



**T.C.**  
**HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇİĞ SÜTLERDEN *ENTEROCOCCUS* SPP. İZOLASYONU,  
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK VE BAZI VİRULANS FAKTÖRLERİN  
BELİRLENMESİ**

**Deniz MÜRŞİTOĞLU**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY  
MAYIS-2019**



T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇİĞ SÜTLERDEN *ENTEROCOCCUS* SPP. İZOLASYONU, ANTİBİYOTİK  
DİRENÇLİLİK VE BAZI VİRULANS FAKTÖRLERİN BELİRLENMESİ

Deniz MÜRŞİTOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY  
MAYIS-2019

T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİĞ SÜTLERDEN *ENTEROCOCCUS* SPP. İZOLASYONU, ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK VE BAZI VİRULANS FAKTÖRLERİN BELİRLENMESİ**

**Deniz MÜRŞİTOĞLU  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Doç. Dr. Ebru Şebnem YILMAZ danışmanlığında hazırlanan bu tez **24/05/2019** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ/OYÇOKLUĞU** ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ebru Şebnem Yılmaz  
Başkan

Prof. Dr. Özkan Aslantaş  
Üye

Doç. Dr. Tülin Arasoğlu  
Üye

**Kod No:**

**Prof. Dr. Erdal SERTKAYA  
Enstitü Müdürü**

Bu çalışma HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 18.YL.057

**Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.**

24.05.2019

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

**Deniz MÜRŞİTOĞLU**

## ÖZET

### ÇİĞ SÜTLERDEN *ENTEROCOCCUS* SPP. İZOLASYONU, ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK VE BAZI VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışmada Hatay ilinde satışa sunulan çiğ sütlerde enterokok türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu, izolatların antibiyotiklere olan duyarlılıklarının, dirence aracılık eden mekanizmaların ve virülens genlerinin (*asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* ve *hyl*) belirlenmesi amaçlandı. Bu kapsamda incelenen 120 çiğ süt örneğinin 95'inden (%79.2) *Enterococcus* spp. izole edildi. Tür spesifik primerlerle yapılan Poimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile izolatların 87'si (%91.6) *E. faecalis*, 5'i (%5.3) *E. faecium*, 2'si (%2.1) *E. durans* ve 1'i de (%1.1) *E. gallinarium* olarak tanımlandı. İzolatların tamamı vankomisine duyarlı bulunurken, %41,1'i (n=39) tetrasikline, %33,7'si (n=32) rifampine, %27,4'ü ampisiline (n=26), %11,6'sı eritromisine (n=11), %5,3'ü yüksek düzeyde gentamisine (n=5), %3,2'si kloramfenikole (n=3) ve %2,1'i (n=2) de siproflaksasine dirençli bulundu. İzolatların 29'u (%30,5) ise incelenen tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu. mPZR ile araştırılan virülens genleri izolatların 84'ünde (%88,4) saptandı. En yaygın virülens geni olarak *gelE* (67, %79,8) saptanırken; bunu sırasıyla *asa1* (54, %64,3), *esp* (53, %63,1) ve *cylA* geni (9, %10,7) izledi. İzolatların hiçbirinde ise *hyl* geni tespit edilmedi. Tetrasiklin dirençli izolatların 32'inde *tetM*, 2'sinde *tetK*, 2'sinde *tetL* ve 4'ünde *tetM* ve *tetK* birlikte tespit edildi. Eritromisin direnç genlerinden *ermB* 8 izolatta ve *ermA* 1 izolatta, *cat* geni ise kloramfenikol dirençli izolatların sadece 1'inde tespit edildi. Aminoglikozid dirençli izolatların 3'ünde *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia* geni, 1'inde ise *aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia* + *aph(3)-IIIa* geni birlikte belirlendi.

Çalışmanın sonuçları çiğ sütlerin antibiyotik direnç ve virülens genleri yönünden önemli bir rezervuar olduğunu göstermiştir. Çiğ sütlerin tüketilmesi sonucunda gastrointestinal sistemde bulunan diğer bakterilere bu genlerin aktarılması halk sağlığı açısından potansiyel öneme sahiptir. Bu nedenle çiğ sütlerdeki bakterilerin antibiyotik direnç profillerinin ve virülens özelliklerinin sürekli izlenmesi önem arz etmektedir.

2019, 49 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Çiğ süt, *Enterococcus* spp., antimikrobiyal direnç, virülens genleri

## ABSTRACT

### ISOLATION OF *ENTEROCOCCUS* SPP., DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE AND DETECTION OF SOME VIRULENCE FACTORS IN RAW MILK

In this study, it was aimed to isolate and identify *Enterococcus* spp. in raw milks sold in Hatay province, to investigate antibiotic susceptibilities and resistance mechanisms implicated and presence of virulence genes (*asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* and *hyl*) of the isolates. To this end, 120 raw milk samples examined and *Enterococcus* spp. was isolated in 95 (79.2%) raw milk samples. Of the 95 *Enterococcus* spp., 87 (91.6%) were identified as *E. faecalis*, 5 (5.3%) as *E. faecium*, 2 (2.1%) as *E. durans* and 1 (1.1%) as *E. gallinarium* by using species specific Polymerase Chain Reaction (PCR). While all isolates were susceptible to vancomycin, various rates of resistance to tetracycline (41.1%, n=39), rifampine (33.7%, n=32), ampicillin (27.4%, n=26), erythromycin (11.6%, n=11), gentamicin (5.3%, n=5), chloramphenicol (3.2%, n=3), and ciproflaxine (2.1%, n=2) were determined. Twentynine (30.5%) isolates were susceptible to all antibiotics tested. The virulence genes were detected in 84 (88.4%) of the isolates. The most common virulence gene was *gelE* (67, 79.8%), followed by *asa1* (54, 64.3%), *esp* (53, 63.1%) and *cylA* gene (9, 10.7%) by mPZR. The *hyl* gene was not detected in any of the isolates. The most common gene detected in tetracycline-resistant isolates was *tetM* (n=32), followed by *tetM-tetK* (n=4), *tetK* (n=2) and *tetL* (n=2), respectively. Erythromycin resistance was associated with *ermB* (n=8) and *ermA* (n=1), whereas *cat* gene was only detected in one isolate. Among aminoglycoside-resistant isolates, three isolates carried *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene, one carried both *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* and *aph(3)-IIIa*,

The results of the study indicated that raw milk is an important reservoir for antibiotic resistance and virulence genes. Consumption of raw milk causes a potential risk to public health due to the transfer of these genes to the other bacteria in the gastrointestinal tract Therefore it is important to monitor the antibiotic resistance profiles and virulence characteristics of the bacteria in raw milk.

2019, 49 pages

**Key words:** Raw milk, *Enterococcus* spp., antimicrobial resistance, virulence genes

## TEŐEKKÖR

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Ebru Şebnem YILMAZ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi birikimi ve tecrübesiyle yardımlarını benden esirgemeyen saygıdeğer Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma tüm hayatım boyunca her kararımda arkamda olan, desteklerini bir an olsun düşünmeden sunan, her zaman başarı ve mutluluğumu isteyen ve bunun için ellerinden geleni yapan sevgili annem Belgin MÖRŐİTOđLU'na, kardeşlerim Derya MÖRŐİTOđLU ve Demet MÖRŐİTOđLU'na sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enterokoklar.....	2
1.2. Enterokokların Tarihçesi.....	2
1.3. Enterokokların Taksonomisi.....	3
1.4. Enterokokların Mikrobiyolojik Özellikleri.....	3
1.5. Enterokokların Yaptığı Hastalıklar.....	6
1.6. Enterokoklarda Antibiyotik Direnci.....	7
1.6.1. Hücre Membranına Etki Gösteren Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları.....	9
1.6.2. Ribozoma Etki Gösteren Antibiyotiklerin Direnç Mekanizmaları.....	10
1.6.3. Nükleik Asit Sentezine Etki Eden Kinolon Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları.....	11
1.7. Enterokoklarda Virülens Faktörleri.....	12
1.7.1. Konak Hücrelerdeki Kolonizasyonda Rol Oynayan Yüzey Faktörleri.....	13
1.7.2. Yüzey Faktörleri.....	14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	16
3. MATERYAL ve METOT.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Çiğ Süt Örneklerinin Toplanması.....	20
3.1.2. Standart Suşlar.....	20
3.1.3. Kullanılan Antibiyotik Diskleri.....	21
3.1.4. Primerler.....	21
3.2. Metot.....	23
3.2.1. <i>Enterococcus</i> spp. İzolasyonu.....	23
3.2.2. Enterokokların İdentifikasyonu.....	24
3.2.3. Enterokokların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	24
3.2.4. Genomik DNA Ekstraksiyonu.....	24
3.2.5. Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi.....	25
3.2.6. Virülens Genlerinin Belirlenmesi.....	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	26
4.1. Enterokok İzolasyonu ve İdentifikasyon.....	26
4.2. Antibiyogram Sonuçları.....	27
4.3. Antibiyotik Direnç Genlerinin Tepiti.....	28
4.4. Virülens Genlerinin Tespiti.....	29



4.5. Tartışma.....	30
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	38
KAYNAKLAR .....	39
ÖZGEÇMİŞ .....	49



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enterokoklarda antibiyotik direnç mekanizması .....	8
Şekil 3.1. Örneklerin toplandığı ilçeler .....	20
Şekil 3.2. Enterococcosel Broth'da enterokok inkübasyonu .....	23
Şekil 4.1. <i>Enterococcus</i> spp., <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> agaroz jel elektroforez görüntüsü	26
Şekil 4.2. <i>E. gallinarium</i> agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	26
Şekil 4.3. <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarında tespit edilen eritromisin direnç genlerinin agaroz jel elektroforezde görüntüsü. ....	28
Şekil 4.4. <i>Enterococcus</i> spp. suşlarında kloramfenikol dirençli izolatlardan belirlenen <i>cat</i> genine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	29
Şekil 4.5. Gentamisin dirençli izolatlarda belirlenen aminoglikozid direnç genlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	29

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enterokokların sınıflandırılması .....	3
Çizelge 1.2. Fenotipik özelliklerine göre enterokok türlerinin sınıflaması.....	4
Çizelge 1.3. Enterokolarda bulunan önemli virülens genleri.....	12
Çizelge 3.1. Enterokokların cins-tür spesifik tanımlanmaları için kullanılan primerler.	21
Çizelge 3.2. Antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler .....	22
Çizelge 3.3. Virülens genlerin belirlenmesinde kullanılan primerler .....	23
Çizelge 4.1. <i>Enterococcus</i> spp.'lerin antibiyotik direnç genleri.....	27
Çizelge 4.2. Virülens genlerin enterokok türlerine göre dağılımı.....	30



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

$\mu$  : Mikron

### KISALTMALAR

ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AF	:Agregasyon Faktörü
AFLP	:Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi
<i>agg</i>	:Agregasyon Maddesi
AME	:Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimler
Bp	:Baz Çifti
<i>cat</i>	:Kloramfenikol Asetil Transferaz
CLSI	:Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CNA	:Columbia-Kolistin-Nalidiksik Asit Agar
cpsA-K	:Konakçı Savunma Sistemine Direnç Oluşturan Ekzopolisakkarit Yapıdaki Kapsüler Polisakkarit
<i>cyl</i>	:Sitolizin
<i>cylA-M</i>	:Sitolizin, Hemolizin
<i>efaA</i>	:Endokarditis Spesifik Antijen
<i>erm</i>	:Eritromisin Ribozom Metilaz
<i>esp</i>	:Enterokokal Yüzey Proteinleri
<i>gelE</i>	:Jelatinaz
<i>hyl</i>	:Hyaluronidaz
hypR	:Transkripsiyonu Düzenleyen Hidrojen Peroksit Düzenleyici
LAP	:Lösinaminopeptidaz
MDR	:Çoklu Antibiyotik Direnci
MIC	:Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MLST	:Multilokus Sekans Tiplendirme

mPZR	:Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NB	Nutrient Broth
NaCl	:Sodyum Klorür
PEA	:Fenil Etil Alkol Agar
PFGE	:Atılımlı Alan Jel Elektroforezi
PZR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	:Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RT-PZR	:Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>sprE</i>	:Serin Proteaz
TS	:Türk Standartları
VRE	:Vankomisin Dirençli Enterokok

## 1. GİRİŞ

Vücudun ihtiyacı olan besinleri ve enerjiyi her gün yeterli miktarda almak dengeli beslenmedir. En önemli besin kaynaklarımızdan biri de süt ve süt ürünleridir. Süt içeriğinde var olan protein, kalsiyum, fosfor, B2 ve B12 vitamini gibi birçok besin maddesinin kaynağı olduğundan insan beslenmesinde önemlidir (Jain, 1998; Black ve ark., 2002). Endüstriyel gelişimle beraber tüketicilerin talepleri daha sağlıklı ve daha doğal hayvansal ürünlere yönelmektedir. Bunlardan biri de çiğ süttür (Zastempowska ve ark., 2016). Türk Standartları (TS) 1018 çiğ süt standardına göre süt; inek, koyun, keçi ve mandaların meme bezlerinden salgılanan, kendine has tat ve kıvamı olan, içine başka maddeler karıştırılmamış, içinden herhangi bir maddesi alınmamış, beyaz veya krem renkli sıvıdır (Besler ve Ünal, 2006).

Çiğ sütte bulunan patojen bakterileri süütün besin değerine zarar vermeden yok etmek için pastörizasyon veya ultra yüksek ısı (UHT) gibi işlemler uygulanmaktadır. Ancak Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde süt üreticilerinden tüketiciye direkt satılabilmektedir (Arabacıoğlu Özbilen 1993; Miller ve ark., 2000). Süt soğuk zincirle taşınmadığı durumlarda ise içeriğinde bulunan mikroorganizma sayısında artış ve besin değerinde azalma gözlenebilmektedir (Ordolf 2001; Sun ve ark., 2001).

Halk sağlığı ve gıda güvenliği uzmanları, dünya çapında her yıl milyonlarca hastalığın patojenlerle kontamine olmuş gıdaların tüketilmesiyle ilişkili olabileceğini bildirmiştir. Süt gıda kaynaklı patojenler için önemli bir rezervuardır (Oliver ve ark., 2005).

Süt mikrobiyotasındaki bakterileri tespit etmek çevresel faktörlerden dolayı çok karmaşıktır ve genellikle baskın tür laktik asit bakterileridir. Bunlar, *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Streptococcus* spp. ve *Enterococcus* spp.'dir. Diğer baskın mikroorganizmalar ise *Micrococcaceae* ve *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri ile *Staphylococcus* spp., filamentöz küf ve mayalardır (Quigley ve ark., 2013).

Enterokok türlerinin psikotrofik yapısı, ısı direnci, farklı substratlarda üreme özelliği nedeniyle süütün soğutulması sırasında bile sayıları artabilir ve pastörizasyon sonrasında dahi hayatta kalabilirler. Süt ürünlerinde enterokokların çok fazla olmasının sebebi yıllardır sağım sırası ve sonrasındaki sağlık koşullarına uygunsuzluk olduğu düşünülmüştür. Bir yandan starter kültür olarak faydalı iken diğer yandan fekal

kontaminasyonun indikatörü olarak da kabul edilmektedir. Bundan dolayı enterokoklar hem çiğ süt hem pastörize süt mikroflorasının bir parçasıdır (Franz ve ark., 1999; Giraffa, 2003). Halk sağlığı açısından enterokoklar taşıdıkları pek çok direnç ve virülens genleri bakımından önemlidir. İnsanlarda, hayvanlarda ve diğer bakterilerde antibiyotik direnç genlerini aktararak antibiyotik direncinin artmasına sebep olabilirler (Murray, 1990; Klare ve ark., 2003).

Gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda yapılan çalışmalarda enterokoklarda artan antimikrobiyal direnç dikkat çekmektedir. Hayvansal kaynaklı gıdalarda dirençli enterokoklar için bir rezervuar görevi yapabilir ve antibiyotik direnç genleri gıdalar yoluyla insanlara bulaşabilir (Elmalı ve Can, 2018). Bu yüzden gıdalardaki dirençli enterokokların varlığının belirlenmesi önem arz eder.

### **1.1. Enterokoklar**

Enterokok cinsi içinde yer alan türler geniş bir konakçı dağılımına sahip olup (çeşitli hayvanlarda, bitkilerde, insanların gastrointestinal ve ürogenital sistemlerinin doğal florasında) özellikle de süt ürünlerinde sıklıkla bulunan Gram pozitif koklardır (Faclam ve ark., 1998; Quednau ve ark., 1998). Yüzey sularında, akarsularda, lağım sularında, toprakta ve çeşitli besin maddelerinde bulunabilirler (Harwood ve ark., 2001). Enterokoklar, insan dışkısında bulunan suda yeterli üreyemeyen ancak koliformlara oranla daha fazla canlılıklarını koruyan bakterilerdir. Bu nedenle özellikle sularda hijyen indikatörü olarak kullanılmaktadır (Arizcun ve ark., 1997). *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* en sık karşılaşılan ve en önemli iki türü olup insanlarda patojeniteye sebep olmalarıyla birlikte fermente gıdaların üretimi ve probiyotik ürün teknolojisinde önemli rolleri bulunmaktadır (Giraffa, 2003). Süte uygulanan pastörizasyon işlemi ile uzaklaştırılmazlar ve donmaya ya da kurutmaya karşı *E. coli*'ye göre dayanıklıdırlar (Nalvuran, 2013).

### **1.2. Enterokokların Tarihçesi**

Enterokok ismi ilk kez 1889 tarihinde Thiercellin tarafından kullanılmıştır (Murray, 1990). Andrewes ve Holder 1906 yılında *Streptococcus faecalis*'i, Orla-Jensen

ise 1919 yılında *Streptococcus faecium*'u tanımlamıştır (Koneman ve ark., 1992). 1933 yılında Lancefield tarafından D grubu antijene sahip olan fekal streptokoklar için serolojik bir tiplendirme geliştirilmiştir. 1937 yılında Sherman'ın sınıflandırmasıyla streptokok türleri dört grupta incelenmişlerdir. Bunlar: piyojenik streptokoklar, viridans streptokoklar, laktik streptokoklar ve enterokoklardır. Bergey's Manual'de 1984 yılında enterokokların ayrı bir cins olarak sınıflandırılması gerektiğini ileri sürmüştür. Böylece daha önceden, hücre duvarı antijen yapısına göre Lancefield tarafından D grubu streptokoklar grubunda gösterilen enterokokların, D grubu streptokoklardan ayrı bir cins olduğu belirlenmiştir (Moellering, 1995). 1993 yılında ise Thiercellin ve Jouhaud tarafından *Enterococcus* olarak tanımlanmıştır (Kompra ve ark., 2010). Modern sınıflandırma tekniği ile *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Enterococcus* olmak üzere 3 ayrı cins başlığı oluşmuştur (Franz ve ark., 1999).

### 1.3. Enterokokların Taksonomisi

*Enterococcus* sınıflandırması Çizelge 1.1' de gösterilmiştir (Faklam ve Teixeira, 1998).

Çizelge 1.1. Enterokokların sınıflandırılması

<b>Kingdom</b>	<b>Bacteria</b>
Division	Firmicutes
Classis	Bacilli
Ordo	Lactobacillales
Familia	Enterococcaceae
Genus	<i>Enterococcus</i>

### 1.4. Enterokokların Mikrobiyolojik Özellikleri

Enterokoklar gram pozitif, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, hareketsiz bakterilerdir (Dağdemir ve Özdemir, 2006). Yaklaşık 1µm çapında, sitokrom enzimleri olmadığından katalaz negatiftir. Fakat bazı türlerde 'pseudo katalaz' yapımı görülmüştür. Oksidaz negatif, fakültatif anaerobik, tek çift veya kısa zincirler halinde olan koklardır (Teixeria ve ark., 2003; Diker ve ark., 2011). Optimum gelişme



sıcaklıkları 37 °C, G+C oranı %37-45 arasındadır (Gilmore, 2002; Tendolkar ve ark., 2003; Karataş, 2005; Fisher ve Philips, 2009). Mikroskobik olarak streptokok türünden ayırt edilemezler (Çelik ve Alhan, 2008). 10-45°C'de %5-10 NaCl'li ortamda ve pH 4.0-9.6 gibi geniş aralıklarda üreyebilme özelliklerinden dolayı Gram pozitif koklardan kolaylıkla ayrılabilir. Kolaylıkla ayrılabilir.

Birçok enterokok suşu fruktoz, galaktoz, maltoz, sellebiyoz, mellebiyoz ve laktozdan asit üretebilmektedir. Enerji kaynağı olarak argininden amonyak üretebilirler (Kılıç, 2001). Enterokoklarda, mannitol, sorbitol, sorboz içeren sıvı besiyerlerinde arginin hidroliz etmeleri ve asit oluşturmalarına göre beş grupta incelenmektedir.

**Grup I;** mannitol, sorbitol ve sorboz sıvı besiyerinde asit oluştururlar ve arginini hidrolize etmezler.

**Grup II;** mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar. Arginini hidrolize ederler, sorbozdan asit oluşturmazlar, sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon gösterirler.

**Grup III;** arginini hidrolize ederler, D antijeni içermezler. Mannitol sorboz ve sorbitol içeren besiyerlerinde asit oluşturmazlar.

**Grup IV;** arginini hidroliz etmezler. Mannitol ve sorboz içeren esiyerlerinde asit oluşturmazlar. Sorbitol içeren sıvı besiyerinde sadece *E. cecorum* asit oluşturur.

**Grup V;** arginini hidroliz etmezler, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluşturur, sorbozdan asit oluşturmaz, sorbitollü sıvı besiyerinde değişik reaksiyon verirler (Tekin, 2004).

Fenotipik özelliklerine göre enterokok türlerinin sınıflaması Çizelge 1.2'de gösterilmiştir (Koneman ve ark., 2005).

Çizelge 1.2. Fenotipik özelliklerine göre enterokok türlerinin sınıflaması

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

\*Aynı türler farklı özelliklerine göre farklı gruplara dâhil edilmiştir

*E. faecalis*, insan kaynaklı enfeksiyonlarda sıklıkla izole edilmektedir. En sık gastrointestinal sistem florası, ağız ve vajinada bulunur.  $\beta$  hemoliz yapar.

*E. faecium*, sebze ve yemlerde ayrıca insanların gastrointestinal sistemlerinde bulunur.  $\alpha$  hemoliz yapar.

*E. durans*, kuru gıda, süt ve nadiren insan ve hayvan üriner sistemlerinde bulunur.  $\alpha$  hemoliz yapar.

*E. avium*, köpek, tavuk ve kuşlarda bulunur.  $\alpha$  hemolitiklidir.

*E. casseliflavus*, bitki ve toprakta bulunur. vankomisine direnci vardır.

*E. gallinarum*, evcil kuşların gastrointestinal sistemlerinde bulunur ve hemodiyalizli bir hastada bulunmuştur. Vankomisine direnci vardır.

*E. hirae*, domuzlarda ve tavuklarda bulunur. hemoliz yapmaz (Albakkour, 2013).

Enterokoklar 60 °C'de 30 dakikalık ısı işlem sonrasında bile canlı kalabilmektedirler. Aylarca buzdolabında canlılıklarını sürdürebilirler. Ancak dondurup tekrardan eritme işlemi ömürlerinin kısa olmasına sebep olur (Teixeira ve ark., 2003; Sayiner, 2008). Çoğu türleri %40 safra varlığında eskulini hidrolize edebilirler (Martin-Platero ve ark., 2009). Farklı gelişim koşullarına sağladıkları adaptasyon yetenekleri sayesinde hem çiğ hem pastörize ürünlerde bulunmaktadır (Dağdemir ve Özdemir, 2006). Hastane ortamlarında kapı tokmağı, yatak, steteskop gibi cansız ortamlarda bile uzun süre hayatta kalabilirler (Sayiner, 2008). Gelişimlerinde B vitamini ve bazı temel aminoasitlere gram pozitif bakterilere oranla daha fazla ihtiyaç duyarlar. Tüm suşları lösinaminopeptidaz (LAP) oluşturur ve glikoz fermentasyonunda son ürünleri laktik asittir (Barbosa, 2009). Bazal metabolizmaları için B1, B6, B12 vitaminlerine, nükleik asit bazlarına ve de bir karbon kaynağına ihtiyaç duyarlar. (Facklam ve ark., 1998). Hücre duvarlarında peptidoglikan, teikoik asit ve polisakkaritler bulunur. Peptidoglikan polimerleri glikan zincirlerine bağlanmış L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala aminoasitlerinden oluşmaktadır (Albakkour, 2013).

Enterokokların farklı karışık kültürlerden izole edilmeleri için kullanılan besiyerleri azidli Enterococcusel agar, Columbia-Kolistin-Nalidiksik asit agar (CNA), safra-eskulin azid agar veya fenil etil alkol agar (PEA)'dır (Winn ve ark., 2006). Besiyerinin içeriğine göre koloni rengi farklı olabilmektedir. Eskulin içeren besiyerinde koloniler siyah bir alan ile çevrili gri beyaz koloniler olarak görülebilir. Besiyeri, tetrazolium tuzları içeriyorsa kolonilerin ortası tuğla kırmızısı görünür (Facklam ve ark.,

1998). Kanlı agarda gri renkli, büyük, parlak, buğulu şekillerde görünüp alfa, beta, hemolitik ya da non hemoliz yapılar (Gürsoy ve Kınık, 2006).

Enterokokların moleküler olarak tiplendirilmesinde çok sayıda teknikten yararlanılmaktadır. Bu tekniklere; atımlı alan jel elektroforezi (PFGE), multilokus sekans tiplendirme (MLST), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) analizi, gen sekans analizi, çoğaltılmış fragment uzunluk polimorfizmi (AFLP) ve real-time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) örnek olarak verilebilir (Mascini ve ark., 2006; Çelik ve Alhan, 2008).

### 1.5. Enterokokların Yaptığı Hastalıklar

Enterokoklar starter kültür olarak yararlıyken, diğer yandan fekal kontaminasyon indikatörü olabilmektedirler. (Halkman, 2000; Riboldi ve ark., 2009). Enterokoklar en yaygın hastane kaynaklı patojenler arasında yer almaktadır. *E. faecium* ve *E. faecalis* fırsatçı patojen olarak bilinmektedir. *E. faecalis* insan enfeksiyonlarının % 80-90'ından sorumludur. *E. faecium* ise geriye kalan enfeksiyonlardan sorumludur (Murray, 1990). Enterokoklar virülens faktörleri ve adezyon yetenekleri ile kalp kapakçıklarında ve böbrek epitel hücrelerinde kolonize olabilirler (Yıldırım, 2007). Çoğunlukla üriner enfeksiyonlar, menenjit, pnömoni, septisemi, damar içi, endokardiyum, karın içi, safra sistemi enfeksiyonlarına sebep olabilir ve yanık yaralarını enfekte edebilirler (Menteş, 2007). Ayrıca enterokokların merkezi sinir sistemi, akciğer, yumuşak doku, sinüsler, kulak, göz ve periodontal dokuları enfekte edebilme özelliği vardır. Ancak bu enfeksiyonlar nadir olarak gözlenmektedir (Murray, 1990). Tüm bunlarda enterokokların vankomisin gibi bazı antibiyotiklere direnç özelliklerinin ve sahip oldukları çeşitli virülens faktörlerinin önemli rolü olduğu belirtilmektedir (İşleroğlu ve ark., 2008). Ayrıca gıda zehirlenmelerinde de enterokoklar rol oynayabilmektedir (Gürsoy ve Kınık, 2006). Bu özelliklerinden dolayı enterokokların starter kültür olarak kullanılması tartışma konusudur.

Çiğ süttten izole edilen *E. faecalis* suşları kullanılarak üretilen fermente sütlerde, potansiyel ACE (anjyotensin dönüştürücü enzim) inhibitörü aktivitesine sahip peptid oluşumunu sağladıkları ve antihipertansif etki gösterdikleri bildirilmiştir. Özellikle hastalığa sebep olan etmenlerin kodlandığı genler ile antibiyotiklere direnç oluşturan

genlerin gastrointestinal sistemdeki diğer bakterilere transfer olma ihtimali ile endişeler artmıştır (Franz ve ark., 2003)

### 1.6. Enterokoklarda Antibiyotik Direnci

Antibiyotikler mikroorganizmalar tarafından üretilen ve diğer mikroorganizmaların üremesini durduran veya öldüren kimyasal bileşiklerdir. Mikroorganizmaların antibiyotikten etkilenmemesine ise direnç denilmektedir. Ayrıca hayvansal gıda üretiminde, hayvan ve bitki hastalıkları ile mücadelede, koruyucu ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Ammor ve ark., 2007).

Enterokoklar antibiyotiklere direnç özelliklerinden dolayı hastanelerde canlılıklarını devam ettirerek dirençli suşların yayılmasına sebep olurlar (Lund ve ark., 2002). Yaptıkları hastalıklara göre, *E. faecium*'un *E. faecalis*'e kıyasla antibiyotiklere daha fazla dirençli olduğu görülmüştür ve *E. faecium* antibiyotik direncini çok çabuk geliştirip transfer edebilmektedir. Bu özelliğini transfer edebilmesiyle de sağlık açısından önemli bir risk oluşturmaktadır (Karataş, 2005). Enterokokların ilk defa 1980'li yıllarda glikopeptitlere karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir (Peters ve ark., 2003). İmmün sistemi zayıf ya da penisiline allerjisi olan kişilerde son çare olarak vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidler kullanılmaktadır. Bu nedenle vankomisine dirençli enterokoklar halk sağlığı için tehlike oluşturmaktadırlar (Gelsomino ve ark., 2003).

Antibiyotik direnci doğal ve kazanılmış direnç olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır:

**a. Doğal direnç;** Bakterilerin bazıları yapıları gereği antibiyotiğe dirençli olabilmektedir. Kalıtsal bir özellik olarak ya da ilaç kullanımıyla bir ilgisi yoktur (Jawetz ve ark., 1995). Örneğin Gram negatif bakterilerde antibiyotik dış membrandan geçemeyeceği için vankomisine doğal olarak dirençlidir. Sefalosporinler, aminoglikozitler, polimiksinler, linkomisin ve klindamisinine karşı oluşan direnç de doğal direnç örneği olarak verilebilir (Poeta ve ark., 2005).

**b. Kazanılmış direnç;** Bakterilerin genetik özelliklerinde meydana gelen değişimler sonucu daha önce duyarlı olduğu bir antibakteriyel ajana direnç geliştirmesidir. Bu kromozomal direnç ya da ekstrakromozomal direnç şeklinde olabilir.



## 1.6.1. Hücre Membranına Etki Gösteren Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

### 1.6.1.1. $\beta$ -laktam grubu ajanlara direnç

Enterokoklardaki doğal penisilin direnci  $\beta$ -laktam ajanlarına düşük bağlanma afinitesi gösteren Penisilin Bağlayıcı Protein-5 (PBP5) enzimine bağlıdır. Bu enzimin afinitesindeki azalma sonucu penisiline düşük düzeyde intrinsik direnç görülür. *E. faecium* örneklerinde bu direnç oranı özellikle artış göstermektedir. Bu suşlardaki penisilin bağlayan proteinlerin penisiline afinitesi son zamanlarda dikkat çekici bir şekilde azalma göstermiştir ve suşların %85-90'ı ampisiline dirençli duruma gelmiştir. *E. faecalis* suşlarında ampisilin direnci daha düşük düzeyde olup %2-3 kadardır (Karagöz, 2005). Enterokokların  $\beta$ -laktam grubundaki antibiyotiklere duyarlılığı streptokoklardan neredeyse 100 kat daha azdır (Shepard ve Gilmore, 2002).  $\beta$ -laktam grubundan antibiyotiklerde en sık görülen direnç mekanizması antibiyotik hedef bölgeye ulaşmadan  $\beta$ -laktamaz enzimleri aracılığıyla antibiyotiğin yıkımı ya da modifiye olmasıdır. Bir diğer direnç mekanizması transpeptidazlar aracılığı ile antibiyotiğin hedef bölgesinin değişikliğidir. Sonucu direnç mekanizması ise eflüks sistemi aracılığıyla antibiyotiğin hedefe ulaşımının engellenmesidir (Wilke ve ark., 2005).

### 1.6.1.2. Glikopeptit grubu antibiyotiklere direnç

Sadece Gram pozitif bakterilerde etkili olan glikopeptitler hücre duvarı sentezini peptidil-D-alanil-D-alanin'in uç kısmına bağlanarak inhibe ederler (Shepard ve Gilmore, 2002; Gülay, 2003). Vankomisin ve teikoplanin glikopeptid antibiyotiklerdir (Yüce, 2001).

Enterokok türlerinde şimdiye kadar glikopeptit direnciyle ilgili 6 gen tanımlanmıştır. Bunlardan *vanA* en iyi tanımlanmış direnç mekanizmasıdır. *VanA* direnç operonunda 7 gen bulunmaktadır. Bunlar: *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanR*, *vanS*, *vanY* ve *vanZ*'dir ve Tn1546 transpozunu ile kazanılmıştır (Gilmore, 2002).

## 1.6.2. Ribozoma Etki Gösteren Antibiyotiklerin Direnç Mekanizmaları

### 1.6.2.1. Aminoglikozidlere direnç

İntrinsik olarak enterokoklar düşük düzeyde aminoglikozidlere dirençli olsada orta seviyeye kadar değişen oranlarda da direnç gösterirler. Bu doğal direnç hücre duvarına geçebilme yeteneğiyle azda olsa ilişkilidir. Yüksek düzeyde aminoglikozid direnci iki farklı mekanizmayla oluşabilir:

**i) Ribozomal direnç:** Ribozomlarda antibiyotiğin bağlanma yerinin değişmesiyle meydana gelir. Sadece streptomisine karşı gelişen ve transfer edilemeyen bu türdeki direnç nadir görülmektedir.

**ii) Aminoglikozid modifiye edici enzimlerin (AME) sentezi ile:** Duyarlı örneklerle genetik mekanizmalarla taşınabildiklerinden hızlı bir şekilde yayılan bu dirençten adeniltransferaz, fosfotransferaz ve asetiltransferaz enzimleri rol oynar. Yüksek düzey gentamisin direncinden sorumlu olan enzim iki aktif bölge taşıyan bir proteindir. Bu protein hem 6'-asetiltransferaz hem de 2'-fosfotransferaz aktivitesine sahiptir. Bu iki aktif bölge özelliği sayesinde streptomisin dışında diğer tüm aminoglikozidlerin sinerjik etkisini ortadan kaldırır. AME'ler genellikle konjugatif plazmidler tarafından kodlanırlar (Karagöz, 2005).

### 1.6.2.2. Kloramfenikole direnç

Yapılan çalışmalarda ilk kloramfenikol direnç genlerinin bir suştan diğerine transferi 1964'te gösterilmiştir. Enterokoklarda kloramfenikole dirençten en sık sorumlu mekanizmanın kloramfenikol asetil transferaz (CAT) sentezi olduğu bildirilmiştir. Bu enzim aracılığıyla oluşan kloramfenikol molekülünün 3 hidroksil grubunda meydana gelen asetillenmeden dolayı kloramfenikol ribozomlara bağlanamaz. Enterokoklar, streptokoklar ve stafilokoklarda bulunan *cat* genlerinin aynı olması bu türler arasındaki horizontal transferin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Lynch ve ark., 1997; Davies, 1994).

### 1.6.2.3. Makrolidlere direnç

Makrolidler, penisilin allerjisi olan kişilerde akla gelen ilk antibiyotiklerdir. Makrolidlerin direnç mekanizmaları;

- i) Hedef bölgede meydana gelen nokta mutasyonu
- ii) 23S rRNA metilasyonu sonucu makrolidlerin hedefe bağlanamaması
- iii) Makrolidlerde lakton halkasının hidrolizi
- iiii) Antibiyotiğin bakteriden efluks pompalarıyla uzaklaştırılması olmak üzere dört çeşittir (Wax ve ark., 2008). Eritromisinler ya da diğer makrolid antibiyotiklere direnç enterokoklarda sık gözlenilmektedir. En yaygın makrolid direnç genleri *erm* genleridir (Jensen ve ark., 1999; Wax ve ark., 2008).

### 1.6.2.4. Tetrasiklinlere direnç

Enterokoklarda en sık gözlenen direnç tetrasiklin direncidir. Tetrasiklinler veteriner ve tıpta sıklıkla kullanılan geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Tetrasiklinlerde kazanılmış direnç üç mekanizma ile olmaktadır. Bunlar; *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)* genlerinin bulunduğu ribozomal koruma, *tet(K)* ve *tet(L)* genlerinin aracılığıyla antibiyotiğin bakteri hücresinin dışına atılmasını sağlayan enerji bağımlı efluks sistemi ve antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonudur (Chopra ve Roberts 2001; Huys ve ark., 2004).

### 1.6.3. Nükleik Asit Sentezine Etki Eden Kinolon Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Bütün bakterilerde DNA giraz enziminde bulunan QRDR bölgesinde meydana gelen mutasyonlar kinolon ve florokinolonlara karşı direnç oluşturmaktadır. Florokinolonlar DNA replikasyonuna engel olarak bakterinin ölümüne sebep olmaktadır. Bunu GryA yani DNA giraz alt ünitesi ve ParC yani topoizomeraz IV alt ünitesinde meydana gelen mutasyonlar ile yapmaktadır (Wax ve ark., 2008).



## 1.7. Enterokoklarda Virülens Faktörleri

Virülens faktörleri, mikroorganizmaların hastalık yapabilme yeteneğinde artış sağlayan moleküllerdir (İşleroğlu ve ark., 2008). Enterokoklarla ilişkili çok sayıda virülens faktör tanımlanmıştır. Enterokokların adezyon ve kolonizasyona sebep olan agregasyon maddesi (*agg*), enterokokal yüzey proteinleri (*esp*), konakçı savunma sistemine direnç ve kolonizasyon oluşturan *E. faecalis* antijen A (*efaA*), doku hasarı oluşturan jelatinaz (*gelE*), serin proteaz (*sprE*), sitolizin (*cylA-M*), hemolizin (*hyl*) konakçı savunma sistemine direnç oluşturan ekzopolisakkarit yapıdaki kapsüler polisakkarit (*cpsA-K*) ve transkripsiyonu düzenleyen hidrojen peroksit düzenleyici (*hypR*) gibi bir çok virülens faktörüne sahip olduğu ortaya konmuştur (Ogier ve ark., 2008). Enterokoklarda bulunan bazı virülens genlerin rolü çizelge 1.3' de gösterilmiştir.

Enterokoklardaki virülens faktörler, konak hücredeki kolonizasyonda rol oynayan yüzey faktörleri ve enterokokların salgıladığı dokulara zarar veren yüzey faktörler olmak üzere iki tiptir (Chajęcka-Wierchowska ve ark., 2017).

Çizelge 1.3. Enterokolarda bulunan önemli virülens genleri (Herkmen, 2015)

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

## 1.7.1. Konak Hücrelerdeki Kolonizasyonda Rol Oynayan Yüzey Faktörleri

### 1.7.1.1. Agregasyon faktörü (AF)

Agregasyon faktörü ilk tanımlanmış yüzey proteindir ve *asa1* geni tarafından kodlanan bir glikoproteindir (Chajeka-Wierzchowska ve ark., 2017). Bir plazmid üzerinde taşınmaktadır (Fisher ve ark., 2009). Enterokokların enfeksiyona sebep olmaları ya da bakteriyemi oluşturmaları için translokasyona ihtiyacı vardır ve bunu etkin alıcı ve verici hücre birleşmesi sağlayarak kolaylaştırmaktadır (Rodzinski ve ark., 2001; Sayiner ve ark., 2008). *E. faecalis* enfeksiyonlarının başlangıcında rol oynadığı düşünülmektedir (Baylan ve ark., 2011). Ökaryot hücrelerde adezyon ve konjugasyon sırasında hücreler arası teması sağlamaktadır. Virülens faktörü olarak, renal tübüler hücreler, nötrofil ve kalp endokardiyal hücrelerine bakteriyel adezyonu artırır (Chow ve ark., 1993; Fisher ve ark., 2009).

### 1.7.1.2. Enterokokal yüzey proteini (Esp)

Kromozomal *esp* geni tarafından kodlanır. Vankomisine duyarlı *E. faecium* (VSEF) izolatlarında tespit edilmiştir (Woodford ve ark., 2001). *E. faecalis*'in hücre yüzeyinde yer almaktadır ve hücre duvarı ile ilişkili bir proteindir (Baylan ve ark., 2011). Esp proteini üriner sistemde kolonizasyonu arttırmaktadır ve idrar yolunda biyofilm oluşmasında etkililerdir (Sava ve ark., 2010; Chajeka-Wierzchowska ve ark., 2017). Bu sayede enterokokların konak dokularda kolonizasyonun oluşturmaya yardımcı olmaktadır ve bakteriyi koruduğu düşünülmektedir (Dicuonzo ve ark., 2001; Baylan ve ark., 2011).

### 1.7.1.3. Endokarditis spesifik antijen (EfaA)

İlk olarak *E. faecalis* ile tanımlanmıştır ve endokardisite neden olduğu bilinmektedir. (Azimi Mahalleh ve ark., 2014). Efa, 34 kDa moleküler ağırlığında olup *E. faecalis* suşlarında *efaA<sub>fs</sub>* ve *E. faecium* suşlarında ise *efaA<sub>fm</sub>* genleri tarafından kodlanan bir proteindir. *efaA* geni magnezyum iyonları tarafından regüle edilen ABC

transporteri (permeaz) kodlayan *afaCBA* operonunun bir parçasıdır. Streptokokların hücre duvarında bulunan adezinlerle EfaA proteini homolog yapıdadırlar (Chajeka-Wierzchowska ve ark., 2017).

## **1.7.2. Yüzey Faktörleri**

### **1.7.2.1. Sitolizin (*cyI*)**

Sitolizin lisin ve aktivatörden oluşur ve sentezini *cy/R1*, *cy/R2*, *cy/L1*, *cy/Ls*, *cy/M*, *cy/B*, *cy/A* ve *cy/I* olmak üzere sekiz genli bir operon sağlamaktadır. Sitolizin aynı zamanda hemolizin olarak adlandırılmaktadır (Van Tyne ve ark., 2013). Sitolizin genleri bir plazmid üzerinde taşınarak bakteriyel kromozoma entegre olur (Jett ve ark., 1994). Enterokokal virülens faktörlerin en iyi karakterize edilenlerinden biridir. Gram negatif bakterilere karşı bakterisidal etkisi bulunmaktadır (Chajeka-Wierzchowska ve ark., 2017). Hemolitik özellik taşımaktadır (Albakkour, 2013). Sitolizin üretimi sonucu hayvanlarda endokardit artışı ve insanlarda enterokoklara bağlı enfeksiyonların şiddetinin arttığı gözlemlenmiştir (Ike ve ark., 1987).

### **1.7.2.2. Jelatinaz (*gelE*)**

Jelatinaz doğal immün sistemin parçası olan antimikrobiyal peptidlerin yıkımlanmasından sorumludur (Schmidtchen ve ark., 2002). Kromozomal lokalizasyona sahip *gelE* geni tarafından kodlanmaktadır. (Chajeka-Wierzchowska ve ark., 2017). Konak dokuda yıkım ile bakteriye besin sağlayarak, biyofilm oluşumunda katkı sağlar (Qin ve ark., 2000). Jelatin, kollojen, insülin, kazein, hemoglobün gibi aktif küçük peptitleri hidrolize edebilirler (Gilmore ve ark., 1994). Yapılan çalışma sonuçlarına göre jelatinaz üreten suşlarda akut toksisite üretmeyen suşlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Sayiner ve ark., 2008).

### **1.7.2.3. Seks feromonları**

Seks feromenleri enterokoklarda kromozomal olarak kodlanan 7-8 amino asit büyüklüğünde ve plazmid akümülyasyonuna neden olan küçük seks feromenlerine (*cpd*, *cob*, *ccf*, *cad*) sahiptir. Plazmidlerin hücreler arasında konjugatif transferini yaparlar. Kimyasal özellikleri nedeniyle enfeksiyonlarda inflamatuvar cevabı artırırlar (Rakita ve ark., 1999).

#### **1.7.2.4. Hyaluronidaz (hyl)**

Kromozomal *hyl* geni tarafından kodlanan bir protein olan hyalüronidaz, klinik olarak *E. faecium* izolatlarında yaygın bulunur. Enzim konnektif dokunun ve kıkırdağın mukopolisakkaritlerinin yıkılmasında ve bakterilerin yayılmasında önemli rol oynamaktadır (Chajek-Wierzchowska ve ark. 2017; Baylan ve ark., 2011; Rice ve ark. 2003). Hyaluronidaz'ın, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae*'de meydana gelen ve nazofarenks ve pnömokokal pnömoninin invazyonuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Berry ve Paton., 2000).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Besleyici bir öge olan süt içinde bulunabilecek enterokoklar ısıtılma nispeten dirençli olmaları ve bozulmaya neden olabilmeleri nedeniyle halk sağlığı açısından önemli mikroorganizmalardır. Fermente ürünler, süt ve süt ürünleri gibi farklı gıdalardan kaynaklı enterokok izolasyonuna dair çalışmalar yapılmıştır.

Keçeci ve ark. (2016), 150 çiğ inek süt örneğinden *Enterococcus* spp.'lerin izolasyonu ve identifikasyonunu yaparak vankomisin direncini araştırmışlardır. Bu çalışma ile 150 çiğ süt örneğinden 84 *Enterococcus* spp. izolatu elde etmişlerdir. Bu izolatların hiçbirinde vankomisine direnç görülmemiştir. Ancak *VanB* geni *E. faecalis* izolatlarının 11'inde ve *E. faecium* izolatlarının 7'sinde pozitif olduğunu belirtmişlerdir ve bir izolatta da *VanC2*, *VanC3* genleri ve 2 *E. faecium* izolatında *VanB*, *VanC2*, *VanC3* genleri birlikte bulmuşlardır.

Tuncer ve ark. (2014), çiğ süttten elde edilen *E. faecalis* MYE58'de enterosin, virülens faktörler ve vankomisin direnç genlerini araştırmışlar ve streptomisin ve tetrasikline karşı direnç tespit etmişlerdir. Bu nedenle enterosin B üreten *E. faecalis* MYE58 suşunun tüketici sağlığı açısından starter kültür olarak kullanılmasının riskli olacağını bildirmişlerdir.

Karakaş (2005), yaptığı çalışmada Adana'dan marketlerden 20 adet sucuk ve 30 adet peynir örneği toplayarak *E. faecium* izole etmiş ve 20 adet sucuktan 3 *Enterococcus* spp. izole etmiştir. Bunları *E. faecium*, *E. durans* ve *E. avium* olarak tanımlamıştır. 30 adet peynir örneğinde ise bir *E. durans* ve bir *E. avium* tespit etmiştir. Peynir ve sucuklarda bulunan *E. durans* izolatlarında hemoliz gerçekleşirken diğer suşlarda hemoliz olmamıştır. *Enterococcus* spp. izolatlarının vankomisin dirençlerine bakılmış ve vankomisine dirençli olmadıklarını tespit etmiştir.

Nam ve ark. (2009), mastisitli sığır sütlerinden izole ettikleri 105 enterokok izolatlarının 47'sini *E. faecalis*, 39'unu *E. faecium*, 6'sını *E. gallinarum*, 6'sını *E. avium*, 5'ini *E. hirae* ve 2'sinide *E. durans* olarak tanımlamışlardır. Tüm izolatların ampisilin, gentamisin ve vankomisine duyarlı olduğunu, bir *E. hirae* izolatının ampisiline direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir. Enterokoklarda en sık gözlenen direnç %69,5 ile tetrasiklinler, %64,7 ile penisilin, %57,1 ile eritromisin, %44,7 ile de sefalotin olduğunu bulmuşlardır. *E. hirae* ve *E. gallinarum* izolatlarında gözlenen direncinde

neredeşye *E. faecium* ve *E. faecalis* kadar yüksek olduğu bularak, 105 izolattan sadece 6 *E. faecium* suşu tüm antimikrobiyellere karşı duyarlı ve 55 tanesi üçten fazla antibiyotiğe direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir. En yaygın çoklu direnci penisilin, tetrasiklin ve eritromisin olarak bulmuşlardır.

Bouymajane ve ark. (2018), Fas'ın Meknes bölgesinden çiğ süt satışı yapılan 150 örnekte enterokok prevalansını ve antibiyotik direncini araştırmışlardır. İzolasyon sonucunda örneklerin % 11,3'ünde *Enterococcus* spp. izole edilmiş ve bunların sırasıyla; % 64,7'sinin *E. faecalis*, %17,6 *E. faecium*, %11,8 *E. durans* ve %5,9 *E. hirae* olarak bulmuşlardır. Tüm *Enterococcus* spp.'ler ampisilin'e, tüm *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının da tetrasikline karşı dirençli olduğunu ve streptomisin dirençlerinde sırasıyla %52,9 *E. faecalis*, %11,8 *E. faecium*, %11,8 *E. durans* ve %5,9 *E. hirae* olarak tespit etmişlerdir. İzole edilen *Enterococcus* spp.'nin çoğunda çoklu antibiyotik direnç indeksi yüksek değerlere ulaşarak halk sağlığı için bir risk oluşturduğunu tespit etmişler. Sonuç olarak yaptıkları bu çalışmanın, nüfus tarafından tüketilen çiğ sütün, profilaktik amaçlı ıslahta kullanılan antibiyotiklere dirençli *Enterococcus* suşları ile kontamine olduğunu göstermişlerdir.

Ortega ve ark. (2016), antimikrobiyal dirençli mikroorganizmaların insanlarda ve hayvanlarda neden olduğu sağlık problemlerinde yaşanan enfeksiyonlardan sorumlu olduğunu belirterek insan ve hayvan doğal florasında bulunan *Enterococcus* spp.'nin prevalansını saptamak amacıyla 24 çiğ süt tankından örnekler alarak bir çalışma yapmışlardır. Antimikrobiyal direnç genlerinin insanlara ve süt üretim ortamındaki diğer hayvanlara bulaşmadaki rollerinin değerlendirilmesi amacıyla izole edilen suşlarda antibiyotik direnç genlerini ve fenotiplerini incelemişlerdir. En yaygın mikroorganizma *E. faecium* ikincisi *E. faecalis* olarak bulmuşlardır. İzole edilen suşların çoğunda çoklu ilaç direnci tespit etmişlerdir. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) çalışmalarına göre dirençli fenotiplere rastlamamışlar ve *vanA* fenotipi tespit etmemişler ancak bazı suşlar *vanA* fenotipinin yakınında MIC değerleri sunduğunu gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, süt sürüleri ve çiğ süt tanklarında antimikrobiyal dirençli mikroorganizma denetleme programlarının uygulanması gerektiğini belirtmişlerdir. Çiftliklerde gelecekteki hayvan tedavilerinde ve süt üretimiyle ilişkili antimikrobiyal direnç iletiminin, hayvanlar ve halk sağlığı açısından risk teşkil etmektedir.

Herkmen (2015), yaptığı çalışmada 600 adet mastisitli sığır sütlerinden izole ettiği *E. faecium* suşlarında *gelE*, *esp* ve *efaAfm* virülans genlerinin varlığını incelemiştir. İzolatların tür ve cins identifikasyonları için PZR kullanmıştır. 96 *Enterococcus* spp. izolatu içerisinde 13 *E. faecium* (%13,5) tespit etmiştir. *E. faecium* izolatlarının virülens genlerinin incelenmesi sonucunda, sırasıyla 9 (%69,2) suşun *efaAfm*, 4 (%30,7) suşun *gelE*, 4 (%30,7) suşun *esp* genlerini taşıdıklarını tespit etmişler, herhangi bir virülens geni taşımayan ise üç (%23,0) izolat bulmuşlardır. Sonuç olarak bu çalışmada izole edilen *E. faecium* suşlarının yüksek patojenite potansiyeline sahip oldukları bulunmuştur. Bu suşlar hayvansal kaynaklardan insanlara bulaşabilir ve enfeksiyona sebep olabilirler.

Öztürk Torlak (2013), Ankara'da farklı marketlerden 25 tavuk, 25 kıyma, 25 çiğ süt, 25 dondurma ve 25 peynir olmak üzere toplam 125 gıda örneğinden 100 enterokok izolatu tespit etmiştir. Araştırmacı bu izolatların antibiyotik duyarlılıklarını ve slime, jelatinaz, DNAaz, hemoliz sentezleyebilme gibi virülens özelliklerini araştırmıştır. Gıda örneklerinden elde edilen 100 *Enterococcus* izolatının, 55'i (%55) *E. faecalis*, 30'unun (%30) *E. faecium*, 6'sının (%6) *E. mundtii*, 5'inin (%5) *Enterococcus* spp., 2'sinin (%2) *E. durans*, 1'inin (%1) *E. raffinosus* ve 1'inin (%1) *E. gallinarum* olarak tanımlanmıştır. İzolatların 35'ini (%35) slime (+), 10'unu (%10) jelatinaz (+), 6'sını (%6) DNAaz (+) ve 8'ini (%8) hemoliz (+) bulmuştur. Ayrıca, izolatların 46'sı (%46) eritromisin, 12'si (%12) gentamisin, 6'sı (%6) penisilin, 5'i (%5) teikoplanin, 3'ü (%3) ampisilin, 2'si (%2) kloramfenikol ve 1'i (%1) levofloksasin dirençli olduğunu tespit etmiştir.

Yüksel (2012), yaptığı tez çalışmasında peynirlerden izole edilen 48 enterokok izolatının virülens faktör ve antibiyotik dirençliliklerini araştırmıştır. İzole ve tanımladığı *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının 11 farklı antibiyotiğe olan duyarlılıklarını, disk difüzyon yöntemi ve mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırmıştır. Bulunan direnç yüzdeleri; ampisilin %16.6, streptomisin %97.91, nalidiksik asit %100, kanamisin %100, gentamisin %14.58, kloramfenikol %22.91, tetrasiklin %25, rifampisin %79.16, vankomisin %79,16, eritromisin %97.91, siprofloksasin %62.5'tir. *E. faecalis* izolatları, antibiyotiklere *E. faecium* izolatlarına göre daha fazla direnç gösterirken nalidiksik asit ve kanamisine eşit oranda direnç göstermiştir. Antibiyotik direnç genleri için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile *tetM* ve *vanB* genleri tüm suşlarda negatif

çıkmiştir. PZR yöntemi ile agregasyon faktör geni, *esp*, *ace*, *efaA*, *gelE*, *fsr* lokusu, sitolizin genleri (*cyIM*, *cylA*, *cyIB*) ve seks feromonlarına (*cpd*, *cob*, *ccf*) bakılmıştır. Virülens determinantların *E. faecalis* suşlarında *E. faecium* suşlarına göre daha yüksek oranda bulduklarını tespit etmişlerdir.



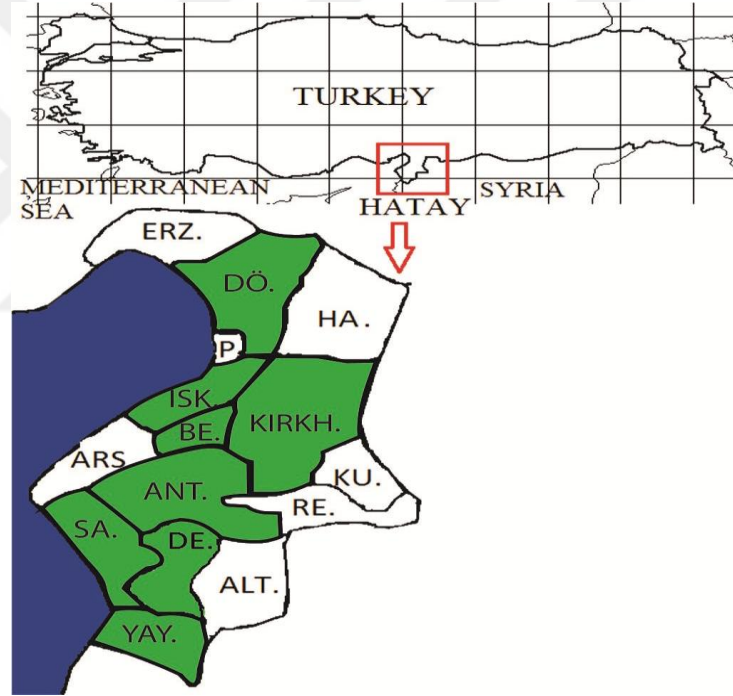


### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çiğ Süt Örneklerinin Toplanması

Hatay ili genelinde Ocak-Şubat 2018 tarihleri arasında 8 farklı ilçeden (Antakya, Belen, Defne, Dörtiyol, İskenderun, Kırıkhan, Samandağ ve Yayladağı) rastgele perakende satış yapılan noktalardan alınan 120 çiğ süt örneği çalışmanın materyalini oluşturdu (Şekil 3.1). Örnekler 50 ml hacimdeki steril falkon tüplerine alınarak soğuk zincir altında laboratuvara getirildi ve işlendi.



Şekil 3.1. Örneklerin toplandığı ilçeler

##### 3.1.2. Standart Suşlar

Çalışmada fenotipik ve moleküler analizler için *E. faecalis* ATCC 29212 ve *E. faecium* ATCC 6057 referans suş olarak kullanıldı.

### 3.1.3. Kullanılan Antibiyotik Diskleri

İzolatların antibiyotik duyarlılık testlerinde rifampin (5 µg), ampicilin (10 µg), vankomisin (30 µg), eritromisin (15 µg), tetrasiklin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), kloramfenikol (30 µg) ve gentamisin (120 µg) diskleri kullanıldı.

### 3.1.4. Primerler

Enterokok izolatlarının cins ve tür düzeyinde tanımlanmaları için kullanılan primerler Çizelge 3.1'de, antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler Çizelge 3.2'de, virülens genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler ise Çizelge 3.3'de verilmiştir (Vankerkhoven ve ark., 2004; Layton ve ark., 2010; Aslantaş ve Tek, 2019).

Çizelge 3.1. Enterokokların cins ve tür spesifik tanımlanmaları için kullanılan primerler

Primer adı	Sekans (5'-3')	Hedef takson	Hedef gen	Amplikon uzunluğu (bp)
E1	TCAACCGGGGAGGGT	<i>Enterococcus</i>	16S	733
E2	ATTACTAGCGATTCCGG	spp.	rRNA	
FL1	ACTTATGTGACTAACTTAACC	<i>E. faecalis</i>	<i>sodA</i>	360
FL2	TAATGGTGAATCTTGGTTGG			
FM1B	ACAATAGAAGAATTATTATCTG	<i>E. faecium</i>	<i>sodA</i>	214
FM2B	CGGCTGCTTTTTTGAATTCTTCT			
AV1	GCTGCGATTGAAAAATATCCG	<i>E. avium</i>	<i>sodA</i>	361
AV2B	TGATCGGTGTTTTTCCATCAGTT			
CA1B	ACAGTTGAAGAATTATTAGCAG ACTTTT	<i>E. casseliflavus</i>	<i>sodA</i>	269
CA2	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG			
GA1	TTACTTGCTGATTTTGATTCG	<i>E. gallinarum</i>	<i>sodA</i>	190
GA2	TGAATTCTTCTTTGAAATCAG			
HI1	CTTTCTGATATGGATGCTGTC	<i>E. hirae</i>	<i>sodA</i>	186
HI2B	AAATTCTTCCTTAAATGTTGC			

Çizelge 3.2. Antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler

Primer Adı	Sekans (5'→3')	Ürün Büyükülüğü (bp)	Kaynak
<i>erm(A)</i>	CCCGAAAATACGCAAATTTTCAT	CCCTGTTTACCCATTTATAAACG	590
<i>erm(B)</i>	TGGATTCCAAATGCGTAATG	CTGTGGTATGGCGGGAAT	745
<i>mef(A/E)</i>	CAATATGGGCAGGGCAAG	AAGCTGTTCCAATGCTACGG	317
<i>tet(K)</i>	GATCAATTGTAGCTTTAGGTGAAGG	TTTTGTTGATTTACCAGGTACCATT	155 Malhotra-Kumar
<i>tet(M)</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG	CGGTAAAGTTCGTCACACAC	406 ve ark. 2005
<i>tet(O)</i>	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	TCCACTGTTCCATATCGTCA	515
<i>tet(L)</i>	TGGTGGAATGATAGCCCATT	CAGGAATGACAGCACGCTAA	229
<i>CatpIP 501-159</i>	GGATATGAAATTTATCCCTC	CAATCATCTACCCTATGAAT	505 Aerestrup ve ark. 2000
<i>aac(6)-Ie-aph(2)-Ia</i>	CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAGCACAATCGACTAAAGAGTACCAATC		369
<i>aph(2)-Ib</i>	CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC	GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	867
<i>aph(2)-Ic</i>	CCACAATGATAATGACTC AGTTCCC	CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444
<i>aph(2)-Id</i>	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC	CCCTCTTCATAACCAATCCATATAACC	641 Vakulenko ve ark.
<i>aph(3)-IIIa</i>	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG	CTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCG	523 2003
<i>ant(4)-Ia</i>	CAAACCTGCTAAATCGGTAGAAGCC	GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	294

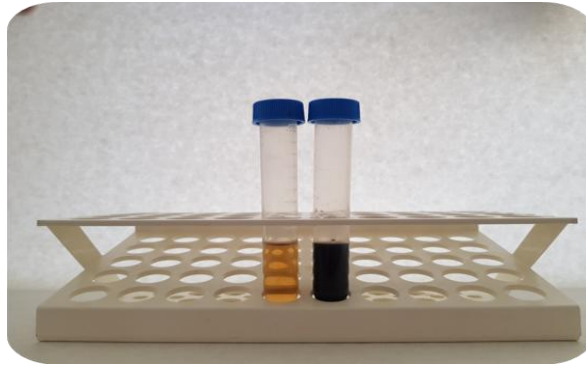
Çizelge 3.3. Virülens genlerin belirlenmesinde kullanılan primerler

Gen	Virülens Faktör	Sekans (5'→3')	Ürün büyüklüğü (bp)
<i>asa1</i>	Agregasyon faktör	GCACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAAGAACATCACCACGA	375
<i>gelE</i>	Gelatinaz	TATGACAATGCTTTTTGGGAT AGATGCACCCGAAATAATATA	213
<i>cylA</i>	Sitolizin	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688
<i>esp</i>	Enterokokal yüzey protein	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510
<i>hyl</i>	Hyaluronidaz	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276

## 3.2. Metot

### 3.2.1. *Enterococcus* spp. İzolasyonu

*Enterococcus* spp. izolasyonu amacıyla soğuk zincirde getirilen süt örnekleri homojenize edilerek ön zenginleştirme amacıyla Enterococcosel Broth'a aktarılarak 37 °C'de 24-48 saat inkube edildi. Renk değişimi (mavi-yeşil) gösteren tüplerden alınan örnekler vankomisin içeren ve içermeyen VRE agara (Vancomycin Resistant Agar) ekim yapılarak 37 °C'de 24-48 saat inkube edildi (Şekil 3.2). Tipik morfolojiye sahip şüpheli kolonilerden biri seçilerek kanlı agara pasajlandı. Gram pozitif, katalaz negatif ve %6,5 tuz içeren NB'da üreyebilme özelliğine sahip izolatlar *Enterococcus* spp. olarak kabul edildi ve tür düzeyinde identifikasyonları yapılmak üzere %20 gliserin içeren BHIB (Brain Heart Infusion Broth) içerisinde -20 °C'de diğer çalışmalar için stoklandı.



Şekil 3. 2. Enterococcosel Broth'da enterokok inkübasyonu

### 3.2.2. Enterokokların İdentifikasyonu

Enterokok olarak belirlenen izolatların genotipik olarak tür düzeyinde tanımlamaları enterokoklara spesifik universal 16S rRNA ve tür spesifik primerler kullanılarak multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (mPZR) yöntemiyle belirlendi (Aslantaş ve Tek, 2009; Layton, 2010).

### 3.2.3. Enterokokların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Enterokok izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları Kirby–Bauer disk difüzyon yöntemi ile klinik laboratuvar standartları enstitüsü (CLSI, 2015) kriterlerine göre yapıldı ve değerlendirildi. Üç veya dört farklı sınıftan antibiyotiğe dirençli izolatlar, çoklu antibiyotik dirençli (MDR) olarak değerlendirildi. Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri ve zon çapları Çizelge 3.4’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Enterokoklar için kullanılan antimikrobiyal duyarlılık zon çapları (CLSI, 2015)

Antibiyotik adı	S (Duyarlı)	I (orta duyarlı)	R (Dirençli)
Ampisilin (10µg)	≥ 17	-	≤16
Vankomisin(30 µg)	≥17	15-16	≤14
Eritromisin(15 µg)	≥23	14-22	≤13
Tetrasiklin(30 µg)	≥19	15-18	≤14
Siprofloksasin(5 µg)	≥21	16-20	≤15
Rifampin(5 µg)	≥20	17-19	≤16
Kloramfenikol(30 µg)	≥18	13-17	≤12
Gentamisin (120 µg)	≥10	7-9(etkisiz)	6

### 3.2.4. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Enterokoklarda izolatların DNA’sı kaynatma yöntemi ile elde edildi (Marques ve Stuarz, 2004).

### 3.2.5. Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Tetrasiklin ve eritromisin dirençli izolatlarda *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS*, *ermA*, *ermB* ve *mefA/E* genlerinin belirlenmesi Malhotra-Kumar ve ark. (2005); aminoglikozid dirençli izolatlarda *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia*, *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia*, *aph(2)-Ib*, *aph(2)-Ic*, *aph(2)-Id*, *aph(3)-IIIa* ve *ant(4)-Ia* genlerinin belirlenmesi Vakulenko ve ark. (2003); kloramfenikol dirençli izolatlarda *catA* geninin belirlenmesi Aerestrup ve ark. (2000), tarafından bildirilen yöntemle yapıldı.

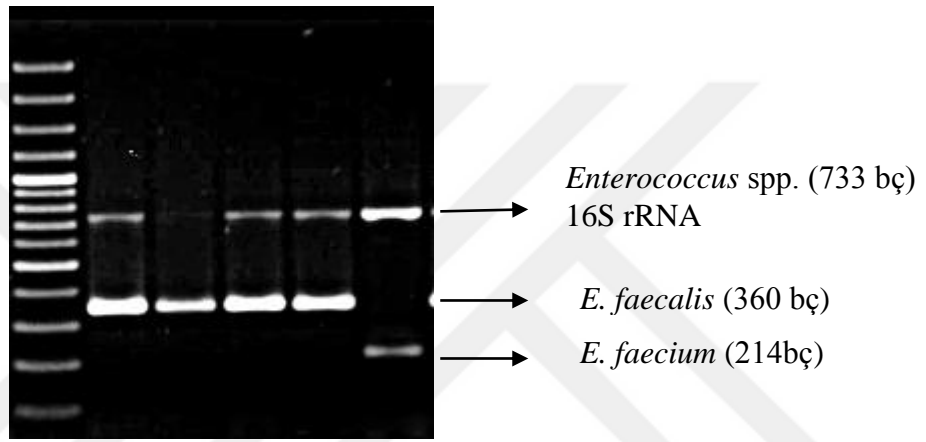
### 3.2.6. Virülens Genlerinin Belirlenmesi

Enterokoklarda *asa1* (agregasyon faktör), *gelE* (gelatinaz), *cylA* (sitolizin), *esp* (enterokokal yüzey protein) ve *hyl* (hyaluronidaz) genleri mPZR tekniği kullanılarak Vankerckhoven ve ark. (2004), tarafından daha önce bildirildiği yöntemle yapıldı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Enterokok İzolasyonu ve İdentifikasyon

İncelemeye alınan 120 çiğ süt örneğinin 95'inden (%79,2) *Enterococcus* spp. izole edildi. Tür spesifik primerlerle yapılan PZR ile izolatların 87'si (%91,6) *E. faecalis*, 5'i (%5,3) *E. faecium*, 2'si (%2,1) *E. durans* ve 1'i de (%1,1) *E. gallinarium* olarak identifiye edildi.



Şekil 4.1. *Enterococcus* spp. (733 bç), *E. faecalis* (360 bç), *E. faecium* (214 bç) agaroz jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.2. *E. gallinarium* (190 bç) agaroz jel elektroforez görüntüsü

## 4.2. Antibiyogram Sonuçları

95 Enterokok izolatının tamamı vankomisine duyarlı iken, diğer antibiyotiklerden en az birine dirençli bulundu. İzolatların %41,1'i (39) tetrasikline, %33,7'si (32) rifampine, %27,4'ü (26) ampisiline, %11,6'si (11) eritromisine, %5,7'si (5) gentamisine, %3,2'si (3) kloramfenikole ve %2,0'ı (2) siproflaksasine dirençli bulundu. 29 (%30,5) izolat ise tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu. 23 farklı antibiyotip profili belirlendi. İzolatların antibiyotik direnç profilleri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

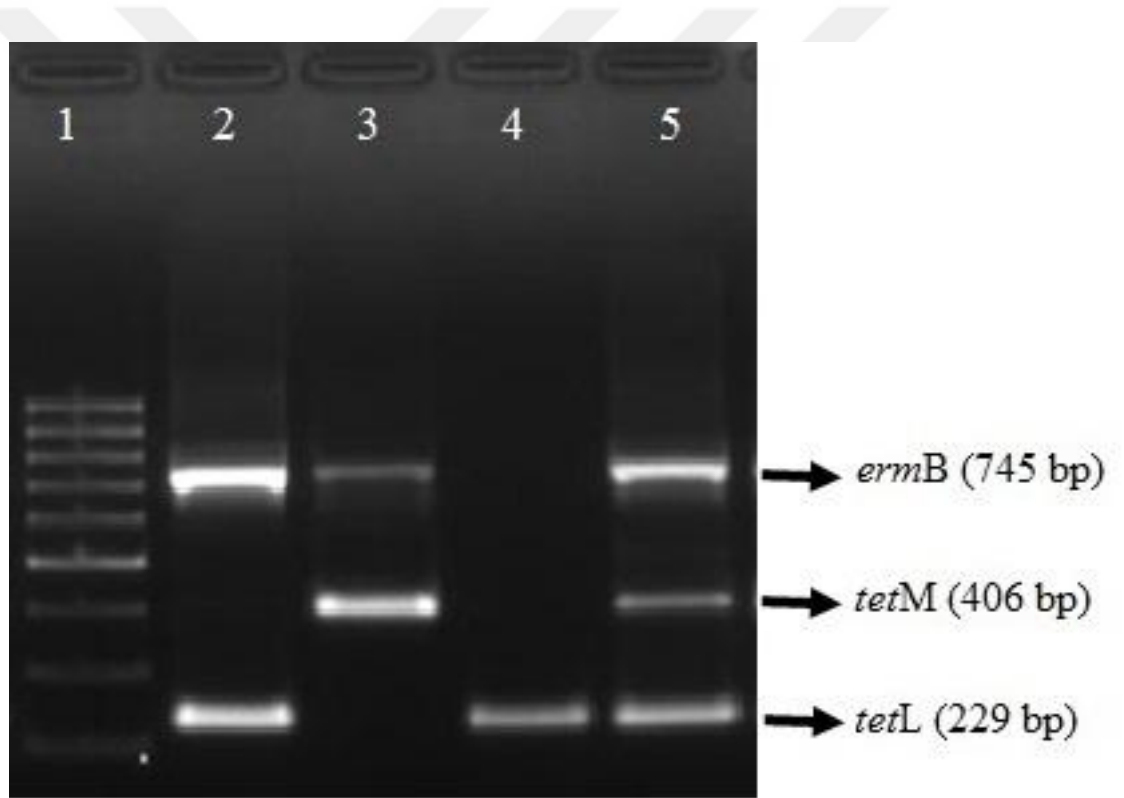
Çizelge 4.1. *Enterococcus* spp.'lerin antimikrobiyal direnç genleri

Antimikrobiyal direnç	<i>E. faecalis</i> (n: 87)	<i>E. faecium</i> (n:5)	<i>E.durans</i> (n:2)	<i>E. gallinarium</i> (n:1)
RA, AM, TE, CN	1(% 1,1)	-	-	-
RA, AM, TE, C	1(% 1,1)	-	-	-
TE, E, C, AM	1(% 1,1)	-	-	-
RA, TE, AM	3(% 3,4)	-	-	-
RA, AM, E	-	1(% 20)	-	-
RA, CIP, CN	1(% 1,1)	-	-	-
RA, TE, E	1(% 1,1)	-	-	-
TE, E, CN	1(% 1,1)	-	-	-
TE, AM, E	1(% 1,1)	-	-	-
TE, CIP, E	-	1(% 20)	-	-
C, TE	1(% 1,1)	-	-	-
RA, TE	7(% 8,0)	-	-	-
RA, AM	6(% 6,9)	-	-	-
RA, E	-	1(% 20)	-	-
E, AM	1(% 1,1)	-	-	-
TE, E	2(% 2,3)	-	-	-
TE, AM	6(% 6,9)	-	-	-
TE, CN	1(% 1,1)	-	-	-
TE	12(% 13,8)	-	-	-
RA	9(% 10,3)	-	-	1(% 100)
AM	4(% 4,6)	1(% 20)	-	-
CN	1(% 1,1)	-	-	-
E	1(% 1,1)	-	-	-
Duyarlı	26(% 29,9)	1(% 20)	2(% 100)	-

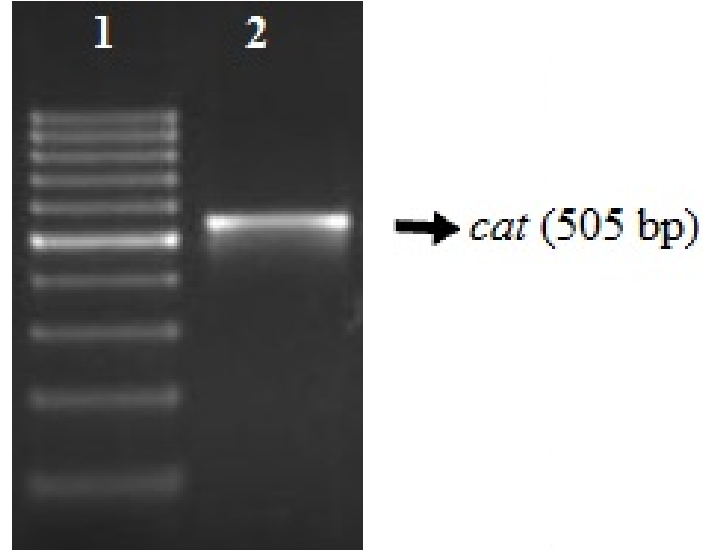


### 4.3. Antibiyotik Direnç Genlerinin Tepiti

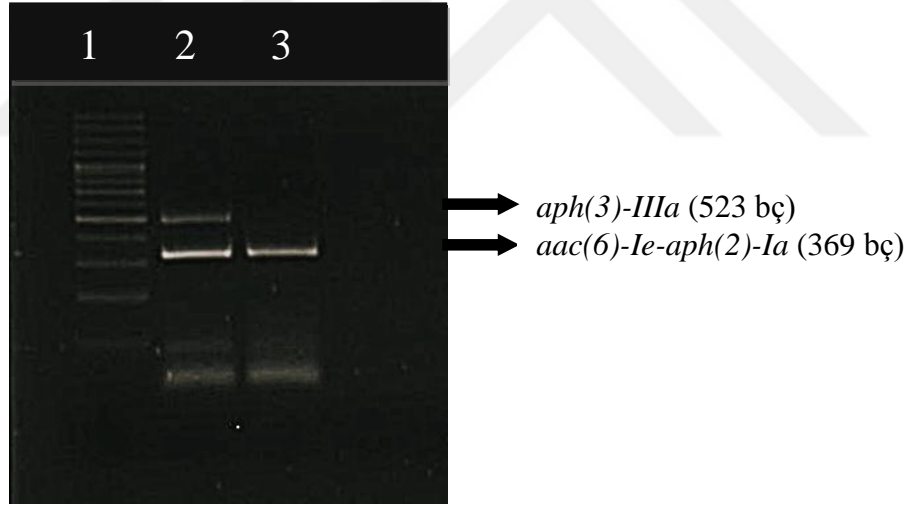
Tetrasiklin direnç genlerinden *tetM* 32 izolatta, *tetK* 2 izolatta, *tetL* 2 izolatta ve *tetM+tetK* 4 izolatta tespit edildi. Eritromisin direnç genlerinden *ermA* 1 izolatta, *ermB* 3 farklı kombinasyonda; *tetM+ermB*: 5, *tetL+ermB*:1 ve *tetM+tetL+ermB*: 2 izolatta bulundu (Şekil 4.3). Fenotipik olarak kloramfenikol dirençli 3 izolatın sadece 1'inde *cat* geni ise saptandı (Şekil 4.4). Aminoglikozid dirençli 5 izolatın 3'ünde *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia* geni, 1'inde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* + *aph(3)-IIIa* geni bulunurken, *ant(4)-Ia*, *aph(2)-Ib*, *aph(2)-Ic* ve *aph(2)-Id* genleri hiçbir izolatta bulunamadı. 1 izolatta ise hiç aminoglikozid direnç geni tespit edilmedi (Şekil 4.5).



Şekil 4.3. *Enterococcus* spp. izolatlarında tespit edilen eritromisin direnç genlerinin agaroz jel elektroforezde görüntüsü. Kuyucuk 1: 100 bp marker, Kuyucuk 2: *ermB* ve *tetL*, Kuyucuk 3: *ermB* ve *tetM*, Kuyucuk 4: *tetM*, Kuyucuk 5: *ermB*, *tetL* ve *tetM*



Şekil 4.4. *Enterococcus* spp. suşlarında kloramfenikol dirençli izolatlardan belirlenen *cat* genine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kuyucuk 1: 100 bç moleküler marker, Kuyucuk 2: *cat* geni, kuyucuk 3: pozitif kontrol



Şekil 4.5. Gentamisin dirençli izolatlarda belirlenen aminoglikozid direnç genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kuyucuk 1: moleküler marker, Kuyucuk 2: *ant(4)-Ia+ aac(6)-Ie-aph(2)-Ia+ aph(3)-IIIa*, Kuyucuk3: *ant(4)-Ia+ aac(6)-Ie-aph(2)-Ia*

#### 4.4. Virülens Genlerinin Tespiti

95 enterokok izolatının 84'ünde (%88,4) en az bir ve daha fazla virülens geni tespit edilirken, 11'inde (%11,6) hiçbir virülens geni bulunmadı. Gen tespit edilen

izolatların hiçbirinde *hyl* geni bulunmadı. En çok bulunan virülens gen *gelE*'dir (67, %79,8). *asa1* geni 95 izolatın 54'ünde (%64,3), *esp* geni 53'ünde (%63,1) ve *cylA* geni ise 9'unda (%10,7) tespit edildi. Tespit edilen virülens gen kombinasyonları ise *gelE+esp+asa1+cylA* (n:4 %4,76), *gelE+esp+asa1* (n:17 %20,2), *gelE+asa1+cylA* (n:3 %3,6), *esp+asa1+cylA* (n:2 %2,4), *gelE+esp* (n:26 %31,0), *gelE+asa1* (n:18 %21,4) ve *esp+asa1* (n:3 %3,7). İzolatlarda tespit edilen virülens genler ve kombinasyonları Çizelge 4.2' de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Virülens genlerin *Enterococcus* spp.'lere göre dağılımı

Virülens gen	<i>E. faecalis</i> n(%) n:87	<i>E. faecium</i> n(%) n:5	<i>E. durans</i> n(%) n: 2	<i>E. gallinarum</i> n(%) n: 1	Toplam (%) n:95
<i>gelE, esp, asa1, cylA</i>	4(4,6)	-	-	-	4(4,2)
<i>gelE, esp, asa1</i>	17(19,5)	-	-	-	17(17,9)
<i>gelE, asa1, cylA</i>	3(3,4)	-	-	-	3(3,1)
<i>esp, asa1, cylA</i>	2(2,3)	-	-	-	2(2,1)
<i>gelE, esp</i>	25(28,7)	1(20)	-	-	26(27,4)
<i>gelE, asa1</i>	17(19,5)	1(20)	-	-	18(18,9)
<i>esp, asa1</i>	3(3,4)	-	-	-	3(3,1)
<i>gelE</i>	1(1,1)	-	-	-	1(1,1)
<i>asa1</i>	8(9,2)	-	-	-	8(8,4)
<i>Esp</i>	2(2,3)	-	-	-	2(2,1)
<i>Negatif</i>	5(5,7)	3(60)	2(100)	1(100)	11(11,6)

#### 4.5. Tartışma

İntestinal floraya özgü olduğu bilinen enterokoklar, insanlarda hastane kaynaklı enfeksiyonlara da neden olan mikroorganizmalardır. Yapılan literatür çalışmasında doğru kullanımı olmaması nedeniyle süt, peynir gibi süt ürünleriyle, et ve diğer et ürünleri gibi geniş yelpazedeki gıdalarda enterokok kontaminasyonu olduğu doğrulanmıştır (Koluman ve ark., 2009). Gıda kaynaklı enterokoklara ilişkin ülkemizde yapılmış çeşitli çalışmalarda enterokokların yaygın olarak izole edildiği belirtilmektedir (Karakaş, 2005; Karabıyık, 2011; Yüksel, 2012; Nalvuran, 2013; Öztürk Torlak, 2013; Herkmen, 2015; Yılmaz ve ark., 2016).

Süt, gıda kaynaklı patojenler için önemli bir rezervuardır. Enterokoklar çoğunlukla kontaminasyona bağlı olarak çiğ sütte bulunmaktadır (Franciosi ve ark.,

2009; Gaglio ve ark., 2016). Özellikle *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinin farklı ülkelerde süt ürünlerinde yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir (Gaglio ve ark., 2016). Ülkemizde çeşitli peynir, et ve değişik fermente gıdalarda enterokokların izolasyonuna, antibiyotik direncine ve virülens genlerine ilişkin yayınlanmış makaleler olmasına karşın, bildiğimiz kadarıyla çiğ süt örneklerinden izole edilen enterokoklarla ilgili kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* çiğ süt ve süt ürünlerinde en sık rastlanılan enterokok türlerini oluşturmaktadır (Tuncer ve ark., 2014). İspanya’da yapılan bir çalışmada keçi sütü örneklerinin %63.6’sından *Enterococcus* spp. izole edilmiştir. Bu izolatların *E. faecalis* ve *E. faecium*’a ait olduğu bildirilmiştir (Cortes ve ark., 2006). Türkiye’de peynirlerle yapılan çalışmalarda 10<sup>6</sup> CFU/g konsantrasyona kadar enterokok varlığı hakkında bazı veriler bulunmaktadır (Aygün ve ark., 2005; Özmen Togay ve ark., 2010). Çıtak ve ark.’ları (2005) 78 çiğ süt örneğinden 177 enterokok izole etmişlerdir; bu izolatların %54,2’si *E. faecalis*, %29’u *E. faecium*, %6,2’si *E. durans*, %5’i *E. hirae/dispar*, %3’ü *E. gallinarum*, %2,2’si *E. mundtii* ve %0,5’i *E. raffinosus* olarak tanımlanmıştır. Araya ve ark. (2005), 105 çiğ süt örneğinin %38’inden enterokok izole etmiş ve bunların %71 *E. faecalis*, %19 *E. faecium*, %4 *E. durans*, %4 *E. gallinarum* ve %2 *E. avium* olarak tanımlamıştır. Keçeci ve ark. (2016) ise, sağlıklı ve mastisitli 150 inek sütünden 84 *Enterococcus* spp. izole etmiş ve bunların %68’ini *E. faecalis*, %9’unu *E. faecium* ve %23’ünü *Enterococcus* spp. olarak PZR ile tanımlanmıştır. Tez çalışmamızda 120 çiğ süt örneğinden 95 (%79,2) enterokok izolasyonu yapılmıştır. Bunların %91,6’si *E. faecalis*, %5,3’ü *E. faecium*, %2,1’i *E. durans* ve %1,1’i *E. gallinarium* olarak belirlenmiştir.

Dünyada ve ülkemizde süt ve süt ürünlerinde farklı enterokok izolasyon oranlarıyla ilgili başka çalışmalarda bulunmaktadır (Karakaş, 2005; Nam ve ark., 2009; Herkmen, 2015; Bouymajane ve ark., 2018). Bu izolasyon farklılığının, ülkeden ülkeye değişebilen sütün işleme koşullarıyla ilgili (hijyen, pastörizasyon gibi) olabileceği belirtilmiştir (Jamet ve ark., 2012). Tez çalışmamızda en sık bulunan tür *E. faecalis* (%91,58) olup bu sonuç Avrupa ülkeleri ve Türkiye’de yapılan çalışmalarla uyumludur. (Araya ve ark., 2005; Koluman ve ark., 2009; Özmen Togay ve ark., 2010; Nieto-Arribas ve ark., 2011; Jamet et al., 2012; Keçeci ve ark., 2016). Buna karşın bazı çalışmalarda *E. faecium*’un en sık izole edilen tür olduğu bildirilmiştir (Tuncer, 2009;

Hammad ve ark., 2015). Ayrıca tezimizde farklı izolasyon oranlarının bulunması çalışmamızda ön zenginleştirme yapılmasıyla da ilgilidir.

Enterokoklar intrinsik olarak (düşük düzey aminoglikozid ve  $\beta$ -laktamlar gibi) çok sayıda antibiyotiğe dirençlidir ve başka antimikrobilyallere de mutasyonlar ve horizontal gen transferi ile direnç kazanabilmektedir. Çalışmamızda tüm izolatlar vankomisine duyarlı bulunmuştur. Benzer şekilde Nam ve ark. (2009), Kasımoğlu-Doğru ve ark. (2010), Şanlıbaba ve Şentürk (2018), çeşitli enterokok türleriyle yaptıkları çalışmada vankomisin direncine rastlamamışlardır. Ancak Özmen Togay ve ark. (2010), Keçeci ve ark. (2016), Elmalı ve Can'ın (2018), hayvansal kaynaklı çeşitli gıda ürünlerinden (çiğ süt, peynir, sürk peyniri, kırmızı et gibi) izole ettikleri enterokok türlerinde az sayıda da olsa *vanA*, *vanB* ve *vanC1* geni tespit etmişlerdir. Örneğin Elmalı ve Can (2018) 66 enterokok izolatın 3'ünde (%4,5) *vanA* belirlemişlerdir. Nam ve ark. (2009), 105 enterokok izolatında en sık gözlenen direncin %69,5'inin tetrasikline, %64,7'sinin penisiline %57,1'inin eritromisine, %44,7'sininde sefalotine dirençli olduğunu, 6 izolatın ise test antibiyotiklerine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Yüksel (2012) 48 enterokok izolatının; %14,5'inin gentamisine, %16,6'sının ampsiline, %22,9'unun kloromfenikole, %25'inin tetrasikline, %62,5'inin siprofloksasine, %79,1'inin rifampine, %79,1'inin vankomisine, %97,9'unun eritromisine, ve tüm izolatların kanamisin ve nalidiksik asite dirençli olduğunu tespit etmiştir. Yavaş (2015), yaptığı çalışmada enterokok izolatlarından %58,5'inin amoksisilin-klavulanik asite, %44,7'sinin ampisilin-sulbaktama, %30,8'inin amikasine, %24,7'sinin tetrasikline ve %23,1'inin pierasilin-tazobaktama dirençli olduğunu bulmuştur. Bouymajane ve ark. (2018), çiğ sütlerle yaptıkları çalışmada 150 çiğ inek sütünden 17 *Enterococcus* spp. izolatı elde etmişler ve bu izolatlarda bulunan antibiyotik direnç oranları %65 tetrasiklin, %78 streptomisin, %55 gentamisin, %40 eritromisin, %15 siprofloksasin, %5 vankomisin, %1,6 kloramfenikol ve %0 penisilin olarak tespit etmişlerdir. Ortega ve ark. (2016), çiğ sütlerden izole ettikleri 19 *Enterococcus* spp. izolatının hepsinin streptomisine intrinsik dirençli olduğunu, karbapenemlere karşı direnç olmadığını, penisilin ve glikopeptitlere karşı dirençli suş oranı %50'den az olduğunu, sefalosporinlere direnç %70'ten yüksek ve linkozamidlere ise %84,2 oranında olduğunu ve izolatların %36,8 vankomisin, %21,1 teikoplanine dirençli olduğunu gözlemlemişler. Klindamisin dirençli tüm suşlar ise en az 3 antibiyotiğe daha dirençli bulunmuştur.

Öztürk Torlak (2013), süt örneklerinden izole ettiği 18 enterokok suşunun %33,3'ünün eritromisine, %5,6'sının gentamisine, %5,6'sının ampisiline, %5,6'sının kloramfenikole ve %5,6'sının teikoplanin antibiyotiklerine dirençli olduğunu bulmuşlardır. Vankomisin, penisilin ve levofloksasin antibiyotiklerine ise tüm *Enterococcus* izolatlarının duyarlı olduğu bulunmuştur. Koluman ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada hazır gıdalardan izole ettikleri *Enterococcus*'ların %24 gentamisin, %24 eritromisin, %22 vankomisin, %8 penisilin ve %2 ampisilin antibiyotiklerine dirençli olduğunu bulmuşlardır. Omar ve ark. (2004), et, süt ürünleri ve çeşitli sebzelerle yaptıkları çalışmada izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının hepsini ampisilin, penisilin, gentamisin, streptomisin ve kloramfenikole duyarlı bulmuşlardır. Eritromisin ve rifampisine ise yüksek oranda direnç gözlemlenmiştir. Vankomisin ve teikoplanin dirençli sadece bir izolat tespit etmişlerdir. Çıtak ve ark.'ları 2005'de çiğ süttten elde ettikleri 177 enterokok izolatlarıyla yaptıkları antimikrobiyal direnç çalışmalarında % 95 oksasilin, %97 streptomisin ve % 86 eritromisine yüksek direnç tespit etmişlerdir. Araştırmacılar *E. faecalis* izolatlarının, *E. faecium* izolatlarına göre vankomisin ve teikoplanine daha fazla dirençli olduklarını bulmuşlardır.

Tez çalışmamızda denenen antimikrobiyal etkenlere karşı en yüksek direnç *E. faecalis* izolatlarında tespit edilmiştir. 95 enterokok izolatının en çok tetrasiklin (%41,1), rifampin (%33,7) ve ampisiline (%27,4) dirençlilikleri belirlendi. Calónico ve ark. (2018), son iki yıllık süreçte *E. faecalis* izolatlarının %40'ın üzerinde TE, VA, E ve AM'e; *E. faecium*'a göre daha dirençli olduklarını belirtmişlerdir. Benzer şekilde bazı çalışmalarda yüksek tetrasiklin direnci gösterilmiştir (Jamet ve ark., 2012; Pesavento ve ark., 2014; Raafat ve ark., 2016). Buna zıt olarak Şanlıbaba ve ark. (2018), çalışmalarında %11,7 tetrasiklin direncine rastlamışlardır. Enterokoklar, enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan  $\beta$ -laktam antibiyotiklere (ampisilin ve penisilin gibi) intrinsik olarak düşük düzey direnç gösterirler. Çalışmamızda ampisilin direnci %27,4 bulunmuştur. Ampisilin direncinin yüksek olduğu sonuçlar benzer çalışmalarda da gösterilmiştir (Pesavento ve ark., 2014; Bulajic ve ark., 2015; Gaglio ve ark., 2016; Demirgöl ve Tuncer, 2017; Şanlıbaba ve Şentürk, 2018). Enterokoklarda yüksek ampisilin direnci penisilin bağlayıcı protein 5 (PBP5)'in yüksek seviyede ekspresyonundan ileri gelmektedir (Vrabec ve ark., 2015).

Enterokoklar arasında tetrasiklin direnci yaygın olup en sık bulunan gen *tetM*'dir. Bu gen dışında enterokoklardaki tetrasiklin direnç determinantları K,L,O ve S sınıflarına sahiptir (Aarestrup ve ark., 2000). Çalışmamızda *tetM* 32 izolatta, *tetK* 2 izolatta, *tetL* 2 izolatta ve *tetM+tetK* 4 izolatta tespit edildi. Yüksel (2012), tetrasikline dirençli 13 enterokok suşuyla yaptığı çalışmada izolatların tamamının *tetM* geni taşıdığını, hiçbirinin *tetL* geni içermediğini belirlemiştir. Aarestrup ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada, 135 tetrasiklin dirençli *E. faecalis* izolatının 128'inde (%95), 81 *E. faecium* izolatının 77'sinde (%95) *tetM* geni tespit etmişlerdir. *tetL* geni ise *E. faecalis* izolatlarının %17'sinde, *E. faecium* izolatlarının ise %16'sında saptanmıştır. Tetrasiklin direncinde önemli olduğu bildirilen *tetM* ribozomal koruma, *tetL*'de efluks atım pompasını kodlamaktadır. (Aarestrup ve ark., 2000, Del Campo ve ark., 2003, Poeta ve ark., 2005). Deney sonuçlarımızda da 95 enterokok izolatında 43 *tetM* geni tespit edilmesi göstermiştir ki, *tetM* geninin horizontal gen transferiyle aktarılması, tetrasiklin dirençliğinin yayılımının anlamak açısından önem taşımaktadır. Yang ve ark. (2019), 81 mastisitli süt örneğiyle yaptıkları çalışmada tüm tetrasiklin dirençli *E. faecalis* izolatında tek ya da kombine olarak bulunan *tetK* (%97.2), *tetL* (%85.9), *tetM* (%97.2) ve *tetS* (%19.7) direnç genleri tespit etmişlerdir.

Eritromisin direnci genellikle *ermB* geni ile ilişkilidir. *erm(B)* geni 23 rRNA'yı modifiye eden ve makrolidlere karşı dirençliliği sağlayan *erm*'i (eritromisin ribozom metilasyon) kodlar (Del Campo ve ark., 2003). Metilasyon nedeniyle antibiyotik ribozomlara bağlanamaz. Makrolidler yanında, linkozamidlere ve streptogramin B'ye karşı da dirençlilik sağlayan bu gen, söz konusu antibiyotiklere dirençli enterokok izolatlarında yaygın bir şekilde görülmektedir (Aarestrup ve ark., 2000, Shepard ve Gilmore 2002). Tez çalışmamızda, eritromisin direnç genlerinden *ermA* 1 izolatta, *ermB* 3 farklı kombinasyonda; *tetM+ermB*: 5, *tetL+ermB*: 1 ve *tetM+tetL+ermB*: 2 izolatta bulundu. Yang ve ark. (2019), eritromisin dirençli izolatlarla yaptıkları çalışmada, tek ya da kombinasyon halinde *ermB* 18 (28.1%) ve *ermC* 62 (96.9%) genlerini birlikte bulmuşlardır.

Çalışmamızda 95 enterokok izolatının 3'ünün (%3,2) kloramfenikole dirençli olduğu ve sadece birinin *cat* geni taşıdığı belirlendi. Benzer şekilde Şanlıbaba ve ark. (2018), kloramfenikol direncini *E. faecalis* izolatlarında %4,2 olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlar Türkiye'de rapor edilen diğer kloramfenikol'ün yüksek direnciyle ilgili

çalışmalardan dūřuktur (Çıtak ve ark., 2004; Yüksel ve ark., 2015). Türkiye’de hayvancılıkta kloramfenikolün kullanımı 2002 yılında yasaklanmıştır (Kasımoğlu-Dođru ve ark., 2010). Bu yasaklanma Türkiye’de dūřuk kloramfenikol direncinin muhtemel sebebi olabilir.

Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direncine, aminoglikozid modifiye eden enzimler (AME) aracılık eder. Çalışmamızda 1 izolatta hiçbir AME geni bulunmazken; 3 izolatta *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia* geni, 1 izolatta ise *aac(6’)-Ie-aph(2’)-Ia + aph(3)-IIIa* geni birlikte bulundu. Yüksel’in (2012), yaptığı çalışmada *aac(6’)-aph(2’)* geni *E. faecalis*’te %26, *E. faecium*’da ise %9 olarak belirlenmiştir. Kobayashi ve ark. (2001), *E. faecalis*’te (%42,5) *aac(6’)-aph(2’)*’nın prevalansını *E. faecium*’a (%4,3) göre daha fazla belirlemiştir. Poeta ve ark. (2005), aynı AME genini yüksek düzey gentamisin dirençli 2 *E. faecalis* izolatında ve Aarestrup ve ark. (2000) ise insan, domuz ve broylerden elde ettikleri beř gentamisin dirençli izolatın (bir *E. faecalis* ve dört *E. faecium*) tümünde bu geni belirlemişlerdir. Benzer sonuca şanlıbaba ve ark.’nın (2018) çalışmasında da rastlanmıştır (%3,8). Bizim deney sonuçlarımızda da beř gentamisin dirençli izolatın dördünde direnç genlerine rastlanmıştır Gentamisin direnç sonuçlarımız benzer çalışmalarla da uyumludur (Jamed ve ark., 2012; Bulajic ve ark., 2015). Bu durum enterokokların hücre duvarından dūřuk düzeyde intrinsik olarak aminoglikozidleri penetre etme durumlarına bağlı olabilmektedir (Moellering ve ark., 1980).

Rifampin direnci enterokoklarda yaygındır. Çünkü mRNA’nın transkripsiyonunu inhibe eder. Çalışmamızda yüksek düzey rifampin direncine rastlanmıştır (%33,7). Ülkemizde benzer şekilde şanlıbaba ve ark. (2018), rifampin direncini %78,4 bulmuşlardır.

Yüksek antibiyotik direnç oranlarının olması antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz kullanımından kaynaklı olabileceği düşünölmektedir. Çok farklı antibiyotik direnç oranlarının bulunması hayvan yemlerinde terapötik olmayan antimikrobiyal büyüme faktörlerinin kullanımı ile ve ölkelerde farklı uygulama mevzuatların olmasından da kaynaklanabilir.

Enterokokların patogeneğinde çeşitli virölens genlerinin rol oynadığı bilinmektedir. (Mundy ve ark., 2000). Enterokokların enfeksiyona neden olması için, konak dokuya kolonize olmaları ve konak immün savunma mekanizmalarından



kaçmasını sağlayacak çeşitli virülens faktörlere ihtiyacı vardır. Bu çalışmada izolatların hiçbirinde *hyl* geni bulunmazken, *gelE*, *asa1*, *esp* ve *cylA* genleri sırasıyla %79,8, %64,3, %63,1 ve %10,7 oranlarında tespit edildi. Onbir izolatta ise hiçbir virülens geni belirlenmedi. Ayrıca çeşitli virülens gen kombinasyonlarına en çok *E. faecalis* izolatlarında rastlandı. Tez çalışmamızda dokuz enterokok izolatının herhangi bir virülens gen ya da direnç geni taşımadığı, ancak bunlardan altı izolatın bir veya birkaç antibiyotiğe fenotipik olarak dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bazı araştırmacılar süt ya da peynir orjinli *E. faecalis* ve *E. faecium* örneklerinde virülens genlerine rastlanmazken (Omar ve ark. 2004), çalışma sonuçlarımıza benzer önceki çalışmalarda, *E. faecalis* izolatlarının daha çok virülant özellik taşıdığını bildirmişlerdir (Franz ve ark., 2001; Martin-Platero ve ark., 2009; Hammad ve ark., 2015). Büyükyörük ve ark.'nın (2014) taze peynirlerle yaptığı çalışmada ise *E. faecium* izolatlarının daha fazla virülens özellik taşıdıklarını raporlamışlardır. Ayrıca çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde, aynı araştırmacılar ve Martin-Platero ve ark., (2009) hemen hemen tüm *E. faecalis* izolatlarının *gelE* ve sıklıkla *asa1* 'e sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Hammad ve ark. (2015), Mısır çiğ süt peyniri ve Karış peynirinden izole ettikleri 100 enterokok izolatının %2,5'inde *asa1*, %0,83 *cylA*, %4,1 *esp*, %6,6 *gelE* ve %0,83'ünde *hyl* virülens genlerinin varlığını tespit etmişler. Herkmen (2015) 13 *E. faecium* izolatının %69,2'sinde *efaAfm*, %30,7'sinde *gelE*, %30,7 *esp* virülens genlerini taşıdıklarını, izolatların %23'ünde hiç virülens gen olmadığını ve bakılan 5 virülens genotipinden %38,4'ünün bir gen, %23'ünün iki gen ve %15,3'ünün üç gen içerdiğini bulmuşlardır. Yang ve ark. (2019), 81 mastisitli süt örneğiyle yaptıkları çalışmada *E. faecalis* izolatlarının virülens genlerini sırasıyla *gelE* 57 (70.4%), *hyl* 2 (2.5%), *asa1* 20 (24.7%), *esp* 69 (85.2%), *efaA* 74 (91.4%), ve *ace* 16 (%19.8) olarak tespit etmişler. İzolatların hiçbirinde *cylA* gözlenmezken, 77 (%95,1) izolatta en az 2 virülens gen tespit edilmiş ve 4 izolat tüm virülens genler açısından negatif bulunmuştur. Gaglio ve ark. (2016) geleneksel peynir, çiğ gıda ve gıda ekipmanlarından izole ettikleri 40 enterokok izolatının 20'sinde farklı virülens genleri tespit etmişlerdir. *E. faecalis* suşlarının *E. faecium*'a göre daha çok virülens faktör taşıdığını ifade etmişlerdir. *E. faecium*'da *gelE* geni 15(%37,5), *asa1* 19 (%47,5), *efaA* 10 (%25,0), *ace* 11 (%27,5) ve *esp* de 8 (%20,0) suшта bulunmuştur.

Bu tez çalışmasıyla, bildiğimiz kadarıyla, Hatay'da ilk kez çiğ sütlerden izole edilen enterokok suşlarında virülens genlerinin varlığını ve dağılımını belirlemiş olduk. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de enterokokların süt ürünlerinin imalatında kullanılma eğilimleri vardır. Tez çalışmamızda yüksek sıklıkta virülens genleri belirlendiğinden, enterokok türlerinin geniş bir virülens gen grubu için moleküler tarama olmadan üretim amacıyla kullanılmamasını tavsiye etmekteyiz. Özellikle süt endüstrisinde enterokokların virülens özelliklerinin fenotipik olarak belirlenmesinin moleküler yöntemler kullanılmadıkça güvenilir olmadığı belirtilmiştir (Malek ve ark., 2012). Tez çalışmamızda izolatlar bazı sınırlı virülens gen varlığı açısından taranmış olsa da, sonuçlarımız gıda endüstrisinde kullanım için enterokok suşlarının güvenliği ile ilgili olarak ifade edilen endişeleri pekiştirmektedir (Ogier ve Serror, 2008). Çalışmamızda denenen tüm antibiyotiklere karşı duyarlı olan ve antibiyotik direnç/virülens geni taşımayan üç enterokok izolatu (*E. durans* n:2, *E. faecalis* n:1) bulunması önemlidir. Bu üç izolatu probiyotik özelliklerinin belirlenmesiyle ilgili daha ileri düzeyde yapılacak çalışmalar ile süt endüstrisinde potansiyel kullanılabilirlikleri ortaya çıkabilecektir.

Bu çalışmanın sonuçları çiğ sütün, yüksek düzeyde *Enterococcus* spp. içerdiğini, halk sağlığına zarar verebilecek potansiyel bir antibiyotik dirençli ve virulent enterokok rezervuarı olabileceğini ve bu genlerin gıda kaynaklı yayılması için bir risk faktörü olduğunu göstermektedir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmamızda Hatay ilinde parakende satış yapılan çiğ süt örneklerinden izole edilen 95 Enterokok izolatında tür dağılımı, antibiyotik dirençlilik profilleri ve bazı virülens faktörlerin belirlenme sıklıklarını esas alan fenotipik ve genotipik analizler gerçekleştirilmiştir.

Deney sonuçları analiz edildiğinde, incelenen çiğ süt kökenli Enterokok türlerinde çoklu antibiyotik direnç gelişimi gözlenmiştir. Bu izolatların, virülansı ve fenotipik olarak çoklu antibiyotik gelişimini teşvik eden paternleri açısından incelendiğinde; hastalık yapıcı olarak bilinen patojeniteye katkıda bulunan bazı yüzey adhezinlerinin ve hidrolitik salınan enzimleri kodlayan genlerin yanısıra, kazanılan çeşitli antibiyotik dirençliliğine sebep olan genleri de içerdikleri tespit edilmiştir. Çiğ süt gibi özellikle gıda kaynaklı enterokok türlerinde antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi, halk sağlığı açısından enterokokların sebep olduğu hastalıkların yalnızca klinik kökenli olmayacağına ve giderek yayılabileceğine dair güçlü sonuçlar sunmaktadır. Ayrıca incelenen çoğu enterokok izolatında en az bir veya çeşitli kombinasyonlar şeklinde virülens genlerin tespiti, bu izolatların fermentasyon yöntemleriyle yapılan geleneksel işlemlerde starter kültür olarak kullanılamayacaklarını ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Gerekirse örnek sayısı artırılarak, enterokoklarda tüm horizontal gen aktarım mekanizmalarının daha detaylı bir şekilde araştırılarak temel direnç mekanizmalarının belirlenmesi, enterokok patogenezinde rol oynayan virülensliğin gelişiminin anlaşılması bakımından önem arz etmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner–Smidt, P., Madsen, M., Jensen, L.B., 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 37:127–137.
- Albakkour, K., 2013. Klinik örneklerden izole edilen enterokokların antibiyotik direnç özellikleri. Ankara Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Al-Kobaisi, M.F., 2007. Jawetz, Melnick & Adelberg’s Medical Microbiology: 24th Edition. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, 7(3):273–275.
- Ammor, M. S., Florez, A.B., Mayo, B., 2007. Antibiotic Resistance in Non-*Enterococcal* Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. **Food Microbiology**, 24, 559-570.
- Arabacıoğlu, Ö.Z., 1993. İçme Sütü Tüketiminin Arttırılması ve Okul Sütü Programları. **5. Türkiye Sütçülük Kongresi**, Ankara.
- Araya, M., Davidovich, G., Arias, M.L., Chaves, C., 2005. Identification of *Enterococcus sp.* isolated from raw milk samples coming from the metropolitan area of Costa Rica and evaluation of its antibiotic sensibility pattern. **Arch Latinoam Nutr**, 55(2):161-6.
- Arias, C.A., Murray, B.E., 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature reviews. Microbiology**, 10:266-78.
- Arias, C. A., Contreras, G. A., and Murray, B. E., 2010. Management of multidrug-resistant *enterococcal* infections. **Clin. Microbiol. Infec**, 16:555-562.
- Arizcun, C., Barcina, Y., Torre, P., 1997. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus spp.* isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. **Int. J. Food Microbiol**, 38: 17-24.
- Aslantaş, Ö., Tek, E., 2019. Isolation of Ampicillin and Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium* from Dogs and Cats. **Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.**, 25(2):263-269.
- Aslantaş, T.Ö., 2018. Molecular and phenotypic characterization of enterococci isolated from broiler flocks in Turkey. **Tropical Animal Health and Production**, doi: 10.1007/s11250-018-01784-z.
- Aygun, A., Aslantas, O., and Oner, O., 2005. A survey on the microbiological quality of Carra, a traditional Turkish cheese. **J. Food Eng**, 66:401-404.
- Ayhan, K., 2000. **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları**, 2. Baskı. Ankara Uni., 2:552, Ankara.
- Azimi, M.A., Göncüoğlu, M., 2014. Enterokokların önemli virülens faktörleri ve gıdalarda bulunuşu. **Etlik Vet Mikrobiyol Derg**, 25 (2): 47-52.
- Barbosa, J., Ferreira, V., Teixeira, P., 2009. Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. **Food Microbiology**, 26:527-532.
- Baylan, O., Nazik, H., Bektöre, B., Cıtil. B.E., Turan, D., Ongen, B., Ozyurt, M., Açikel, C.H., Haznedaroğlu, T., 2011. The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary *Enterococcus* isolates. **Mikrobiyol Bul.**, 45(3):430-45.

- Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, Nm., Franz, Cm., Holzapfel, Wh., Pérez-Pulido, R., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A., 2004. Functional And Safety Aspects Of Enterococci Isolated From Different Spanish Foods. **Syst Appl Microbiol**, 27(1):118-30.
- Berry, A. M., Paton, J. C., 2000. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. **Infect. Immun**, 68:133– 140.
- Besler, H. ve Ünal, S. 2006. **IV Uluslar arası beslenme ve diyetetik kongresi bildiri kitabı**, Ankara’da satılan sokak sütlerinin bazı vitaminler açısından değerlendirilmesi ve ev koşullarında uygulanan kaynatmanın süreye bağlı olarak vitaminlere olan etkisi, Ankara.
- Black, RE., Williams, SM., Jones, IE., Goulding, A., 2002. Children who avoid drinking cow milk have low dietary calcium intakes and poor bone health. **American Journal of Clinical Nutrition**, 76:675-80.
- Bouymajane, A., Rhazi, F.F., Oulghazi, S., Ed-Dra, A., Benhallam, F., El Allaoui, A., Anissi, J., Sendide, K., Ouhmidou, B., Moumni, M., 2018. Occurrence, molecular and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from raw cow's milk trade by street trading in Meknes city, Morocco. **Germes**, 4;8(2):77-84.
- Bulajić, S., Tambur, Z., Opačić, D., Miljkovic-Semlimovic, B., Doder, R., 2015. Cenic-Milosevic, D. Characterization of Antibiotic Resistance Phenotypes and Resistance Genes in *Enterococcus* Spp. Isolated from Cheeses. **Archives Biology Sciences**, 67(1):139-146.
- Cakır, D., 2000. **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları**, 2. baskı. Ankara Univ., 522, Ankara.
- Calonico, C., Pesavento, G., Delfino, V., Forni, S., Nostro, A.L., 2018. Prevalence of Antibiotic Resistance in Enterococci: A 14 Year Survey. **Journal of Food and Nutrition Research**, 6(10):626-637.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Łaniewska-Trokenheim, Ł., 2017. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. **LWT-Food Science and Technology**, 75:670-676.
- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, 65:232-260.
- Chow, J. W., Thal, L. A., Perri, M. B., Vazquez, J. A., Donabedian, S. M., Clewell, D. B., Zervos, M. J., 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. **Antimicrob. Agents Chemother**, 37:2474–2477.
- Cortés, C., De La Fuente, R., Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, Jc., Ruiz-Santa-Quiteria, Ja., Orden, Ja., 2006. Occurrence And Preliminary Study Of Antimicrobial Resistance Of Enterococci Isolated From Dairy Goats In Spain. **Int J Food Microbiol**, 1;110(1):100-3.
- Çelik, Ü., Alhan, E., 2008. Difficult Pathogen in Pediatric Infections: *Enterococcus*. **Çocuk Enf. Derg**, 2: 58-66.
- Çıtak, S., Yucel, N., Orhan, S., 2004. Antibiotic Resistance and Incidence of *Enterococcus* Species in Turkish White Cheese. **International Journal of Dairy Technology**, 57(1):27-31.

- Dağdemir, E., Özdemir, S., 2006. Süt ve mamüllerinde enterokoklar. Türkiye 9, gıda kongresi, Bolu.
- Davies, J., 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, 264:375-82.
- Del Campo, R., Ruiz-Garbajosa, P., Sa'nchez-Moreno, M.P., Baquero, F., Torres, C., Canto'n, R., Coque, T.M., 2003. Antimicrobial resistance in recent fecal enterococci from healthy volunteers and food handlers in Spain: genes and phenotypes. **Microbial Drug Resistance**, 9:47–60.
- Demirgöl, F., Tuncer, Y., 2017. Detection of Antibiotic Resistance and Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sucuk, a Traditional Turkish Dry-Fermented Sausage. **Korean Journal of Food Science Animal Resources**, 37(5):670-681.
- Dicuonzo, G., Gherardi, G., Lorino, G., Angeletti, S., Battistoni, F., 2001. Antibiotic resistance and genotypic characterization by PFGE of clinical and environmental isolates of enterococci. **FEMS Microbiol Lett**, 201(2):205-211.
- Diker, K.S., Akan, M., Çarlı, T., Yardımcı, H., Şen, A., Ülgen, M., Sareyyupoglu, B., Çetin, C., 2011. **Veteriner Mikrobiyoloji ve Epidemiyoloji**. T.C. Anadolu Üniversitesi Yayını, 2317, Eskişehir.
- Eaton T. J., and Gasson M. J., 2001. Molecular screening of *Enterococcus* Virulence determinants and potential for genetic exchange between Food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, 67 1628–1635.
- Elmalı, M., Can, Y. H., 2018. The prevalence, vancomycin resistance and virulence gene profiles of *Enterococcus* species recovered from different foods of animal origin. **Veterinarski arhiv**, 88 (1):111-124.
- Facklam, R.R., Teixeria, L.M., *Enterococcus*. 1998. In: **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial infections. 2 (Systematic Bacteriology)**. Ed: Edvard Arnold, 9th edition, London.
- Fisher, K., Phillips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, 155(6):1749-57.
- Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. Eterococci at the crossroads of food safety. **Int J Food Microbiol**, 47:1–24.
- Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods a conundrum for food safety. **Int J Food Microbiol**, 88:105-122.
- Franz C M A P, Muscholl-Silberhorn A. B., Yousif N. M. K., Vancanneyt M., Swings J. and Holzapfel W. H., 2001. Incidence of virulence factors And antibiotic resistance amon enterococci isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, 67 4385–4389.
- Frazzon, A.G., Gama, B.A., Hermes, V., Bierhals, C.G., Pereira, R.I., Guedes, A.G., d'Azevedo, P.A., Frazzon, J., 2010. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet(M) and tet(L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **World J Microbiol Biotechnol**, 26:365–370.
- Gaglio, R., Couto, N., Marques, C., Lopes, M. F. S., 2016. Moschetti, G.; Pompa, C.; Settani, L., Evaluation of Antimicrobial Resistance and Virulence of Enterococci from Equipment Surfaces, Raw Materials, and Traditional Cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, 236:107-114.

- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T., M.; Swings, 2003. Effect of Raw-Milk Cheese Consumption on the Enterococcal Flora of Human Feces. **J. Applied and Environmental Microbiology**, 69(1): 312-319.
- Gilmore, M.S., Segarra, R.A., Booth, M.C., Bogie, C.P., Hall, L.R., Clewell, D.B., 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1- encoded cytolytic toxin system and istrelationshiptol antibiotic determinants. **J. Bacteriol**, 176:7335-7344.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. **Int J Food Microbiol**, 1;88(2-3):215-22.
- Gülay,Z., 2003. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu. **Toraks Dergisi**, 1(3):75-85.
- Gürsoy, O., Kınık, Ö., 2006. Peynir teknolojisinde enterokoklar-İ:biyokimyasal özellikleri ve peynir teknolojisindeki önemleri. **Ege Üni. Ziraat Fak. Dergisi**, 43(3):79-90
- Halkman, K., 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2. Baskı. **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını**, Sim Matbaası, 17:522, Ankara.
- Hammad, A. M., Shimamoto, T., Shimamoto, T., 2014. Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-toeat raw fish. **Food Microbiol**, 38,:62-66.
- Hammad, A.M., Hassan, H.A., Shimamoto, T., 2015. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. **Food Control**, 50:815-820.
- Harwood, V.J., Brownell, M., Perusek, W., Whitlock, J.E., 2001. Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and chicken feces in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, 67:4930-4933.
- Helkmen, T.B., 2015. Mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *Enterococcus faecium* suşlarında gele, esp ve efaafm genlerinin varlığının incelenmesi.. Adnan Menderes Üniversitesi **Sağlık Bilimleri Enstitüsü** Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Huys, G., D'Haene, K., Collard, J.M., Swings, J., 2004. Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* Isolates from Food . **Appl Environ Microbiol**, 70(3):1555-62.
- Ike, Y., Hashimoto, H., Clewell, D. B., 1987. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (Streptococcus) faecalis strains associated with human parenteral infections. **J. Clin. Microbiol**, 25:1524–1528.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Demirpençe, Y., Yıldırım, M., 2008. Enterokoklar: Biyokimyasal, fizyolojik ve fonksiyonel özellikleri ile patojenitesi. **Akademik Gıda**, 6(3): 16-26.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., 2008. Yöresel Peynirden Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterisinin İzolasyonu ve Tanısı. **Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, Sayı 1.
- Jain, M., 1998. Dairy Foods, Dairy Fats, and Cancer. A review of epidemiological evidence. **Nutrition Research**, 18(5):905-937.
- Jamet, E., Akary, E., Poisson, M. A., Chamba, J. F., Bertrand, X., Serror, P., 2012. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. **Food Microbiol**, 31:191-198.

- Jensen, L., B., Frimodt-Möller, N., Aarestrup, F., M. 1999. Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. **FEMS Microbiology Letters**, 170, 151-158.
- Jett, B. D., Huycke, M. M., Gilmore, M. S., 1994. Virulence of enterococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, 7:462-478.
- Karabıyık, Z., 2011. Fermente et örneklerinden izole edilen enterococcus türlerinin bazı teknolojik özellikleri ve çoklu antibiyotik dirençliliği. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Karagöz, G., 2005. Yoğun bakım ünitesinde vankomisin dirençli enterokok taşıyıcılığının araştırılması. Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği Doktora Tezi.
- Karakaş, A., 2005. Beyaz peynir ve fermente sucuklardan *Enterococcus faecium*'un izolasyonu ve tanımlanması. Çukurova Üniversitesi **Fen Bilimleri Enstitüsü** Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Kasımoğlu-Doğru, A., Gencay, Y.E., Ayaz, N.D., 2010. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level; absence of van A and van B genes in *E. faecalis* and *E. faecium*. **Res. Vet. Sci.**, 89:153-158.
- Kececı1, T., Gumussoy, K.S., Hızlısoy, H., 2016. İnek Sütlerinden İzole Edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*'un Vankomisin Direnci. **Journal of Faculty of Veterinary Medicine**, 13(2):139-150.
- Kesenkaş, H., Akbulut, N., 2010. İzmir İlinde Satılan Sokak Sütleri ile Orta ve Büyük Ölçekli Çiftliklerde Üretilen Sütlerin Özelliklerinin Belirlenmesi. **Ege Üniv Zir Fak Derg.**, 47(2):161-169.
- Kılıç, S., 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. **Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları**, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G., Witte, W., 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. **International Journal of Food Microbiology**, 88: 269-290.
- Klein, G., 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastro-intestinal tract. **Int J Food Microbiol**, 88:123-131.
- Kobayashi, N., Alam, M.M., Nishimoto, Y., Urasawa, S., Uehara, N., Watanabe, N., 2001. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. **Epidemiology and Infection**, 126: 197-204.
- Koluman, A., Akan, L.S., Çakiroğlu, F.P., 2009. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. **Food Control**, 20(3): 281-283.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C., Procop, G., Woods, G., 2005. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. **Lippincott Co**, Sixth edition, Philadelphia.
- Laverde Gomez, J. A. L., Hendrickx, A. P., Willems, R. J., Top, J., Sava, I., Huebner, J., Et al., 2011. Intra-and interspecies genomic transfer of the *Enterococcus faecalis* Pathogenicity island. **Plos One**, 6, e16720.
- Layton, B.A., Walters, S.P., Lam, L.H., Boehm, A.B., 2010. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. **J Appl Microbiol**, 109(2):539-47.



- Lund, B., Adamsson, I., Edlund, C., 2002. Gastrointestinal Transit Survival of an *Enterococcus faecium* Probiotic Strain Administered with or without Vancomycin. **International Journal of Food Microbiology**, 77: 109-115.
- Lynch, C., Courvalin, P., Nikaido, H., 1997. Active Efflux of Antimicrobial Agents in Wild-Type Strains of Enterococci. **Antimicrob Agents Chemother**, 41(4): 869-871.
- Malek, R., El-Attar, A., Mohamed, M., Anwar, S., El-Soda, M., & Beal, C., 2012. Technological and safety properties display biodiversity among enterococci Isolated from two Egyptian cheeses, “Ras” and “Domiaty”. **International Journal Of Food Microbiology**, 153, 314e322.
- Martin-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., 2009. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats’ milk cheeses. **Int J Food Microbiol**, 132:24-32.
- Marques E.B., Suzart S., 2004. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. **J. Med Microbiol**, 53:1069-73.
- Menteş, G.Ö., 2007. Yoğun bakım, onkoloji, hemotoloji hastalarında gastrointestinal sistemde kolonize olan enterokok türleri ve vankomisine dirençli profiller. **Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi**.
- Miller, G.D., Jarvis, K.J., McBean, L.D., 2000. Handbook of Dairy Foods and Nutrition. In: **Jensen RG, Kroger M, editors. The Importance of Milk and Milk Products in the Diet**. CRC Press., 4-24, New York.
- Moellering, R.C., 1995. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis*, and *Leuconostoc* species. 1995. In: **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Fourth edition, Principles and Practice of Infectious Diseases**. Churchill Livingstone Company., 1826-1835, New York.
- Moellering, R.C., 1995. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis*, and *Leuconostoc* species. 1995. In: **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Fourth edition, Principles and Practice of Infectious Diseases**. Churchill Livingstone Company., 1826-1835, New York.
- Moellering, R.C., Murray, B.E., Schoenbaum, S.C., Adler, J., Wennersten, C.B., 1980. A Novel Mechanism of Resistance to Penicillin-Gentamicin Synergism in *Streptococcus Faecalis*. **J. Infect. Dis.**, 141:81-86.
- Mundy, L.M., Sahm, D.F., Gilmore M., 2000 Relationships between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiological Review**, 13(4):513-522
- Murray, B.E., 1990. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiological Review**, 3:46-65.
- Nalvuran, Z., 2013. Peynirlerden izole edilen farklı *Enterococcus* türlerinin bakteriyosin üretme yeteneklerinin ve bakteriyosinlerinin karakteristiklerinin belirlenmesi Selçuk Üni. **Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi**.
- Nam, H.M., Lim, S.K., Moon, J.S., Kang, H.M., Kim, J.M., Jang, K.C., Kim, J.M., Kang, M.I., Joo, Y.S., Jung, S.C., 2009. Antimicrobial resistance of enterococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. **Zoonoses Public Health**, 57(7-8):59-64.

- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Chicón, R., Cabezas, L., Palop, L., 2011. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. **Food Microbiol**, 28:891-899
- Ogier, J.C., Serror, P., 2008. Safety assesment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. **Int J Food Microbiol**, 126:291-301.
- Oliver, S.P., Jayarao, B.M., Almeida, R.A., 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathog. Dis**, 2:115–12.
- Omar N B, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif N M K, Franz C M A P, Holzapfel W H, Perez-Pulido R, Martinez-Canamero M and Galvez A., 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated From different Spanish foods. **Systematic and Applied Microbiology**, 27 118–130.
- Ordolff, D., 2001. Introduction of electronics into milking Technology. **Computers and Electronics in Agriculture**, 30:125–149
- Ortega, C., Espada, M., Simón, M.C., 2016. Patterns of resistance to antibiotics in *Enterococcus* spp isolated from raw milk tank of dairy farms; a risk for animal and public health? **REDVET Rev. Electrón. Vet**, 17-7.
- Özmen Togay, S., Çelebi Keskin, A., Açık, L., Temiz, A., 2010. Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. **J. Appl. Microbiol**, 109:1084-1092
- Pesavento, G., Calonico, C., Ducci, B., Magnannini, A., Lo Nostro, A., 2014. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Enterococcus* Spp. Isolated from Retail Cheese, Ready-To-Eat Salads, Ham, and Raw Meat. **Food Microbiology**, 41:1-7.
- Peters, J., Mac, K., W\_Chmann-Schauer, H., Klein, G., Ellerbroek, L., 2003. Species Distribution and Antibiotic Resistance Patterns of Enterococci Isolated from Food of Animal Origin in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, 88, 311-314.
- Poeta, P., Costa, D., Sa'enz, Y., Klibi, N., Ruiz-Larrea, F., Rodrigues, J., Torres, C., 2005. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. **The Journal of Veterinary Medical**, 52:396–402.
- Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 200. Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. **Infect Immun**, 68(5):2579-86.
- Quednau, M., Ahrne, S., Peterson, A.C., Molin G., 1998. Antibiotic resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. **Journal of Applied Microbiology**, 84:1163-1170.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. 2013. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiol Rev**, 37: 664–698.
- Raafat, S.A., Abo-Elmagd, E.K., Awad, R.A., Hassan, E.M., 2016. Prevalence of Vancomycin Resistant Enterococci in Different Food Samples. **Egyptian Journal of Medical Microbiology**, 25(4):47–55.
- Rakita, R.M., Vanek, N.N., Jaquez-Palas, K., Mee, M., Mariscalco, M.M., Dunny, G.M., Snuggs, M., van Winkle, W.B., Simon, S.I., 1999. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils

- despite phagocysto-sis and neutrophil activation. **Infect. Immun**, 67:6067-6075.
- Riboldi, G.P., Frazzon, J., Azevedo, P., Frazzon, A., 2009. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40:125-128.
- Rozdzinski, E., Marre, R., Susa, M., Wirth R, Muscholl-Silberhorn A., 2001. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. **Microb Pathog**, 30(4):211-220.
- Sadık Buyukyoruk, Naim D. Ayaz, Yılmaz E. Gencay, Devrim Beyaz And Pelin Kocak., 2014. Species Distribution, Molecular Characteristics And Vancomycin Resistance Gene Profiles Of *Enterococcus* Sp. Isolates From Farmhouse Cheeses In Western Turkey. **International Journal of Dairy Technology**, 10.1111/1471-0307.12090
- Sanlibaba, P., ve Senturk, E., 2018. Prevalence, Characterization And Antibiotic Resistance Of Enterococci From Traditional Cheeses In Turkey. **International Journal of Food Properties**, 21(1):1955-1963.
- Sava, I.G., Heikens, E., Huebner, J., 2010. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. **Clin Microbiol Infect**, 16(6):533-40.
- Saymer, H.S., 2008. Antibiyotik duyarlılıkları ve kolonize hastalıklarda risk faktörlerinin değerlendirilmesi. Ok Meydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi **Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği Uzmanlık Tezi**.
- Schmidtchen, A., Frick, I.M., Andersson, E., Tapper, H., Björck, L., 2002. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. **Mol Microbiol**, 46(1):157-68.
- Shankar, V., Baghdayan, A. S., Huycke, M. M., Lindahl, G., Gilmore, M. S., 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. **Infect. Immun**, 67:193–200.
- Shepard, B.D., Gilmore, M.S., 2002. Differential Expression of Virulence-Related Genes in *Enterococcus faecalis* in Response to Biological Cues in Serum and Urine. **Infect Immun**, 70(8):4344-52.
- Shepard, B.D., Gilmore, M.S., 2002. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**, 4:215–224.
- Sun, X., Yang, X., Wang, E. 2003. Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, 1005: 189–195.
- Teixeira, L.A., Facklam, R.R., 2003. *Enterococcus*. In: **Manual of Clinical Microbiology**, Eighth edition, ASM Pres, 422-433, Washington.
- Tekin, G.M., 2004. Enterokoklar: Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenezi. Önemli ve Sorunlu Bakteri Enfeksiyonları. **Bilimsel Tıp Yayınevi**, 121-140, Ankara.
- Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Shankar, N., 2003. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. **Cellular Molecular Life Sciences**, 60:2622–2636.
- Togay, S.Ö., Ay, M., Altunatmaz, S.S., Aksu, F.Y., Tınaztepe, Ö.E., İssa, G., Büyükcünal, S.K., 2016. Antimicrobial Activity Potential of *Enterococcus* spp. Isolated from some Traditional Turkish Cheeses. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, 22(5):765-770.

- Torlak, F.Ö., 2013. Klinik ve Gıda Örneklerinden İzole Edilen *Enterococcus*'ların Virülens Faktörleri ve Antibiyotik Dirençlilikleri. Gazi Üniversitesi **Fen Bilimleri Enstitüsü** Yüksek Lisans Tezi.
- Tuncer, M., Özden, B., Tuncer, Y., 2014. Çiğ süttten izole edilen enterosin B üreticisi *Enterococcus faecalis* MYE58 suşunun güvenlik değerlendirmesi. **Gıda / The Journal Of Food**, 39(5):275-282.
- Tuncer, Y., 2009. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese. **Afr. J. Biotechnol**, 8:7008-7016.
- Van, T.D., Martin, M.J., Gilmore, M.S., 2013. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. **Toxins**, 29(5):895-911.
- Vaningelgem, F., Ghijssels, V., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. Cometabolism of citrate and glucose by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in the absence of cellular growth. **Applied and Environmental Microbiology**, 72: 319-326.
- Vankerckhoven, V., Van, A.T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., Goossens, H., 2004. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. **J Clin Microbiol**, 42(10):4473-9.
- Vrabec, M., Lovayova, V., Dudrikova, K., Gallo, J., Dudrikova, E., 2015. Antibiotic Resistance and Prevalence of *Enterococcus* Spp. And *Escherichia coli* Isolated from Bryndza Cheese. **Italian Journal of Animal Science**, 14:609-614.
- Wax, R., G., Lewis, K., Salyers, A., A., Taber, H. 2008. Bacterial Resistance to Antimicrobials. **Taylor and Francis Group, LLC**
- Wayne, P.A., 2012. Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 17<sup>th</sup> informational suplement, M100- S22,
- Wilke, M.S., Lovering, A.L., Strynadka, N.C., 2005. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Curr Opin Microbiol**, 8(5):525-33.
- Winn, W., Stephan, A., Janda, W., Koneman, E.W., Procop, G., 2006. Koneman's Color Atlas and Textbook of diagnostic Microbiology.. **Lippincott Williamsa Wilkins**, Baltimore Philadelphia, USA.
- Woodford, N., Soltani, M., Hardy, K. J., 2001. Frequency of *esp* in *Enterococcus faecium* isolates. **Lancet**, 358:584.
- Yang, F., Zhang, S., Shang, X., Wang, X., Yan, Z., Li, H., Li, J., 2019. Short communication: Antimicrobial resistance and virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. **Journal of dairy science**, 102(1):140-144.
- Yavaş, E.S., 2015. Gıdalardan İzole Edilen Enterobacteriaceae Türlerinin Amino Asit Dekarboksilaz Aktivitesi Biyofilm Oluşumu Ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi.
- Yıldırım M., 2007. Enterokoklar ve Enterokoklarla Gelişen Enfeksiyonlar. **Düzce Üniv. Tıp Fak. Derg**, 2:46-52.
- Yılmaz, E. S., Aslantas, Ö., Pehlivanlar Ö.S., Türkyılmaz, S., Kürekci, C., 2016. Prevalence, antimicrobial resistance and virulence traits in enterococci from food of animal origin in Turkey. **LTW-Food Sci. Technol.**, 66:20-26.
- Yuksel, F.N., Akcelik, N., Akcelik, M., 2015. Incidence of Antibiotic Resistance Virulence Determinants in *Enterococcus Faecium* and *Enterococcus Faecalis*

- Strains, Isolated from Traditional Cheeses in Turkey. **Molecular Genetics, Microbiology Virology**, 30(4):206-215.
- Yüce, A., 2001. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. **Klinik dergisi**, 14(2):41-46.
- Yüksel, F.N., 2012. Gıda Kaynaklı *Enterococcus Faecalis* ve *Enterococcus Faecium* Suşlarında Virülens Faktörlerin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi **Fen Bilimleri Enstitüsü** Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Zastempowska, E., Grajewski, J., Twarużek, M. 2016. Food-borne pathogens and contaminants in raw milk- A Review. **Ann. Anim. Sci**, 16(3):623–639.



## ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Mersin’de doğdum. İlkokul, Ortaokul ve Lise öğrenimini Mersin’de tamamladım. Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldum. 2016 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesinde pedagojik formasyon aldım. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalına 2017 – 2018 güz döneminde yüksek lisans öğrenimine başladım.

