

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

MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN E. DURANS VE E. HIRAE’NİN
İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU

ELİF SEZGİN KAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından VTF- 15072 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN–2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Elif Sezgin KAYA tarafından hazırlanan “**MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN *E. DURANS* VE *E. HIRAE*’NİN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU**” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/11/2016

Ad ve Soyadı:

Üniversitesi

İmzası

Üye: Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ

.....

Üye: Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ
(Danışman)

ADÜ

.....

Üye: Yrd. Doç. Dr. Fulya OCAK

MCBÜ

.....

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemi ve tez sürecinde sabrı ve anlayışıyla bana hep yardımcı olan danışmanım Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim üyelerine, manevi desteğin en büyüğünü veren kıymetli aileme sonsuz teşekkür eder, bu tezi kısa zaman önce aramızdan ayrılan babam Osman Nuri KAYA'ya ithaf ederim.



İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Mastitis Nedir?	2
2.2. Mastitisin Önemi ve Önlenmesi	3
2.3. Mastitis Etkenleri.....	4
2.3.1. <i>E. coli</i> Mastitisleri	5
2.3.2. <i>Klebsiella</i> Mastitisleri.....	5
2.3.3. Diğer Gram Negatif Patojenler.....	6
2.3.4. <i>S. aureus</i>	6
2.3.5. <i>S. agalactiae</i>	7
2.3.6. Diğer Streptokoklar, Enterokoklar ve Laktokoklar	7
2.4. Enterokoklar	7
2.4.1. <i>E. durans</i> ve <i>E. hirae</i>	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Gereç	14
3.1.1. Süt Örnekleri	14
3.1.2. Besiyerleri ve Solusyonlar.....	14
3.1.2.1. Besiyerleri.....	14
3.1.2.1.1. Chromocult® Enterococci Broth.....	15
3.1.2.1.2. Chromocult® Enterococci Agar	15
3.1.2.1.3. Kanlı Agar	15
3.1.2.1.4. Brain Heart Infusion Broth	15
3.1.2.1.5. Brain Heart Infusion Broth (%20 gliserinli).....	15
3.1.2.2. Solusyonlar	16

3.1.2.2.1. %6,5 NaCl içeren Nutrient Broth	16
3.1.2.2.2. %3'lük Hidrojen Peroksit	16
3.1.2.2.3. Jel Yükleme Tamponu	16
3.1.2.2.4. TAE Elektroforez Tamponu	17
3.1.3. PZR.....	17
3.1.3.1. Kullanılan Cihazlar.....	17
3.1.3.2. MgCl ₂ , Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer, dNTP Set	17
3.1.3.3. Primerler	18
3.1.3.4. Agaroz Jel Hazırlanışı	18
3.1.3.5. Marker	18
3.1.3.6. Etidyum Bromür	19
3.1.3.7. Sekans Analizi	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Süt Örneklerinin Alınması.....	20
3.2.2. Enterokok İzolasyonu	20
3.2.3. Enterokokların Fenotipik İdentifikasyonu.....	20
3.2.3.1. Katalaz Testi	21
3.2.3.2. %6.5 NaCl'de Büyüme.....	21
3.2.3.3. <i>E. hirae</i> ve <i>E. durans</i> İzolatlarının Genotipik Belirlenmesi	21
3.2.3.3.1. DNA İzolasyonu	22
3.2.3.3.2. DNA'nın Elektroforezi	22
3.2.3.3.3. DNA'nın Saflık Kontrolü ve Miktar Tayinleri.....	22
3.2.4. PZR.....	23
4. BULGULAR	25
4.1. İzolasyon.....	25
4.2. PZR.....	25
4.2.1. <i>Enterococcus</i> sp.	25
4.2.2. <i>E. hirae</i>	26
4.2.3. <i>E. durans</i>	26
4.2.4. 16S PZR	27
5. TARTIŞMA.....	28
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	31
KAYNAKLAR.....	32
ÖZGEÇMİŞ	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
GBS	: Grup B Streptokoklar
CMT	: California Mastitis Test
RFLP	: Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Çeşitliliği
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DAP	: Daptomisin
TEI	: Teikoplanin
VAN	: Vankomisin
ERY	: Eritromisin
CIP	: Siprofloksasin
TET	: Tetrasiklin
DRE	: Daptomisin Dirençli Enterokok
VRE	: Vankomisin Dirençli Enterokok
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribo Nükleik Asit
ATCC	: American Type Culture Collection
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
ATP	: Adenozin Trifosfat

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Mastitis kaynakları	4
Resim 2. RFLP bant paternleri.....	9
Resim 3. <i>E. faecium</i> suşlarının RAPD-PZR bant paternleri	9
Resim 4. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu...	19
Resim 5. İzolatların selektif katı ve sıvı besiyerlerinde görünümü.....	25
Resim 6. <i>Enterococcus</i> spp. PZR elektroforez görüntüsü.....	26
Resim 7. <i>E. hirae</i> ve <i>E. durans</i> PZR elektroforez görüntüsü.....	26
Resim 8. 16S universal primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR.....	27
Resim 9. <i>E. hirae</i> sekans sonucu	27
Resim 10. <i>E. durans</i> sekans sonucu	27

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Enterokok identifikasyonu.....	12
Tablo 2. Kullanılan primerlerin dizileri, amplikon uzunlukları, hedef genleri...	18
Tablo 3. Master miksin hazırlanma oranları	23
Tablo 4. PZR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı.....	23



ÖZET

MASTITİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN *E. DURANS* VE *E. HIRAE*'NİN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU

Kaya S. E. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2016.

Bu çalışmada, mastitisli süt örneklerinden izole edilen ve çok yüksek 16S rRNA benzerliği nedeniyle sıklıkla birbiriyle karıştırılan *Enterococcus durans* ve *Enterococcus hirae*'nin moleküler yöntemler kullanılarak identifikasyonlarının yapılması amaçlandı. Çalışma materyalini 620 klinik veya subklinik mastitisli süt örneği oluşturdu. Fenotipik yöntemlerle 96 enterokok şüpheli izolat elde edildi. Bu isolatların cins spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonucu hepsinin *Enterococcus* spp. olduğu doğrulandı. Tür spesifik primerler kullanılarak uygulanan PZR sonucunda izole edilen 96 enterokokun 9 (%9.3)'unun *E. hirae* ve 5 (%5.2)'inin *E. durans* olduğu belirlendi. İzolatların 16S rRNA fragmentleri universal 16S primerleri kullanılarak çoğaltıldı ve sekans analizi ile identifikasyonlar doğrulandı. 16S rRNA benzerliği yüksek olan bu iki türün geleneksel fenotipik yöntemler kullanılarak birbirinden ayırt edilmeleri oldukça zor olup, bu çalışmayla türe özgü primerler kullanılarak uygulanan moleküler yöntemlerle bu gibi türlerin kolayca ayırt edilebileceği gösterilmiştir. Özellikle mastitisli sığır sütlerinden sık izole edilen enterokokların tanımlanmasıyla ilgili kesin sonuç veren, kolay ve zaman tasarrufu sağlayan yöntemlerin laboratuvarlarda uygulanmasının faydalı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu iki enterokok türünün virulens faktörleri ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi üzerine yapılacak olan çalışmaların bu mikroorganizmaların patogenezelelerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *E. hirae*, *E. durans*, mastitis, PZR

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *E. DURANS* AND *E. HIRAE* FROM MASTITIC BOVINE MILKS

Kaya S. E. Adnan Menderes University, Health Sciences Institute Department of Microbiology, Master Thesis, Aydin, 2016.

In this study, the identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* which are mostly interfering with each other because of very high 16S rRNA similarity that were isolated from mastitic milk samples with using molecular methods was aimed. The material was consisted of milk samples taken from 620 cows suspected of clinical or subclinical mastitis. Firstly, ninety six enterococci suspected isolates were obtained with phenotypic methods. Then it was confirmed that all these isolates were *Enterococcus* spp. by PCR with using specific primers. The results of PCR with using species-specific primers showed that out of 96 enterococci isolates 9 (9.3%) were *E. hirae* and 5 (5.2%) were *E. durans*. 16 S ribosomal RNA fragments were amplified with using universal 16 S primers and these identifications were also confirmed with sequence analysis. It's difficult to differentiate these two species by using phenotypic methods from each other because of their high 16S rRNA similarities and it was also showed that these species could be easily differentiated by molecular methods with using specific primers. It's concluded that this method could be useful for routine laboratory procedures of the identification of enterococci isolated from mastitic bovine milk because of its time-saving, easiness and reliability. It's thought that further studies on the determination of virulence factors and antibiotic resistance of these two enterococci spp. should be designed to understand the pathogenesis of these microorganisms.

Keywords: *E. hirae*, *E. durans*, mastitis, PCR

1. GİRİŞ

Süt işletmelerinin en sık karşılaşılan problemlerinden birisi olan mastitisin ülkemizde ineklerde oldukça yüksek oranlarda görülmekte olup; yol açtığı maddi kayıplar milyonlara ulaşmaktadır. Geç teşhis, yanlış antibiyotik kullanımı ve enfeksiyonların belirlenmesindeki güçlükler mastitis tedavisinin doğru yapılmasının önemini artırmaktadır. Klinik ve subklinik mastitis etkenlerinin doğru tanımlanması, enfeksiyonun tespiti ve önlenmesi için gereklidir. Bakterilerin fenotipik özelliklerinden yararlanılarak uygulanan yöntemler bazı durumlarda çok güvenilir olmamakla birlikte zaman da alabilmekte bu da teşhis sürecini olumsuz etkilemektedir. Böyle durumlarda moleküler yöntemlerin uygulanması daha doğru sonuçlara götürmektedir. Gram pozitif, sporsuz, genelde hareketsiz, fakültatif anaerob ve katalaz negatif kok görünümündeki enterokoklar yaygın bir epidemiyolojiye sahiptir. İnsan ve hayvanların sindirim sisteminin doğal bir bileşenidir ve hastane enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilirler. Kanatlılarda septisemi, köpeklerde üriner sistem enfeksiyonu, buzağı ve kuzularda endokarditis, ineklerde mastitis etkenidirler. Mastitise pek çok bakteriyel etken sebep olabilmekle birlikte, mastitisten enterokok izolasyonunun % 6-42 oranlarında olduğu bilinmektedir. Enterokokların en belirgin özellikleri birçok antibiyotiğe dirençli olmaları, yeni dirençler oluşturma potansiyellerinin bulunması ve sahip oldukları direnci birbirlerine hatta başka cins bakterilere aktarabilme yetenekleridir. Enterokokların pek çok türünün bulunduğu bildirilmekle birlikte; bu türlerden üzerinde en çok çalışılan *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* türleridir. Bunlar insanlarda patojen olmaları yanında, fermente gıdaların üretimi ve probiyotik ürün teknolojisinde önemli rol oynarlar. Daha az bilinen enterokoklardan olan *E. durans* ise süt ve kuru gıdadan sıklıkla izole edilmekle birlikte insan ve hayvan üriner sistemden daha az oranlarda izole edildiği bilinmektedir. Yine az bilinen enterokoklardan olan ve önceden atipik *E. faecium* olarak bilinen *E. hirae* ise özellikle domuz ve tavuklar için önemli türlerdir. *E. durans* ve *E. hirae* arjinini hidrolize eder, ancak mannitol, sorbitol ve sorboz sıvı besiyerinde karbonhidrattan asit yapamazlar. *E. durans* ve *E. hirae*'nin insanlardan izole edildiği bildirilmektedir. Yaptığımız literatür incelemesi sonucunda *E. durans* ve *E. hirae*'nin mastitis etiyolojisindeki rolleri konusunda yeterli bilgi bulunmadığı görülmüştür. Bu çalışmada mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokoklar içerisinde birbirleri ile sıklıkla karışan *E. durans* ve *E. hirae*'nin moleküler yöntemler kullanılarak identifikasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mastitis Nedir?

Mastitis, Yunanca'da "meme" anlamına gelen "mastos" kelimesi ve "yangı" anlamına gelen "itis" ekiyle türemiştir. Meme dokusundaki süt bezlerinde, sütün depolanması ve dışarı çıkmasını sağlayan kanal ve boşluklarda oluşan hastalıkların tümüne verilen addır (Deveci ve ark. 1994). Kısaca meme bezi yangısı olarak tanımlanır (Anonim 1).

Patojen bakterilerin meme başından girerek içerdeki bezleri ve kanalları etkilemesiyle dokular iltihaplanır. Enfeksiyonu oluşturan etkene, sayısına, metabolizma ve çevresel faktörlere göre ciddiyeti değişmektedir (Anonim 1).

Hayvanlarda mastitis klinik belirtilere göre iki başlıkta incelenir: Klinik ve subklinik. Klinik (Görünür) mastitis; titreme, ağrı, ateş, hızlı nabız, kısa ve hızlı soluma ile huzursuz görünüm mevcuttur. Memede kısa sürede şişlik, mavimsi veya koyu mor renk ve meme başından sarımsı sıvı akışı gözlenir.

Subklinik (Gizli) mastitis; süt normal görünümde olup miktardaki azalmaya dikkat edilmeyebilir. Varlığı özel testler sonucu tespit edilebilir. Klinik mastitise dönüşebilir (Gürgen 2005).

Etken kaynağına göre mastitis, çevresel ve kontagiyöz olmak üzere ikiye ayrılır: Çevresel mastitis; toprak, ahır, su, gübre gibi ortamlarda bulunan mikroorganizmaların kuru veya laktasyon döneminde oluşturduğu enfeksiyon olup genelde klinik olarak gözlenir. Çevresel mastitis etkenlerine *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp.), *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp. (başlıca *Streptococcus uberis* daha seyrek *Streptococcus dysgalactiae*) ve *Enterococcus* spp. örnek verilebilir. Sinekler aracılığıyla taşınan *Arcanobacterium pyogenes* ve *Mycoplasma bovis* gibi mikoplazma türleri de yaz mevsiminde mastitise yol açmaktadır.

Kontagiyöz mastitis; sürü içerisindeki hayvanlardan birbirlerine veya aynı hayvanın meme loblarından diğerine kontaminasyonu ile gerçekleşir. Başlıca etkenler arasında *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium bovis* ve *Mycoplasma* spp. sayılabilir (Gürgen 2005).

2.2. Mastitisin Önemi ve Önlenmesi

İnsanlar için önemli bir besin kaynağı olan sütün sağlıklı ve kaliteli olması için meme sağlığı önemlidir (Erdem ve Atasever 2004). Sütün içeriğini ve miktarını olumsuz etkileyen mastitis; hayvanın yaşı, ırkı, laktasyon sayısı, süt verimi, memenin anatomik ve fizyolojik yapısı, barınak koşulları, mevsim, sağım teknikleri ve beslenmesine bağlı oluşabilmektedir (Göncü 2000, Şeker ve ark. 2000, Uzmay ve ark. 2003).

Mastitis; süt veriminde azalmaya, memenin bir veya daha çok lobunun körleşmesine, hayvanın kasaplık olmasına hatta ölümüne neden olabilmektedir. Büyük oranlarda süt kaybının olması, tedavi masrafları ve zaman kaybı işletme için yüklü faturalar çıkarabileceği için hayvanlarda mastitisin önemi diğer hastalıklardan öne geçmektedir (Gürgen 2005).

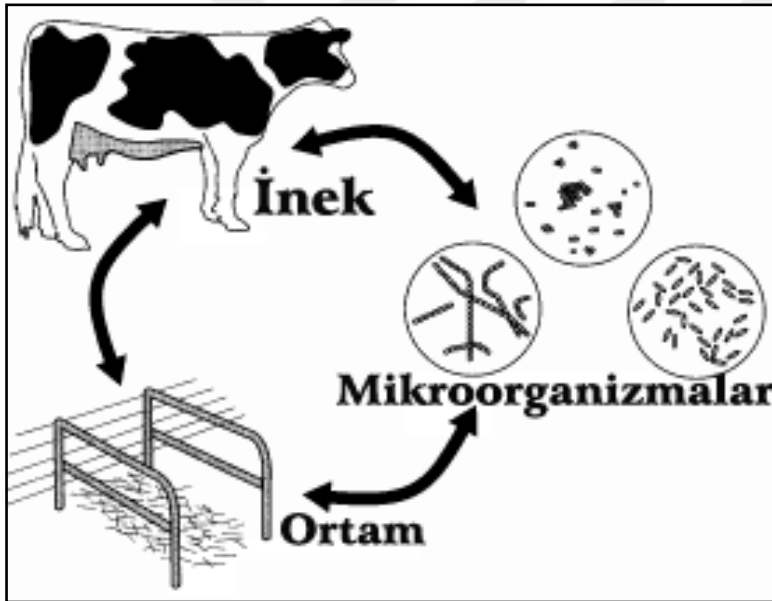
Son zamanlarda süt işletmelerinde en çok karşılaşılan sorunlardan biri mastitis olup; geç teşhis, subklinik ve kronik enfeksiyonların belirlenmesindeki zorluklar, tedavide kullanılan antibiyotiklerin süt ve etteki kalıntıları nedeniyle maddi zararlar daha da artmaktadır (Kuru ve Oral 2013). Ülkemiz ineklerinde yaklaşık %30 oranında mastitis görülmekte, mastitis sebebiyle %10 oranında süt verimi azalmakta ve böylece ekonomik zarar yılda milyonlara tekabül etmektedir (Sabuncuoğlu ve ark. 2003). Sığırlarda mastitisin yol açtığı ekonomik kayıp Türkiye’de 28 milyon dolar civarlarındadır (Tekeli 2005).

Mastitisi önlemede dikkat edilmesi gereken kritik noktalar:

- Tank sütünde somatik hücre sayısı 200 bin olmalı,
- Aylık klinik mastitis oranı %2’yi geçmemeli,
- Sağım makinası vakumu sıklıkla kontrol edilmeli,
- Belli periyotlarda süt kültürü yapılmalı,
- Süt kültüründe gözlenen etkenlerin kontagiyöz ya da çevresel olmasına göre iyileştirme yapılmalı,
- Sağılan sütün ilk damlası koyu renk bir kaba alınıp kontrol edilmeli,
- Sağım öncesi iki kez meme daldırma solüsyonu kullanılarak kurulanmalı,
- Sağımcının eğitime önem verilmeli,
- Sık tekrarlayan mastitisli inekler, sürünün sağlığı için sürüden çıkarılmalı,
- Mikroorganizmaların taşıyıcısı olan sineklerle mücadele edilmeli,
- Mastitisin sıklıkla görüldüğü çiftliklerde yemlere Selenyum, Çinko ve E vitamini içeren katkıları mutlaka ilave edilmeli,
- Mastitis için hazırlanan aşılar kullanılmalıdır (Anonim 2).

2.3. Mastitis Etkenleri

Mastitiste 100'den fazla bakterinin etken olduğu bilinmektedir. Aerosol yolla bulaşabilen *Mycoplasma* spp., *S. aureus*, *S. agalactiae* ve *C. bovis* gibi bakteriler mastitis epidemiyolojisinde büyük önem taşır. Etkenlerden bazılarının patojenitesi diğerlerine göre daha fazladır. Memenin normal florasında bulunan, fırsatçı patojen bakteriler uygun ortam bulduklarında mastitise yol açabilir (Anonim 3). Mastitis; Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler, mikoplazmalar, mayalar ve algleri içeren geniş bir organizma yelpazesinden kaynaklanabilir (Resim 1). Sığır mastitisine sık neden olan *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. agalactiae* ve *S. aureus* gibi birçok mikrobiyal tür ayrıca insanlarda kommensal veya patojen olarak da görülür. Ancak *S. uberis*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* ya da *S. chromogenes* gibi diğer etken türler genelde sadece hayvanlarda bulunur.



Resim 1. Mastitis kaynakları

Sığır mastitis epidemiyolojisini alttür seviyesine kadar araştırmak amacıyla son yirmi yılda; elektroforetik bant kalıplarına dayanan karşılaştırmalı tiplendirme metotları, seçilen genlerin sekansı, virulans gen sekansı ve tüm genom sekansı gibi moleküler tiplendirme yöntemlerinden oldukça yararlanılmaktadır (Zadoks ve ark. 2011a).

Ayrı ayrı hayvanlar içinde ve hayvanların, sürülerin, ülkelerin ve konakçı türlerin arasında, diğer hayvan ya da insan meme bezi temas bölgeleri ve çevresel kaynaklar dikkate alınarak mastitis patojenlerindeki suş dağılımı araştırılmıştır. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar; kaynaklar, bulaşma yolları, birçok sığır mastitis patojeni için hastalığın seyri, konakçı adaptasyon mekanizması ve hastalığın nedeninin anlaşılmasına önemli katkıda bulunmuştur (Zadoks ve ark. 2011a).

2.3.1. *E. coli* Mastitisleri

E. coli, süt sığırlarının meme içi enfeksiyonlarında sık görülen bir etkidir. Enfeksiyon genellikle klinik belirtiler gösterir. Epidemiyolojik veriler ve suş tiplendirme çalışmaları, çiftliklerdeki mastitis vakalarıyla ilişkili izolatlar arasında geniş heterojenite olduğunu göstermiştir (Lam ve ark. 1996, Lipman ve ark. 1995, Nemeth ve ark. 1994). *E. coli* çevresel fırsatçı patojendir. Suşları, mastitise neden olma yeteneğiyle diğer *E. coli* suşlarından ayıran spesifik virulans faktörler yoktur (Bean ve ark. 2004, Wenz ve ark. 2006, Suojala ve ark. 2011). Klinik bulguların ciddiyeti, hafif ile ölümcül arasında olabilirken, büyük ölçüde konakçı özelliklerine bağlanır (Burvenich ve ark. 2003).

E. coli mastitis vakalarının çoğu süresizdir ve konakçı ya da patojenin ölümü ile sona erer. Üç yüz sürüyü içeren bir çalışmada, ineklerin %11'inde *E. coli* mastitisin tekrarlayan klinik vakaları bildirilmiştir (Döpfer ve ark. 1999).

2.3.2. *Klebsiella* Mastitisleri

Sığırlarda mastitise en sık neden olan *Klebsiella* türleri *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca*'dır. Son zamanlarda kullanılan moleküler metotlar, spesifik olarak *rpoB* gen sekansı, fenotipik görünümü *K. pneumoniae* ya da *K. oxytoca* olan bazı izolatların *Raoultella* cinsine ait bir yakın akraba olduğunu gösterdi. *R. terrigena* ve *R. planticola* türleri süt çiftliği ortamında bulunup bunlardan *R. planticola* süttten izole edilmiştir (Munoz ve ark. 2007, Zadoks ve ark. 2011b).

Süt sığırlarında *Klebsiella*, meme başında oldukça yaygın görülür (Munoz ve ark. 2008). İneklerdeki suş heterojenitesinde dışkı ve çiftlik çevresi göz önüne alındığında, mastitise neden olan suşun kaynağını, bunun tam tersi, meme dışı kaynaklı suşların mastitise

neden olma potansiyelini belirlemek zor olabilir. Süt örneklerindeki *Klebsiella* heterojenitesinde numune toplama tekniğinin önemli rolü olabilir (Zadoks ve ark. 2011a). Yapılan ilginç bir çalışmada ahşap bazlı yatak takımı sıklıkla *Klebsiella* kaynağı olarak bildirilmiş ve mastitis salgınları ile de ilişkilendirilmiştir. Kullanılan yatakta *Klebsiella* varlığı, sığır dışkısıyla ya da *Klebsiella* ile enfekte ineklerin sütünün kontaminasyona bağlı olduğu düşünülmektedir (Munoz ve ark. 2007, Verbist ve ark. 2011).

2.3.3. Diğer Gram Negatif Patojenler

Koliform olmayan Gram negatif türler bazen şiddetli mastitis sorunlarına neden olabilir. *P. aeruginosa*, kadınlarda mono veya polimikrobiyal meme apseleri ve septik mastitis (Moazzez ve ark. 2007, Harji ve ark. 2010) ile ve sığır, koyun ve keçi (Sela ve ark. 2007) mastitisi ile ilişkilendirilmiştir. Süt sığırlarında *P. aeruginosa* mastitisi salgınları, Avustralya (McLennan ve ark. 1997), İrlanda (Daly ve ark. 1999), İsrail (Sela ve ark. 2007) ve Hollanda (Sol ve ark. 1998)'da genellikle yüksek ölüm oranıyla rapor edilmiştir.

Aydın'da yapılan bir çalışmada, 123 sığırın 226 meme lobundan alınan sütlere klinik (%11.4) ve subklinik (%88.6) mastitis teşhisi konulmuştur. Bunların 38 (%16.8)'inde herhangi bir bakteri üremez iken; 188 (%83.2) süttten izolasyon yapılmıştır. 42 tür 16S rRNA fragmentleri çoğaltılarak sekans analizi ile identifiye edilmiştir. *S. aureus* (%22.9) en çok izole edilen tür olmakla birlikte bunu *E. coli* (%10.1), *S. chromogenes* (%8.5), *S. haemoliticus* (%7.5) ve *Hafnia alvei* (%6.4)'nin izlediği belirlenmiştir. 188 izolatin 43 (%22.9)'ünün bulaşıcı ve 145 (%77.1)'inin çevresel etkenler olduğu tespit edilmiştir (Türkyılmaz ve ark. 2010).

2.3.4. *S. aureus*

S. aureus, insan ve sığır da dahil olmak üzere çeşitli hayvan türlerinde kommensal ve patojendir. *S. aureus*, kadınlarda bakteriyel mastitisin en yaygın etiyolojik etkenidir ancak insanda sitafilakokkal mastitis kapsamlı olarak çalışılmamıştır (Delgado ve ark. 2011).

Staphylococcus aureus, birçok ülkede bulaşıcı sığır mastitis vakalarından izole edilen başlıca patojenlerden biridir. Daha sıklıkla koagülaz negatif stafilokoklar izole edilmesine

rağmen, *S. aureus* kontrolü zor ve antimikrobiyal direnç görülme sıklığının yüksek olması nedeniyle eskiden beri önemli bir patojen olma özelliği taşır (Castelani ve ark. 2013).

2.3.5. *S. agalactiae*

İnsanlarda *S. agalactiae* ve B grubu streptokoklar (GBS); bebeklerde erken ve geç dönem başlangıçlı hastalıklarıyla, ürogenital ve gastro-intestinal sistemde asemptomatik kolonizasyonla, ve gebe olmayan erişkinlerde septisemi ve diğer klinik belirtilerle ilişkilendirilir (Larppanichpoonphol ve Watanakunakorn 2001, Jones ve ark. 2006). Kadınlarda, *S. agalactiae* meme apse formasyonuna ve klinik ya da asemptomatik mastitise neden olabilir (Rench ve Baker 1989).

Sığırlarda mastitis, *S. agalactiae* enfeksiyonu ile ilişkili tek hastalıktır. Sığır *S. agalactiae* moleküler epidemiyolojisinde önemli nokta, ya sığırlar ve insanlar arasındaki doğrudan temas yoluyla ya da insan patojenik suşların sığır rezervuarına evrilmesiyle insan sağlığı için bir tehlike oluşturup oluşturmadığıdır (Bisharat ve ark. 2004). Aksine bazıları, sığırlardaki enfeksiyonun kaynağı olarak insanın rol alabileceğini (Doğan ve ark. 2005), bu mekanizmanın ayrıca köpekler, kediler ve timsahlar için de önerilebileceğini ileri sürmüşlerdir (Yildirim ve ark. 2002, Bishop ve ark. 2007).

2.3.6. Diğer Streptokoklar, Enterokoklar ve Laktokoklar

Petersson-Wolfe ve arkadaşları (2008), sığır mastitisindeki enterokokların genetik çeşitliliğinin yüksek olduğunu göstermiş, muhtemel mastitis kökenlerinin dışkı yolu ile bulaştığı kanısına varmış, mastitisle ilişkilendirilen en yaygın türlerin de *E. faecalis* ve *E. faecium* olduğunu bildirmişlerdir.

2.4. Enterokoklar

Enterococcus cinsi ilk olarak 1984'te Schleifer ve Kilpper-Bälz tarafından önerilmiştir. *Enterococcus* cinsi geçerli şekilde yayınlanmış 55 türü (Anonim 4) kapsayan, Gram pozitif, aerob ya da fakültatif anaerob, 10°C ile 45°C'de üreyebilen, %40 safra tuzunda eskülin

hidroliz eden, pirolidonil arilamidaz (PYR-Oxoid) üreten, oksidaz ve katalaz negatif, bakteriyosin üreten, sporsuz, tekli, çift ya da zincir şeklinde düzenlenmiş oval bakterilerdir.

Enterokoklar, Gram pozitiflerin klostridyal dalının parçası olan laktik asit bakteri grubuna dahildir. En yakın filogenetik komşuları *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium* ve *Aerococcus*'tur (Holzapfel ve ark. 2001, Klein 2003).

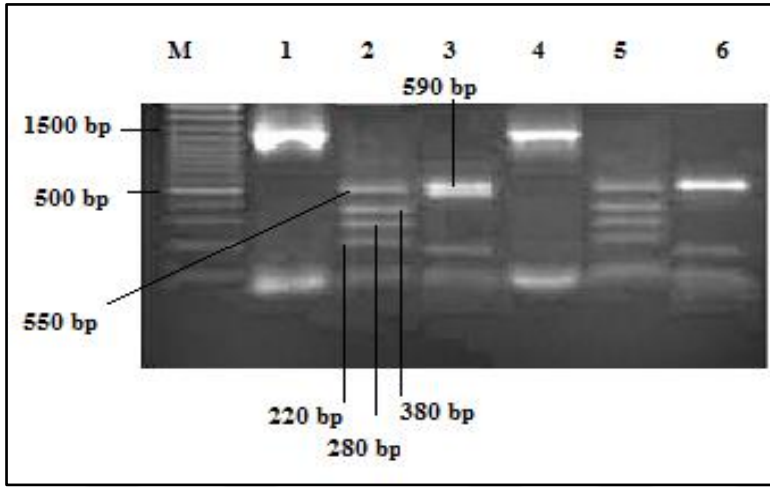
Enterokokların sınıflandırılması son yıllarda dikkate değer değişikliklere uğramıştır. *Enterococcus*'un ayrı bir tür olarak tanımlanmasından sonra, sınıflandırma metotlarının iyileştirilmesi sonucu *Enterococcus canis* (De Graef ve ark. 2003), *E. hermanniensis* (Koort ve ark. 2004) ve *E. phoeniculicola* (Law-Brown ve Meyers 2003) gibi birkaç yeni tür tanımlandı. Buna ek, *E. porcinus* ve *E. seriolicida* sırasıyla *E. villorum* (De Graef ve ark. 2003) ve *Lactococcus garvieae* (Teixeira ve ark. 1996) olarak yeniden sınıflandırılmıştır.

Enterokoklar geniş bir konakçı dağılımına sahiptirler. İnsan ve hayvanlarda gastrointestinal sistemin doğal flora elemanlarıdır ve toprak, bitki ve gıdalarda da bulunabilirler (Aarestrup ve ark. 2000). Çevresel yayılımı sahip bu bakteriler, insanlarda hastane enfeksiyonlarında ciddi bir sorun oluşturmalarına karşın epidemiyolojik bilgi kısıtlıdır (Petersson-Wolfe 2006). Çoğunlukla fırsatçı enfeksiyonlar oluşturan enterokoklar kanatlılarda septisemi, köpeklerde üriner sistem enfeksiyonu, buzağı ve kuzularda endokarditis ve ineklerde mastitis etkenidir (Quinn ve ark. 2002).

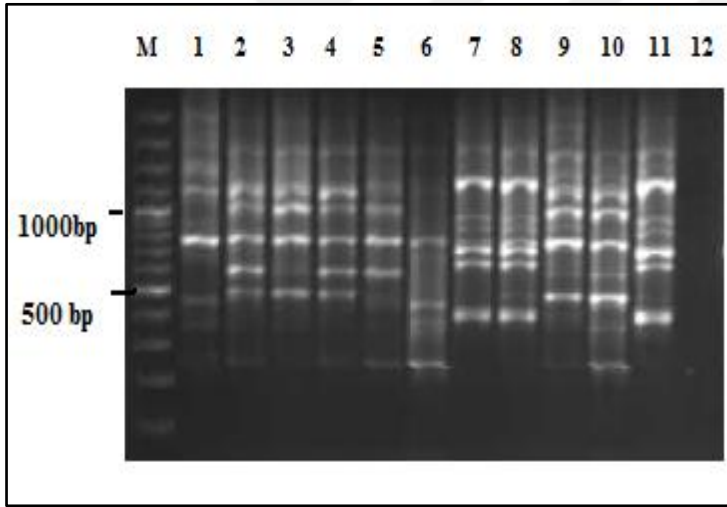
Sağım hijyenine dikkat edilmemesi, düzenli altlık temizliği yapılmaması memeyi enfekte ederek mastitis oluşmasına yol açar. Enterokoklar meme başından girerek kanal yolunda kolonize olur ve klinik belirtiler meydana gelir (Mannu ve ark. 2003, Petersson-Wolfe 2006). Enterokoklar, tek başına mastitis oluşturmalarına karşın mastitis vakalarından çoğunlukla streptokoklarla beraber izole edilmesi enterokok etkenli mastitislerin sık sık streptokok mastitisiyle karıştırılmasına neden olmaktadır (Cengiz ve ark. 2011). Enterokokların; somatik hücre sayısı yüksek sütlerden ve kuru dönemde daha sık tespit edildiği (Petersson-Wolfe ve ark. 2007), çalışmalarda mastitisli örneklerden % 6-42 oranlarında izole edildiği bildirilmiştir (McDonald TJ ve McDonald JS 1976, Petersson-Wolfe 2006).

Cengiz ve ark.nın (2011) çalışmasında 37 (%9,1)'si Ankara ilindeki ve 38 (%6,2)'i Balıkesir ilindeki orta büyüklükte olan işletmelerde mastitis şüpheli inek sütlerinden izole edilen 75 adet *Enterococcus* spp. incelenmiştir. Moleküler tiplendirme restriksiyon enzimi uzunluk polimorfizmleri polimeraz zincir reaksiyonu (RFLP PZR) ile yapılmış (Resim 1) ve bu yöntemle 61 adet etken *E. faecium* ve 14 adet etken ise *E. avium* olarak tanımlanmıştır. İzolatların genotiplendirilmesi amacıyla yapılan rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA

polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD PZR) sonuçlarına göre (Resim 2) *E. faecium* suşlarında 10, *E. avium* izolatlarında ise 7 farklı profil görüntülenmiştir.



Resim 2. RFLP bant paternleri. M: Marker (100 bp DNA Ladder Plus) 1: *E. faecium* 16S rDNA 2: *E. faecium*-Hha1 kesimi 3: *E. faecium*- Msp1 kesimi 4: *E. avium* 16S rDNA 5: *E. avium*- Hha1 kesimi 6: *E. avium*- Msp1 kesimi



Resim 3. *E. faecium* suşlarının RAPD-PZR bant paternleri. M: marker (100 bp DNA ladder plus, Fermentas) 1-11. hatlar *E. faecium* suşları, 12.hat, negatif kontrol.

Kateete ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmada, klinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen ve Phoenix 100 ID/AST otomatik sistemle tanımlanan 58 izolatın 16 (%28)'sının enterokok olduğunu, bunların beşinin *E. faecium*, dördünün *E. hirae*, üçünün *E. faecalis*, ikisinin *E. gallinarum*, birinin *E. durans* ve birinin *E. raffinosus* olduğunu bildirilmişlerdir. Aynı çalışmada sağımıcılardan alınan nazal sıvı örneklerinden 31 izolatın sekizinin (%26) enterokok olduğunu ve bunların dördünü *E. faecium*, ikisini *E. faecalis* ve ikisini *E. hirae* olarak tanımladılar. İneklerden izole edilen enterokokların tümü ampisilin duyarlı

olup; beşi tetrasiklin, üçü vankomisin, ikisi teikoplanin, üçü eritromisin, biri daptomisin ve biri siprofloksasine düşük dirençli bulunmuştur.

Önemli enterokok türlerinin genel özellikleri aşağıda verilmiştir:

***E. faecalis*:** Gastrointestinal floranın doğal bir parçasıdır. Ağız, hepatobiliyer sistem ve vajinadan da izole edilmiştir. İnsan kaynaklı enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilmektedir. Ayrıca çeşitli hayvan enfeksiyonlarından da sorumlu olduğu bildirilmektedir. En fazla üriner enfeksiyon, yara, periton sıvısı, pelvik apse, endokardit ve kan kültürlerinden izole edilmektedir. Beta hemolitik olup, % 6.5'luk NaCl ve pH 9.6 da ürer.

***E. faecium*:** İnsan ve sığırların gastrointestinal sisteminde doğal olarak bulunan bu mikroorganizmanın, yiyecek, sebze ve yemlerden izole edildiği bilinmektedir. İki biyotipi vardır. *E. faecalis*'e göre antimikrobiyallere daha dirençli olmaları önemlerini artırmaktadır. Alfa hemolitik olup, %6.5'luk NaCl ve pH 9.6 da ürerler.

***E. avium*:** Kuşlar, tavuk, köpek gibi hayvanlardan izole edilmiştir. İnsan gastrointestinal sistem florasının da bir parçasıdır. En çok apandisit, otit ve beyin apselerinden izole edildiği bildirilmiştir. Alfa hemolitik olup %6.5'luk NaCl'de üremesi zayıftır. H₂S üretir, pigmentsizdir.

***E. casseliflavus*:** Bitki ve toprakta bulunduğu bildirilmiştir. Vankomisin dirençli olması ve fırsatçı insan enfeksiyonları yapması açısından önemlidir. %6.5'luk NaCl ve pH 9.6 da ürer. Hareketlidir ve sarı pigment yapar.

***E. gallinarum*:** Evcil kuşların gastrointestinal sisteminde bulunan etken, hemodiyalizli bir hastadan izole edilmiştir. Vankomisin dirençlidir. Koyun kanlı agarda nonhemolitik olup at kanlı agarda beta hemoliz yapar. %6.5'luk NaCl ve pH 9.6 da ürer. Hareketlidir, pigment yapmaz (Sayiner 2008).

2.4.1. *E. durans* ve *E. hirae*

E. durans ve *E. hirae* nadiren insanlardan izole edilir. Eski literatürde *E. durans*'tan; insan bağırsağı florasının küçük bir bileşeni olarak bahsedilmektedir (Noble 1973, Watanabe ve ark. 1981) ve *E. hirae*'nin orijinal tanımına göre, her ne kadar nadir görünse bile bu, ortam ile ilişkilendirilmiştir (Farrow ve Collins 1985). Bu genel tablonun istisnası olan bir çalışmaya göre, sağlıklı bireylerin %18'i *E. durans* ve %9'u *E. hirae* taşıyıcısıdır (Blaimont ve ark. 1995). *E. durans* ve *E. hirae* ile ilişkilendirilmiş insan enfeksiyonları çok nadir görülür. Literatürlerde *E. hirae* enfeksiyonu ile ilgili sadece birkaç tane iyi tanımlanmış klinik vaka vardır (Gilad ve ark. 1998), buna rağmen hastanelerdeki izolasyon sonuçlarına göre pek çok tetkikte enterokokkal izolatlar koleksiyonundaki suşların küçük bir kısmında düzenli olarak *E. hirae* ve *E. durans* bulunmaktadır.

E. durans, preruminant buzağılar ve genç tavuklar hariç, evcil hayvanların bağırsak florasında çok nadir görülürken; *E. hirae* çeşitli evcil hayvan türlerinde bağırsak florasında sıklıkla görülür (Devriese ve ark. 1987). Bunlara ek olarak, bu bakteriler hayvansal gıdalarda ve suda bulunur. *E. hirae*; civcivlerde septisemi ve beyinde fokal nekroza, papağanlarda da septisemiye neden olabilir. *E. hirae* veya *E. durans* suşları; yavru fareler, taylor ve sıpalar, kedi yavruları, köpek ve köpek yavruları, danalar, tavuklar ve süttten kesilmemiş yavru domuzlardaki bağırsak hastalıkları ile ilişkilidir (Devriese ve ark. 2002).

Son on yıl içinde, enterokokların neden olduğu hastane enfeksiyonlarının sayısında güçlü bir artış olmuştur. *E. faecalis*, kayıtlı vakaların çoğundan sorumlu olup onu *E. faecium* takip eder. Ancak *E. durans* ve *E. hirae* etkenlerinin neden olduğu enfeksiyonların sıklığında artış rapor edilmiştir.

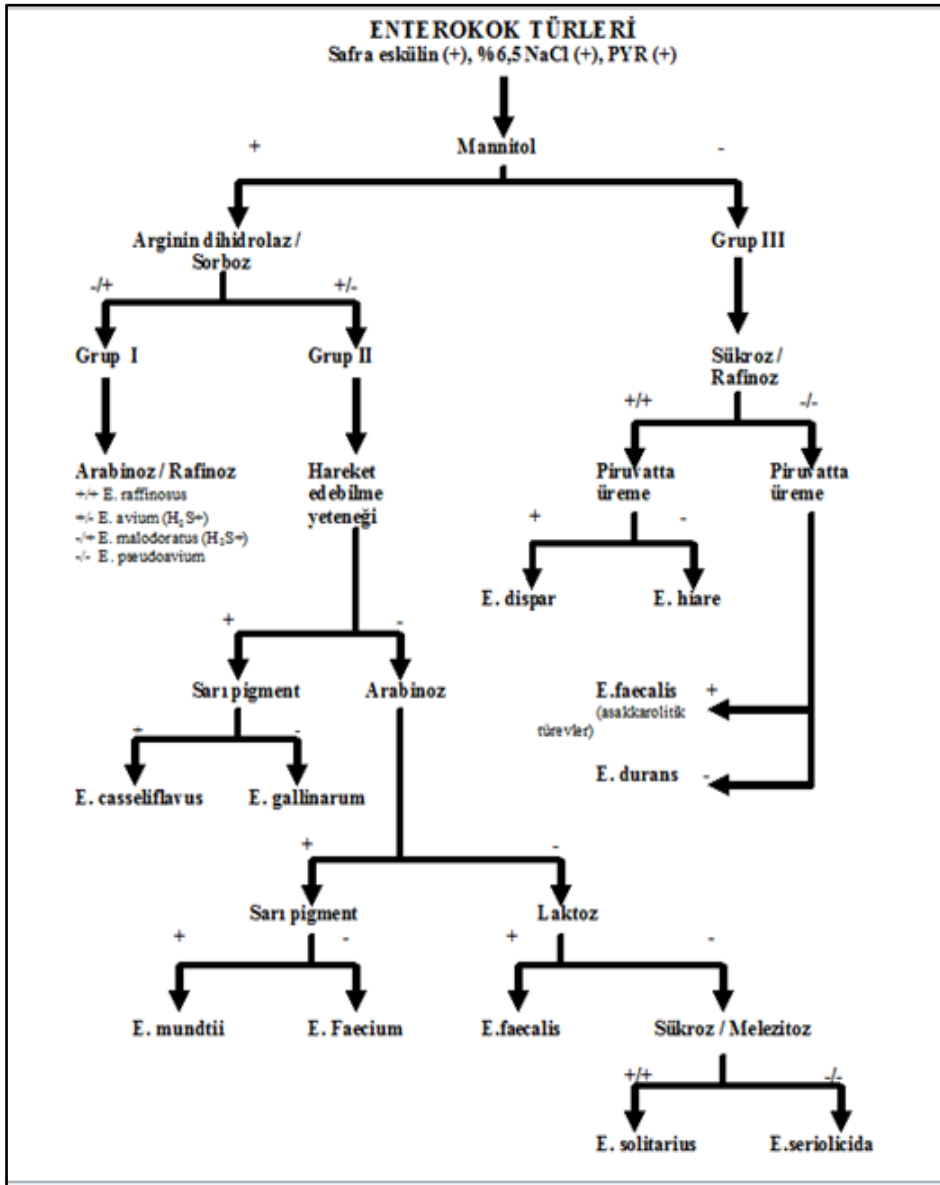
Moellering 1995'te *E. durans*'ın insan enfeksiyonlarında nadir bir etken olduğunu belirtmiştir. O zamandan beri Amerika Birleşik Devletleri (Perlada ve ark. 1997), Belçika (Descheemaeker ve ark. 2000), Almanya (Kaufhold ve Klein 1995), ve Yunanistan (Tsakris ve ark., 1998) gibi birçok ülkeden *E. durans* ile ilişkili vakalar bildirilmiştir. *E. hirae*'nin bildirimi ise Almanya (Kaufhold ve Klein 1995), İrlanda (Mangan ve ark. 1997), İsrail (Gilad ve ark. 1998) ve İsviçre (Liassine ve ark. 1998) gibi ülkelere olmakla birlikte daha sınırlı sayıda kalmıştır.

Enterokoklarda antibiyotik direnci en önemli sorunlardan birisidir. Vankomisin (VRE) ve teikoplanine dirençli enterokokkal suşların enfeksiyonları klinik açıdan büyük önem taşımaktadır. VRE özellikle *E. faecium*'dur ancak son zamanlarda, vankomisine dirençli *E. durans* ve *E. hirae* suşları izole edilmiştir. Üstelik, laboratuvar ortamında vankomisin

direncinin *E. durans*'tan *E. faecium*'a, *E. hirae*'den *E. faecalis*'e ve tavuklarda *E. hirae*'den *E. faecium*'a transfer olduğunu tanımlayan raporlar mevcuttur. *E. durans* suşlarının insan kanında sıklıkla beta hemolitik aktivite göstermesinden beri bu türün neden olduğu kandaki enfeksiyonlardan endişe edilmektedir. Bu nedenle etken suşları doğru tanımlamak önemlidir. Ne yazık ki, fenotipik özelliklere dayalı otomatik sistemler daha nadir karşılaşılan enterokok türlerini tanımlamaya her zaman izin vermez. Singer ve ark. (1996) ve Tsakris ve ark. (1998) *E. durans*'a ait suşların geleneksel testler ile tanımlanmasındaki hataları rapor etmişlerdir. Ayrıca *E. hirae*'nin tanımlanmasının da problemli olabileceği Tritz ve arkadaşları (1990) tarafından rapor edilmiştir.

Enterokok identifikasyon şeması Tablo 1'de gösterilmiştir (Koneman ve ark. 2006).

Tablo 1. Enterokok identifikasyonu



Enterokok türlerinin biyokimyasal yöntemler kullanılarak yapılan identifikasyonları oldukça zor ve zaman alıcıdır. *E. hirae*, melibiyoz ve sukrozdan asit üretirken, *E. durans* her iki test için negatif olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, %98'den fazla 16S rDNA benzerliği bulunan *E. hirae* ve *E. durans* gibi bakterileri konvansiyonel testlerle fenotipik olarak birbirinden ayırt etmek güç olduğundan rutin teşhis laboratuvarlarında genellikle yapılmamaktadır. Yaptığımız literatür incelemesi sonucunda *E. durans* ve *E. hirae*'nin mastitis etiyolojisindeki rolleri konusunda yeterli bilgi bulunmadığı görülmüştür. Bu çalışmada, sığır sütlerinden izole edilen, çok yüksek 16S rDNA benzerliği nedeni ile genelde birbirleri ile sıklıkla karışan, *E. durans* ve *E. hirae* izolatlarının moleküler yöntemler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile identifikasyonlarının yapılması amaçlandı.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Süt Örnekleri

Bu çalışmanın materyalini, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda geçmiş yıllardaki çalışmalar sırasında incelenmiş olan 620 mastitisli (klinik veya subklinik) süt örneği oluşturdu. Çalışmada kullanılan materyaller uzman veteriner hekimler yardımı ile alınmış olup; klinik mastitis meme loblarının fiziksel muayenesi ile belirlenirken (meme loblarında şişkinlik, sıcaklık, ağrı, kızarıklık ya da sulu, kanlı, pıhtılı süt vs.), subklinik mastitisli ineklerin tespitinde Kalifornia Mastitis Testi (CMT)'nden yararlanılmıştır. Çalışmadaki ineklerin hepsi laktasyon döneminde olup, son bir ayda antibiyotik tedavisi almamış, Holştayn ırkı, yaşları 2-9 arasında, klinik muayenede meme loblarında anormallik bulunan veya CMT ile pozitif reaksiyon (1+, 2+, 3+) veren ineklerin sütleri çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.2. Besiyerleri ve Solusyonlar

3.1.2.1. Besiyerleri

Mastitisli sütlerden enterokok türlerinin selektif olarak izole edilmesinde Chromocult® Enterococci Broth (EB) (Merck) ve Enterococcus Agar (EA) (BD) kullanıldı. İzolasyonu yapılan mikroorganizmaların tuz toleranslarının tespitinde %6.5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB) (Oxoid), izolatların pasajlanma işleminde Kanlı Agar (BHIA) (Merck), izolatların saklanmalarında ise %20 gliserin içeren Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Merck) kullanıldı. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve içerikleri aşağıda verilmiştir.

3.1.2.1.1. Chromocult® Enterococci Broth

Chromocult Enterococci Broth.....18 g

Besiyeri 18.0 g/L olacak şekilde ısıtılarak çözdürüldü. Beş ml olacak şekilde tüplere dağıtılıp otoklavda 121°C 'da 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanan besiyeri berrak ve sarı renkli olup, pH'sı 25°C 'da 7,5±0,2'dir. Besiyerinin bileşiminde bulunan sodyum azid özellikle Gram negatif bakterilerin gelişmesini baskılar. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucopyranoside (X-GLU)'in parçalanması özel peptonlar ile desteklenir. X-GLU'nun parçalanması sonunda oluşan mavi-yeşil renk oluşumu enterokoklar için karakteristiktir.

3.1.2.1.2. Chromocult® Enterococci Agar (EA)

Chromocult® Enterococci Agar56 g

Besiyeri 56 g/L olacak şekilde ısıtılarak çözdürüldü. Karışımın pH'sı 7.2-7.4'e ayarlandı, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildi. Besiyeri 50°C'ye kadar soğutulup petrilere döküldü. Besiyeri bileşimindeki fosfatlar, Tween 80 ve seçilmiş peptonlar enterokokların gelişimini destekler. Enterokoklar, besiyerindeki kromojenik substratları parçalayarak kolonilerin siyah-koyu kahverengi almasını sağlar. Bu da enterokokların kolayca saptanmasına sebep olur. Sodyum azid ve safra tuzları çoğu refakatçi mikroflorayı baskılar. Enterokok olmayan bakteriler şeffaf, beyaz-sarımsı renkte koloniler oluşturur bunlar enterokokların ürettiği siyah renkten kolayca ayrılırlar.

3.1.2.1.3. Kanlı Agar

Kanlı Agar..... 40 g/L

Besiyeri litrede 40 gr olacak şekilde çözdürüldü. pH'sı 7.2-7.4'e ayarlanıp, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildi. Sonra, 50°C'ye kadar soğutulup petrilere döküldü.

3.1.2.1.4. Brain Heart Infusion Broth

BHIB..... 37 g/L

Besiyeri litrede 37 gr olacak şekilde çözdürüldü. Karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanıp, 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldı. 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildi.

3.1.2.1.5. Brain Hearth Infusion Broth (BHIB) (%20 gliserinli)

BHIB.....	3.7 g
Gliserin.....	20 ml
Distile su.....	80 ml

Besiyeri 100 ml.de 3,7 gr olacak şekilde çözdürüldü. pH' sı 7.2-7.4'e ayarlanıp, 500 µl miktarda ependorf tüplere dağıtıldı. 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildi.

3.1.2.2. Solusyonlar

3.1.2.2.1. %6,5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB)

NB.....	8 g/l
NaCl.....	6.5 g

Nutrient Broth'a %6.5 NaCl ilavesi yapılarak çözülmüş, 5 ml olarak tüplere dökülmüş, otoklavda steril edilmiş ve bu ortam, organizmaların tuz toleranslarını tespit etmek için kullanılmıştır (Atlas 2004).

3.1.2.2.2. %3'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Ticari olarak temin edilen bu çözelti, organizmaların katalaz aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanıldı.

3.1.2.2.3. Jel Yükleme Tamponu (6 X)

Bromofenol mavisi.....	25 mg
Sukroz	4 g

H₂O 10 ml'ye
tamamlandı. Hazırlanan tüm besiyerleri ve solüsyonlar kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de saklandı.

3.1.2.2.4. TAE Elektroforez Tamponu

50x konsantrasyonda stok solüsyon aşağıdaki gibi hazırlandı:

Tris Base.....	40 mM
Asetik Asit	20 mM
EDTA	1 mM

Buffer solüsyonu olarak stoktan 20 ml alınıp distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklandı.

3.1.3. PZR

3.1.3.1. Kullanılan Cihazlar

PZR 96 örnek kapasiteli Boeco (Almanya) marka kademeli termal döngüleme cihazında elektroforez VWR marka 64 kuyucuk kapasiteli elektroforez tankında, görüntüleme Vilber Lourmat (Infinity VX2, Almanya) marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

3.1.3.2. MgCl₂, Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer, dNTP Set

25 mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 100 mM deoksinnükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas) kullanıldı.

3.1.3.3. Primerler

Çalışmada kullanılan tüm primerlerin kullanım amaçları, dizileri, ampikon uzunlukları, hedef genleri, kaynakları ve Tablo 2’te verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan primerlerler dizileri, ampikon uzunlukları, hedef genleri

Primer	Sekans (5'-3')	Ampikon uzunluğu (bp)	Hedef Gen	Kaynak
Ent1 Ent2	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112	<i>tuf</i>	Ke ve ark. 1999
DU1 DU2	CCTACTGATATTAAGACAGC TAATCCTAAGATAGGTGTTTG	295	<i>sodA</i>	Jackson ve ark. 2004
HI1 HI2	CTTTCTGATATGGATGCTGTC TAAATTCTTCCTTAAATGTTG	187	<i>sodA</i>	
16S20 16S1390	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GACGGGCGGTGTGTACAA	1371	16SrRNA	Sghir ve ark. 1998, Suau ve ark. 1999

3.1.3.4. Agaroz Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma)..... 1 ve 1.5 g
TAE (0,5 X)..... 100 ml

Hazırlanan buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatıldı. Karışım, 40-50°C’ye kadar soğutuldu. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

3.1.3.5. Marker

Marker olarak 100 bp (Vivantis ve Fermentas marka) ve PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA’sı (Fermentas) kullanıldı.

PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA’sının hazırlanışı:

30 µl λ DNA (Fermentas)

30 µl 10X Buffer

4 µl PstI enzimi (Fermentas)

236 µl enjeksiyonluk distile su

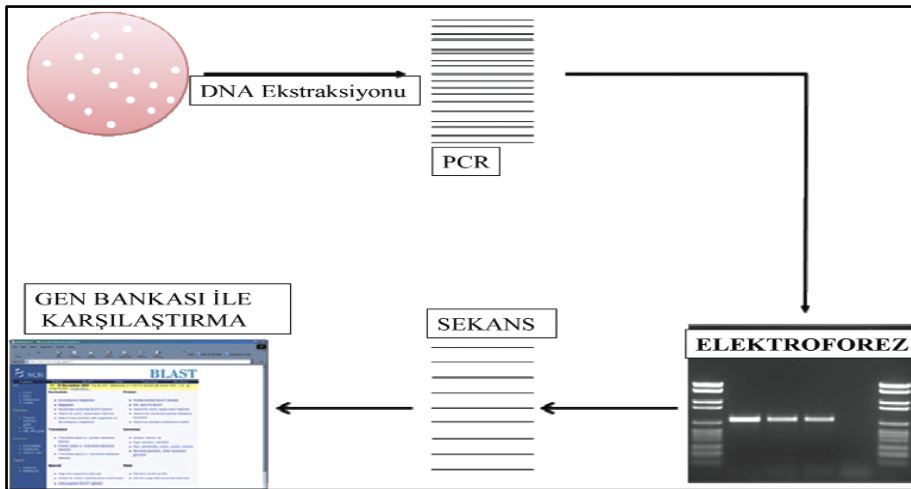
Bir saat 37°C’de bekledikten sonra 30 µl loading dye eklendi. Her elektroforez reaksiyonu için 7 µl kullanıldı (Anderesson 2009).

3.1.3.6. Etidyum Bromür

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka %1’lik etidyum bromür 500 ml 0,5X TAE içerisine 100 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

3.1.3.7. Sekans Analizi

Tüm bakterilerden 16S rRNA fragmanını çoğaltmaya yarayan bu primerlerle elde edilen ampliconlar tür tayini yapılabilmesi için (*E. hirae* ve *E. durans*) sekans analizine tabi tutuldular. Elde edilen ampliconlar sekans analizleri için özel bir firmaya (Macrogen, Korea) gönderildi. Firma saflaştırmayı takiben ABI Primse cihazı ile sekans analizini gerçekleştirdi. Elde edilen 16S rRNA sekansları tür tayininin yapılabilmesi için gen bankası ile karşılaştırıldı. Bu amaçla National Center of Biotechnology Information’ın web sayfasındaki (Anonim 5) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanıldı. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonunun yapılışı Resim 4’te gösterilmiştir.



Resim 4. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu

3.2. Yöntem

3.2.1. Süt Örneklerinin Alınması

Süt örnekleri alınması esnasında öncelikle meme lobları su ile yıkanıp kurulandıktan sonra %70'lik alkolle temizlendi. Eller sabunlandı, eldiven giyildi. Meme başındaki saprofit mikroorganizmaları uzaklaştırmak için birkaç ml süt boşa sağıldı. Veteriner hekimler tarafından enjektör içerisine yaklaşık 3-5 ml miktarda süt alındı (Baştan 2002). Alınan 620 süt örneği soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırıldı.

3.2.2. Enterokok İzolasyonu

Alınan süt örnekleri, öncelikle selektif sıvı besiyeri olan Enterokok Buyyon'a 100 µl miktarda olacak şekilde inokule edilerek, aerobik şartlarda 37°C'de 24-72 saat inkübe edildiler. Besiyerinin parlak sarı olan renginin mavi-yeşil renge dönüştüğü örneklerden bir öze dolusu alınarak selektif katı besiyeri olan Enterokokosel Agar'a ekimleri yapıldı. Besiyeri 37°C'de aerobik şartlarda 24-48 saat süreyle bekletildikten sonra, siyah-koyu kahverenginde koloniler enterokok türleri yönünden şüpheli olarak kabul edildi. İncelenmek üzere tekrar enterokokosel agara ve kanlı agara pasajlandılar.

3.2.3. Enterokokların Fenotipik İdentifikasyonu

Selektif besiyerinde enterokok şüpheli olarak (siyah-koyu kahverenginde koloniler) değerlendirilen kolonilere sırası ile Gram boyama, %6.5 tuz içeren NB'da üreme ve lam üzerinde katalaz testleri yapıldı (Lanthier ve ark. 2010). Gram pozitif kok görünümünde, %6,5 tuz içeren NB'da üreyebilen ve katalaz negatif bakteriler enterokok şüpheli olarak kabul edildi. Bu isolatlar, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere moleküler testler yapılmaya kadar -20°'de %20 gliserinli BHIB içerisinde saklandılar.

3.2.3.1. Katalaz Testi

Katalaz enzimi hidrojen peroksiti (H_2O_2), su (H_2O) ve oksijene (O_2) ayırmaktadır. Bu nedenle bu test bakteriler tarafından sentezlenen katalaz (hidrojen peroksit oksido redüktaz) enziminin varlığını saptamak amacıyla kullanılmaktadır. Katalaz testi yapılırken kanlı agar pasajlanmış mikroorganizma kültüründen bir öze dolusu alınıp, %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu damlatılmış bir lam üzerinde koloni ve hidrojen peroksit solüsyonunun karıştırılması ile gerçekleştirilir. Bu işlem sonunda hava kabarcığı oluşumuna neden olan izolatlar katalaz pozitif olarak, hava kabarcığı oluşturmeyen izolatlar katalaz negatif olarak değerlendirildi (Temiz 2000).

3.2.3.2. %6.5 NaCl'de Büyüme

Enterokok türleri için önemli ve ayırt edici testlerden birisidir ve bakterinin identifikasyonunda kullanılır. %6.5 oranında NaCl içeren ve içermeyen NB ortamına ekilen bakterilerin, 24 saatlik inkübasyondan sonra üremeleri değerlendirildi. Tuz içermeyen NB'daki kadar bulanıklık oluşturan NaCl'lü NB içeren tüplerde üreyebilen izolatlar için sonuç pozitif olarak kaydedildi ve bu türlerle identifikasyona devam edildi (Gerhardt ve ark. 1994). Kontrol mikroorganizma olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kullanıldı.

3.2.3.3. *E. hirae* ve *E. durans* İzolatlarının Genotipik Belirlenmesi

Enterokok türlerinin biyokimyasal yöntemler kullanılarak yapılan identifikasyonları oldukça zor ve zaman alıcıdır. *E. hirae*, melibiyoz ve sukrozdan asit üretirken, *E. durans* her iki test için negatif olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, %98.8'den fazla 16S rDNA benzerliği bulunan *E. hirae* ve *E. durans* gibi bakterileri konvansiyonel testlerle fenotipik olarak birbirinden ayırt etmek çok güç olduğundan rutin teşhis laboratuvarlarında yapılmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, izole edilen enterokok şüpheli izolatlar içerisindeki *E. hirae* ve *E. durans* izolatlarını belirlemek için spesifik primer çifti kullanılarak PZR yapıldı. PZR için öncelikle izolatlardan DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

3.2.3.3.1. DNA İzolasyonu

İzolasyonu yapılan bakterilerden total DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle 200 µl bakteri süspansiyonu 400 µl lizis solüsyonu ile karıştırıldı. 65°C’de 5 dakika inkube edildi. 600 µl kloroform ilave edilerek karıştırıldı ve 10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Presipitasyon solüsyonu, 720 µl steril distile su ile 80 µl 10x konsantre solüsyonu karıştırılarak hazırlandı. Santrifüjden sonra üst sıvı yeni bir tüpe aktararak 800 µl presipitasyon solüsyonu ilave edildi. 10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, pelete 100 µl 1,2 M NaCl ilave edilerek vortekslendi. 300 µl soğuk etanol ilave edilerek 10 dakika -20°C’de DNA’nın presipitasyonu sağlandı. 10.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Üstteki etanol dökülerek pelet %70’lik soğuk etanol ile yıkandı. DNA 100 µl steril distile suda çözündürülerek iyice karıştırıldı. Her bir PZR reaksiyonu için 2 µl kalıp DNA kullanıldı.

3.2.3.3.2. DNA’nın Elektroforezi

İzolatlardan elde edilen genomik DNA’lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. DNA elektrofrezinde %1 agaroz içeren jel kullanıldı. Bunun için 5 µl DNA, 1 µl yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 50 V’ta 60 dakika yürütüldü. Elektrofrez sonucunda, başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA’ların bütünlüğünün tam olduğunu gösterdi (Sambrook ve ark. 1989).

3.2.3.3.3. DNA’nın Saflık Kontrolü ve Miktar Tayinleri

DNA bütünlüğü %1’lik agaroz jelde kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometre ile yapıldı (Sambrook ve ark. 1989). Spektrofotometrede DNA’ların 260 nm ve 280 nm’deki absorbansları hesaplandı (OD260 ve OD280) ve bu değerler arasındaki oran kullanılarak DNA’nın saflığı kontrol edildi. OD260/OD280 oranının 1.8-2.0 arasında olması DNA’nın saf olduğunu, bu aralıktan daha aşağıda olması RNA

kontaminasyonu olduğunu ve bu aralıktan daha yukarıda olması da protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir (Turner ve ark. 2004).

3.2.4. PZR

Master mikslerin hazırlanışı: Tüm PZR reaksiyonlarında bir örnek için PZR amplifikasyonu 30 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0.2 mM, primer (her biri için) 0.4 pmol, Taq DNA polymerase 1.5 U olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri Tablo 3'te belirtilmiştir.

Tablo 3. Master miksin hazırlanma oranları

Malzeme (Konsantrasyon)	İstenen Son Konsantrasyon	10 örnek (µl)
Buffer (10X)	1 X	30
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	24
dNTP (10 mM)	0.2 mM	6
Primer-F (100 pmol)	0.4 pmol	1.2
Primer-R (100 pmol)	0.4 pmol	1.2
Taq Polimeraz (5 U)	0.3 µl/ 50 µl	1.8
dH ₂ O	Son miktara tamamlanır	235.8

Master miksler hazırlandıktan sonra 0.2 ml'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 28'er µl hazırlanan master miksten ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip programlandı.

Enterococcus spp., *E. hirae* ve *E. durans* ve sekans analizi amacı ile gerçekleştirilen 16S PZR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı sırası ile için Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. PZR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı

		<i>Enterococcus</i> spp.		<i>E. hirae</i> / <i>E. durans</i>		16SrRNA	
Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre	Sıcaklık (°C)	Süre	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyon	1	95	5 dk	95	5 dk	95	5 dk
Denatürasyon	35	95	30 sn	95	30 sn	95	30 sn
Bağlanma		55	30 sn	57	30 sn	54	30 sn
Uzama		72	30 sn	72	30 sn	72	60 sn
Son Uzama	1	72	10 dk	72	10 dk	72	10 dk

Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklmesi: 6x yükleme boyasından 1 µl alınıp, 5 µl PZR ürünleriyle birleştirildikten sonra bir pipet yardımı ile bu karışımdan 6 µl jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi.

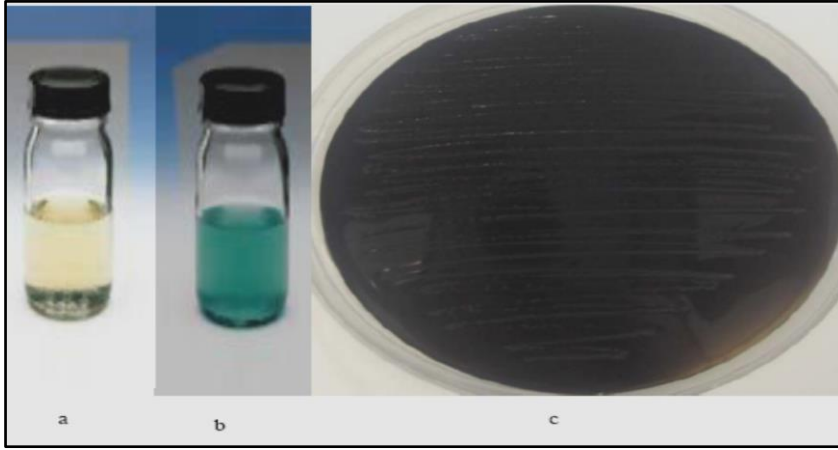
Yürütme: Hazırlanan jelle, istenilen örnekler ve markerların yükleme yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 100V, 400A akımda, 45 dakika yürütüldü.

Görüntüleme ve Değerlendirme: 100 Volt'ta 45 dakikalık elektroforez süresinin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde içerisinde etidyum bromür olan tanka konuldu. Burada 15 dakika boyanmaya bırakıldı. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. Değerlendirme, jel UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PZR için ayrı olarak daha önce bildirildiği şekilde (Tablo 2) yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon

Çalışmada toplam 620 mastitisli süt örneğinin selektif besiyerlerine ekimleri yapıldı. Chromocult® Enterococci Agar'da referans suşla (*E. faecalis* ATCC 29212) benzer görünümü (Resim 5) olan bakteri kolonileri seçilerek toplamda 96 *Enterococcus* sp. şüpheli izolat elde edildi.



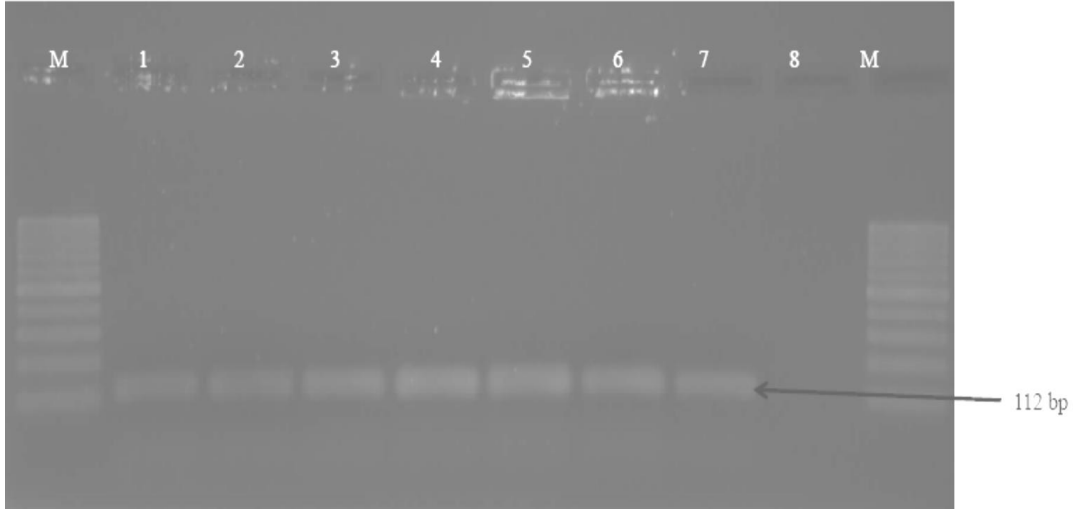
Resim 5. İzolatların selektif katı ve sıvı besiyerlerinde görünümü a. Ekim yapılmamış EB b. EB'da *E. faecalis* ATCC 29212 suşu c. EA'da *E. faecalis* ATCC 29212 suşu

Bu izolatların Gram pozitif kok görünümünde olup %6.5 tuzlu NB'da üreyip, katalaz negatif oldukları doğrulandıktan sonra incelemeye dahil edildiler.

4.2. PZR

4.2.1. *Enterococcus* spp.

Doksan altı enterokok şüpheli suşun DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında 112 bp uzunluğunda ampikon elde edilen 96 izolatın hepsinin *Enterococcus* spp. olduğu doğrulandı (Resim 6).



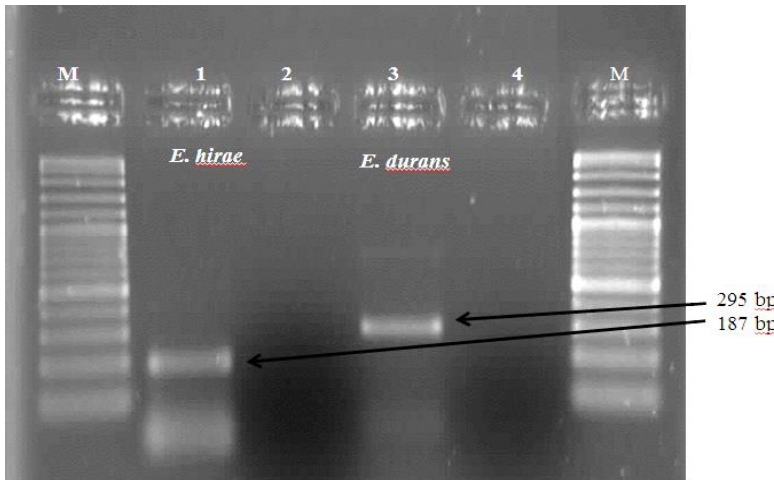
Resim 6. *Enterococcus* spp. PZR elektroforez görüntüsü 1-6: *Enterococcus* spp. saha izolatları 7: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) 8: Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder

4.2.2. *E. hirae*

Doksan altı *Enterococcus* spp. DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında 295 bp uzunluğunda ampikon elde edilen 9 izolatın (%9.3) *E. hirae* olduğu belirlendi (Resim 7).

4.2.3. *E. durans*

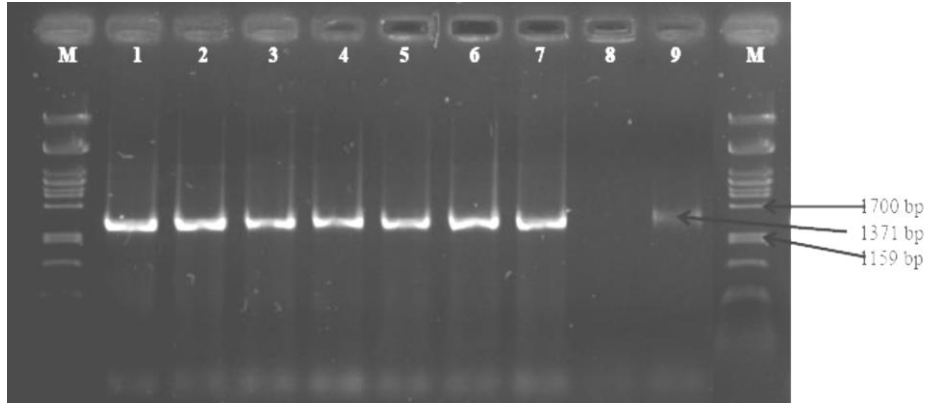
Doksan altı *Enterococcus* sp. DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında 187 bp uzunluğunda ampikon elde edilen 5 izolatın (%5.2) *E. durans* olduğu belirlendi (Resim 7).



Resim 7. *E. hirae* ve *E. durans* PZR elektroforez görüntüsü 1: *E. hirae* saha izolatu 2: Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) 3: *E. durans* saha izolatu 4: Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder

4.2.4. 16S PZR

Sekans için gerçekleştirilen 16S PZR sonucunda 1371 bp uzunluğunda ampikon elde edildi (Resim 8).



Resim 8. 16S universal primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR **M:** Marker (PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı) **1-7:** *Enterococcus* spp. izolatları, **8:** Negatif Kontrol (DNA'sız master miks) **9:** Pozitif Kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212).

PZR'da pozitif olarak görülen bir *E. hirae* ve bir *E. durans* saha izolatu sekanslandı. Sekans sonucuna göre *E. hirae* ve *E. durans* olduğu belirlenen bu izolatlar daha sonra pozitif kontrol olarak kullanıldı. *E. hirae* ve *E. durans* izolatlarının sekans sonuçları Resim 9 ve 10'da gösterilmiştir.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JR_037082.1	<i>Enterococcus hirae</i> strain R 16S ribosomal RNA, partial sequence	2128	2128	95%	0.0	98%
JR_036922.1	<i>Enterococcus durans</i> strain 98D 16S ribosomal RNA, partial sequence	2122	2122	94%	0.0	98%
JR_042054.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain IMG_11423 16S ribosomal RNA, complet	2113	2113	96%	0.0	98%

Resim 9. *E. hirae* sekans sonucu

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
NR_036922.1	<i>Enterococcus durans</i> strain 98D 16S ribosomal RNA, partial sequence	1953	1953	100%
NR_037082.1	<i>Enterococcus hirae</i> strain R 16S ribosomal RNA, partial sequence	1953	1953	100%
NR_044160.1	<i>Enterococcus thailandicus</i> strain FP48-3 16S ribosomal RNA, partial s	1936	1936	100%
NR_042054.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain IMG_11423 16S ribosomal RNA, complet	1930	1930	100%
NR_024906.1	<i>Enterococcus mundtii</i> strain ATCC 43186 16S ribosomal RNA, partial :	1914	1914	100%
NR_041933.1	<i>Enterococcus ratti</i> strain ATCC 700914 16S ribosomal RNA, partial se	1908	1908	100%

Resim 10. *E. durans* sekans sonucu

5. TARTIŞMA

Mastitise neden olan mikroorganizmaların doğru bir şekilde tanımlanması, klinik ve subklinik olgulardaki enfeksiyonların tespiti ve kontrol edilebilmesi için oldukça önemlidir. Bakterilerin fenotipik özelliklerinden yararlanılarak uygulanan konvansiyonel yöntemler bazı mastitis etkenlerinin teşhisi için güvenilir olmayabilir. Doğru tanımlama yapılabilmesi için moleküler yöntemlerin kullanılması daha kesin sonuçlara ulaştırır.

İnsanlarda ve hayvanlarda doğal floranın bir bileşeni olan enterokoklar, insanda endokardit gibi nozokomiyal enfeksiyonlar ve bazı hayvanlarda bağırsak enfeksiyonu, sepsisemi gibi hastalıklardan sorumludur. Özellikle süt sığırlarında, sağım hijyeni yetersizliği ve çevresel faktörlerin etkisiyle memeye ulaşan enterokoklar enfeksiyon oluşturarak mastitise yol açar. Birçok antibiyotiğe karşı doğal dirençli olmaları, yeni dirençler oluşturma yetenekleri ve bunun yanında bu dirençleri aktarabilmeleri enterokok enfeksiyonlarının ciddiyetini arttırmaktadır. Bu nedenle öncelikle etkenin doğru teşhis edilmesi ve ardından doğru tedavi uygulanması son derece önemlidir.

Bu çalışmada 620 klinik ve subklinik mastitisli süt örneği incelendi. Moleküler yöntemler kullanılarak yapılan identifikasyon sonuçlarına göre bu örneklerden 96 izolat (%15,4) *Enterococcus* spp. olarak tanımlandı. Enterokoklardan 9'unun (%9.3) *E. hirae* ve 5'inin (%5.2) *E. durans* olduğu tespit edildi.

Macun ve arkadaşlarının 2011'de yaptığı çalışmada 213 adet süt örneğinden izole edilen etkenlerden 9'u (%4.22) *Enterococcus* olarak tanımlanmış, bunlardan 3'ünün (%33.3) *Enterococcus faecium*, 2'sinin (%22.2) *Enterococcus faecalis*, 3'ünün (%33.3) *Enterococcus hirae* ve birinin (%11.1) *Enterococcus solitarius* olduğu bildirilmiştir.

Yeşilmen ve arkadaşları (2012), 239 adet subklinik mastitisli inek sütü örneklerinden 66 (%24.63) *S. aureus*, 30 (%11.19) *S. epidermidis*, 20 (%7,46) *S. haemolyticus*, 27 (%10.07) *S. agalactiae*, 10 (%3.73) *S. dysgalactiae*, 5 (%1.87) *S. uberis*, 10 (%3.73) *Bacillus* spp., 23 (%8.58) *E. coli*, 10 (%3.73) *E. cloacae*, 10 (%3.73) *E. faecalis*, 5 (%1.87) *K. pneumonia*, 5 (%1.87) *P. aeruginosa*, 8(%2.99) *Diplococcus* spp. ve 10 (%3.73) *Candida* spp. izole etmişlerdir.

Kuyucuoglu (2011), Afyon ve çevresinde elde edilen 392 mastitisli süt örneğinden 43 (%10.9) adet enterokok su u saptamış, bunların %53.4' n  *E. faecalis* ve %18.6'sını da *E. faecium* olduğunu bildirmiştir.

Ankara ve Balıkesir illerindeki süt işletmelerinden sağlanan sütlerin incelendiği bir çalışmada (Cengiz ve ark. 2011) 75 enterokok su u ele alınmıştır. RFLP-PZR ile moleküler tiplendirmesi yapılan su ların 61'i *E. faecium* ve 14'  *E. avium* olarak tanımlanmıştır. İzolatların RAPD PZR ile genotiplendirmesi sonucu *E. faecium* su larında 10 adet, *E. avium* su larında ise 7 adet farklı profil görüntülenmesi enterokokların mastitisteki rolünü ve önemini göstermiştir.

Kateete ve arkadaşlarının 2013'teki çalışmasında sığır sütlerinden izole ettikleri 16 adet enterokoktan 4'  *E. hirae* ve 1'i *E. durans* olarak tanımlanmıştır.

Bir  alı mada *E. hirae* su larının *copY* ve *murG* genleri primerleriyle yapılan PZR ile sadece *E. durans* su larında amplifikasyon ürünü veren *mur-2ed* genleri primerlerinin kombinasyonu ile multipleks PZR kullanılması bu iki türün tanımlanması için hızlı bir alternatif olduğu bildirilmiştir (Arias ve ark. 2006).

Ryu ve arkadaşları 2013'te 16S rRNA gen sekans analizi ile inceledikleri 439 çevresel izolattan %91'ini *Enterococcus* spp. olarak tanımlamışlardır. Bunlardan %34 *E. casseliflavus*, %25 *E. faecalis*, %15 *E. mundtii*, %5 *E. faecium* ve %5'ini *E. hirae* olarak tanımlamışlardır.

Knijff ve arkadaşları 2001'de *E. durans* ve *E. hirae* için D-alanin: D-alanin ligaz (ddl) kodlayan genleri hedef alan primerler ile t re özgü PZR uygulamışlardır. Multipleks PZR denemesinde, farklı kökenli (hayvan, silaj, peynir, et ve klinik örnekler) toplam 46 izolatu incelenmiştir. İzolatların 30'unu *E. durans* ve 16'sını *E. hirae* olarak bildirmi lardır. Burada yapılan testin multipleks formu; hız, güvenilirlik ve özgünlük avantajlarını birleştirerek *E. durans* ve *E. hirae*'nin doğru tanımlanması sağlanmıştır. Ayrıca bu yaklaşım, tek izolatu tanımlanması için uygulanan test sayısını da düşürmektedir. PZR ile tanımlamanın hem epidemiyolojik hem de terapötik çalışmalar açısından avantajlı ve güvenilir olup, klinik önemi artan tanımlanmış enterokokkal türlerin yelpazesini geni letmi tir.

Devriese ve arkadaşlarının 2002'deki çalışmasında *E. durans*, *E. hirae* ve *E. villorum* su larının tanımlanması için farklı testler kar ıla tırılmı tır. *E. faecium* grubuna ait olan bu türlerin 16S rRNA dizilim benzerliğinin %98.8'den fazla olması filogenetik olarak birbirleriyle oldukça ilişkili olduklarını ispat ederken ayırt edilmesindeki g   klere işaret etmektedir.

Tüm hücre proteinlerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile analizi, tRNA ayarlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve isteğe bağlı hazırlanmış (D11344) PZR analizi ile çok farklı kaynaklardan elde edilmiş bir suş koleksiyonu içinden bu üç tür doğru bir şekilde tanımlanabilir. Buna karşın, biyokimyasal reaksiyonlar ayrı bir grup olarak bu üç türün diğer enterokoklardan kesin ayrımını sağlar. Bu grup içinde, *E. villorum*'u ayırt etmek için D-ksiloz asidifikasyonu kullanılabilir, fakat bazı istisnalar görülebilir. Klindamisine aşırı duyarlı suşlar *E. durans* olarak tanımlanabilir, fakat bu türün birçok suşu edindiği dirençten dolayı, *E. hirae* ve *E. villorum*'dan ayırt edilemeyebilir.

16S rDNA benzerliği %98.8'den fazla olan bakterileri, geleneksel testler ile birbirlerinden ayırt etmek zordur. Tür tanımlamalarında *E. hirae* melibiyoz ve sükrozdan asit üretir şeklinde tanımlanırken, *E. durans* her iki testte de negatif olarak kabul edilir. Bununla birlikte, melibiyoz-pozitif *E. durans* suşları tanımlanmış ve Rapid ID 32 STREP tanılama sisteminin analitik profil indeksi, melibiyozu bağlı olarak, sükroz-pozitif *E. durans* suşlarının varlığını tespit etmiştir (Facklam and Collins 1989).

Naser ve arkadaşları (2005) tanımlanan türleri geçerli bir şekilde temsil eden 91 enterokok izolatu arasındaki akrabalığı, ATP sentazın alfa alt birimini kodlayan gen olan atpA'nın 1102 bp'lik fragmanı karşılaştırarak incelemiştir. Gözlenen ilişkiler, 16S rRNA gen sekans analizinden çıkan filogeni sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Bununla birlikte atpA gen sekansı, 16S rRNA'ya göre türleri ayırt etmede daha etkilidir. Bütün türler, atpA sekansına dayalı olarak maksimum %92 benzerlik göstermektedir. *E. faecium* türleri grubunun altı üyesi (*E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. villorum*, *E. mundtii* ve *E. ratti*) %99'un üzerinde 16S rRNA gen sekans benzerliği göstermiştir, ancak atpA gen sekansı benzerliğinin en yüksek değeri sadece %89.9'dur. *E. faecium* suşları dışındaki tüm türler için tür içi atpA sekans benzerliği %98.6 ile %100 arasında değişmekte; *E. faecium* suşları %96,3 ile düşük atpA sekans benzerliğine sahiptir. Verilere göre atpA, enterokokların identifikasyonu ve filogenetik çalışmalar için alternatif bir araç sağlamaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda Aydın yöresinde mastitislerin etiyolojisinde enterokokların %15,4 oranında rol oynadığı görülmüştür. Bu izolatlardan %9.3'ünün *E. hirae* ve %5.2'sinin *E. durans* olduğu belirlenmiştir. Dolayısı ile identifikasyonları zor olan bu türlerin yöremizde enterokokal mastitis etiyolojisinde önemli yerlerinin olduğu söylenebilir.

Mastitisle doğru bir şekilde mücadele etmek için tüm sürüleri kapsayan bir kontrol programı oluşturulmalı ve enfeksiyona neden olan etkenler doğru tanımlanmalıdır. Konvansiyonel yöntemlerle enterokok identifikasyonlarının yapılması zor, zahmetli ve zaman alıcıdır. Bu nedenle, enterokoklar gibi mastitis etiyolojisinde günden güne önem kazanan etkenlerin daha ileri tekniklerle güvenilir bir şekilde identifikasyonlarının yapılabilmesinin, süt sığırcılığı ekonomisine de katkı sağlayacağı açıktır. Bu etkenlerin cins ve tür düzeyinde tanımlanmalarında spesifik gen bölgelerinin belirlenmesine dayanan primerler kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu ile fazla sayıda izolat kısa sürede identifiye edilebilmekte ve bu nedenle de moleküler yöntemler tercih sebebi olabilmektedir. Kısa sürede ve güvenilir identifikasyonların yapılabilmesine imkan vermesi sebebi ile moleküler yöntemlerin rutin teşhiste kullanılmasının faydalı olduğu düşünülmektedir. Günümüzde maliyet açısından daha uygun ve personel bilgisi daha artmış olduğundan fenotipik yöntemlere göre önemli avantajlar sağlar.

16S universal primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR ile, etkenlerin cins ve tür düzeyinde tanımlanmalarında spesifik gen bölgelerinin belirlenmesine dayanan primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR'ların birbirleri ile uyumlu oldukları sonucuna varıldı.

Enterokok türlerinin öneminin günden güne artması sebebi ile nispeten üzerinde oldukça az çalışılmış olan bu iki enterokok türünün virulens faktörleri ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi üzerine başka çalışmalar yapılması bu mikroorganizmaların patogenezlerinin daha iyi anlaşılmasına katkısı olacak bilgilere ulaşmamızı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Aarestrup FM, Bager F, Andersen JS. Association between the use of avilamycin for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers epidemiological study and changes over time. *Microbial Drug Resistance* 2000, 6: 71-75.

Anderesson MD. DNA 6X Loading Dye. Cancer Center.

Eriřim Adresi: [http:// www.mdanderesson.org/education-and-research/departments-programs-and-labs/labs/dent-laboratory/protocols/dna-6x-loading-dye.html](http://www.mdanderesson.org/education-and-research/departments-programs-and-labs/labs/dent-laboratory/protocols/dna-6x-loading-dye.html), Eriřim Tarihi: 17 Ekim 2016.

Anonim 1. Alke İlaç Ar-Ge Laboratuvarları.

Eriřim Adresi: http://www.alkenet.com/Alke_Mastitis_Genel_Bilgi, Eriřim Tarihi: 15 Ekim 2016.

Anonim 2. Mastitis Kontrolünde Kritik Noktalar.

Eriřim Adresi: <http://www.egevet.com.tr>, Eriřim Tarihi: 06 Ağustos 2016.

Anonim 3. Mastitise Neden Olan Etkenler.

Eriřim Adresi: <https://intravet.wordpress.com>, Eriřim Tarihi: 07 Ağustos 2016.

Anonim 4. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.

Eriřim Adresi: www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html, Eriřim Tarihi: 05 Ekim 2016.

Anonim 5. The National Center for Biotechnology Information.

Eriřim Adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Eriřim Tarihi: 17 Ekim 2016.

Arias CA, Robredo B, Singh KV, Torres C, Panesso D, Murray BE. Rapid identification of *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* by PCR and detection of a homologue of the *E. hirae* mur-2 Gene in *E. durans*. *Journal of Clinical Microbiology* 2006, p. 1567–1570

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

Baştan A. İneklerde Meme Hastalıkları. *Hatipoğlu Basım ve Yayımlar San. Tic. Ltd. Şti.* Ankara 2002.

Bean A, Williamson J, Cursons RT. Virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from mastitic milk. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 2004, 51(6):285-7.

- Bisharat N, Crook DW, Leigh J, Harding RM, Ward PN, Coffey TJ, Maiden MC, Peto T, Jones N.** Hyperinvasive neonatal group B *Streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. *Journal of Clinical Microbiology* 2004, 42(5):2161-7.
- Bishop EJ, Shilton C, Benedict S, Kong F, Gilbert GL, Gal D, Godoy D, Spratt BG, Currie BJ.** Necrotizing fasciitis in captive juvenile *Crocodylus porosus* caused by *Streptococcus agalactiae*: an outbreak and review of the animal and human literature. *Epidemiology and Infection* 2007, 135(8):1248-55.
- Blaimont B, Charlier J, Wauters G.** Comparative distribution of *Enterococcus* species in faeces and clinical samples. *Microbial Ecology in Health and Disease* 1995, 8(3):87–92.
- Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L.** Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research* September-October 2003, 34(5):521-64.
- Castelani L, Santos AF, Dos Santos Miranda M, Zafalon LF, Pozzi CR, Arcaro JR.** Molecular Typing of Mastitis-Causing *Staphylococcus aureus* Isolated from Heifers and Cows. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, 14(2):4326-33.
- Cengiz S, Tekin O, Akan M.** Mastitislerden izole edilen enterokokların moleküler tiplendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2011, 58, 17-20.
- Daly M, Power E, Björkroth J, Sheehan P, O'Connell A, Colgan M, Korkeala H, Fanning S.** Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiological investigation of mastitis outbreaks in Irish dairy herds. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65(6):2723-9.
- De Graef EM, Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Collins MD, Lefebvre K, Swings J, Haesebrouck F.** Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003, 53(Pt 4):1069-74.
- Descheemaeker P, Ieven M, Chapelle S, Lammens C, Hauchecorne M, Wijdooghe M, Vandamme P, Goossens H.** Prevalence and molecular epidemiology of glycopeptide-resistant enterococci in Belgian renal dialysis units. *Journal of Infectious Diseases* 2000, 181, 235–241.
- Delgado S, García P, Fernández L, Jiménez E, Rodríguez-Baños M, del Campo R, Rodríguez JM.** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2011, 62(2):225-35.

- Deveci H, Apaydın A M, Kalkan C, Öcal H.** Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları. *Fırat Üniversitesi Basımevi* 1. Baskı, Elazığ, 1994.
- Devriese LA, Van de Kerckhove A, Kilpper BR, Schleifer KH.** Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1987, 37: 257-259.
- Devriese LA, Vancanneyt M, Descheemaeker P, Baele B, Van Landuyt HW, Gordts B, Butaye P, Swings J, Haesebrouck F.** Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *Journal of Applied Microbiology* 2002, 92:821-827.
- Doğan B, Schukken YH, Santisteban C, Boor KJ.** Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43(12):5899-906.
- Döpfer D, Barkema HW, Lam TJ, Schukken YH, Gaastra W.** Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 1999, 82(1):80-5.
- Erdem H, Atasever S.** Süt sığırlarında mastitisin tanımı, teşhisi ve korunma yolları. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2004, 19(2):100–108.
- Farrow JAE, Collins MD.** *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1985, 35(1), 73-5.
- Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR.** Methods for general and molecular bacteriology. *American Society for Microbiology*, Washington, USA 1994.
- Gilad J, Borer A, Riesenber N, Peled N, Shnaider A, Schlaeffer F.** *Enterococcus hirae* septicemia in a patient with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1998, 17(8):576-7.
- Göncü S.** Adana Entansif Süt Sığırcılığı İşletmelerinde Yetiştirilen Saf ve Melez Siyah Alaca İnek Sütlerinde Somatik Hücre Sayısına Etki Eden Faktörler ve Mastitis İle İlişkisi. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi* 2000.
- Gürge Y.** Mastitis (Meme İltihabı). *Çukurova Üniversitesi Tarımsal Yayın, Haberleşme, Araştırma ve Uygulama Merkezi Çiftçi Broşürü* Haziran Sayısı 2005.
- Harji DP, Rastall S, Catchpole C, Bright-Thomas R, Thrush S.** Pseudomonal breast infection. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 2010, 92(3):W20-2.
- Holzapfel WH, Haber P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 2001, 73(2 Suppl):365S-373S.

- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB.** Use of a Genus and species-specific multiplex PCR for identification of *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004, 42:8; 3558–3565.
- Jones N, Oliver KA, Barry J, Harding RM, Bisharat N, Spratt BG, Peto T, Crook DW; Oxford Group B Streptococcus Consortium.** Enhanced invasiveness of bovine-derived neonatal sequence type 17 group B *Streptococcus* is independent of capsular serotype. *Clinical Infectious Diseases* 2006, 42(7):915-24.
- Kateete DP, Kabugo U, Baluku H, Nyakarahuka L, Kyobe S, Okee M, Najjuka CF, Joloba ML.** Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. *PLoS ONE* 2013, 8(5): e63413.
- Kaufhold A, Klein R.** Species identification and antibiotic susceptibility of enterococci isolated from clinical specimens of hospitalized patients. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1995, 282, 507– 518.
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG.** Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 1999, 37(11):3497-503.
- Klein G.** Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* 2003, 88:23–31.
- Knijff E, Dellaglio F, Lombardi A, Andrighetto C, Torriani S.** Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. *Journal of Microbiological Methods* 2001, 47:35–40.
- Koneman EW, Allen S, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC.** Identification of *Enterococcus* species - kit systems for identifying enterococci. *Diagnostic Microbiology*, New York, Lippincott-Raven Publishers 2006, 597-649.
- Koort J, Coenye T, Vandamme P, Sukura A, Björkroth J.** *Enterococcus hermanniensis* sp. nov., from atmosphere packaged broiler meat and canine tonsils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2004, 54:1823–1827.
- Kuru M, Oral H.** Mastitis Tedavisinde Fitoterapi ve Homeopatinin Kullanımı. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013, 2(2) 112-116.
- Kuyucuoglu Y.** Antibiotic resistances of enterococci isolated from bovine subclinical mastitis. *Eurasian Journal of Veterinary Science* 2011, 27(4) 231- 234.

- Lam TJ, Lipman LJ, Schukken YH, Gaastra W, Brand A.** Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. *American Journal of Veterinary Research* 1996, 57:39–42.
- Lanthier M, Scott A, Lapen D, Zhang Y, Topp E.** Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* spp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals and birds, and wildlife. *Canadian Journal of Microbiology* 2010, 56:715–729.
- Larppanichpoonphol P, Watanakunakorn C.** Group B Streptococcal bacteremia in nonpregnant adults at a community teaching hospital. *Southern Medical Journal* 2001, 94:1206–11.
- Law-Brown J, Meyers PR.** *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003, 53: 683–685.
- Liassine N, Frei R, Jan I, Auckenthaler R.** Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from a Swiss hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 1998, 36:1853–1858.
- Lipman LJ, de Nijs A, Lam TJ, Gaastra W.** Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. *Veterinary Microbiology* 1995, 43(1):13-9.
- Macun HC, Yağcı İP, Ünal N, Kalender H, Sakarya F, Yıldırım M.** Kırıkkale’de belirlenen subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve antibiyotik direnç Durumu. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2011, 8(2) 83-89.
- Mangan MW, McNamara EB, Smyth EG, Storrs MJ.** Molecular genetic analysis of high-level gentamicin resistance in *Enterococcus hirae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997, 40:377–382.
- Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Dupre I, Sechi LA.** Comparison of incidence of virulence determinants and antibiotics resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology* 2003, 88: 291-304.
- McLennan MW, Kelly WR, O'Boyle D.** *Pseudomonas* mastitis in a dairy herd. *Australian Veterinary Journal* 1997, 75(11):790-2.
- McDonald TJ, McDonald JS.** *Streptococci* isolated from bovine intramammary infections. *American Journal of Veterinary Research* 1976, 37(4):377-81.

Moazzez A, Kelso RL, Towfigh S, Sohn H, Berne TV, Mason RJ. Breast abscess bacteriologic features in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemics. *Archives of Surgery* 2007, 142(9):881-4.

Moellering RC. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Livingstone, New York 1995, 1826–1835.

Munoz MA, Welcome FL, Schukken YH, Zadoks RN. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *Journal of Clinical Microbiology* 2007, 45(12):3964-71.

Munoz MA, Bennett GJ, Ahlström C, Griffiths HM, Schukken YH, Zadoks RN. Cleanliness scores as indicator of *Klebsiella* exposure in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2008, 91(10):3908-16.

Naser S, Thompson FL, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, Thompson CC, Vancanneyt M, Swings J. Phylogeny and Identification of *Enterococci* by *atpA* Gene Sequence Analysis. *Journal Of Clinical Microbiology* 2005: 2224–2230.

Nemeth J, Muckle CA, Gyles CL. In vitro comparison of bovine mastitis and fecal *Escherichia coli* isolates. *Veterinary Microbiology* 1994, 40(3-4):231-238.

Noble CJ. Carriage of group D streptococci in the human bowel. *Journal of Clinical Pathology* 1978, 31(12):1182-1186.

Perlada DE, Smulian AG, Cushion MT. Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of enterococci in Cincinnati, Ohio: a prospective city-wide survey. *Journal of Clinical Microbiology* 1997, 35:2342–2347.

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

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

Petersson-Wolfe CS, Adams S, Wolf SL, Hogan JS. Genomic typing of enterococci isolated from bovine mammary glands and environmental sources. *Journal of Dairy Science* 2008, 91(2):615-9.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA 2002.

- Rench MA, Baker CJ.** Group B streptococcal breast abscess in a mother and mastitis in her infant. *Obstetrics & Gynecology* 1989, 73(2):875-877.
- Ryu H, Henson M, Elk M, Toledo-Hernandez C, Griffith J, Blackwood D, Noble R, Gourmelon M, Glassmeyer S, Santo Domingo JW.** Development of quantitative PCR assays targeting the 16S rRNA genes of *Enterococcus* spp. and their application to the identification of *Enterococcus* species in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 2013, 79,1: 196-204.
- Sabuncuoğlu N, Çolak A, Akbulut Ö, Tüzemen N, Bayram B.** Siyah alaca ve esmer ineklerde CMT skoru ile bazı süt verim özellikleri arasındaki ilişkiler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2003, 34(2):139–143.
- Sambrook J, Fritsch EF, Shuman HA.** Molecular Clonning: a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1989.
- Sayiner HS.** Klinigi sürveyansla saptanan VRE'lerin dağılımı, antibiyotik duyarlılıkları ve kolonize hastalarda risk faktörlerinin değerlendirilmesi. *Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji* 2008, 1-65.
- Schleifer KH, Kilpper-Bälz R.** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nomenclature revision as *Enterococcus faecalis* combination new and *Enterococcus faecium* combination new. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1984, 34:31–34.
- Sela S, Hammer-Muntz O, Krifucks O, Pinto R, Weisblit L, Leitner G.** Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from mastitis outbreaks in dairy herds. *Journal of Dairy Research* 2007, 74(4):425-429.
- Sghir A, Antonopoulos D, Mackie RI.** Design and evaluation of a *Lactobacillus* group-specific ribosomal RNA-targeted hybridization probe and its application to the study of intestinal microecology in pigs. *Systematic and Applied Microbiology* 1998, 21:291-296.
- Singer DA, Jochimsen EM, Gielerak P, Jarvis WR.** Pseudo-outbreak of *Enterococcus durans* infections and colonization associated with introduction of an automated identification system software update. *Journal of Clinical Microbiology* 1996, 34:2685– 2687.
- Sol J, Barkema HW, Berghege IM, Borst GH, Hoornick LJ, Sampimon OC.** Mastitis following drying up associated with teat wipes contaminated with *Pseudomonas aeruginosa*. *Tijdschr Diergeneeskde* 1998, 123(4):112-113.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson G, Collins Dore J MD.** Direct rDNA community analysis reveals a myriad of novel bacterial lineages within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65:4799-4807.

- Suojala L, Pohjanvirta T, Simojoki H, Myllyniemi AL, Pitkälä A, Pelkonen S, Pyörälä S.** Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 2011, 147(3-4):383-388.
- Şeker İ, Rişvanlı A, Kul S, Bayraktar M, Kaygusuzoğlu E.** İsviçre Esmeri ineklerde meme özellikleri ve süt verimi ile CMT skoru arasındaki ilişkiler. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2000, 40(1):29–38.
- Teixeira LM, Merquior VL, Vianni MC, Carvalho MG, Fracalanza SE, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Facklam RR.** Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996, 46(3):664-8.
- Tekeli T.** Mastitis, AB Sürecinde Kaliteli Süt Üretimi ve Somatik Hücre Sayısı. *Güzelış Matbaası, Konya* 2005, 19-35.
- Temiz A.** Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. *Hatiboğlu Yayınevi, Ankara* 2000, Sayfa: 291
- Tritz DM, Iwen PC, Woods GL.** Evaluation of MicroScan for identification of *Enterococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology* 1990, 28:1477–1478.
- Tsakris A, Woodford N, Pournaras S, Kaufmann M, Douboyas J.** Apparent increased prevalence of highlevel aminoglycoside-resistant *Enterococcus durans* resulting from false identification by a semiautomated software system. *Journal of Clinical Microbiology* 1998, 36:1419 1421.
- Turner IJ, Scott DJ, Allen S, Roberts CJ, Soultanas P.** The *Bacillus subtilis* DnaD protein: a putative link between DNA remodeling and initiation of DNA replication. *FEBS Letters* 2004, 19; 577(3):460-464.
- Türkyılmaz S, Yıldız Ö, Oryaşın E, Kaynarca S, Bozdoğan B.** Mastitisli sığır sütlerinden izole edilen bakterilerin moleküler identifikasyonu. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2010, 16 (6): 1025-1032.
- Uzmay C, Kaya İ, Akbaş Y, Kaya A.** Siyah alaca İneklerde meme ve meme başı formu ile laktasyon sırası ve laktasyon döneminin subklinik mastitis üzerine etkisi. *Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi* 2003, 27:695–701.
- Verbist B, Piessens V, Van Nuffel A, De Vuyst L, Heyndrickx M, Herman L, Van Coillie E, De Vliegher S.** Sources other than unused sawdust can introduce *Klebsiella pneumoniae* into dairy herds. *Journal of Dairy Science* 2011, 94(6):2832-2839.

- Watanabe T, Shimohashi H, Kawai Y, Mutai M.** Studies on streptococci: 1. Distribution of faecal streptococci in man. *Microbiology and Immunology* 1981, 25(3):257-269.
- Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, Ellis RP, Magnuson RJ.** *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *Journal of Dairy Science* 2006, 89(9):3408-3412.
- Yeşilmen S, Özyurtlu N, Bademkiran S.** Diyarbakır yöresinde subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2012, 1 (4):24-29.
- Yildirim AO, Lämmle C, Weiss R, Kopp P.** Pheno and genotypic properties of streptococci of serological group B of canine and feline origin. *FEMS Microbiology Letters* 2002, 2;212(2):187-192.
- Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH.** Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2011a, 16:357–372.
- Zadoks RN, Griffiths HM, Munoz MA, Ahlstrom C, Bennett GJ, Thomas E, Schukken YH.** Sources of *Klebsiella* and *Raoultella* species on dairy farms: be careful where you walk. *Journal of Dairy Science* 2011b, 94(2):1045-1051.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı: KAYA, Elif Sezgin
Uyruk: Türkiye Cumhuriyeti
Telefon: 0 530 341 4866
E-mail: elifkaya1304@gmail.com
Diller: Türkçe, İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012

İŞ DENEYİMİ

Ünvan	Yer/Kurum	Yıl
Ürün Uzmanı	İstanbul/NPS Biyosidal	2012-2014