

## Mastitisli Sığırlardan İzole Edilen *Enterococcus faecium* İzolatlarında *gelE*, *esp* ve *efaAfm* Genlerinin Varlığının İncelenmesi<sup>#</sup>

Tuğçe Bahar HERKMEN<sup>1</sup>, Süheyla TÜRKYILMAZ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Aydın/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın/TÜRKİYE

Corresponding author e-mail:sturkyilmaz@adu.edu.tr

#Bu proje Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No: VTF-15003) desteklenmiştir.

### ÖZ

Bu çalışmada, 600 mastitisli sığır sütünden izole edilen *Enterococcus faecium* izolatlarının önemli virulens genlerinin [jelatinaz (*gelE*), enterokokal yüzey proteini (*esp*), adezyonla ilgili protein (*efaAfm*)] polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile incelenmesi amaçlandı. Enterokok izolasyonu selektif besiyerleri kullanılarak gerçekleştirildikten sonra cins ve tür düzeyinde identifikasyonlar PZR ile doğrulandı. Çalışmada 96 *Enterococcus spp.* izole edilirken; bunların %13,5'i *E. faecium* olduğu belirlendi. Bu izolatların virulens genlerinin incelenmesi sonucunda %69,2'sinin *efaAfm*, %30,7'sinin *gelE* ve %30,7'sinin *esp* genlerini taşıdıkları saptandı. İzolatların %23,1'inin herhangi bir virulens geni taşıymıyordu. Beş farklı virulens genotipi saptandı. Sonuç olarak bu çalışma, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecium* izolatlarının yüksek patojenite potansiyeline sahip olduklarını gösterdi. *E. faecium* ile ilişkili diğer virulens faktörlerin tanımlanması, bu virulens faktörlerinin antibiyotiklerle ilişkilerinin ortaya konması konusunda daha geniş kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *E. Faecium*, *Efaafm*, *Esp*, *Gele*, Mastitis

### Investigation of the Presence of *gelE*, *esp* and *efaAfm* Genes in *Enterococcus faecium* Isolates Isolated from Mastitic Bovine

#### ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the important virulence genes [gelatinase (*gelE*), adhesion-associated protein (*efaAfm*) and enterococcal surface protein (*esp*)] of *Enterococcus faecium* isolates isolated from 600 mastitic bovine milk samples with polymerase chain reaction (PCR). *Enterococci isolation* was performed with using selective agars. Identifications based on genus and species were also performed with PCR. Only 13.5% isolates were determined as *E. faecium* in 96 *Enterococcus spp.* It was determined that 69.2%, 30.7% and 30.7% isolate were carrying *efaAfm*, *gelE*, and *esp* genes, respectively. 23.1% of the isolates did not carry any virulence genes. Five different genotypes were detected. Finally, it can be said that *E. faecium* isolates isolated from mastitic bovine milk have high pathogenity. It is thought that further studies should be conducted on the definition of virulence factors related to severity of the infection and expending traits of *E. faecium* and their relationships with some kind of antibiotics should also be revealed.

**Key Words:** *E. Faecium*, *Efaafm*, *Esp*, *Gele*, Mastitis

To cite this article: **Herkmen TB, Türkyılmaz S.** Mastitisli Sığırlardan İzole Edilen *Enterococcus faecium* İzolatlarında *gelE*, *esp* ve *efaAfm* Genlerinin Varlığının İncelenmesi. *Kocatepe Vet J.* 2016; 9(2): 54-60.

## GİRİŞ

Enterokoklar geniş konakçı dağılımına sahip mikroorganizmalar olmakla birlikte; hayvanların sindirim sisteminde bulunan doğal flora bakterileridirler ve özellikle altlık temizliğinin iyi yapılmadığı ve sağım hijyenine dikkat edilmediği durumlarda memeleri kolaylıkla infekte ederek tek başlarına veya genellikle streptokoklar ile birlikte mastitise sebep olabilmektedirler (Smith ve Hogan 2003).

Enterokok türlerinin sahip oldukları antibiyotik dirençliliği, virulens faktörleri ve genetik değişiklikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, izolatlar arasında konakçı orijinine göre farklılıkların mevcut olduğu, antibiyotik direnç mekanizması ve virulens gen özellikleri yönünden farklı mekanizmalarla bu özellikleri kazandıkları belirtilmiştir (Charles ve ark. 2001, Petersson-Wolfe ve ark. 2007a). İnsandan insana da bulaşma yeteneği olduğu bilinen hayvansal kökenli enterokokların özellikle subklinik mastitisli süt ve süt ürünleri ile insanlara bulaşabileceği bildirilmektedir (Tenhagen ve ark. 2006). Meydana gelen infeksiyonlarda, *E. faecium*, antibiyotiklere karşı *Enterococcus faecalis*'ten daha dirençli olmasıyla dikkat çekmektedir (Lund ve ark. 2002).

Enterokokların patojenitelerine, sahip oldukları çeşitli virulens faktörlerinin önemli katkıları olduğu bilinmektedir. Bu virulens faktörlerinden en önemlilerinden birisi olan enterokokal yüzey proteini (*esp*), bakterinin konak immun sisteminden kaçmasını kolaylaştıran hücre duvarı ile ilgili proteindir (Shankar ve ark. 1999). Jelatinaz (*gelE*), hemoglobin ve diğer biyoaktif bileşenleri parçalayan bir proteazdır. *efaAfm* ise *E. faecium* izolatları tarafından sentezlenen hücre duvar adezinidir (Eaton ve Gasson 2001).

Yapılan daha önceki çalışmalar incelendiğinde, araştırmacıların özellikle klinik vakalardan ve çevresel örneklerden elde edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının virulens genlerinin incelenmesi üzerine odaklanmış oldukları görülmüştür (Eaton ve Gasson 2001, Lanthier ve ark. 2010a). Yurdumuzda mastitisli sığır sütlerinden izole edilmiş olan *E. faecalis* izolatlarının virulens genlerinin incelendiği bir çalışma mevcut olmakla birlikte (Yıldız ve Türkyılmaz 2015), *E. faecium* izolatlarının önemli virulens genlerinin incelendiği bir çalışma şu anki bilgilerimize göre bulunmamaktadır. Bu çalışmada, yöresindeki mastitisli sığır süt örneklerinden izole edilen *E. faecium* izolatlarının önemli virulens genlerinden olan jelatinaz, enterokokal yüzey proteini ve *E. faecium* hücre duvar adezin genlerinin varlığının moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Enterokokların insan sağlığı için önemli bir patojen olduğu düşünüldüğünde, incelenen bu virulens genlerinin yöremizdeki izolatlarda varlığı ve yaygınlığının belirlenebilmesi bu izolatların

patojeniteleri hakkında temel bilgi sağlama potansiyeli taşımaktadır.

## MATERYAL ve METOD

### Materyal

Bu çalışmada 3–9 yaşlı, Holştayn ırkı, son bir ay içerisinde antibiyotik tedavisi uygulanmamış, klinik ya da subklinik mastitisli 600 süt örneği kullanıldı. Klinik mastitisli ineklerde fiziksel muayenede meme loblarında anormallik (şişkinlik, sıcaklık, ağrı, kızarıklık ya da sulu, kanlı, pıhtılı süt gibi) gözlemlenirken; subklinik mastitisli olan ineklerin belirlenebilmesi amacı ile Kalifornia Mastitis Testi (CMT) kullanıldı.

### Referans suşlar

Pozitif kontrol olarak *gelE* geni için *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Lanthier ve ark. 2010a) suşu, *esp* ve *efaAfm* genleri için önceden doğrulanmış kültür bankamızdaki izolatlar; negatif kontrol olarak da *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

### Besiyerleri

Süt örneklerinden selektif olarak *Enterococcus* sp.'nin izolasyonu amacıyla Chromocult® *Enterococci* Broth (EB) (Merck) ve BBLTM *Enterococcus* Agar (EA) (BD), organizmaların tuz toleranslarını tespit etmek için %6,5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB) (Oxoid) ve izolatların saklanması için %20 gliserinli Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Merck) kullanıldı.

### Primerler

Çalışmada kullanılan primerler hakkında bilgi Tablo 1.'de verilmiştir.

**Tablo 1:** PZR'da kullanılan primerler

**Table 1:** Primers used in PCR

Primer	Dizi (5'-3')	Amplikon Uzunluğu (bp)	Kaynak
Ent1	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	Ke ve ark. 1999
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC		
FAC11	GAGTAAATCAGTGAACGA	1.091	Vilela ve ark. 2006
FAC21	CGCTGATGGTATCGATTTCAT		
<i>gelE</i> F	ACCCCGTATCATTGGTTT	419	Eaton ve Gasson 2001
<i>gelE</i> R	ACGCATTGCCTTTCCATC		
<i>esp</i> F	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	933	Shankar ve ark. 1999
<i>esp</i> R	CGGTCAACACTTGCATTGGCGA		
<i>efaA</i> FF	AACAGATCCGCATGAATA	735	Eaton ve Gasson 2001
<i>efaA</i> RR	CATTTTCATCATCTGATAGTA		

### Metot

#### Enterokok İzolasyonu

Mastitisli sığırlardan alınan süt örnekleri laboratuvara getirildikten sonra, ilk olarak EB'a öze dolusu inokule edildiler. Buyyonlar aerob koşullarda 37°C'de, besiyerinin parlak sarı rengi mavi-yeşil renge dönüşüncüye kadar, yaklaşık 24-72 saat inkübe edildi. Renk değişimi olan kültürlerden bir öze dolusu alındı selektif EA'a ekimleri yapıldı. Besiyeri 37°C'de aerob koşullarda 24-48 saat süreyle inkübe edildi. Sürenin sonunda üreyen siyah, koyu kahverengi koloniler

enterokok türleri yönünden şüpheli kabul edilerek, incelenmek üzere tekrar EA'ya pasajlandı.

#### *Enterokok spp.* ve *E. faecium* İdentifikasyonu

Enterokokların cins düzeyinde ayrımı için ekilen selektif besiyerinde siyah, koyu kahverengi üreyen enterokok şüpheli kolonilere Gram boyama, %6,5 tuz içeren NB'da üreme ve katalaz testleri yapıldı (Lanthier ve ark. 2010b). Gram pozitif kok şeklinde görülen, %6,5 tuz içeren NB'da üreyebilen ve katalaz negatif olan kolonilerin identifikasyonları için EA pasajları yapıldı ve 37°C'de 24-48 saat inkube edildi. Süre sonunda şüpheli koloniler PZR ile incelenene kadar -20°C'de %20 gliserinli BHIB içerisinde saklandı. İzolatların cins (Ke ve ark. 1999) ve *E. faecium*'un tür bazında identifikasyonları (Vilela ve ark. 2006) daha önceki çalışmalarda bildirildiği şekilde gibi PZR ile yapıldı.

İzolatlardan DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (InstaGene Matrix, BIO-RAD, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. DNA saflık kontrolü ve miktar tayinleri yapıldıktan sonra PZR'da kullanıldı.

#### PZR

Çalışmada standart bir PZR işlemi uygulandı. Sikluslar 95°C'de 5 dak. başlangıç denatürasyonu takiben; 95°C'de 30 sn. denatürasyon, 50°C (*efaAfm*), 53°C (*E. faecium*), 54°C (*gelE*), 55°C (*Enterococcus spp.*), 56°C (*esp*) bağlanma, 72°C 60 sn. uzama toplam 30 siklus, 72 °C'de 15 dak. son uzama olacak şekilde ayarlandı.

#### Sekans Analizi

*E. faecium* izolatları ile *esp* ve *efaAfm* genleri için pozitif kontrol olarak önceden doğrulanmış kültür bankamızdaki izolatlar kullanıldı. *E. faecium* izolatları ile *esp* ve *efaAfm* virülens genleri varlığını belirlemek için, uygun primerler kullanılarak DNA'lar çoğaltıldı. Elde edilen ampliconlar sekans analizleri için ticari bir firmaya (Macrogen, Hollanda) gönderildiler. Firma saflaştırmaı takiben ABI Primse cihazı ile sekans analizini gerçekleştirdi. Ampliconların sekansları gen bankası ile karşılaştırıldı. Bu amaçla National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanıldı.

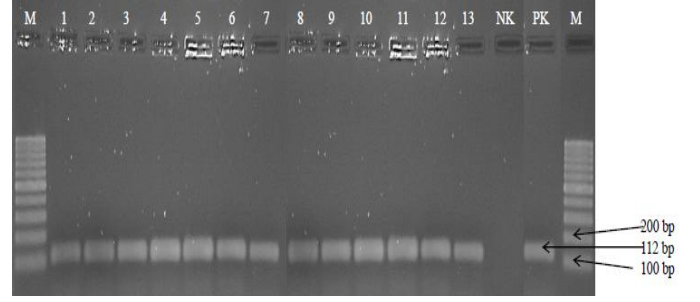
## BULGULAR

#### İzolasyon

Bu çalışmada 600 mastitisli süt örneğinin incelenmesi sonucunda toplamda 96 enterokok şüpheli izolat elde edildi.

#### PZR

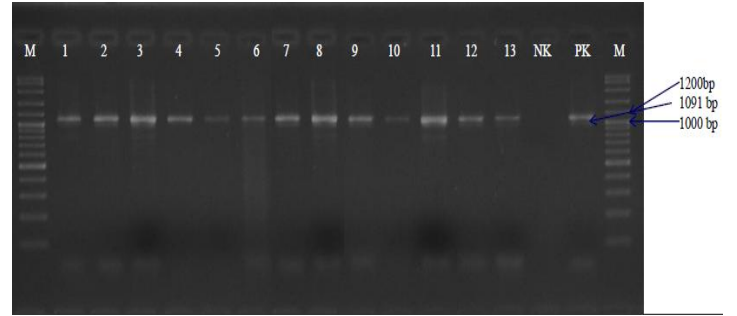
Doksan altı enterokok şüpheli izolat ile yapılan PZR sonrasında 96 izolatın hepsinde 112 bp uzunluğunda amplicon elde edildi ve *Enterococcus spp.* olarak tanımlandı.



**Resim 1:** *Enterococcus spp.* PZR elektroforez görüntüsü 1-13: *Enterococcus spp.* saha izolatları PK: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) NK: Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

**Figure 1:** PCR detection of *Enterococcus spp.* isolated strains 1-13: *Enterococcus spp.* field isolates PK: Positive control (*E. faecalis* ATCC 29212) NK: Negative control (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

*Enterococcus spp.* olarak tanımlanan 96 izolat DNA'sı ile yapılan PZR sonrasında, izolatların 13 (%13,5)'ünde 1091 bp uzunluğunda amplicon elde edildi ve bunlar *E. faecium* olarak identifiye edildi.



**Resim 2:** *E. faecium* PZR elektroforez görüntüsü 1-13: *E. faecium* saha izolatları PK: Pozitif kontrol (Önceden doğrulanmış kültür bankamızdaki izolat) NK: Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

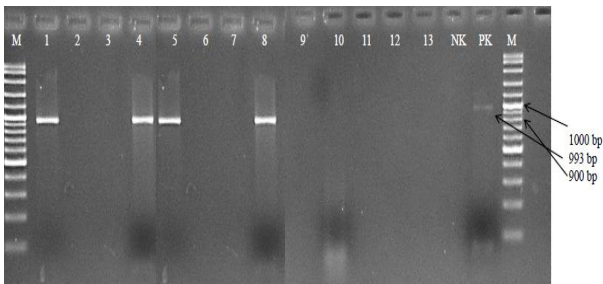
**Figure 2:** PCR detection of *E. faecium* strains 1-13: *E. faecium* field isolates PK: Positive control (Verified isolate in our culture bank) NK: Negative control (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

Virülens Genleri (*gelE*, *esp*, *efaAfm*): On üç *E. faecium* izolatının virülens genleri yönünden yapılan PZR incelemesi sonucunda 419 bp uzunluğunda amplicon elde edilen 4 izolatın (%30,75) *gelE* geni, 993 bp uzunluğunda amplicon elde edilen 4 izolatın (%30,75) *esp* geni, 735 bp uzunluğunda amplicon elde edilen 9 izolatın (%69,2) *efaAfm* geni pozitif olduğu belirlendi.



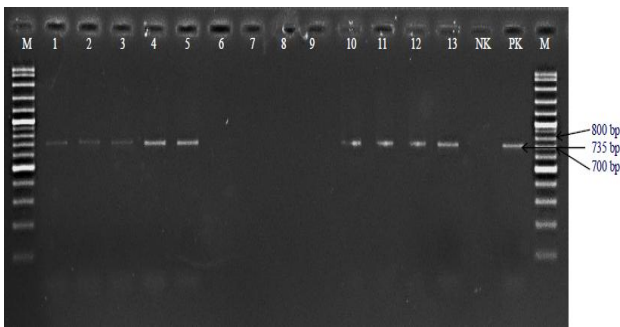
**Resim 3:** Virulens gen PZR (*geE*) 1-4. *geE* geni taşıyan saha izolatları PK: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) NK: Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

**Figure 3:** Virulence gene PCR (*geE*) 1-4. *geE* positive fields isolates PK: Positive control (*E. faecalis* ATCC 29212) NK: Negative control (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)



**Resim 4:** Virulens gen PZR (*esp*) 1-4-5-8: *esp* geni taşıyan saha izolatları PK: Pozitif kontrol (Önceden doğrulanmış kültür bankamızdaki izolat) NK: Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

**Figure 4:** Virulence gene PCR (*esp*) 1-4-5-8: *esp* positive fields isolates PK: Positive control (Verified isolate in our culture bank) NK: Negative control (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)



**Resim 5:** Virulens gen PZR (*efaAfm*). 1-2-3-4-5-10-11-12-13: *efaAfm* geni pozitif saha izolatları PK: Pozitif kontrol (Önceden doğrulanmış kültür bankamızdaki izolat) NK: Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

**Figure 5:** Virulence gene PCR (*efaAfm*) 1-2-3-4-5-10-11-12-13: *efaAfm* positive fields isolates PK: Positive control (Verified isolate in our culture bank) NK: Negative control (*E. coli* ATCC 25922) M: 100 bp DNA ladder (Vivantis)

*E. faecium* izolatlarının taşıdığı virulens genlerinin dağılımı Tablo 2.'de verilmiştir.

**Tablo 2:** *E. faecium* izolatlarının virulens genleri

**Table 2:** Virulence genes of *E. faecium* isolates

	<i>geE</i>	<i>esp</i>	<i>efaAfm</i>	Pozitif virulens gen/genleri (sayısı)
1	+	+	+	<i>geE</i> , <i>esp</i> , <i>efaAfm</i> (3)
2	+	-	+	<i>geE</i> , <i>efaAfm</i> (2)
3	+	-	+	<i>geE</i> , <i>efaAfm</i> (2)
4	+	+	+	<i>geE</i> , <i>esp</i> , <i>efaAfm</i> (3)
5	-	+	+	<i>esp</i> , <i>efaAfm</i> (2)
6	-	-	-	- (0)
7	-	-	-	- (0)
8	-	+	-	<i>esp</i> (1)
9	-	-	-	- (0)
10	-	-	+	<i>efaAfm</i> (1)
11	-	-	+	<i>efaAfm</i> (1)
12	-	-	+	<i>efaAfm</i> (1)
13	-	-	+	<i>efaAfm</i> (1)
<b>Toplam (%)</b>	<b>4</b> 30,7	<b>4</b> 30,7	<b>9</b> 69,2	

Toplam 13 *E. faecium* izolatının virulens genlerinin incelenmesi sonucunda sırasıyla 9 (%69,2) izolatın *efaAfm*, 4 (%30,7) izolatın *geE*, 4 (%30,7) izolatın *esp* genlerini taşıdıkları tespit edildi.

Toplamda altı virulens genotipi mevcuttu. Bir virulens geni taşıyan 5 (%38,4), iki virulens geni taşıyan 3 (%23,0), üç virulens geni taşıyan 2 (%15,3) izolat mevcuttu. Herhangi bir virulens geni taşımayan üç (%23,1) izolat bulunmaktaydı. İzolatların virulens genotiplerinin dağılımı ise Tablo 3'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.:** *E. faecium* izolatlarının taşıdıkları virulens genotipleri

**Table 3:** Genotyping of *E. faecium* isolates

Genotip	Virulens gen sayısı	Virulens gen/genleri	İzolat sayısı	(%)
1	1	<i>esp</i>	1	7,7
2	1	<i>efaAfm</i>	4	30,7
3	2	<i>esp</i> , <i>efaAfm</i>	1	7,7
4	2	<i>geE</i> , <i>efaAfm</i>	2	15,4
5	3	<i>geE</i> , <i>esp</i> , <i>efaAfm</i>	2	15,4
6	0	-	3	23,1
<b>Toplam</b>			<b>13</b>	<b>100,0</b>

## TARTIŞMA

Klinik ve subklinik mastitis vakalarının teşhisi ve kontrolü için hastalığa sebep olan patojenlerin doğru şekilde izolasyonu ve tanımlanması oldukça önemlidir. Laboratuvarlarda, mastitis etkeni bakteriyel patojenlerin izolasyonu ve tanımlanması için, genellikle bu etkenlerin fenotipik özelliklerinin belirlenmesine dayanan biyokimyasal testlerle sonuca

varılmaktadır. Ancak; yalnızca biyokimyasal testlerle etkenin tanımlanması, mastitise sebep olan enterokok gibi bazı bakteri cinsleri açısından zor olduğu için, bu şekilde identifikasyonları güç olan etkenler için moleküler doğrulama gerektirdiği bildirilmektedir (Devriese ve ark. 1999, Bensalah ve ark. 2006).

İnsandan insana da bulaşma yeteneği olduğu bilinen hayvansal kökenli enterokoların özellikle subklinik mastitisli süt ve süt ürünleri ile insanlara bulaştığı bildirilmektedir (Tenhagen ve ark. 2006). Meydana gelen infeksiyonlarda, *E. faecium*, antibiyotiklere karşı *E. faecalis*'ten daha dirençli olmasıyla dikkat çekmekte ve patojenik *E. faecium*'un çok çabuk antibiyotik direnç mekanizması geliştirebilmesinin ve bu özelliğini transfer edebilme kabiliyetinin sağlık açısından önemli bir risk olduğu düşünülmektedir (Lund ve ark. 2002). Mastitisli sığırlardan elde edilen *E. faecium* türlerinde virulens genlerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmaması sebebi ile; bu çalışmada, mastitisli sığır sütlerinden elde edilen *E. faecium* izolatlarının bazı önemli virulens genlerinin varlığının moleküler yöntemler kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için ilk aşamada enterokok izolatları selektif besiyerleri kullanılarak izole edilmiş; bu izolatların cins ve tür düzeyinde doğrulamaları moleküler yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Böylece *E. faecium* türünün doğrulanmasında güvenilir ve pratik bir yöntem kullanılmıştır.

Mastitise neden olan *E. faecium* izolatlarının identifikasyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar çalışmanın yapıldığı coğrafik bölgeye göre farklılık göstermektedir. Yurt dışında yapılan çalışmalarda izolasyon oranlarının %6-71 arasında değiştiği görülmektedir (Devriese ve ark. 1999, Petersson-Wolfe ve ark. 2007b). Yurdumuzda bu konu ile ilgili olarak fazla çalışma bulunmamakla birlikte; *E. faecium* izolasyon oranı Afyon'da %18,6 (Kuyucuoğlu 2011), Ankara'da %81,3 (Cengiz ve ark. 2011) olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada ise %13,5 oranında *E. faecium* izole edilmiştir. Çalışmalar arasındaki izolasyon oranının değişik olması izolasyonların farklı coğrafik bölgelerden yapılmasından, hayvanların yetiştirme şekillerinin farklı olmasından, hatta süt örneklerinin toplandığı hayvanlarda görülen mastitisin formundan da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kromozomal *gelE* geni tarafından kodlanan jelatinaz enzimi kollajen, jelatin, hemoglobinin gibi bir çok küçük peptidleri hidrolize eden ve hayvan modellerinde endoftalmit ve endokardit olgularını şiddetlendiren hücre dışı bir çinko-endopeptidazdır (Eaton ve Gasson 2001). Kommensal *E. faecium* izolatlarıyla kıyaslama yapıldığında klinik *E. faecium* izolatlarında *gelE* pozitifliğinin daha sık saptandığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Waar ve ark. 2002, Creti ve ark. 2004). Ayrıca, sebze kaynaklı *E. faecium* izolatlarının %45,5'inde, su kaynaklı izolatların %33,3'ünde *gelE* geninin bulunduğu, klinik

kaynaklı izolatların ise hiçbirisinde *gelE* geni saptanmadığını gösteren ilginç bir çalışma da bulunmaktadır (Abriouel ve ark. 2008). Ekstrasellüler jelatinazı kodlayan *gelE* geni taşıyan izolatlar sulardan (Lanthier ve ark. 2010a), gıdalardan ve klinik vakalardan (Eaton ve Gasson 2001, Semedo ve ark. 2003, Creti ve ark. 2004) izole edilen *E. faecium* izolatlarında sıklıkla bulunduğu bildirilmekte; ancak, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokokların jelatinaz oluşumları hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Semedo ve ark. 2003). Bir başka çalışmada (Vankerckhoven ve ark. 20004) ise, *gelE* geninin 12 *E. faecalis* endokardit şüşunun tamamında (%100), 19 dışkı şüşunun ise 10'unda (%52.6) saptanmıştır. Bu durum, virülans ve hastalıkta jelatinazın önemini göstermekte ve biyofilm oluşumunda etkin olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada ise yöremizdeki mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 13 *E. faecium* izolatlarının %30,7'sinde *gelE* geni varlığı tespit edilmiştir.

Kromozomal *esp* geni tarafından kodlanan ve hücre duvarı ile ilişkili bir protein olan *esp*, hücre yüzeyinde yer alır. Bakteriyi, konağın bağışıklık sisteminden koruduğu düşünülen *esp*, enterokokların üriner sistemde persistansı, kolonizasyonu ve artmış virulensi ile ilişkili bulunmuştur (Shankar ve ark. 2002). Yapılan çalışmalar incelendiğinde genellikle medikal ya da gıda kaynaklı izolatlarda bu gen varlığının incelendiği görülmektedir. Örneğin; *E. faecium* klinik izolatlarında *esp* geni pozitifliğini Eaton ve Gasson (2001) %78, Baylan ve ark. (2011) %6,5 olarak tespit etmişlerdir. Genellikle *esp*'yi kodlayan genlerin gıda kaynaklı enterokok izolatlarına oranla klinik enterokok izolatlarında daha yüksek sıklıkla bulunduğu belirlenmiştir (Eaton ve Gasson 2001). Aynı zamanda gıda kaynaklı *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarında da *esp* geni bulunma sıklığı farklılık göstermektedir. *E. faecium* izolatlarında *esp* genine nadiren rastlanırken, *E. faecalis* izolatlarında bu oran daha yüksektir (Eaton ve Gasson 2001). Bu çalışmada ise yöremizdeki mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 13 *E. faecium* izolatının %30,7'sinde *esp* geni varlığı tespit edilmiştir.

*efaAfm*'nin, enterokokların yüzeylere yapışmasını yani adezyonunu sağladığı bildirilmekle birlikte; infeksiyon yapma gücü halen kesin olarak bilinmemektedir (Belgacem ve ark. 2010). *efaAfm* pozitif gen pozitifliğini Tuncer ve Inoğlu (2013), peynirde yaptıkları çalışmada %75, Eaton ve Gasson (2001) ise gıdalar da %82 olarak saptarken, klinik izolatlarda %100 olarak tespit etmişlerdir. *E. faecium*'un hücre duvarı adezinlerinden olan ve bakterinin konak hücrelerine yapışmasından sorumlu olan virulens geni *efaAfm*, bu çalışmamızda mastitisli sığır süt izolatlarının % 69,2'sinde tespit edilerek en çok belirlenen virulens geni olmuştur.

Enterokoklardaki yüzey proteini ve adezyonla ilgili proteinlerin virülans faktörlerinin, konjugasyon sırasında verici ve alıcı bakteriler arasında virülans ve



antibiyotik direnç genlerini içeren konjugatif plazmidlerin transferini kolaylaştırdıkları düşünülmekte, bu genlerin pozitifliği ile plazmidlerle kazanılan antimikrobiyal direnç arasındaki bir ilişkidir kuşulanılmaktadır (Shankar ve ark. 1999, Vankerkhoven ve ark. 2004). İzolatlarımız arasında bu iki virulens genine de yüksek oranda rastlanması, mastitisli sığır sütlerinde elde edilen bu izolatların patojenite potansiyellerinin yüksek olabilecekleri hakkında fikir vermektedir.

Yurdumuzda veteriner sahada mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecium* izolatlarının virulens genlerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Tüm hijyenik uygulamalara rağmen, mastitis probleminin sürmesi, saha izolatlarının virulens faktörlerinin incelenmesinin önemini artırmakta ve aşıların da dahil olduğu kontrol programlarının geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmadan sağlanan bilgilerin kullanılması özellikle enterokokların neden olduğu mastitis koruma programlarının düzenlenmesine katkı sağlayacaktır.

#### KAYNAKLAR

**Abriouel H, Omar NB, Molinos AC.** Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int J Food Microbiol* 2008; 123: 38-49.

**Baylan O, Nazik H, Bektore B, Citil BE, Turan D, Ongen B, Özyurt M, Açıkel CH, Haznedaroğlu T.** The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary enterococcus isolates. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45: 430-445.

**Belgacem ZB, Abriouel H, Omar NB, Lucas R, Martinez-Canamero M, Galvez A, Manai M.** Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control* 2010; 21: 462-470.

**Bensalah F, Flores MJ, Mouats A.** A rapid PCR based method to distinguish between *Enterococcus* species by using degenerate and species-specific *sodA* gene primers. *African J Biotechnol* 2006; 5: 607-702.

**Cengiz S, Tekin O, Akan M.** Mastitislerden izole edilen enterokokların moleküler tiplendirilmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2011; 58: 17-20.

**Charles MAPF, Albrecth BMS, Nuham KY, Marc V, Jean S, Wilhelm HH.** Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among *Enterococcus* isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4385-4389.

**Creti R, Imperi M, Bertuccini L.** Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol* 2004; 53: 13-20.

**Devriese LA, Hommez J, Laevens H, Pot B, Vandamme P, Haesebrouck F.** Identification of aesculinhydrolyzing *Streptococci*, *Lactococci*, *Aerococci* and *Enterococci* from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet Microbiol* 1999; 70: 87-94.

**Eaton TJ, Gasson MJ.** Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microb* 2001; 67: 1628-1635.

**Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron M.** Development of a PCR assay for rapid detection of *Enterococci*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3497-3503.

**Kuyucuoğlu Y.** Antibiotic resistances of enterococci isolated from bovine subclinical mastitis. *Eurasian J Vet Sci* 2011; 27: 231- 234.

**Lanthier M, Scott A, Lapen D, Zhang Y, Topp E.** Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* sp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals and birds, and wildlife. *Canadian J Microbiol* 2010b; 56: 715-29.

**Lanthier M, Scott A, Zhang Y, Cloutier M, Durie D, Henderson VC, Wilkes G, Lapen DR, Topp E.** Distribution of selected virulence genes and antibiotic resistance in *Enterococcus* species isolated from the South Nation River drainage basin, Ontario, Canada. *J Appl Microbiol* 2010a; 110: 407-421.

**Lund B, Adamsson I, Edlund C.** Gastrointestinal Transit Survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. *Intl J Food Microbiol* 2002; 77: 109-115.

**Nam HM, Lim SK, Moon JS, Kang HM, Kim JM, Jang KC, Kang MI, Joo YS, Jung SC.** Antimicrobial resistance of *Enterococci* isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. *Zoonoses Public Health* 2009; 57: e59-64.

**Petersson-Wolfe CS, Adams S, Wolf SL, Hogan JS.** Genomic typing of *Enterococci* isolated from bovine mammary glands and environmental sources. *J Dairy Sci* 2007b; 91: 615-619.

**Petersson-Wolfe CS, Wolf SL, Hogan JS.** In vitro growth of *Enterococci* of bovine origin in bovine mammary secretions from various stages of lactation. *J Dairy Sci* 2007a; 90: 4246-4231.

- Semedo T, Santos MA, Lopes MF, Figueiredo Marques JJ, Barreto Crespo MT, Tenreiro R.** Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: a common trait in the genus? *Syst Appl Microbiol* 2003; 26: 13–22.
- Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS.** Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; 67: 193–200.
- Smith KL, Hogan JS.** Environmental mastitis caused by species of *Streptococcus* and *Enterococcus*: risk factors and control. Ohio Agricultural Research and Development Center The Ohio State University Wooster, USA, 2003.
- Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W.** Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 2006; 89: 2542–2551.
- Tuncer Y, Inoğlu ZN.** Safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish tulum cheese. *J Safety* 2013; 33: 369-377.
- Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C.** 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* 2004; 42: 4473-4479.
- Vilela, MA, Souza, SL, Palazzo ICV, Ferreira JC, Morais Jr MA, Darini ALC, Morais MMC.** Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. *Mem. Inst. The Mem I Oswaldo Cruz* 2006; 101: 716-719.
- Waar K, Muscholl-Silberhorn AB, Willems RJ, Slooff MJ, Harmsen HJ, Degener JE.** Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. *J Infect Dis* 2002; 185: 1121-1127.
- Yıldız Ö, Turkyilmaz S.** Investigation of virulence genes of *Enterococcus faecalis* strains isolated from mastitic bovine milk. *Isr J Vet Med* 2015; 70: 16-22.