santrifüje tabi tutulmuş ve elde edilen pelet, kanlı agara (% 5 defibrine koyun kanı) ekilmiştir. İzolatlar, -80 ° C'de gliserol içeren bir stok ortamında saklanmıştır ve 24 saat boyunca 37 °C'de buzağı serumu (% 5) ilave edilmiş beyin-kalp infüzyonu (BHI) ortamında yeniden canlandırılmış ve saflık kontrolü için kanlı agara (% 5 defibrine koyun kanı) tekrar ekim yapılmıştır.

Sun ve arkadaşlarının 2017 yılında yayınlamış olduğu çalışmada Pekin'de bulunan 2150 Holstein ineğinden oluşan ticari bir süt sürüsünden toplam 1145 süt örneği toplandığını bildirmişlerdir. Bu sürünün seçilmesinin nedeninin toplu tank sütünde Real-Time PCR ile *A. viridans* varlığının tespit edilmesi ve seçilen ineklerin tek meme başlarında klinik ve subklinik mastitis geçmişi bulunması olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışmada bakteri izolasyonu için 10 mikrolitre (µl) süt örneği,% 5 koyun kanı içeren trypticase soya agar üzerine ekmişler ve daha sonra petripleri 37 ° C'de 24 saat inkube etmişlerdir. *A. viridans* dışındaki bakteriyel izolatlar, Ulusal Mastitis Konseyi (2001) tarafından öngörülen şemayı izleyen mikrobiyal morfoloji ve biyolojik kimya testi ile tanımlamışlardır. Şüpheli *A. viridans* kolonilerinin başlangıç taraması, koloni morfolojisi, hemoliz reaksiyonu ve gram boyamalara göre yapmışlardır (Liu ve ark, 2015). *A. viridans*'ın ileri tanımlanması, piyasada bulunan API Rapid 20 strep kitleri kullanılarak yapıldığı bildirilmiştir. *A. viridans*'ın tanımlanması, evrensel primerlerin kullanıldığı 16S



rRNA' daki 750 basepair'lik parçanın PCR ile çoğaltılmasının ardından sekanslama ve ardından BLAST analizi ile doğrulandığını ve *A. viridans* türlerinin  $\geq$  % 98 homoloji seviyesinde tanımlandığı bildirilmiştir.

Tüm diğer izolatlar arasında *A. viridans* insidansı % 16.67 olarak belirlenmişler ve subklinik mastitis vakalarından saf kültürlerde sadece % 28.67 (80/279) oranında *A. viridans* izolatı elde edildiğini bildirmişlerdir.

*Aerococcus* şüpheli üriner bir örnekte tanı laboratuvarına gelirse, bakteriler mikroskopik olarak muayene edilmediği sürece, kanlı agardaki görünümünden ötürü, bir alfa hemolitik *Streptococcus* olarak sınıflandırılması muhtemeldir. Eğer bir *Aerococcus* kan kültürü şişesinde üretilmişse, mikroskopiye dayalı ön tanımlama ile bakteri *Staphylococcus* olarak tanımlanacaktır. Laboratuardaki sonraki rutinlere bağlı olarak, doğru tanıya ulaşılabilir birçok aerokokun farklı bakteri olarak tanımlanmasına yol açan birçok zorluk mevcuttur (Senneby ve ark, 2012). Kontaminant olarak düşünülen streptokokların İYE' na neden olan aerokoklar olduğu anlaşıldığından beri idrar kültürlerindeki aerokokların doğru identifikasyonu önemli hale gelmiştir. Streptokoklar ve enterokokların yanı sıra aerokoklarla bakteremi vakalarında, enfeksiyöz endokarditis daima göz önüne alınmalıdır ve üriner sistemde bir aerokoksik bakteremi odağı aranmalıdır (Rasmussen, 2013).

Aerokoklar, gram boyamada çiftler, tetradlar ya da kümeler olarak görünmekte, ancak stafilokokların aksine katalaz üretmemektedirler. Kanlı agarda alfa hemolitikler ve streptokoklara benzer şekilde küçük yarı şeffaf koloniler oluştururlar. Hem aerobik hem de anaerobik koşullarda üreyebilmektedirler (Williams ve ark, 1953). *Aerococcus viridans* tanımlanan ilk türdür ve daha sonra cinsinin farklı biyokimyasal özelliklere sahip ilave türler bulunduğu belirtilmiştir (Rasmussen, 2013). Farklı karbonhidratları hidrolize etmenin yanı sıra pirolidonil amino-peptidaz ve arginin dihidrolaz aktivitesi de dahil olmak üzere birçok biyokimyasal testin aerokok türler arasında ayırım yapmak için önemli olduğu tespit edilmiştir (Lawson ve ark, 2001).

Piyasada bulunan sistemlerden API sistemi ve BBLCrystal-GP, *A. urinae*'yi kolaylıkla tanımlarken Vitek 2 sistemi genellikle bu türün tanımlanamamasına neden olur. Hem API hem de Vitek *A. sanguinicola*'yı *A. viridans* olarak yanlış tanımaktadır. Bu da identifikasyonda bu metodlar kullanıldığında *A. viridans* kaynaklı infeksiyonların sonuçlarını hatalı hale getirmektedir (Rasmussen, 2013). Farklı *Aerococcus spp* ve ilgili bakterilerin antibiyogramları da taksonomik amaçlar için kullanılmıştır. *Aerococcus*

*urinae*, sülfametoksazol ve gentamisine dirençli ve penisiline duyarlıdır, oysa *A. viridans* değildir (Christensen ve ark, 1996).

## 2.5. Klinik ve Subklinik Mastitis Vakalarında *Aerococcus* Türleri

*Aerococcus viridans*, hastane ortamlarında yaygın olarak hava kaynaklı bir organizmadır ve nadiren de olsa, endokardit, üriner sistem infeksiyonları, septik artrit ve akut çocukluk menenjiti gibi insan infeksiyonlarıyla ilişkilidir. *Aerococcus viridans*, süt ineklerinde subklinik mastitis infeksiyonlardan izole edilmiştir ve ıstakozların ölümcül bir hastalığından (gaffkemia) sorumludur.

*Aerococcus viridans*, *Aerococcus* cinsi arasında tanımlanan ilk türdür ve idrar yolu infeksiyonu, artrit ve endokardit'e neden olan bir insan patojeni olarak bildirilmiştir (Razeq ve ark, 1999; Gopalachar ve ark, 2004; Popescu ve ark, 2005). Klinik veteriner sahada, *A. viridans*, sığır mastitisiyle (Devriese ve ark, 1999; Liu ve ark, 2015) ve ayrıca domuzlarda artrit, pnömoni ve menenjitte neden olan etken olarak tanımlanmıştır (Martin ve ark, 2007). Patojenin hem insan hem de hayvan sağlığına yaygınlığı ve etkisi hakkında somut bir veri yoktur. Diğer *Aerococcus* türleri, mikrobiyel tanımlama için hızlı ve doğru bir yöntem olarak, MALDI-TOF MS kullanılarak daha fazla tanımlanmıştır (Rasmussen, 2013; Senneby ve ark; 2013). *A. viridans*'ın moleküler karakterizasyonuna değinen birkaç çalışma, yüksek genetik heterojenitenin uygulanan teknikten bağımsız olduğunu gözlemlemiştir (Martin ve ark, 2007; Liu ve ark, 2015). Klinik izolatlar arasında antimikrobiyal duyarlılık profilleri arasındaki farklılıklar da bildirilmiştir (Popescu ve ark, 2005; Martin ve ark, 2007; Rasmussen, 2013; Liu ve ark, 2015).

*Aerococcus viridans*, gram pozitif, hareketsiz, mikroaerofilik koklardır (Facklam ve Elliot, 1995). Sığır mastitisindeki bu organizmanın patojenik önemi belirsiz olsa da, zaman zaman süt ineklerinde subklinik mastitis infeksiyonlardan tek tür olarak izole edilmiştir (Devriese ve ark, 1995; Zadoks ve ark, 2004).

Sığır mastitisi hala dünyanın pek çok yerinde süt endüstrisi için çok yaygın ve masraflı bir hastalıktır. Mastitis hayvan refahını da etkilemekte (Bradley2002) ve ineklerin sürüden çıkarılmalarının en önemli nedenlerinden biri olarak bilinmektedir. Bakteriyel infeksiyon, mastitin başlıca sebebidir. *Aerococcus viridans*, *Streptococcaceae* ailesine aittir ve saprofitik bir bakteri olarak çevrede bulunabilir. Bu mikroorganizma streptokoklara çok benzer ve yakından benzerliğinden dolayı hatalı tanımlanabilmektedir (Rasmussen 2013). Klinik olarak, bu bakteri bazı insan ve hayvan hastalıklarıyla ilişkilidir (Chen ve ark, 2012;

Zhou ve ark, 2014). Veteriner sahada, istakoz (Stebbing 2007), tilapia balığı (Ke ve ark, 2012), domuz ve sığırlarda (Guccione ve ark, 2013) infeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. *Aerococcus viridans*'ın Doğu Asya'daki sığır mastitisiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark, 2015; Saishu ve ark, 2015).

Mastitis klinik ve subklinik formlara ayrılabilir. Klinik mastitiste, süt, meme veya inekte belirtiler görülebilir (Fogsgaard ve ark, 2015). Subklinik mastitis, meme veya sütte görsel bir anormallik olmaksızın somatik hücre sayılarının (SCC) artması ile karakterizedir. Süt ineklerinde, 200.000 hücre / mL'den yüksek bir SCC, subklinik mastitisin göstergesidir. Subklinik mastitisin prevalansı daha fazla olduğu için ekonomik kayıplar daha yüksektir (Halasa ve ark, 2007).

*Aerococcus viridans* sığır mastitis vakalarında ortaya çıkan etiyolojik ajandır. Daha önce sığır mastitisiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir; Bununla birlikte sığır mastitisindeki kesin rolü ve süt SCC'sinde ve süt kompozisyonunda ortaya çıkan değişikliklerin yeterince araştırılmadığı bildirilmiştir (Sun ve ark, 2017).

*A. viridans* izolatlarının 17 farklı antimikrobiyal ajana karşı antibiyotik duyarlılığı, Klinik Laboratuar Standart Enstitüsünün (CLSI 2013) kurallarına göre Kirby-Bauer disk difüzyon metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tüm diğer izolatlar arasında *A.viridans* insidansı % 16.67 olarak belirlenmişler ve subklinik mastitis vakalarından saf kültürlerde sadece % 28.67 oranında *A. viridans* izolatu elde edildiğini bildirmişlerdir.

Önceki çalışmalar, mastitis vakalarında *A.viridans*'ın az izole edilmesinin nedeninin bu bakterinin streptokok veya stafilokok olarak yanlış tanımlamalardan kaynaklanmaktadır (Rasmussen, 2013). Bununla birlikte, tanımlama tekniklerinin geliştirilmesi, özellikle de moleküler analizlerin uygulanması, *A.viridans*'ın daha kesin bir şekilde tanımlanmasına yol açtığı bildirilmiştir. Çin (Liu ve ark, 2015) ve Japonya'da (Saishu ve ark, 2015) yapılan son iki araştırma, *A. viridans*'ın sığır mastitis vakalarından izole edildiğini bildirmiştir.

*Aerococcus viridans*'ın sığır mastitisinin etiyolojisindeki rolü netleşmemiştir (Zadoks ve ark, 2004). Öte yandan *Aerococcus viridans* sığır mastitis vakalarından izole edildiği bildirilmiştir (Spakova ve ark, 2012). Kasım 2011 ile Şubat 2013 arasında Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 6 ticari süt çiftliğinden toplam 1,091 inekten 0-6 günlük süttten alınan sağım sonrası süt örnekleri kullanılarak yapılan çalışmada, *Aerococcus* türleri, *Koagülaz negatif Staphylococcus* türünden sonra ikinci en sık görülen tür olarak tespit edilmiştir (Arruda ve ark, 2013).

Saishu ve arkadaşlarının 2015 yılında yayınlanan çalışmasında *A. viridans*' ın sığır mastitis vakalarıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Bu organizma saf kültürde klinik mastitisli ineklerden alınan 38 süt örneğinden izole edildiği belirtilmiştir. *A. viridans* ile enfeksiyona neden olan kaynaklardan biri işlenmiş gübre ve yatak materyali olabileceğinin düşünülmesinin nedeni mastitisli, işlenmiş gübre ve yatak materyalleri bulunan ineklerden izole edilen *A. viridans* suşları' nın direnç fenotipi, PFGE paternleri ile gösterildiği gibi yakından ilişkili bulunmuştur ve aynı antimikrobik maddeye direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Hemen hemen tüm izolatların, klindamisin hariç, test edilen ilaçlara duyarlı olduğu vurgulanmıştır. İneklerden izole edilen *A. viridans*'lardaki antimikrobiyal direnç konusunda kısıtlı bilgi bulunmaktadır.

## 2.6. *Aerococcus* Türlerinde Antibiyotik Direnci

Çoğu *Aerococcus* türü, beta-laktam antibiyotiklere ve diğer birçok antibiyotik grubuna duyarlıdır. Antibiyotik duyarlılıkları farklı türler arasındaki bazı önemli farklılıkları göstermektedir. *A. urinae* ve *A. sanguinicola*'nın penisilin için çok düşük MIC (Minimal Inhibitory Concentration)'leri ve sefalosporinler ve karbapenemler için nispeten düşük MIC'leri vardır (Skov ve ark, 2001; Facklam ve ark, 2003). *Aerococcus viridans*, penisiline karşı yüksek MIC değeri göstermiştir ve kazanılan penisilin direnci belgelenmiştir. *Aerococcus spp.* aminoglikozidlere düşük veya yüksek direnç gösterirler ve bu etken maddeye karşı *A. viridans* yüksek MIC değerleri göstermektedir (Skov ve ark, 2001; Facklam ve ark, 2003). Endokarditis enfeksiyonundan izole edilen iki *A. urinae* izolatu üzerine invitro olarak penisilin ve netilmisin veya gentamisin kombinasyonunun sinerjik bakterisidal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Zbinden ve ark, 1999). *Aerococcus* türlerinin vankomisine duyarlı olmasına rağmen, artan MİK değerleri rapor edilmiştir (de Jong ve ark, 2010). Tetrasiklin, eritromisin, klindamisin ve rifampisin gibi antibiyotikler aerokoklardan kaynaklanan enfeksiyonlara karşı kullanılmaktadır, ancak genellikle in vitro etkili olmaktadır (Skov ve ark, 2001; Facklam ve ark, 2003).

Antibiyotik direnç mekanizması, İYE tedavisinde kullanılan antibiyotikler için daha karmaşıktır. *Aerococcus urinae*, enterokoklar gibi aslen sülfonamidlere dirençlidir ve çoğu rapor, *A. urinae*'nin trimetoprim'e karşı dirençli olduğunu iddia etmektedir, bununla birlikte, trimetoprime olan direncin hangi test ortamının kullanıldığına bağlı görünmektedir (Humphries ve ark, 2011). Humphries ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu bir çalışmada trimetoprimin üriner sistem tedavisinde gerçekten önemli etkileri olabileceği

belirtilmiştir. *Aerococcus urinae*'nin, E-test kullanılarak ölçülen MIC50 değeri siprofloksasin için 0.125 mg / ml veya 0.5 mg / ml agar dilüsyon metodu baz alındığında 1 mg / ml olduğu bildirilmiştir (Rasmussen, 2013). Siprofloksasin için 0.5 mg / ml bu türlerde direnç noktası olduğu için, *A. urinae* İYE'nin tedavisi için siprofloksasinin seçimi tartışmalıdır ve *A. urinae*'nin siprofloksasine karşı direnç kazandığı daha sonraki çalışmalarda bildirilmiştir (Cattoir ve ark, 2011). *Aerococcus urinae*'nin genellikle levofloksasine duyarlı olduğu iddia edilmiştir (Sierra-Hoffman ve ark, 2005) ancak yapılan başka bir araştırmada izolatların % 30'unun dirençli olduğu bildirilmiştir (Shelton-Dodge ve ark, 2011). *Aerococcus sanguinicola*'nın co-trimoksazol (Cattoir ve ark, 2010) ve trimetoprim (Facklam ve ark, 2003) duyarlı olduğu bildirilmesine rağmen, Senneby ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada *A. sanguinicola*'nın trimetoprim dirençli olduğunu bulmuştur.

*Aerococcus sanguinicola*'nın fluorokinolonlara karşı direnç seviyesi sonuçları arasında farklılık göstermesine karşın, bu türün daha yüksek MIC değerine sahip olduğu ve *A. urinae*'ya göre fluorokinolonlara daha dirençli olduğu görülmüştür (Cattoir ve ark, 2010; Shelton-Dodge ve ark, 2011). İdrar yolları infeksiyonu tedavisinde kullanılan diğer antibiyotikler arasında, fosfomisin *A. urinae*'ya karşı etkili olduğu ancak *A. sanguinicola*'ya karşı etkili olmadığı belirtilmiştir (Cattoir ve ark, 2010). *Aerococcus urinae*'nin nitrofurantoin duyarlı olduğu kabul edilirken, nitrofurantoinin *A. sanguinicola*'ya etkisi hakkındaki verileri yayınlanmamıştır (Schoor ve ark, 1997). Rasmussen 2013 yılında yayınladığı derlemede idrar yolları infeksiyonu tedavisinde kullanılan pivmecillinam, sefadroksil ve seftibuten için aerokokların MIC'leri üzerinde yapılan çalışmaların yetersiz olduğunu belirtmiştir.

*Aerococcus urinae*,  $\beta$ -laktamlar da dahil olmak üzere geniş bir antimikrobialere duyarlıdır, ancak sülfonamidlere ve aminoglikozitlere dirençlidir. Christensen 2012 yılında yapmış olduğu çalışmada, *Aerococcus viridans*'ın penisilin, ampisilin, sefalosporinler, tetrasiklin, doksisisiklin, kloramfenikol, furazolidon, eritromisin, klindamisin, vankomisin, teikoplanin, daptomisin, rifampin, klavulanatta karşı duyarlı ancak aminoglikozidlere, sülfonamidlere, trimetoprim'e, nalidixik asit'e, kolistin, aztreonam, sulbaktam ve basitrasin'e dirençli olduğunu tespit etmiştir. *Aerococcus viridans*, basitrasin, klavulanat, kolistin, furazolidon, penisilin ve tobramisine duyarlı değildir. Penicillin'e duyarlı izolatları bildiren raporlar bulunmasına rağmen, *Aerococcus viridans* suşları arasındaki penisilin direnci bildirilmiştir. Kern ve Vanek (1987), bazı *Aerococcus viridans* suşlarının trimetoprim-metoksazol ve ofloksasine dirençli olduğunu bildirmiştir.

Araştırmamızda mastitisli ineklerden elde edilen sütlerde *Aerococcus* türlerinin varlığının tespit edilmesi ve yapılacak antibiyotik duyarlılık testi ile etkene yönelik doğru antibiyotik seçiminin yapılması amaçlanmıştır. Böylelikle; süt sığırcılığı yapılan işletmelerde mastitise yol açan etkenlerden biri olan *Aerococcus viridans* türünün hızlı bir Şekilde identifikasyonunun mümkün hale getirilmesi ve etkin tedavi protokollerinin tavsiye edilmesi hedeflenmiştir.



## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

Araştırma materyalini oluşturan numuneler, Aydın ilinde yer alan, süt sığırcılığı yapılan özel çiftliklerden 2018 yılı Mart ve Ağustos ayları arasında gerçekleştirilmiştir. Bu çiftlikler serbest sistem yarı açık yapıda olup, standart rasyon programı uygulanmakta ve makine ile sağım yapılmaktadır. Araştırmamızda, 25-250 başlık hayvan kapasitesine sahip 6 çiftlikteki klinik mastitisli ineklerden, uzman veteriner hekim tarafından alınmış 100 süt örneği kullanılmıştır. Çalışmaya hepsi laktasyon döneminde olan, son bir ayda antibiyotik tedavisi uygulanmamış, en az bir doğum yapmış, 2-8 yaşlı, Holstein ırkı hayvanlar dahil edilmiştir. Klinik mastitisin belirlenmesinde son 3 gün içinde meme bölgesinde görülen yangı semptomlarıyla (ağrı, hassasiyet, kızarıklık, sıcaklık artışı ve fibrinöz doku oluşumu), sütte görülen değişiklikler (süt veriminin azalması, sütte kötü koku, süütün kanlı, irinli, pıhtılı olması) dikkate alınmıştır. Ayrıca klinik mastitis tanısı CMT (California Mastitis Test) ile doğrulanmıştır. Toplanan sütlerin *Aerococcus* sp. yönünden mikrobiyolojik analizleri, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Teşhis ve Analiz Laboratuvarında yapılmıştır.

#### 3.1.1. Besiyerleri ve Ayıraçlar

##### 3.1.1.1. Besiyerleri

###### 3.1.1.1.1. Blood Agar (Merck 1. 10886)

Blood Agar 40 g

Distile su 1000 ml

2500 ml distile su içine 100 gr besiyeri ilave edildi ve karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlandı, 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup, içine % 7 oranında steril insan kanı ilave edildi.

### 3.1.1.1.2. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129)

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Mueller-Hinton Broth | 38 g    |
| Distile su           | 1000 ml |
| pH: 7,3±0,2          |         |

Besiyeri 38 g olacak şekilde distile su içinde eritilip 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. 45–50 °C'a soğutulup steril petri kutularına 12,5 ml döküldü.

### 3.1.1.1.3. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (% 20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225)

|            |       |
|------------|-------|
| BHIB       | 8 g   |
| Gliserin   | 20 ml |
| Distile su | 80 ml |

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

### 3.1.1.1.4. Trypton Soya Broth (TSB) (Oxoid CM 129)

|            |         |
|------------|---------|
| TSB        | 8 g     |
| NaCl       | 75 g    |
| Distile su | 1000 ml |

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı. 5 ml miktarda steril tüplere dağıtıldı. 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

### 3.1.2. Kaliforniya Mastitis Test Ayracı (Immucell®)

Alkil Benzen Sülfonat

pH indikatörü

Ayraçlar, süt ile karıştırılarak enfeksiyonun derecesine göre klinik mastitis şüphesi taşıyan hayvanların sütleri toplandı.



### 3.1.3. Primerler

*Aerococcus* sp. *16S rRNA* primerleri olan  $P_{LS}$  ve  $P_{LA}$ 'ya ait oligonükleotid dizisi ve referansı Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** *Aerococcus* spp. *16S rRNA* primerleri

| Primer   | Oligonükleotid dizisi ( 5'-3')        | Hedef bölge | Referans         |
|----------|---------------------------------------|-------------|------------------|
| $P_{LS}$ | 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3 '    | 1400 bp     | Ke ve ark., 2012 |
| $P_{LA}$ | 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T - 3' |             | Ke ve ark., 2012 |

*Aerococcus viridans* tür spesifik *16S rRNA* primer dizilimleri olan  $AC2$  ve  $AC4$  'e ait oligonükleotid dizisi ve referansı Tablo 3'de verilmiştir.

**Tablo 3.** *Aerococcus viridans* tür spesifik primerleri

| Primer | Oligonükleotid dizisi ( 5'-3')         | Hedef bölge | Referans             |
|--------|--|-------------|----------------------|
| $AC2$  | 5'- GTG CTT GCA CTT CTG ACG TTA GC- 3' | 540 bp      | Martin ve ark., 2007 |
| $AC4$  | 5'- TGA GCC GTG GGC TTT CAC AT- 3'     |             | Martin ve ark., 2007 |

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Örneklerin Alınması

Her süt örneği alınırken, meme başları dezenfekte edilip kurulandı ve %70'lik alkol ile silindi. Meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak için ilk birkaç ml süt atıldı. Steril enjektörler içine 10 ml miktarda alındı. Alınan 100 mastitisli süt örnekleri soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına aynı gün getirilip laboratuvar çalışmalarına başlandı.

### 3.2.2. *Aerococcus* sp. İzolasyonu

Laboratuvara getirilen süt örnekleri % 7 koyun kanı içeren kanlı agara ekilmiş ve 24 saat inkubasyon sonunda 1 mm çapında, pigmentsiz veya sarı pigmentli, alfa hemoliz yaptığı belirlenen koloniler identifikasyon için gram boyama yapılarak gram pozitif kok olarak değerlendirilen suşların biyokimyasal özellikleri konvansiyonel yöntemlerle değerlendirilmiştir.

### 3.2.3. *Aerococcus* sp. Mikroskopisi

Elde edilen kolonilerin Gram (+) *Aerococcus* cinsine ait olup olmadığının tespiti amacıyla Gram boyama uygulanmıştır. Gram boyama için, temiz bir lam üzerine steril öze ile 2-3 öze dolusu fizyolojik tuzlu su konulmuş ve 24 saat inkube edilmiş koloni öze ile alınarak karıştırılarak lam üzerine yayılmıştır. Lam havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek fikse edilmiş ve soğumaya bırakılmıştır. Kristal viyole boyası ile 1 dakika muamele edildikten sonra boya dökülmüş ve lam üzerine lugol solüsyonu damlatılarak 1 dakika beklenmiş ve sonrasında lügol çözeltisi dökülerek kurutma kâğıdı ile kurulanmıştır. Lam % 96'lık etil alkole daldırılıp çıkarılarak 10-15 saniye süreyle alkol ile dekolorize edilmiş daha sonra ise distile su ile yıkanarak kurutma kâğıdı ile kurulanmıştır. Son olarak lam üzerine safranin damlatılarak 30 saniye süreyle boyanmış ve numune distile su ile yıkanarak kurutulmaya bırakıldıktan sonra ışık mikroskopunda incelenmiştir. Mikroskopta Gram pozitif özellik gösteren yuvarlak şekilli bakteriler aranmıştır (Winn ve ark, 2006).

### 3.2.4. *Aerococcus* sp. Konvansiyonel İdentifikasyonu

İzolatların fenotipik identifikasyonlarında kullanılan katalaz testi aşağıdaki anlatıldığı şekilde yapılarak gerçekleştirilmiştir.

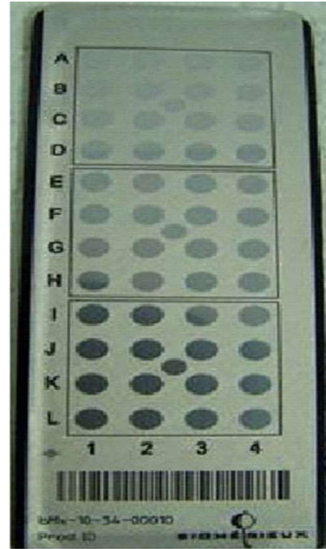
#### 3.2.4.1. Katalaz Testi

Test için besiyerine üreyen koloniler steril öze ile alınıp temiz bir lam üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 1-2 damla % 3'lük hidrojen peroksit damlatılmıştır. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırdığı için ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlenmiştir. Bu nedenle test sonucu kabarcıklar

meydana geldiğinde katalaz pozitif, kabarcıklar oluşmadığında ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir. *Aerococcus* sp. katalaz negatiftir (Bilgehan, 2000).

### 3.2.5. *Aerococcus* sp. VITEK MS (MALDI-TOF MS) ile İdentifikasyon

Çalışmamızda VITEK MS/IVD/V.3.0 (bioMérieux, France) veritabanı kullanıldı ve üreticinin talimatı doğrultusunda gerçekleştirilen bütün işlemler aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Ön testler ile Gram pozitif, kok ve katalaz pozitif olarak saptanan *Aerococcus* sp. olarak ön identifikasyonu yapılan izolatlardan kanlı agara pasaj yapıldı. 18-24 saat sonrasındaki taze kolonilerden birer koloni 1 µl'lik öze ile alınarak VITEK MS slaytlarına ince bir tabaka halinde yayıldı. Bir slaytta aynı anda 15 adet izolat hazırlandı. Hazırlanan slaytta her 16 kuyucuk ortasında yer alan kalibrasyon kuyucuğuna kalite kontrol ve kalibrasyon amacıyla kütle spektrum profili çok iyi bilinen *E. coli* ATCC 8739 ince bir tabaka halinde yayıldı. Hazırlanan slayttaki kuyucukların her birinin üzerine 1'er µl matriks solüsyonu CHCA ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklendi ve oda ısında kurumaya bırakıldı. 2 Dakika beklenildikten sonra slayt cihaz içine yerleştirilerek çalışma başlatıldı. Cihaz ilk çalıştırıldığında vakum ve kalibrasyon işleminin yaklaşık 10 dakika sürmesinin ardından izolatların her birinin spektrumları alınmaya başlandı. 15 adet örnek ve 3 adet kalibrasyon spotunun yer aldığı slaytımızın toplam raporlama süresi 57 dakika olarak ölçüldü (Örnek başına yaklaşık 1.7 Dakika). Çalışmada kullanılan VITEK MS slaytı Resim 1'de sunulmuştur.



Resim 1. VITEK MS Slaytı

### 3.2.6. *Aerococcus* İzolatlarının Genotipik İdentifikasyonu

#### 3.2.6.1. DNA Ekstraksiyonu

Öncelikle *Aerococcus* sp. izolatlarından PCR’da kullanılmak üzere izolatlardan total DNA ekstraksiyonu, Thermo Scientific™ Genomic DNA Purification ekstraksiyon kiti ile gerçekleştirildi.

##### **Thermo Scientific™ Genomic DNA Purification Kit Prosedürü:**

\*Bir öze dolusu kültür 400 µl lizis solusyonu ile süspanse edildi. 65°C’de 5 dk inkube edildi.

\*600 µl kloroform ilave edildikten sonra 10.000 rpm’de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.

\*800 µl presipitasyon solusyonu pelet üzerine ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika karıştırıldı.

\*10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren pelet 1.2 M NaCl solusyonunda çözdürüldü.

\*300 µl etanol eklendikten sonra 10 dakika -20°C’de bekletildi. 10.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra %70’lik etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü. Her bir PCR reaksiyonu için 5 µl template DNA kullanıldı.

#### 3.2.6.2. PCR

##### 3.2.6.2.1. *Aerococcus* sp 16S rRNA PCR Aşaması

16S rRNA primerine spesifik ürünlerin aranması için yapılan PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu toplam 25 µl toplam hacimde, olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve hacimleri Tablo 4’de belirtilmiştir.

**Tablo 4.** Mastermiks hazırlanma oranları

| Malzeme (Ticari)   | Kullanılan Hacim |
|--|------------------|
| MASTER Mix<br>(Genet Bio® ExPrime Taq Premix (2X), Cat no.G-5000N) | 10µL             |
| Forward Primer (10pmol)  | 0,5µL            |
| Reverse Primer (10pmol)  | 0,5µL            |
| DNA  | 3 µL             |
| ddH <sub>2</sub> O   | 11 µL            |
| <b>TOPLAM</b>  | 25 µl            |

Mastermikslere hazırlandıktan sonra 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 22'şer µl hazırlanan mastermiksten ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan için 3'şer µl alınıp ilgili tüplerin içerisine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 termal döngüleme cihazına yüklenip programlandı. *Aerococcus* sp. 16S rRNA analizlerinde kullanılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı Tablo 5'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.** *Aerococcus* sp. 16S rRNA PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

| Basamak                       | Döngü Sayısı | Sıcaklık | Süresi |
|-------------------------------|--------------|----------|--------|
| <b>Başlangıç Denatürasyon</b> | 1            | 94°C     | 5 dk   |
| <b>Denatürasyon</b>           | 31           | 94°C     | 1 dk   |
| <b>Bağlanma</b>               |              | 59°C     | 1 dk   |
| <b>Uzama</b>                  |              | 72°C     | 1 dk   |
| <b>Son Uzama</b>              | 1            | 72°C     | 5 dk   |
| <b>Bekletme</b>               | 1            | 4°C      | ∞ dk   |

### 3.2.6.2.2. *Aerococcus viridans* tür spesifik PCR Aşaması

*Aerococcus viridans* tür spesifik primerine spesifik ürünlerin aranması için yapılan PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu toplam 25 µl toplam hacimde, olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve hacimleri Tablo 6'da belirtilmiştir.

**Tablo 6.** Mastermiks hazırlanma oranları

| Malzeme (Ticari)   | Kullanılan Hacim |
|--|------------------|
| MASTER Mix<br>(Genet Bio® ExPrime Taq Premix (2X), Cat no.G-5000N) | 10µL             |
| Forward Primer (10pmol)  | 0,5µL            |
| Reverse Primer (10pmol)  | 0,5µL            |
| DNA  | 3 µL             |
| ddH <sub>2</sub> O   | 11 µL            |
| <b>TOPLAM</b>  | <b>25 µl</b>     |

Mastermikslere hazırlandıktan sonra 0,2 mL’lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine *Aerococcus viridans* tür spesifik primeri bulunan 22’şer µl hazırlanılan mastermiksten ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA’dan için 3’şer µl alınıp ilgili tüplerin içerisine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 termal döngüleme cihazına yüklenip, programlandı. *Aerococcus viridans* tür spesifik analizlerinde kullanılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı Tablo 7’de gösterilmiştir.

**Tablo 7.** *Aerococcus viridans* tür spesifik geni PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

| Basamak                       | Döngü Sayısı | Sıcaklık | Süresi |
|-------------------------------|--------------|----------|--------|
| <b>Başlangıç Denatürasyon</b> | 1            | 94°C     | 5 dk   |
| <b>Denatürasyon</b>           | 31           | 94°C     | 1 dk   |
| <b>Bağlanma</b>               |              | 62°C     | 1 dk   |
| <b>Uzama</b>                  |              | 72°C     | 1 dk   |
| <b>Son Uzama</b>              | 1            | 72°C     | 5 dk   |
| <b>Bekletme</b>               | 1            | 4°C      | ∞ dk   |

### 3.2.6.3. PCR Ürün Jel Elektroforezi

0,2 mL tüplerde oluşturulan 25 µl’lik PCR ürünlerinden 10’ar µl pipet yardımıyla alınıp, 3 µl 6x loading dye ile karıştırıldı. Oluşturulan karışımın tamamı alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi. Hazırlanmış olan jelle, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroferez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 80V 500A akımda 60 dakika yürütüldü. Elektroferez işleminin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde elektroferez tankından çıkarıldı. Süre

sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı ile fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PCR için ayrı değerlendirildi.

PCR analizi değerlendirmesinde, *Aerococcus* spp. *16S rRNA* primeri için 1400 bp, *Aerococcus viridans* tür spesifik primerleri için 540 bp uzunluğunda bant oluşumları gözlemlendi.

### 3.3. Antibiyogram

Antibiyogram çalışmamızda 418591 referans numaralı VITEK AST-P641 kartları kullanıldı. Tablo 8’de VITEK AST-P641 kartında yer alan antibiyotikler, konsantrasyonları ve raporlanabilir aralıkları belirtilmiştir.

**Tablo 8.** VITEK AST-P641 kartında yer alan antibiyotikler, konsantrasyonları ve raporlanabilir aralıkları

| Antimikrobiyel Ajan               | Konsantrasyon         | Raporlanabilir Aralık |             |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------|
|                                   |                       | ≤                     | ≥           |
| Penisilin (P)                     | 0.125,0.25,1,2,8,64   | 0.12                  | 8           |
| Siprofloksasin (CIP)              | 1, 2, 4               | 0.5                   | 8           |
| Eritromisin (E)                   | 1, 2, 4, 8            | 0.25                  | 8           |
| Klindamisin (CM)                  | 0.06, 0.25, 1         | 0.125                 | 4           |
| Linezolid (LNZ)                   | 0.5, 1, 2             | 0.5                   | 8           |
| Teicoplanin (TEC)                 | 0.5, 2, 8, 32         | 0.5                   | 32          |
| Vankomisin (VA)                   | 1, 2, 4, 8, 16        | 0.5                   | 32          |
| Tetrasiklin (TE)                  | 0.5, 1, 2             | 1                     | 16          |
| Tigesiklin (TGC)                  | 0.25, 0.5, 1          | 0.12                  | 2           |
| Trimetoprim/Sulfametoksazol (SXT) | 8/152, 16/304, 32/608 | 10(0.5/9.5)           | 320(16/304) |
| Nitrofurantoin                    | 0.5, 1, 2             | 64                    | 64          |

VITEK GP kartları ile yapılan identifikasyon çalışmasında hazırlanan 0.50 – 0.63 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonundan 280 µl alınarak steril başka bir 3 ml’ lik salin solüsyonuna aktarıldı ve otomatik pipet vasıtası ile numunenin homojen şekilde karışımı sağlandı. VITEK Kartları ile identifikasyon işleminde olduğu gibi önce cihaz tarafından dolumu sonrasında da inkübatör modülüne aktarımı yapıldı. Sonuçlar 8 saat içinde cihaz tarafından alındı.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada Aydın ili ve çevresindeki süt sığırcılığı işletmelerinde bulunan hayvanlardan klinik bulgular ve California Mastitis Test ile mastitis problemi gösterdiği belirlenen hayvanlara ait sütler steril koşullarda alınan, toplam 100 adet süt örneği konvansiyonel yöntemler ile *Aerococcus viridans* yönünden incelenmiştir. İzole edilen *Aerococcus* sp. izolatları MALDI-TOF MS ve 16S rRNA genotipik identifikasyon yöntemleri ile tanımlanarak metodolojik karşılaştırmaları yapılmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları VITEK2 cihazında VITEK AST-P641 kartları kullanılarak yapılmıştır.

### 4.1. Konvansiyonel Yöntemler ile *Aerococcus* sp. İzolasyon Bulguları

Araştırmamızda incelenen 100 süt örneğinin 15 (% 15,0)' inden *Aerococcus* sp. izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen *Aerococcus* sp. suşlarının katalaz testi sonucunda 15 (% 100) adedi negatif olarak belirlenmiştir.

### 4.2. VITEK MS (MALDI-TOF MS) ile *Aerococcus viridans* İdentifikasyon Bulguları

Araştırmamızda *Aerococcus* sp. izolatları, VITEK MS (MALDI-TOF MS) cihazı ile identifiye edilmiştir. VITEK MS (MALDI-TOF MS) cihazı ile yapılan identifikasyon çalışmaları sonucunda, izolatların 15 (% 100)'i *Aerococcus viridans* olarak tiplendirilmiştir (Tablo 9).

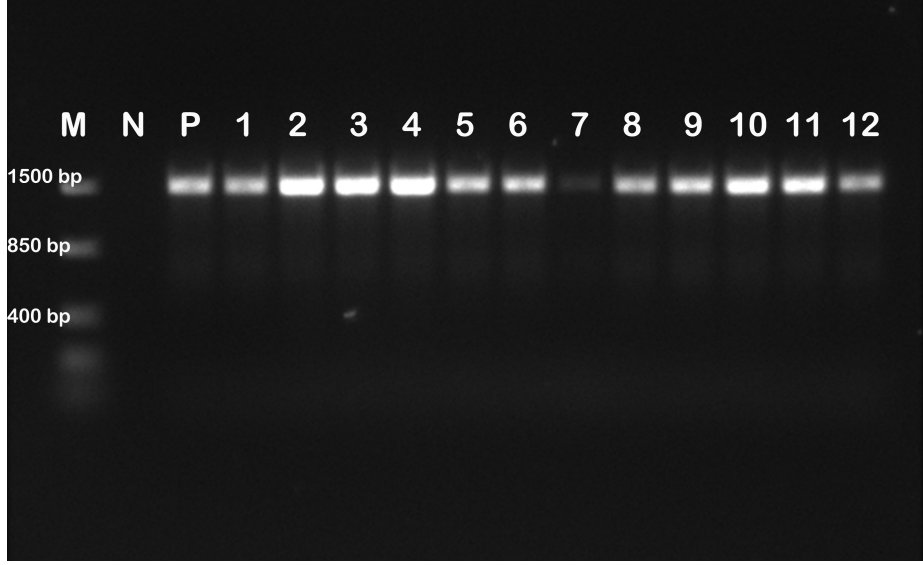


**Tablo 9.** VITEK MS (MALDI-TOF MS) identifikasyon sonuçları

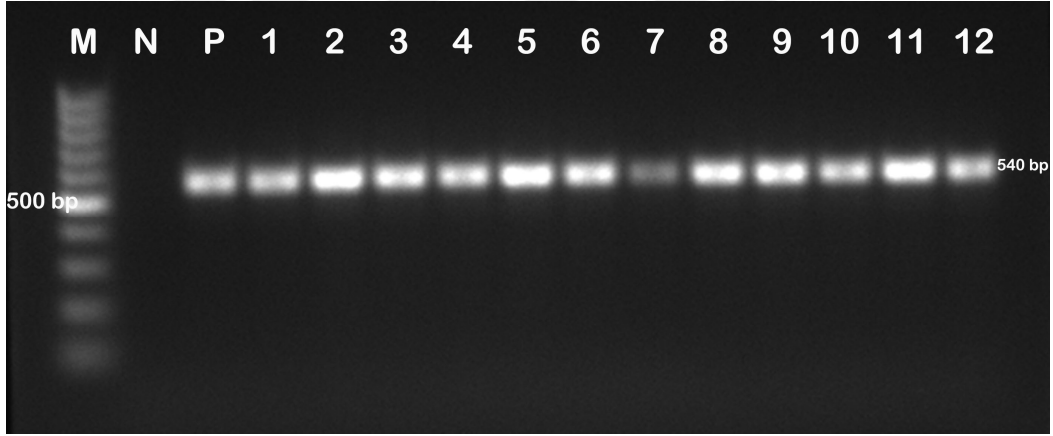
| Sıra | Numune No | Katalaz Sonucu | VITEK MS (MALDI-TOF MS) ile İzole Edilen <i>Aerococcus viridans</i> Türleri | VITEK MS Yüzdesi |
|------|-----------|----------------|---|------------------|
| 1    | A1-1      | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 2    | A2-2      | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 3    | A4-1      | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 4    | A11-1     | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 5    | A12-1     | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 6    | A12-2     | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 7    | A13-1     | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 8    | A22-1     | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 9    | A22-2     | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 10   | A27-1     | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 11   | A36-1     | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 12   | A37-1     | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 13   | A38-1     | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 14   | A38-2     | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |
| 15   | A50-1     | Negatif        | <i>Aerococcus viridans</i>  | 99,9%            |

#### 4.3. *Aerococcus sp.* 16S rRNA ve Tür Spesifik PCR ile Genotipik İdentifikasyon Bulguları

Araştırmamızda VITEK MS (MALDI-TOF MS) cihazı ile identifikasyonları yapılan 15 (% 15) adet izolat, ilk olarak 16S rRNA primerleri kullanılarak *Aerococcus sp.* olarak identifiye edilmişler ve daha sonra tür spesifik primerler ile yapılan PCR sonucunda *Aerococcus viridans* olarak doğrulanmıştır. Elde edilen elektroforez görüntüleri Resim 2 ve Resim 3’de sunulmuştur. PCR sonucunda elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 15 *Aerococcus viridans* izolatının VITEK MS (MALDI-TOF MS) sonuçlarına paralel olarak tiplendirildiği görülmektedir (Tablo 10).



**Resim 2.** 16S rRNA spesifik primerler ile yapılan PCR elektroforez görüntüsü  
M: Marker (Low range), N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol, 1-12: *Aerococcus* sp.  
pozitif örnekler



**Resim 3.** Tür spesifik primerler ile yapılan PCR elektroforez görüntüsü  
M: Marker (100 bp'lik), N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol, 1-12: *Aerococcus viridans*  
pozitif örnekler

**Tablo 10.** PCR ile İdentifiye Edilen *Aerococcus viridans* türleri

| Sıra | Numune No | Katalaz Sonucu | 16S rRNA PCR ile İdentifiye Edilen <i>Aerococcus</i> sp. Türleri | Tür Spesifik PCR ile İdentifiye Edilen <i>Aerococcus viridans</i> Türleri |
|------|-----------|----------------|--|---|
| 1    | A1-1      | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 2    | A2-2      | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 3    | A4-1      | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 4    | A11-1     | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 5    | A12-1     | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 6    | A12-2     | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 7    | A13-1     | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 8    | A22-1     | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 9    | A22-2     | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 10   | A27-1     | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 11   | A36-1     | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 12   | A37-1     | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 13   | A38-1     | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 14   | A38-2     | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |
| 15   | A50-1     | Negatif        | <i>Aerococcus</i> sp.  | <i>Aerococcus viridans</i>  |

Araştırmamız sonucunda elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, identifikasyonları yapılan katalaz negatif tüm izolatların VITEK MS (MALDI-TOF MS) ve PCR sonuçları doğrultusunda aynı *Aerococcus viridans* olarak identifiye edildiği görülmektedir.

#### 4.4. Antibiyogram Bulguları

Çalışmamızda tiplendirilmeleri yapılmış *Aerococcus viridans* suşlarına 418591 referans numaralı VITEK AST-P641 kartları ile VITEK 2 Compact cihazı ile antibiyogram yapılmıştır. Antibiyogram sonucunda izolatlardan elde edilen MIC düzeyindeki sonuçlar Tablo 11’de gösterilmektedir. İzolatların CLSI (2017) standartlarına göre değerlendirilen (Tablo 12) antibiyogram sonuçları Tablo 13’de belirtilmektedir.

**Tablo 11.** *A. viridans* izolatlarının MIC düzeyindeki sonuçları

| Sıra No | Numune No | P     | CIP  | E     | CM    | LNZ | TEC  | VA   | TE  | TGC   | SXT | Nitrofuran |
|---------|-----------|-------|------|-------|-------|-----|------|------|-----|-------|-----|------------|
| 1       | A1-1      | 32    | 1    | ≤0,25 | ≥4    | 2   | ≥32  | ≤0,5 | 2   | ≤0,12 | ≤10 | 256        |
| 2       | A2-2      | ≤0,12 | ≤0,5 | ≥8    | ≥4    | 2   | ≥32  | ≤0,5 | ≥16 | ≤0,12 | ≤10 | ≤16        |
| 3       | A4-1      | ≤0,12 | 1    | ≤0,25 | ≤0,12 | 2   | ≥32  | ≤0,5 | ≤1  | ≤0,12 | ≤10 | 256        |
| 4       | A11-1     | ≥64   | 1    | ≤0,25 | ≥4    | ≥8  | ≥32  | 4    | 4   | 0,25  | ≤10 | 256        |
| 5       | A12-1     | ≥64   | 1    | ≤0,25 | ≤0,12 | ≥8  | ≤0,5 | 4    | ≥16 | 0,25  | ≤10 | 256        |
| 6       | A12-2     | ≥64   | ≤0,5 | ≤0,25 | ≥4    | ≥8  | ≥32  | 16   | ≥16 | 0,25  | 20  | ≥512       |
| 7       | A13-1     | ≤0,12 | 1    | ≤0,25 | 0,25  | 2   | ≤0,5 | ≤0,5 | ≤1  | ≤0,12 | ≤10 | 256        |
| 8       | A22-1     | 1     | 1    | ≤0,25 | ≥4    | ≥8  | ≥32  | ≤0,5 | 2   | 0,5   | ≤10 | 256        |
| 9       | A22-2     | 0,25  | ≤0,5 | 2     | 0,25  | 2   | ≤0,5 | ≤0,5 | ≤1  | ≤0,12 | ≤10 | 128        |
| 10      | A27-1     | ≥64   | ≤0,5 | ≤0,25 | ≥4    | ≥8  | ≥32  | 16   | ≥16 | ≤0,12 | ≤10 | 256        |
| 11      | A36-1     | 32    | 1    | ≤0,25 | ≥4    | 2   | ≤0,5 | 4    | 2   | ≤0,12 | ≤10 | 256        |
| 12      | A37-1     | 16    | 1    | ≤0,25 | ≤0,12 | 2   | ≤0,5 | 4    | ≤1  | ≤0,12 | 20  | 256        |
| 13      | A38-1     | ≤0,12 | 1    | ≤0,25 | 0,25  | 2   | ≤0,5 | ≤0,5 | ≤1  | ≤0,12 | ≤10 | 256        |
| 14      | A38-2     | 0,25  | 1    | ≥8    | ≥4    | 4   | ≥32  | ≤0,5 | ≤1  | ≤0,12 | ≤10 | 256        |
| 15      | A50-1     | ≥64   | 1    | ≤0,25 | ≥4    | ≥8  | ≤0,5 | 4    | 8   | ≤0,12 | ≤10 | 256        |

**Tablo 12.** CLSI standart MIC değerleri

| <b>Antibiyotikler</b>             | <b>S</b>    | <b>I</b> | <b>R</b>    |
|-----------------------------------|-------------|----------|-------------|
| Penisilin                         | $\leq 0.12$ |          | $\geq 0.25$ |
| Siprofloksasin (CIP)              | $\leq 1$    | 2        | $\geq 4$    |
| Eritromisin (E)                   | $\leq 0.5$  | 1-4      | $\geq 8$    |
| Klindamisin (CM)                  | $\leq 0.5$  | 1-2      | $\geq 4$    |
| Linezolid (LNZ)                   | $\leq 4$    |          | $\geq 8$    |
| Teicoplanin (TEC)                 | $\leq 8$    | 16       | $\geq 32$   |
| Vankomisin (VA)                   | $\leq 4$    | 8-16     | $\geq 32$   |
| Tetrasiklin (TE)                  | $\leq 4$    | 8        | $\geq 16$   |
| Tigesiklin (TGC)                  | $\leq 0.5$  |          |             |
| Trimetoprim/Sulfametoksazol (SXT) | $\leq 2/38$ |          | $\geq 4/76$ |
| Nitrofurantoin                    | 64          |          | 64          |

CLSI (2017)'den modifiye edilmiştir.

**Tablo 13.** Araştırmamızda izole edilen *Aerococcus viridans* suşlarının antibiyogram sonuçlarının değerlendirilmesi

| <b>Sıra No</b> | <b>Numune No</b> | <b>P</b> | <b>CIP</b> | <b>E</b> | <b>CM</b> | <b>LNZ</b> | <b>TEC</b> | <b>VA</b> | <b>TE</b> | <b>TGC</b> | <b>SXT</b> | <b>Nitrofuran</b> |
|----------------|------------------|----------|------------|----------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|------------|------------|-------------------|
| 1              | A1-1             | R        | S          | S        | R         | S          | R          | S         | S         | S          | S          | R                 |
| 2              | A2-2             | S        | S          | R        | R         | S          | R          | S         | R         | S          | S          | S                 |
| 3              | A4-1             | S        | S          | S        | S         | S          | R          | S         | S         | S          | S          | R                 |
| 4              | A11-1            | R        | S          | S        | R         | R          | R          | S         | S         | S          | S          | R                 |
| 5              | A12-1            | R        | S          | S        | S         | R          | S          | S         | R         | S          | S          | R                 |
| 6              | A12-2            | R        | S          | S        | R         | R          | R          | I         | R         | S          | S          | R                 |
| 7              | A13-1            | S        | S          | S        | S         | S          | S          | S         | S         | S          | S          | R                 |
| 8              | A22-1            | S        | S          | S        | R         | R          | R          | S         | S         | S          | S          | R                 |
| 9              | A22-2            | S        | S          | I        | S         | S          | S          | S         | S         | S          | S          | R                 |
| 10             | A27-1            | R        | S          | S        | R         | R          | R          | I         | R         | S          | S          | R                 |
| 11             | A36-1            | R        | S          | S        | R         | S          | S          | S         | S         | S          | S          | R                 |
| 12             | A37-1            | R        | S          | S        | S         | S          | S          | S         | S         | S          | S          | R                 |
| 13             | A38-1            | S        | S          | S        | S         | S          | S          | S         | S         | S          | S          | R                 |
| 14             | A38-2            | S        | S          | R        | R         | I          | R          | S         | S         | S          | S          | R                 |
| 15             | A50-1            | R        | S          | S        | R         | R          | S          | S         | I         | S          | S          | R                 |

Araştırmamızda identifiye edilen 15 *Aerococcus viridans* izolatının Siprofloksasin, Tigesiklin ve Trimetoprim-Sulfometoksazol'e % 100, Vankomisin'e %87, Eritromisin'e % 80, Tetrasiklin'e % 67, Penisilin ve Linezolide % 53.3 oranlarında duyarlı; Nitrofurantoin'e %93 ve Teikoplanin'e % 53.3 oranlarında dirençli olduğu görülmektedir (Tablo 14).

**Tablo 14.** Araştırmamızda izole edilen *A. viridans* suşlarının antibiyogram sonuçlarının yüzde değerleri

| İzolat                               | ANTİBİYOTİKLER |        |       |       |         |         |       |       |        |        |                |
|--------------------------------------|----------------|--------|-------|-------|---------|---------|-------|-------|--------|--------|----------------|
|                                      | P              | CIP    | E     | CM    | LNZ     | TEC     | VA    | TE    | TGC    | SXT    | Nitrofurantoin |
| <i>Aerococcus viridans</i><br>(n=15) | %53.3 S        | %100 S | %80S  | %40 S | %53.3 S | %46.7 S | %87 S | %67 S | %100 S | %100 S | %7 S           |
|                                      | %46.7 R        |        | %13 R | %60 R | %39.7 R | %53.3 R |       | %26 R |        |        | %93 R          |
|                                      |                |        | % 7 I |       | %7 I    |         | %13 I | %7 I  |        |        |                |

## 5. TARTIŞMA

Daha önceki yapılan çalışmalarda mastitis vakalarından Streptokok veya Stafilokok türleri olarak yanlışlıkla identifiye edildiklerinden dolayı, *A. viridans* izolasyon oranlarının minimum seviyede olduğu tahmin edilmektedir (Rasmussen 2013). Bununla birlikte, tanımlama tekniklerindeki gelişmeler, özellikle moleküler analizlerin uygulanması *A. viridans*'ın daha güvenilir bir şekilde tespit edilmesine yol açmıştır.

*Aerococcus*'un tür tanımlanmasında altın standart, 16S rRNA kodlayan genin dizilimine dayanır. Bu sekanslar, aerokok tanımlamasında güvenilirdir ve onları diğer cinslerden ve aynı cinsin türlerini birbirlerinden ayırmaktadır (Lawson ve ark, 2001). Ancak bu yöntem, rutin kullanım için zaman alıcı ve pratik değildir. Bu nedenle, matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometrisinin (MALDI-TOF MS) *Aerococcus* türlerinin tayini için iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Otuzbeş *Aerococcus* türünden birinin tayini için kullanıldığında, MALDI-TOF MS bu izolatların hepsini tür düzeyine doğru olarak tanımlamıştır (Christensen ve ark, 2012).

Moreno ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada MALDI-TOF MS tanımlaması için bakteriyel proteinler bir etanol / formik asit protokolü kullanılarak ekstrakte edilmiştir (Hijazin ve ark, 2012). Protein süspansiyonu (1 µl) parlak çelik bir plakaya aktarılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Numune, 1 ml matrisle (% 50 asetonitril /% 2.5 trifloroasetik asit içerisinde 10 mg a-siyano-4-hidroksi-sinamik asit mL<sup>-1</sup>) kaplanmış ve kütle spektrumları bir Microflex™™ kitle spektrometresi kullanılarak ölçülmüştür. Spektrumlar MALDI BioTyper™™ 3.0'a yüklenmiş ve üretici firmanın patentli kütüphanesi ile karşılaştırılmıştır ve log (skor) değeriyle sonuçlandırılmıştır. Çalışma sonucuna göre 22 izolatın tamamı *Aerococcus viridans* için log (skor) değerlerinin >2.0 olduğu MALDI BioTyper™™ ile tanımlanmıştır. Kısmi 16S rRNA gen sıralama, U45, U62 ve U83 izolatları ile gerçekleştirildi; Sekansları, *A. viridans* ATCC 11563'e % 99 özdeşlik gösterdiği bildirilmiştir. *Streptococcaceae* familyasının diğer cinsleri için gösterildiği gibi MALDI-TOF MS, *A. viridans* tanısı için güvenilir bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır (Cherkaoui ve ark, 2011; Kudirkiene ve ark, 2015; Moreno ve ark, 2015).

Saishu ve arkadaşları (2015) ayrıca, Japonya'da klinik mastitis vakalarından *A. viridans*'ın %8'inin varlığını bildirmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada, *A. viridans*'ın neden olduğu mastit insidansı, daha önce bildirilenlerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmadan önce, süt hayvanlarında hijyenik sağım uygulamalarında bir gelişme gözlenmiş ve bunun da *S. aureus* gibi bulaşıcı patojenlerin neden olduğu mastitis insidansında belirgin bir düşüş ile sonuçlanabileceği belirtilmiştir (Azevedo ve ark, 2016). Bununla birlikte, bu uygulama, iyi yönetilen sürülerde çevresel streptokoklar, *A. viridans*'lar ve fırsatçı bakteri olan koagulaz negatif stafilokok gibi diğer patojenlerin insidansında da düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (Ruegg, 2009). Buna ek olarak, çeşitli yönetim uygulamaları mastitis insidansını önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Ali ve ark, 2014). Karışık bakteri kültürlerinde izole edilmemiş 99 farklı bakteri ve 80 *A. viridans* subklinik mastitis ile ortaya çıkan inek sütünün saf kültürlerinde toplanmıştır. Bu veriler, *A. viridans*'ın sığır mastitisinde önemli bir rol oynayabildiğini ve subklinik mastitis vakalarında sekonder olarak bulunma olasılığını vurgulamaktadır.

Sun ve arkadaşlarının 2015 yılında yayınladığı çalışmanın bulguları *A. viridans*'ın, yıl içinde subklinik mastitis olgularından izole edilen en yaygın ikinci bakteri olduğunu ve kış aylarında artış görüldüğünü ortaya koymuştur. Liu ve arkadaşları 2015 yılında Kuzey Çin'de yaptıkları çalışmada *A. viridans*'ın kaynaklı subklinik mastitis izolasyon oranının %6.1 olduğunu bildirmişlerdir.

Hadimli ve arkadaşlarının 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada CMT testi ile tespit edilmiş 651 subklinikli mastitis örneğiyle çalışılmıştır. Toplam 104 Katalaz Negatif Gram Pozitif kok izolat; *S. agalactiae* (%12.50), *S. uberis* (%10.57), *E. faecalis* (%30.76), *E. faecium* (%1.30), *A. viridans* (%20.19), *L. lactis subsp lactis* (%1.92), *L. garvieae* (%0.96) ve *L. garvieae/lactis subsp. lactis* (%2.88) olarak tanımlanmış 3 izolatın (%2.88) ise tanımlanamadığı bildirilmiştir.

Araştırmamızda klinik ve subklinik mastitis görülen süt sığırlarından toplanan numunelerden yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda yeni nesil identifikasyon sistemleri ve genotipik identifikasyon yöntemleri kullanılarak daha önce yapılmış çalışmalara paralel olarak %15 oranında *A. viridans* izole ve tanımlanmıştır. Bu sayede, diğer patojen koklar ile identifikasyonu karışabilen ve tanımda gözden kaçan bir etken olan ve mastitisteki patogenezini ve rolü literatür verilerine göre tam olarak aydınlatılamamış olan *A. viridans* türlerinin varlığı ortaya konulmuştur.

Sun ve arkadaşlarının 2017 yılında yayınladığı çalışmada *Aerococcus viridans* izolatlarının çoğunluğunun, test edilen antimikrobiyal ajanların çoğuna iyi ile orta derecede arasında duyarlılık gösterdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, izolatların trimetoprim / sülfametoksazole karşı oldukça dirençli olduğu ve kısmen tetrasiklin, kanamisin, streptomisin, amikasin, klindamisin ve gentamisine dirençli olduğu bulunmuştur. Bu



çalışmanın sonuçları, *A. viridans*'ın hayvan kökenli izolatların  $\beta$ -laktamlara ve vankomisine oldukça duyarlı olduğunu (Martín ve diğerleri, 2007; Liu ve ark, 2015) gösteren bir çalışmanın bulgularıyla uyumlu bulunmuştur (Špaková ve diğerleri 2012). Trimetoprim / sülfametoksazol, tetrasiklin, klindamisin ve streptomisine direnç de önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Martín ve ark, 2007; Liu ve ark, 2015).

Saishu ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı çalışmada 13 antimikrobiyel maddenin antimikrobiyal duyarlılığı, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü kılavuzundaki M31-A3'e göre disk difüzyon yöntemi ile %5 defibrine koyun kanı ilave edilmiş Mueller-Hinton Agar kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan antimikrobik maddeler ve disk içeriği: penisilin (10 IU), ampisilin (10  $\mu$ g), amoksisilin-klavulanik asit (20/10  $\mu$ g), sefazolin (30  $\mu$ g), sefuroksim (30  $\mu$ g), streptomisin 10  $\mu$ g), gentamisin (10  $\mu$ g), eritromisin (15  $\mu$ g), klindamisin (2  $\mu$ g), vankomisin (30  $\mu$ g), siprofloksasin (5  $\mu$ g), kloramfenikol (30  $\mu$ g) ve tetrasiklin (30  $\mu$ g) olarak seçilmiştir. *Escherichia coli* ATCC25922 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kalite kontrol suşları olarak kullanılmıştır. İnhibisyon bölgesi çapları önceki çalışmada tanımlanan direnç kırılma noktaları ve CLSI belgesi M31-A3 kullanılarak yorumlanmıştır.

Owens ve arkadaşlarının 1990 yılında ve Spakova ve arkadaşlarının 2012 yıllarında yayınlanan araştırmalarında, sığır meme infeksiyonundan elde edilen *A. viridans* izolatlarının önemli bir kısmı streptomisin, tetrasiklin, eritromisin ve beta-laktamlara karşı dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Penisiline dirençli *A. viridans* suşları, insan vakalarından izole edilmiştir (Uh ve ark, 2002). Saishu ve arkadaşlarının 2015 yılında yayınlanan çalışmasında *A. viridans* izolatlarının çoğunda (% 89.7) klindamisine karşı direnç tespit edilmiştir. Klindamisin'in Japonya'daki klinik uygulamalarda veya inek yemlerinde kullanılmadığı için direncin kesin nedeni tespit edilememiştir.

Hadimli ve arkadaşlarının 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada *A. viridans* izolatlarının; oksitetrasiklin, ampisilin, penisilin G, amoksilin, kanamisin+sefaloksin, oksasilin ve amoksisilin+klavulanik asite %100 ve sefaperazona %90.4 duyarlı oldukları saptanmış, kloksasilin, linkomisin, linkomisin+spektinomisine ise %100 oranında dirençli oldukları tespit edilmiştir.

Araştırmamızda identifiye edilen *A. viridans* suşlarında literatür verilerine paralel olarak Tigesiklin, Vankomisin ve makrolidlere duyarlılık; Nitrofurantoin ve Teikoplanin'e karşı ise dirençlilik tespit edilmiştir. Söz konusu bulgulara ve gelişen çoklu ilaç direncine bağlı olarak, *A. viridans* kaynaklı mastitis olgularında, etken identifikasyonu ile birlikte

antibiogram muayenelerinin etkene yönelik olarak mutlaka yapılması gerektiği ortaya konulmuştur.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yıllarca *Aerococcus* türleri sadece bu bakterilere özel ilgi duyan laboratuvarlar tarafından tanımlanmıştır. Günümüzde *Aerococcus* infeksiyonlarının farkındalığının artması, *Aerococcus* türlerinin tanımlanması için geliştirilmiş araçlar ile birleşince, insan ve hayvan patojenleri olarak daha doğru bir şekilde değerlendirilmeye başlanmıştır. *Aerococcus* türlerinin doğru bir şekilde tanımlanması için biyokimyasal yöntemlerin yerine MALDI-TOF MS kullanılmaktadır. İdentifikasyonlarda yapılan hatalardan dolayı mastitis vakalarında gözden kaçmış olabilmesine rağmen, *Aerococcus viridans* gerek klinik gerekse subklinik mastitis olgularından izole edilebilen bir bakteri türüdür.

Altın standart olarak araştırmamızda da kullanılan 16S rRNA geninin dizilimine yönelik genotipik identifikasyon ve otomatize ileri identifikasyon sistemi olan MALDI-TOF MS ile birlikte, klinik ve subklinik mastitisli sığırlardan 15 adet (%15) *A. viridans* identifikasyonu yapılmıştır. Ayrıca Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) belirleme yöntemine dayalı olarak yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde, identifiye edilen suşlarda çoklu antibiyotik direnci geliştiği saptanmıştır.

Süt sığırcılığı yapılan işletmelerde ciddi ekonomik kayıplara neden olan mastitis teşhisinin titizlikle yapılması gerektiği bilinmektedir. *A. viridans* izolasyon ve identifikasyonunda yapılan hataların en aza indirilmesi amacıyla rutin muayene prosedürleri arasına PCR testleri ve MALDI-TOF MS analizlerinin eklenmesi, identifiye edilen etkene yönelik antibiyotiklerin belirlenmesi önem kazanmıştır. Elde edilen verilerin, ileride yapılacak araştırmalara *A. viridans* etkeninin sığırlarda gerek klinik, gerekse subklinik mastitis hastalığında oynadığı rolün aydınlatılması açısından ışık tutması umulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Aguirre M, Collins MD.** Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*- like organisms from urinary tract infections: description of *Aerococcus urinae* sp. nov. *Journal of General Microbiology* 1992;138:401e5.
- Alozie A, Yerebakan C, Westphal B, Steinhoff G, Podbielski A.** Culture-negative infective endocarditis of the aortic valve due to *Aerococcus urinae*: a rare aetiology. *Heart Lung Circulation* 2012, 21, 231-233.
- Arruda AG, Godden S, Rapnicki P, Gorden P, Timms L, Aly SS, Lehenbauer TW and Champagne J.** Randomized noninferiority clinical trial evaluating 3 commercial dry cow mastitis preparations: I. quarter-level outcomes. *Journal Dairy Science*. 2013, 96: 4419–4435.
- Barberg AE, Endres MI, Salfer JA. and Reneau JK.** Performance and welfare of dairy cows in an alternative housing system in Minnesota. *Journal of Dairy Science*. 2007, 90, 1575–1583.
- Bradley A.** Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal*, 2002, 164, 116–128.
- Bruegger D, Beiras-Fernandez A, Weis F, Weis M, Kur F.** Extracorporeal support in a patient with cardiogenic shock due to *Aerococcus urinae* endocarditis. *The Journal of Heart Valve Disease* 2009, 18, 418-420.
- Cattoir V, Kobal A, Legrand P.** *Aerococcus urinae* and *Aerococcus sanguinicola*, two frequently misidentified uropathogens. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2010, 42, 775-780.
- Cattoir V, Kobal A, Legrand P.** First molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Aerococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55, 451-452.
- Chen LY, Yu WC, Huang SH, Lin ML, Chen TL, Fung CP.** Successful treatment of *Aerococcus viridans* endocarditis in a patient allergic to penicillin. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2012, 45, 158–160.
- Christensen JJ, Dargis R, Hammer M, Justesen US, Nielsen XC, Kemp M.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of Gram-positive, catalase- negative cocci not belonging to the *Streptococcus* or *Enterococcus* genus and benefits of database extension. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50, 1787-1791.

- Christensen JJ, Jensen IP, Faerk J, Kristensen B, Skov R, Korner B.** Bacteremia/septicemia due to Aerococcus-like organisms: report of seventeen cases. Danish ALO Study Group. *Clinical Infectious Diseases*, 1995, 21, 943-947.
- Christensen JJ, Korner B, Casals JB, Pringler N.** Aerococcus-like organisms: use of antibiograms for diagnostic and taxonomic purposes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996, 38, 253-258.
- Christensen JJ, Korner B, Kjaergaard H.** Aerococcus-like organism an unnoticed urinary tract pathogen. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 1989, 97, 539-546.
- Christensen JJ, Vibits H, Ursing J, Korner B.** Aerococcus-like organism, a newly recognized potential urinary tract pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, 29, 1049-1053.
- Collins MD, Jovita MR, Hutson RA, Ohle'n M, Falsen E.** Aerococcus christensenii sp. nov., from the human vagina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1999, 49, 1125-1128.
- de Jong MFC, Soetekouw R, Kate ten RW, Veenendaal D.** Aerococcus urinae: severe and fatal bloodstream infections and endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48, 3445-3447.
- Devriese LA, Hommez J, Laevens H, Pot B, Vandamme P, Haesebrouck F.** Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci, and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Microbiology*, 1999, 70, 87-94.
- Ebnöther C, Altwegg M, Gottschalk J, Seebach JD, Kronenberg A.** Aerococcus urinae endocarditis: case report and review of the literature. *Infection* 2002, 30, 310-313.
- Facklam R, Lovgren M, Shewmaker PL, Tyrrell G.** Phenotypic description and antimicrobial susceptibilities of Aerococcus sanguinicola isolates from human clinical samples *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41, 2587-2592.
- Facklam R, Elliott JA.** 1995. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, 479-495.
- Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D.** The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nature Reviews Microbiology* 2006, 4, 445-457.

- Fogsgaard KK, Bennedsgaard TW, Herskin MS.** Behavioral changes in freestall-housed dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98, 1730-1738.
- Hadimli HH, Sayın Z, Erganiş O, Kav K.** Subklinik mastitisli süt ineklerinden izole edilen katalaz negatif Gram pozitif kokların identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Eurasian Journal of Veterinary Science* 2013, 29(3), 153-158
- Gopalachar A, Akins RL, Davis WD, Siddiqui AA.** Urinary tract infection caused by *Aerococcus viridans* a case report. *Medical Science Monitor*. 2004, 10, 73–75.
- Grude N, Jenkins A, Tveten Y, Kristiansen BE.** Identification of *Aerococcus urinae* in urine samples. *Clinical Microbiology and Infection*, 2003, 9, 976-979.
- Guccione J, Nizza S, Mallardo K, Cantiello A, Fiorito F, Loria AD.** Penicillin-resistant *Aerococcus viridans* bacteremia associated with bovine severe respiratory syndrome. *Open Journal of Veterinary Medicine*. 2013, 03, 131–135.
- Guccione J, Nizza S, Mallardo K, Cantiello A, Fiorito F.** Penicillin-resistant *Aerococcus viridans* bacteremia associated with bovine severe respiratory syndrome. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 03, 131–135.
- Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H.** Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Veterinary Quarterly*, 2007, 29, 18–31.
- Hijazin M, Alber J, Lämmler C, Weitzel T, Hassan AA, Timke M, Kostrzewa M, Prenger-Berninghoff E, Zschöck M.** Identification of *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *bernardiae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis and by species-specific PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 2012, 61, 457–459.
- Humphries RM, Lee C, Hindler JA.** *Aerococcus urinae* and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49, 3934e3935.
- Ibler K, Truberg Jensen K, Ostergaard C, Soñksen UW, Bruun B, Schönheyder HC.** Six cases of *Aerococcus sanguinicola* infection: clinical relevance and bacterial identification. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2008, 40, 761-765.
- Janosek J, Eckert J, Hudac A.** *Aerococcus viridans* as a causative agent of infectious endocarditis. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology*, 1980, 24, 92-96.
- Ke X, Lu M, Ye X, Gao F, Zhu H, Huang Z.** Recovery and pathogenicity analysis of *Aerococcus viridans* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in southwest of China. *Aquaculture*, 2012, 43, 18–23.

- Kerbaugh MA, Evans JB.** *Aerococcus viridans* in the hospital environment. *Journal of Applied Microbiology*, 1968, 16, 519–523.
- Lawson PA, Falsen E, Ohle'n M, Collins MD.** *Aerococcus urinaehominis* sp. nov., isolated from human urine, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001,51, 683-686.
- Lawson PA, Falsen E, Truberg-Jensen K, Collins MD.** *Aerococcus sanguicola* sp. nov., isolated from a human clinical source. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001, 51, 475-479.
- Leite A, Vinhas-Da-Silva A, Fel'cio L, Vilarinho AC, Ferreira G.** *Aerococcus viridans* urinary tract infection in a pediatric patient with secondary pseudohypoaldosteronism. *Revista Argentina de Microbiología*, 2010, 42, 269-270.
- Liu G, Liu Y, Ali T, Ferreri M, Gao J, Chen W, Yin J, Su J, Fanning S, Han B.** Molecular and phenotypic characterization of *Aerococcus viridans* associated with subclinical bovine mastitis *PLoS One*, 2015, 10(4), 0125001.
- Martin V, Vela AI, Gilbert M, Cebolla J, Goyache J, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF.** Characterization of *Aerococcus viridans* isolates from swine clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007, 45, 3053–3057.
- Nathavitharana KA, Arseculeratne SN, Aponso HA, Vijeratnam R, Jayasena L, Navaratnam C.** Acute meningitis in early childhood caused by *Aerococcus viridans*. *British Medical Journal (Clinical Research Edition)*, 1983;286:1248.
- Owens WE, Watts JL, Greene BB, Ray CH.** Minimum inhibitory concentrations and disk zone diameter for selected antibiotics against streptococci from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 1990, 73, 1225–1231.
- Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Mylly V, Honkanen-Buzalski T.** Bovine Mastitis in Finland 2001—Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87, 2433–2441.
- Popescu G-A, Benea E, Mitache E, Piper C, Horstkotte D.** An unusual bacterium, *Aerococcus viridans*, and four cases of infective endocarditis. *The Journal of Heart Valve Disease*, 2005, 14, 317-319.
- Rasmussen M.** *Aerococci*: hard to find and classify. *Revista Argentina de Microbiología* 2011, 43, 312.
- Rasmussen M.** *Aerococcus viridans* is not a matter of opinion. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 2012, 40, 112.

- Rasmussen M.** Aerococci and aerococcal infections. *Journal of Infection*, 2013, 66, 467–474.
- Razeq JH, Thomas GM, Alexander D.** The first reported case of *Aerococcus* bacteremia in a patient with HIV infection. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 1999, 5, 838–839.
- Saishu N, Morimoto K, Yamasato H, Ozaki H, Murase T.** Characterization of *Aerococcus viridans* isolated from milk samples from cows with mastitis and manure samples. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2015, 77(9), 1037–1042.
- Schuur PM, Kasteren ME, Sabbe L, Vos MC, Janssens MM, Buiting AG.** Urinary tract infections with *Aerococcus urinae* in the south of The Netherlands. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 1997, 16, 871-875.
- Senneby E, Petersson AC, Rasmussen M.** Clinical and microbiological features of bacteraemia with *Aerococcus urinae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 18, 546-550.
- Senneby E, Nilson B, Petersson AC, Rasmussen M.** Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry is a sensitive and specific method for identification of *Aerococci*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013, 51, 1303–1304.
- Shannon O, Mo'rgelin M, Rasmussen M.** Platelet activation and biofilm formation by *Aerococcus urinae*, an endocarditis causing pathogen. *Infection and Immunity*, 2010, 78, 4268-4275.
- Shelton-Dodge K, Vetter EA, Kohner PC, Nyre LM, Patel R.** Clinical significance and antimicrobial susceptibilities of *Aerococcus sanguinicola* and *Aerococcus urinae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2011, 70, 448-451.
- Sierra-Hoffman M, Watkins K, Jinadatha C, Fader R, Carpenter JL.** Clinical significance of *Aerococcus urinae*: a retrospective review. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2005, 53, 289-292.
- Skov R, Christensen JJ, Korner B, Frimodt-Møller N, Espersen F.** In vitro antimicrobial susceptibility of *Aerococcus urinae* to 14 antibiotics, and time-kill curves for penicillin, gentamicin and vancomycin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2001, 48:653-658.
- Slany M, Freiburger T, Pavlik P, Cerny J.** Culture-negative infective endocarditis caused by *Aerococcus urinae*. *The Journal of Heart Valve Disease*, 2007, 16, 203-205.
- Spaková T, Elecko J, Vasil M, Legáth J, Pristas P, Javorský P.** Limited genetic diversity of *Aerococcus viridans* strains isolated from clinical and subclinical cases of bovine mastitis in Slovakia. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2012, 15, 329–335.



- Stebbing PD, Pond MJ, Peeler E, Small HJ, Greenwood SJ, Verner-Jeffreys D.** Limited prevalence of gaffkaemia (*Aerococcus viridans* var. *homari*) isolated from wild-caught European lobsters *Homarus gammarus* in England and Wales. *Diseases o Aquatic Organisms*, 2012, 100, 159–167.
- Taylor PW, Trueblood MC.** Septic arthritis due to *Aerococcus viridans*. *The Journal of Rheumatology*, 1985, 12, 1004-1005.
- Tekin A, Tekin G, Turunc, T, Demiroglu Z, Kizilkiliç O.** Infective endocarditis and spondylodiscitis in a patient due to *Aerococcus urinae*: first report. *International Journal of Cardiology*, 2007, 115, 402-403.
- Uh Y, Son JS, Jang IH, Yoon KJ, Hong SK.** Penicillin-resistant *Aerococcus viridans* bacteremia associated with granulocytopenia. *Journal of Korean Medical Science*, 2002, 17, 113–115.
- Untereker WJ, Hanna BA.** Endocarditis and osteomyelitis caused by *Aerococcus viridans*. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 1976, 43, 248-252.
- Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. The Firmicutes. Williams & Wilkins; 2009.
- Wellenberg GJ, van der Poel WHM, Van Oirschot JT.** Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*. 2002, 88, 27–45.
- Williams REO, Hirsch A, Cowan ST.** *Aerococcus*, a new bacterial genus. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 1953, 8, 475-480.
- Wise MG, Siragusa GR.** Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable- based diets. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102, 1138-1149.
- Zadoks RN, González RN, Boor KJ, Schukken YH.** Mastitis-causing streptococci are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. *Journal of Food Protection*. 2004, 67, 2644–2650.
- Zbinden R, Santanam P, Hunziker L, Leuzinger B, Graevenitz vonA.** Endocarditis due to *Aerococcus urinae*: diagnostic tests, fatty acid composition and killing kinetics. *Infection*, 1999, 27, 122-124.
- Zhou W, Niu D, Zhang Z, Ning M, Shen H, Zhang K.** Vancomycin resistance due to VanA in an *Aerococcus viridans* isolate. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2014, 32, 462.

# ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : OKLAY, Mehmet Ali  
**Uyruk** : T.C  
**Doğum yeri ve tarihi** : Söke/ 21.07.1962  
**Telefon** : 05323230436  
**E-mail** : canancabu@hotmail.com  
**Yabancı Dil** : İngilizce

## EĞİTİM

| Derece | Kurum               | Mezuniyet tarihi |
|--------|---------------------|------------------|
| Lisans | Ankara Üniversitesi | 14.06.1985       |

## İŞ DENEYİMİ

|           |  |                 |
|-----------|--|-----------------|
| 1985-1990 | Tanmanlar Koyunculuk<br>Söktav Yumurta<br>Serbest Veteriner Hekimlik | Veteriner Hekim |
| 1990-2010 | Hisar A.Ş Salyangoz Fabrikası  | Sorumlu Müdür   |
| 2010-2018 | Serbest Veteriner Hekimlik   | Veteriner Hekim |

## AKADEMİK YAYINLAR

### 1. MAKALELER

xxx

### 2. PROJELER

xxx

### 3. BİLDİRİLER

#### A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

xxx

#### B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

xxx