



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2015 -002

**MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN
ENTEROCOCCUS FAECALIS SUŞLARININ PLAZMİT
PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ**

Mehmet ÖZTÜRK

DANIŞMAN
Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

AYDIN-2015

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2015 -002**

**MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN
ENTEROCOCCUS FAECALIS SUŞLARININ PLAZMİT
PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ**

Mehmet ÖZTÜRK

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ**

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE
AYDIN

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğrencisi Mehmet Öztürk tarafından hazırlanan “Mastitisli Sığır Sütlerinden İzole Edilen *Enterococcus faecalis* Suşlarının Plazmit Profillerinin İncelenmesi” başlıklı tez, 12.01.2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

1- Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

2- Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

ADÜ, Veteriner Fakültesi

3- Yrd. Doç. Dr. Nural EROL

ADÜ, Veteriner Fakültesi

İmzası:



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Enterokoklar, insan ve hayvanları infekte etme yeteneğinde olan mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar, düşük virülensli olarak bilinmelerine rağmen; pek çok antibiyotiğe karşı intrensek olarak dirençli olmaları, diğer antibiyotiklere de kolaylıkla direnç geliştirebilmeleri ve çevreye adaptasyonlarının iyi olması gibi özellikleri, onları diğer patojenlerden daha avantajlı hale getirmektedir. Normalde süt ineklerinin sindirim sistemi florasında bulunan ve mastitislerine sebep olan fırsatçı patojenlerdir. Yapılan çalışmalarda mastitislerden yörelere göre ve kullanılan izolasyon yöntemlerine göre farklı oranlarda (% 6-42) enterokok izolasyonu gerçekleştirilmektedir.

Çevresel bir epidemiyolojiye sahip olan enterokoklar, insanlarda nozokomial infeksiyonlarda önemli bir problem haline gelmelerine rağmen; plazmit içerikleri hakkındaki bilgiler yetersizdir. Enterokok plazmit profillerinin incelenmesi enterokokal infeksiyonların yayılımının açıklanmasına katkıda bulunmaktadır. Enterokoklar birçok direnç ve virulens faktör geni içeren plazmite sahiptirler. Bu direncin aktarılması ve direnç yollarının izlenmesi açısından plazmit içeriklerinin incelenmesi önemlidir.

Suşlardaki plazmit sayısının artması, suşun patojenitesinin arttırdığını göstermektedir. Aynı zamanda plazmit profil analizi klonal yayılımı belirleyebilmek için iyi bir moleküler tiplendirme yöntemi olarak kullanılmaktadır. Şu anki bilgilerimize göre, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* suşlarının plazmit profillerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ile Türkiye’de mastitisli sığırlar sütlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının plazmit profilleri ilk kez incelenmiştir. Yöredeki saha izolatları arasındaki plazmit yayılımı belirlenerek, izole edilen enterokok suşlarının patojenitesi ve klonal yayılımı hakkında bilgi sahibi olunmuştur.

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (VTF 14032 no’lu proje) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL VE ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1. 1. Enterekokların Tarihçe ve Taksonomisi.....	2
1. 2. Mikrobiyolojik Özellikler.....	3
1. 2. 1. Hücre Duvarı Yapısı ve Antijenik Özellikleri.....	4
1. 2. 2. Görünüm ve Boyama Özellikleri.....	4
1. 2. 3. Genom Özellikleri.....	5
1. 3. Plazmitler.....	6
1. 3. 1. Plazmitlerin Sınıflandırılması.....	6
1. 3. 1. 1. İnkompatabilite Durumlarına Göre Sınıflama.....	6
1. 3. 1. 2. Taşıdıkları Spesifik Sekanslara Göre Sınıflama.....	7
1. 3. 1. 2. 1. F Faktörü (Fertilite Plazmitleri).....	7
1. 3. 1. 2. 2. Direnç Plazmitleri.....	8
1. 3. 1. 2. 3. Virulans Plazmitler.....	10
1. 3. 1. 2. 4. Metabolik Plazmitler.....	10
1. 3. 1. 2. 5. Kolisin Plazmitler.....	11
1. 3. 1. 2. 6. İntegratif Plazmitler.....	11
1. 3. 2. Enterekoklarda Bulunan Plazmitler.....	11
1. 3. 2. 1. RepA-N Plazmitleri.....	12
1. 3. 2. 2. Inc18 Plazmitleri.....	13
1. 3. 2. 3. RCR Plazmitleri.....	14
1. 3. 2. 4. Rep-3 Plazmitleri.....	15
1. 3. 3 Genetik Bilgi Transferi.....	16
1. 4. Enterokoklarda Antibiyotik Direnci.....	16
1. 4. 1. İnterensek Direnç.....	17

1. 4. 1. 1. B-Laktam Direnci	17
1. 4. 1. 2. Aminoglikozid Direnci	17
1. 4. 1. 3. Diğer Antibiyotikler	18
1. 4. 2. Eksterensek Direnci	18
1. 4. 2. 1. β -laktam Direnci	18
1. 4. 2. 2. Aminoglikozid Direnci	18
4. 2. 3. Kloramfenikol Direnci	19
4. 2. 4. Tetrasiklin Direnci	19
4. 2. 5. Kinolon Direnci	19
4. 2. 6. MLSB (Makrolid, Linkozamid ve B tipi Streptogramin) Direnci	19
4. 2. 7. Oksazolidinon Direnci	20
4. 2. 8. Glikopeptit Direnci	20
5. Epidemiyoloji	20
1. 6. Enterokokların Önemi	21
2. GEREÇ ve YÖNTEM	24
2.1. Gereçler	24
2.1.1. İzolasyon Örnekleri	24
2.1.2. Referans Suşlar	24
2. 1. 3. Besiyerleri, Ayıraç ve Solusyonlar	24
2. 1. 3. 1. Besiyerleri	24
2. 1. 3. 1. 1. Chromocult® Enterococci Broth	25
2. 1. 3. 1. 2. Chromocult® Enterococci Agar	25
2. 1. 3. 1. 3. Brain Heart Infusion Agar	26
2. 1. 3. 1. 4. Brain Heart Infusion Broth	26
2. 1. 3. 1. 5. Brain Heart Infusion Broth	26
2. 1. 3. 1. 6. %6.5 NaCl içeren Nutrient Broth	26
2. 1. 3. 2. Ayıraç ve Solusyonlar	27
2. 1. 3. 2. 1. %3'lük Hidrojen Peroksit	27
2. 1. 3. 2. 2. TEG (Tris-HCl, EDTA, Glukoz) Solüsyonu	27
2. 1. 3. 2. 3. %20'lik SDS Çözeltisi	27
2. 1. 3. 2. 4. 0,5 N NaOH Çözeltisi	27
2. 1. 3. 2. 5. Alkali Liziz Solusyonu	27
2. 1. 3. 2. 6. %30'luk Potasyum Asetat	28

2. 1. 3. 2. 7. Fenol Kloroform	28
2. 1. 3. 2. 8. İsoopropanol	28
2. 1. 3. 2. 9. 125 mM TrisHCl + 300 mM Sodyum Asetat Solusyonu	28
2. 1.3. 2. 10. 50 mM' lık Tris- HCl Solusyonu	28
2. 1. 3. 2. 11. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH: 8.0) Buffer	28
2. 1. 3. 2. 12. Gel Loading Buffer	29
2. 1. 3. 2. 13. Agarose Jel Hazırlanışı	29
2. 1.3. 2. 14. Marker	29
2. 1. 3. 2. 15. Etidium Bromür	30
2.1.4. PZR	30
2.1.4.1. Kullanılan Cihazlar	30
2.1.4.2. MgCl ₂ , Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer, dNTP Set	30
2.1.4.3. Primer	30
2.2. Yöntem	31
2.2.1.Örneklerin alınması	31
2. 2.1.1. Süt Örnekleri	31
2.2.2. Enterokokların İzolasyonu	31
2.2.3. Enterokokların İdentifikasyonu	31
2.2.3.1 Katalaz Testi	32
2.2.3.2 %6,5 NaCl'de Büyüme	32
2.2.3.3. E. faecalis suşlarının tür düzeyinde identifikasyonu	32
2.2.3.3.1. DNA İzolasyonu	32
2.2.3.3.2. DNA'nın Elektroforezi	33
2.2.3.3.3. DNA' nın Safılık Kontrolü ve Miktar Tayinleri	33
2.2.3 PZR	33
2.2.3.1. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi	34
2.2.3.2. Yürütme	34
2.2.3.3. Görüntüleme ve Değerlendirme	35
2.2.4. Plazmit DNA'sının İzolasyonu	35
2.2.4.1. Plazmitlerin Elektroforez Tankına Yüklenmesi	36
2.2.4.2. Yürütme	36
2.2.4.3. Görüntüleme ve Değerlendirme	36
2. 2. 4.4. UPGMA Analizi	36

3. BULGULAR	37
3.1. İzolasyon	37
3.2. PZR	37
3.3. Plazmit Profillerinin İncelenmesi	38
4. TARTIŞMA	44
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	48
ÖZET	50
SUMMARY	51
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	63
TEŞEKKÜR	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A:	Amper
ATCC:	Amerikan Kültür Bankası
BHIA:	Breain Heart İnfison Agar
BHIB:	Breain Heart İnfison Broth
bp:	Baz çifti
Cam:	Kloramfenikol
CMT:	Kalifornia Mastitis Testi
dATP:	deoksiadenin tri fosfatm
dCTP:	deoksisitozin tri fosfat
dGTP:	deoksiguanin tri fosfat
dk:	Dakika
dNTP:	deoksinükleotid tri fosfat
dTTP:	deoksitimin tri fosfat
EB:	Enterokok Broth
F plazmiti:	Fertilite plazmiti
g:	relatif santrifüj kuvveti
G+C:	Guannin ve Sitozin oranı
Kb:	Kilobaz
LTA:	Lipoteikoik asitler
M:	Moleküler marker
MA:	Moleküler ağırlık
MgCl₂:	Magnezyum klorür
Mg/ml:	Mililitredeki miligram miktarı
ml:	mililitre
mM:	Milimolar
NaOH:	Sodyum Hidroksit
NB:	Nutrient Broth
OD:	Optik dansite
ORF:	Açık okuma çerçevesi
Pmol:	Pikomol

PS:	Plazmit sayısı
PZR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
R plazmiti:	Direnç plazmiti
RO:	Replikasyon orjini
rpm:	Dakika başı devir sayısı
SDS:	Sodyum Dodesil Sulfat
Str:	Streptomisin
Sul:	Sulfanamid
TBE:	Tris- Borik Asit- EDTA Solusyonu
TEG:	Trih HCL- EDTA- Glukoz Solusyonu
Tet:	Tetrasklin
TIGR:	Genomik Araştırmalar Enstitüsü
U:	Ünite
UV:	Ultra viyole ışık
UPGMA:	Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu
V:	Volt
VRE:	Vankimisin Dirençli Enterokok
V/V:	Volüm /volüme
λ:	Lamda
μl:	mikrolitre
μg/ ml:	mililitredeki μ g miktarı

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1. 1. Enterokokların sınıflandırılması.....	3
Çizelge 2. 1. Kullanılan primer çifti, dizisi, amplikon büyüklüğü, kaynağı.....	30
Çizelge 2. 2. Mastermiksin hazırlanma oranları.....	34
Çizelge 2. 3. <i>E. faecalis</i> PZR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı.....	34
Çizelge 3. 1. 1- 18 arası izolatların içerdiği plazmitleri boyutları.....	40
Çizelge 3. 2. 19- 36 arası izolatların içerdiği plazmitlerin boyutları.....	41
Çizelge 3. 3. 37- 54 arası izolatların içerdiği plazmitlerin boyutları.....	42
Çizelge 3. 4. 55- 56 arası izolatların içerdiği plazmitlerin boyutları.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. 1 Bir fertilite plazmitinin genetik haritası.....	8
Şekil 1. 2. Direnç plazmiti R100' ün genetik haritası.....	9
Şekil 3. 1: Ekim yapılmamış EB.....	37
Şekil 3. 2. <i>E. faecalis</i> PZR elektroforez görüntüsü.....	38
Şekil 3. 3. <i>E. faecalis</i> 1-18 nolu örnekler plazmit profili görüntüsü.....	39
Şekil 3. 4. <i>E. faecalis</i> 19-36 nolu örnekler plazmit profili görüntüsü.....	40
Şekil 3. 5. <i>E. faecalis</i> 37-54 nolu örnekler plazmit profili görüntüsü.....	42
Şekil 3. 6. <i>E. faecalis</i> 55-56 nolu örnekler plazmit profili görüntüsü.....	43

1. GİRİŞ

Meme dokusunun yangısı olarak tanımlanan mastitis, süt salgısında fiziksel ve kimyasal değişikliklerin ve meme dokusunda patolojik değişikliklerin şekillenmesiyle karakterizedir (Bradley 2002, Pyörala 2003). Mastitis hastalığının nedeni olarak bakteriler, mikoplazmalar, mayalar ve algler gibi 137 farklı organizma tespit edilmiştir (Watts 1988). Hastalığın etiolojisinde bakteriyel etkenler ilk sırayı oluşturur. Mastitise neden olan bakteriyel patojenler kaynağına göre çevresel ve bulaşıcı olarak iki grupta incelenir. Bulaşıcı patojenleri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ve *Streptococcus dysgalactiae*; çevresel etkenleri *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* ve enterokoklar oluşturur. Enterokoklar, *Streptococcaceae* ailesi içerisinde yer alan Gram pozitif kok şeklinde görülen, katalaz negatif özellik gösteren, yüksek tuz ve pH düzeylerinde üreyebilen etkenlerdir (Hardie ve Whitley 1997, Franzetti ve ark 2004).

Enterokoklar geniş bir konakçı dağılımına sahiptirler. Hayvanların sindirim sisteminde yerleşik doğal flora bakterisi olan bu etkenler, özellikle sağım hijyenine dikkat edilmediği ve altlık temizliğinin düzenli yapılmadığı durumlarda memeleri kolaylıkla infekte ederek mastitise neden olmaktadır. Meme başından giren enterokoklar meme kanalı boyunca yerleşip kolonize olurlar ve meme bezinde enfeksiyona ilişkin klinik bulgular meydana getirirler. Enterokok etkenleri tek başlarına mastitis oluşturabilmelerine rağmen mastitis olgularından genellikle streptokokkal etkenlerle birlikte izole edilmektedirler (Smith ve Hogan 2003). Yapılan çalışmalarda mastitislerden % 6-42 oranları arasında enterokok izolasyonunun gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Çevresel bir epidemiyolojiye sahip olan enterokoklar, insanlarda nozokomial infeksiyonlarda önemli bir problem haline gelmelerine rağmen epidemiyolojileri konusunda bilgiler yetersizdir (Petersson-Wolfe ve ark 2007).

Enterokok patojeni olan bir mastitis, çevreden hayvanlara bulaşabildiği gibi hayvandan hayvanada bulaşabilir (Rossitto ve ark 2002). Ayrıca enterokoklar antibiyotik direnç genleri taşımaları açısından da önemlidirler. Hayvanlarda ve insanlarda diğer

patojen ve komensal bakterilere de antibiyotik direnç genlerini aktarabilir ve antibiyotik direncinin artmasına sebep olabilirler (Murray 1990; Klare ve ark 2001).

Normal gastrointestinal sistem bakteriyel florasının parçası olan enterokoklar insanlarda nosokomial bakteriyemi, peritonitis, endokarditis, üriner sistem ve yumuşak doku infeksiyonlarına neden olurlarken; hayvanlarda sporadik infeksiyonlar oluşturular. Bunlardan en önemlileri kahverengi yumurtacılarda görülen *Enterococcus faecalis*'in neden olduğu amiloid artropati ve sığırlarda subklinik mastitis (Diker ve ark 2011), kedi ve köpeklerde otitis eksterna, üriner sistem infeksiyonlarıdır. *E. durans*, *E. hirae* ve *E. villorum* türleri köpek, kedi, tay ve buzağılarda ishale yol açtığı, *E. hirae*'nin bir kedide enteropatiye, karaciğer safra kanalı ve pankreatik kanalında supuratif yangıya neden olduğu bildirilmiştir (Moellering 2000).

1.1. Enterokokların Tarihçe ve Taksonomisi

Enterokok terimi ilk defa 1899'da Fransa'da Thiercelin tarafından kullanılmıştır. Aynı yıl MacCallum ve Hastings daha sonradan hemolitik bir enterokok olduğu anlaşılan *Micrococcus zymogenes* adını verdikleri endokardite yol açan bir bakteri tanımlamışlardır. 1906'da Andrewes ve Horder, endokarditli bir hastadan izole ettikleri bakteriyi *Streptococcus faecalis* olarak tanımlamıştır (Murray 1990). Streptokoklar 1919 yılında Brown tarafından kanlı agarda yaptıkları hemoliz tipine göre alfa, beta, gama hemolitik olarak ilk defa sistematik olarak sınıflandırılmıştır (Brown 1919). R. Lancefield, 1933 yılında streptokokları hücre duvarında bulunan polisakkarit C maddesinden yararlanarak presipitasyon testi ile A'dan V'ye kadar gruplandırmıştır (Lancefield 1933). Sherman ise streptokokları; hemoliz, üreme derecesi ve özellikleri, biyokimyasal özellikleri ve antijen yapılarına göre, piyogen, laktik, viridans streptokoklar ve enterokoklar olarak 4 gruba ayırmıştır (Sherman 1937).

19. yüzyılın başlarında *Streptococcus faecium* ve *S. faecalis* aynı tür olarak kabul edilirdi (Sherman 1937) fakat 1940 ve 1950' lerde yapılan çalışmalar iki organizmanın biyokimyasal özelliklerinin farklı olduğunu göstermiştir. 1960' ların ortasında *Streptococcus faecium* ve *S. faecalis* iki farklı tür olarak kabul edilmiştir ve günümüze kadar pek çok sayıda enterokok izole edilmiştir. Şu anda genbank taxonomi tarayıcısında enterokoklara ait 52 tür görülmektedir. *Enterococcus alcedinis*, *Enterococcus*

aquimarinus, *Enterococcus asini*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus azikeevi*, *Enterococcus caccae*, *Enterococcus camelliae*, *Enterococcus canintestini*, *Enterococcus canis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus columbae*, *Enterococcus devriesei*, *Enterococcus dispar*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus eurekaensis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus hawaiiensis*, *Enterococcus hermannienseis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus inusitatus*, *Enterococcus italicus*, *Enterococcus lactis*, *Enterococcus lemanii*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus moravienseis*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus olivae*, *Enterococcus pallens*, *Enterococcus pernyi*, *Enterococcus phoeniculicola*, *Enterococcus plantarum*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus quebecenseis*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus ratti*, *Enterococcus rattus*, *Enterococcus rivorum*, *Enterococcus rotai*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Enterococcus silesiacus*, *Enterococcus sulfureus*, *Enterococcus termitis*, *Enterococcus thailandicus*, *Enterococcus ureasiticus*, *Enterococcus ureilyticus*, *Enterococcus viikkienseis*, *Enterococcus villorum*. Enterokoklar Firmiculates phylumunda, Enterobacteriaceae familyasında yer alır. Enterokokların sınıflandırılması aşağıdaki çizelgede (Çizelge 1.1) verilmiştir.

Çizelge 1. 1. Enterokokların sınıflandırılması

Kingdom	Bacteria
Division	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Lactobacillales
Family	Enterococcaceae
Genus	<i>Enterococcus</i>

1.2. Mikrobiyolojik Özellikler.

Enterococcus cinsi üyeleri katalaz negatif, Gram Pozitif tekli, ikili ya da kısa zincirli koklardan oluşur. Fakültatif anaerob bakterilerdir. Optimal üreme sıcaklığı 35°C'dir. Birçok türü +10 ile +45°C arasında üreyebilir. Glukoz fermentasyonu sonucu laktik asit oluştururlar; fakat gaz yapmazlar. *E. faecalis* türlerinin yaklaşık üçte biri at, tavşan veya insan kanlı agarda beta hemoliz yapabilirken koyun kanlı agarda hemoliz yapmazlar. Diğer türler ise ya alfa hemolitiktir veya hemoliz yapmazlar (Teixeira ve ark 2007). Bütün türler pH 9,6 ve %6,5 NaCl konsantrasyonunda üreyebilirler. Safıralı

besiyerinde (%40'lık) eskülini hidrolize ederler. Birçok türü 60°C'de 30 dakika canlılıklarını sürdürebilirler (Moellering 2005). *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* gibi bazı türler hareketlidir. *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. pallens*, *E. canintestini*, *E. devriesei*, *E. moraviensis* ve *E. saccharolyticus* dışında kalan tüm kökenler PYR pozitifdir. Tüm türler LAP pozitifdir. *E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. pallens*, *E. mundtii* ve *E. sulfureus* pigmentlidir. Enterokok suşlarının çoğu hücre duvarında gliserol teikoik asit içerir. Enterokok DNA'sının G+C içeriği %37-45 arasında değişir. Genom büyüklüğü ise 2000-3500 kb arasında değişmektedir. Enterokokların yaklaşık %80'i Lancefield grup D antiserumu ile aglütinasyon verir. Sitokrom enzimleri olmadığı için katalaz negatiftirler; fakat kanlı agarda üreyen bazı *E. faecalis* suşlarında zayıf katalaz pozitiflik görülebilir (Teixeira ve ark 2007).

1.2. 1. Hücre duvarı yapısı ve antijenik özellikleri

Enterokokların hücre duvarının üç bileşeni peptidoglikan, teikoik asit ve polisakkaritlerdir. Hücre duvarının %40'ı peptidoglikandan oluşur, geri kalan kısım ise ramnoz içeren polisakkarit ve ribitol içeren teikoik asittir. Peptidoglikan polimerleri glikan zincirler ve bunlara bağlanmış kısa peptitler L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala'dan oluşur. Komşu peptitler, pentapeptid yan zincirler ile çapraz bağlanırlar. Peptidoglikan dışı yardımcı polimerlerin yapısal bileşimi kesin olarak bilinmemektedir (Facklam ve Teixeira 1998).

Lancefield'in serolojik tiplendirmesinde; streptokokların çoğunun, baskın olan hücre duvarı karbonhidratlarına göre sınıflanmasına karşın, enterokokların yer aldığı "D" grubunda serolojik tiplendirme lipoteikoik asitlerin (LTA) antijenik özelliklerine göre yapılır. Gruba özelliğini veren "D" antijeni, gliserol ünitelerine bağlanmış yüksek oranda glukoz içeren poligliserolfosfatın teikoik asit polimeridir. LTA in lipit kısmı 1-kojibiosyl digliseriddir. Bu glikolipit membranın bir parçası olarak bulunur. Streptokokal grup-D antijenleri enterokok türleri ile *Streptococcus bovis* kompleks, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Vagococcus*'larda bulunmaktadır (Fisher ve Phillips 2009).

1.2. 2 Görünüm ve Boyama Özellikleri

Enterokoklar 0,5-1 µm çapında, tek tek, diplokoklar veya kısa zincirler şeklinde görülebilen, yuvarlak, oval veya kokobasil şeklindeki bakterilerdir. Katı besiyerinde

Üretilen bakteriler kok veya kokobasiller Şeklinde görülürken, sıvı besiyerlerinde üretilen enterokokların daha uzun zincirler oluŐturdukları gözlenir. Anilin boyalarla kolay boyanırlar ve Gram pozitifler. *E.gallinorum* ve *E.casseliflavus* hariŐ, çoğu hareketsizdir (Facklam ve Teixeira 1998). Morfolojik olarak streptokoklardan ayrılmaları zordur.

1.2.3. Genom zellikleri

ABD’de The Institute for Genomic Research (TIGR) ve Joint Genomic Institute of the Dept of Energy laboratuvarlarında hastane enfeksiyonlarından en sık izole edilen *E.faecalis*, *E.faecalis* V583, ve *E.faecium*, *E.faecium* ATCC BAA-472, suşlarının tam genom dizi analizi yapılmıştır. Enterokokların G+C içeriği %37-45 arasındadır (Upadhyaya 2009, Tendolkar 2003).

E. faecalis V583 genomu, 3.218.031 bp uzunluğunda olup 3182 open reading frame(ORF)’e sahiptir. Genlerin çoğu, türler veya özellikle *Streptococcus* ve *Staphylococcus* cinsleri arasında lateral gen transferi ile kazanılmıŐtır.

VanB fenotipi gösteren ilk VRE suşu olan *E.faecalis* V583 suşunun, genomunun yaklaşık olarak %25’i mobil veya eksojen gen olarak kazanılmış DNA dizilerinden oluşur. Bu mobil elementler konjugatif ve kompozit transpozonlar, patojenite adaları, integre plazmid genleri ve faj bölgeleri ve çok sayıda insersiyon dizilerinden oluşur.

Mobil gen elementlerinin kazanımı ilaç direncinin kazanımı ve yayılımına katkıda bulunmaktadır. Bu da enterokokların ilaç direncinde bir rezervuar olduğunun kanıtıdır. *E.faecalis* V583 suŐunda kromozomal DNA dışında büyüklükleri 66320 bp, 57660 bp ve 17963 bp olan 3 plazmid bulunur. Plazmidler de sırası ile 72, 64 ve 19 ORF kodlanır. Plazmidlerin G+C oranı %34 civarındadır(Upadhyaya 2009, Tendolkar 2003). *E.faecium* genomu 2.928.706 bp byklĞinde olup, 3309 ORF içerir. Genomda toplam G+C oranı %37,8’dir (Upadhyaya 2009, Tendolkar 2003).

1.3. Plazmitler

Bazı prokaryotik (bakteriler) ve ökaryotik organizmalarda (maya, filamentöz mantar, mavi algler, bazı bitki hücreleri), hücrenin büyük kromozomundan ayrı olarak sitoplazma içinde ya serbest olarak (plazmit) ya da hücre kromozomu ile birleşmiş halde (epizom), DNA karakterinde ekstrakromozomal, birkaç yüz baz çiftinden 200 kb' a kadar değişen boyutlarda plazmit adı verilen genetik elemanlar bulunmaktadır (Lodish ve ark 2000). Plazmitler, konakçı hücrenin mutlaka taşınması gereken yapılar değildir. Bununla birlikte, pek çok plazmit, özel koşullara uyum sağlamak için önemli olan genler içerir. Bu genler, çoğu kez bakterinin plazmiti taşıdığına dair temel işaret olurlar.

Doğada bazı plazmitler, bulunduğu hücreden başka bir hücreye taşınmasını sağlayan gen veya genler taşımaktadırlar (F plazmitleri), bazıları antibiyotik direnç genleri (R plazmitler), bazıları da olağan dışı molekülleri metabolize etmeyi sağlayan genler (Parçalayıcı plazmitler) ve nadir olarak hiçbir fonksiyonel gen taşımayanları da vardır (şifreli plazmitler)

1.3.1. Plazmitlerin Sınıflandırılması

Bakteri plazmitleri çeşitli özellikleri dikkate alınarak bazı klasifikasyonlara tabi tutulmuştur. Ancak, yine de tam yerleşmiş ve bütün kriterlere uyabilecek veya cevap verebilecek bir sınıflama yapılmış değildir. Bunlardan bazılarına ait bilgiler aşağıda özetle verilmektedir.

1.3.1.1. İnkompabilite durumlarına göre sınıflama

Bakteri plazmitleri, aynı hücrede birlikte bulunup bulunmadıklarına göre iki kısma ayrılmaktadır. Eğer, birden fazla plazmit aynı bakteride uyum içinde bulunabiliyorsa bunlar kompatible grubu içine dâhil edilmektedirler. Eğer birlikte uyum içinde olamıyor ve birbirlerini itiyorlarsa bunlar da inkompabile plazmitler olarak kabul edilmektedirler. Bu son grubu, aynı zamanda, birbirlerinin üremelerine veya biri diğerinin replikasyonuna da mani olmaktadır. Plazmitler bu özelliklerine göre gruplara (FI, FII, FIIII, X, PI, Ia, vs) ayrılmaktadırlar. *E.coli* 'de 20'den fazla, stafilokoklarda 15 ve pseudomonaslarda da 11 inkompabilite grubu belirlenmiştir(Arda 2000).

1.3.1.2. Taşıdıkları spesifik sekanslara göre sınıflama

Plazmitlerin en önemli özelliklerinden birisi, kuşkusuz, DNA'larında bazı özel informasyonların (markerler) kodlarına sahip olmalarıdır. Bütün plazmitler kendi replikasyonlarını mümkün kılacak genleri mutlaka taşımak zorundadırlar. Bazı plazmitler konjugasyon için gerekli olan genleri de taşır ve bunlar bazen ya transfer fonksiyonunun kendisi ya da çeşitli virulansa karşı duyarlılıkları ile biyolojik olarak saptlanabilirler.

Plazmitler konak için esas olan genleri taşımamalarına rağmen, hücrenin fenotipi üzerinde önemli etkileri olan genleri taşıyabilirler. Bazı durumlarda bakterinin ekolojisi için temel özellikleri kodladığı düşünülen genler plazmitler üzerinde yer almaktadır. Konjugatif plazmitler bu özelliklerini transfer edebilme yeteneğindedirler. Bu markerlere göre plazmitler 6 gruba ayrılırlar:

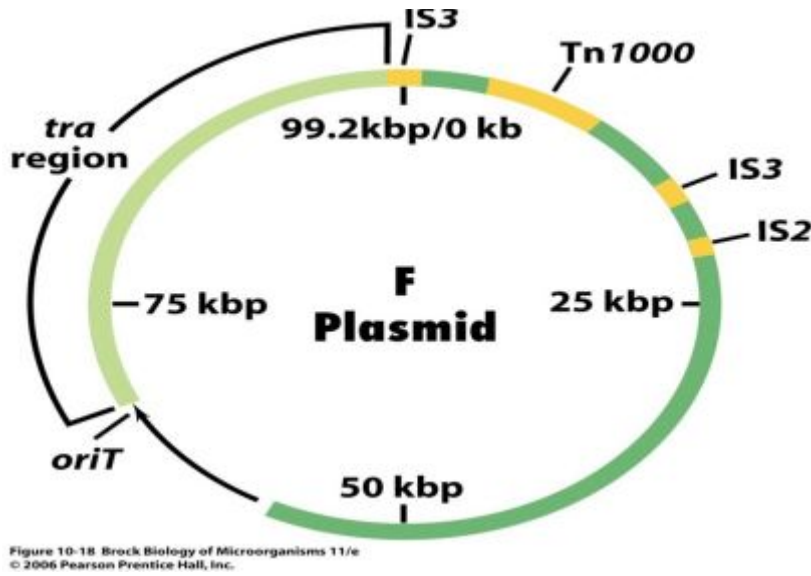
- 1-F faktörü (Fertilite plazmitleri)
- 2- Direnç plazmitleri
- 3-Virulans plazmitleri
- 4-Kolisin plazmitleri
- 5-Metabolik plazmitler
- 6- İntegratif plazmitler

Bu özellikler bakteriye seçici ortam stersinde pozitif yönde etki etmektedir. Plazmitler bakteriler için birçok özellik kazandırmasına rağmen başlıca kazandırdıkları fenotipik özellikler şöyledir:

1.3.1.2.1. F faktörü (Fertilite plazmitleri)

F faktörü (fertilite faktörü) en iyi *E. coli* K 12 suşlarında incelenmiştir. Bir plazmit olan F faktörü, sirküler, sarmal ve çift iplikçikli otonom bir DNA molekülüdür (MA: 63x106 dalton, 95 kb uzunlukta ve hücre de 1-3 tane kadar). Konak bakterisinin yaklaşık %2'si kadar uzunlukta olan bu plazmit, yapısında replikasyon orijinininden (RO)'dan ayrı olarak kendisinin transferini sağlayabilecek ve pilus formasyonunu kodlayan bilgilere sahiptir (Tra operonda 21 gen) (Arda 2000).

Bu plazmit hangi hücreye aktarılırsa, o bakteride hücre membranında pilus sentezi (pilus formasyonu) meydana gelir. Bu pilus (seks pilusu), bu faktörü taşımayan alıcı hücrenin (F- hücre), verici hücre ile (F+ hücre) bağlantı kurmasına ve bir konjugasyon köprüsü oluşturmaya yardımcı olur. F faktörü konjugatif (transmissible) bir plazmitdir. F faktörü bakterinin sitoplazmasında bulunabileceği gibi, içerdiği çok sayıda transpoze element ile konakçı kromozomuna integre olabilir ve Hfr (high frequency recombination) hücre meydana gelir (Masson ve Ray 1988). Hfr plazmitleri konakçı DNA' nın büyük bir kısmını, nadiren kromozomun tamamını alıcı hücreye transfer edebilir. Bir F plazmitinin genetik içeriği Şekil 1.1 de gösterilmektedir.



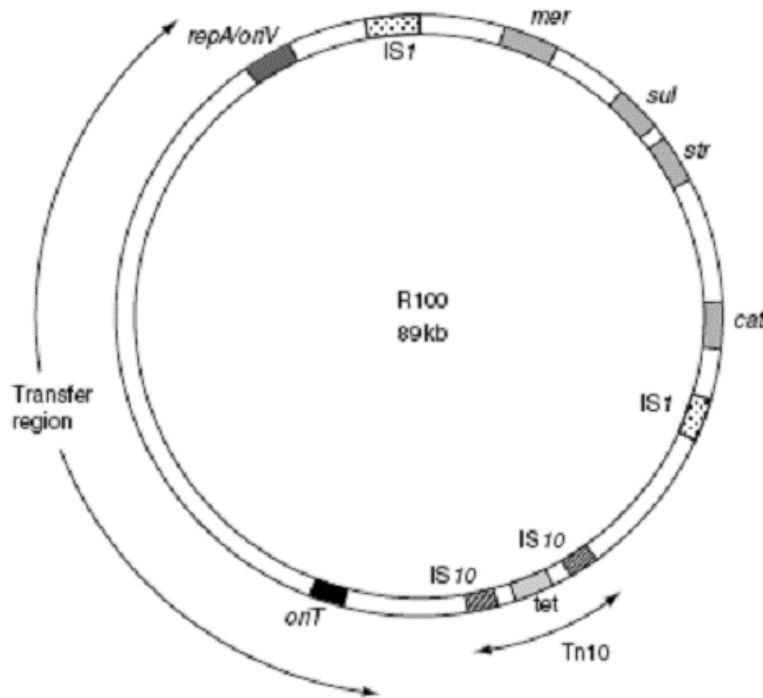
Şekil 1.1 Bir fertilite plazmitinin genetik haritası

1.3.1.2.2. Direnç Plazmitleri

Plazmitlerin en yaygın ve en iyi çalışılmış grupları direnç (R) plazmitleridir. Bu plazmitler, büyük konjugatif plazmitlerdir ve bir ya da daha çok antibiyotik direnç geni taşıyabildikleri gibi civa, cadmium, nikel, kobalt, arsenik gibi maddelere karşıda direnç genleri taşıyabilirler (Smith ve ark 1998). Direnç plazmitleri ilk kez Japonya' da bir dizanteri vakasında Şigella' dan bağırsak *E. coli*' sine transfer olarak gözlemlendi. ilk olarak sulfonamid (Sul) direnci bulunmuştur, daha sonra hızlı bir şekilde tetracycline (Tet), kloramfenikol (Cam), ve streptomisin (Str) dirençleri takip etmiştir (Watanabe 1963).

Bu dirençli suşların izole edilmelerinden hemen sonra, bunların direnç özelliğini hücreler arası kontak ile duyarlı suşlara aktarabildikleri gözlemlenmiştir. Konjugatif R plazmitlerinin bulaşıcı olma özelliği, bunların hücre populasyonlarında hızla yayılmalarına neden olmuştur. Günümüzde dirençli plazmitler önemli bir sorun oluşturmaktadır (Madigan ve Martinko 2010).

Bir R plazmiti birçok antibiyotik direnç geni taşıyabilir Genel olarak kodladığı proteinler ya antibiyotiği inaktive eder ya da hücre içine girişini engeller. Örneğin, R100 plazmiti 94,3 kb lik bir plazmit olup taşıdığı genler sülfonamid, streptomisin, spektinomisin, fusidik asit, kloramfenikol ve tetrasiklin gibi birçok antibiyotiğe karşı direnç kodlamaktadır (Şekil.1.2) . R100 plazmiti ayrıca civaya karşı direnç sağlayan bir kaç gen de taşımaktadır. Bu plazmit enterik bakterilerin *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteusi*, *Salmonella* ve *Shigella* cinsleri arasında aktarılmakla birlikte enterik olmayan gram negatif *Pseudomonas* bakterisine aktarılmaz. Birçok antibiyotiğe karşı direnç genleri taşıyan plazmitler bilinmektedirler. R plazmiti üzerindeki çok sayıdaki direnç geni aynı zamanda transpozon elementidir. Hem bu özellik hemde R plazmitlerinin çoğunun konjugatif oluşu, bunları geleneksel antibiyotik tedavisi için önemli bir tehdit haline getirmektedir (Madigan ve Martinko 2010).



Şekil 1. 2. Direnç plazmiti R100' ün genetik haritası

1.3.1.2.3. Virulans Plazmitler

Bakteri hücresinin, konakçı organizmaya adhezyonu ve kolonizasyonu ile ilgili bir veya birçok gen taşıyabilirler. Salgılanan toksin, enzim ve diğer moleküller, konakçıyı hasara uğratabilir. Ancak, bu etkinlikleri, virulent bakterinin konakçıya yeterince ve uygun yoldan girmesi ve konakçının genetik ve/veya immunolojik yönden (spesifik antikor taşınamaması) duyarlı olması ile yakından ilişkilidir. Bakteri, ne kadar virulent olursa olsun, eğer konakçı buna direnç gösteriyorsa, mikroorganizma üreyemez, infeksiyon veya hastalık oluşturmaz. Enteropatojenik *E. coli* de, hemolizin ve enterotoksin plazmit tarafından kodlanmaktadır (Clarke ve ark 2003). *S. Aureus* ta ekzofoliatif toksinin plazmit bağlantılı olduğu bilinmektedir (Yamaguchi ve ark 2001). Dahası 3 proteinden (koruyucu antijen, letal faktör, yapısal protein) oluşan iki *Bacillus anthracis* toksini pXol' de lokalize olmuştur (Sirard ve ark 1994). *Agrobacterium tumefaciens* te bulunan sirkular Ti plazmiti, bakterinin bitki ile etkileşmesinden, bitkiye infekte olarak bitki tümörüne neden olmaktadır (Otten ve De Ruffray 1994).

1.3.1.2.4. Metabolik Plazmitler

Metabolik aktivite birçok bakteride kromozomlarda bulunan özel genler tarafından yönetilirler. Ancak, bazı bakterilerde de metabolizma ile ilgili reaksiyonlar hem kromozomal ve/veya hem de plazmit orijinli olabilmektedir (Arda 2000).

Taşıdıkları bazı genler, hücre metabolizmasına yardımcı olur. Örneğin; sükroz ve laktoz kullanımı gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda yer alırlar (LeBlanc ve ark 1979, Hardesty ve ark 1987)

P. putida ve diğer pseudomonaslarda birçok kimyasal maddeyi ayrıştırabilecek plazmit kaynaklı enzimlere sahiptirler. Böyle enzimlerin sayısı 10'dan fazlayı bulmaktadır. Örn.: SAL, NAH, ASL ve TOL plazmitleri, sıra ile salisilat, naftalin, alkil benzen sulfonat ve tolueni ayrıştırarak catechola çevrilir ve sonra da plazmitlerce kodlanan enzimler tarafından asetaldehit ve piruvatlara dönüştürülür (Arda 2000). *Rhizobium* türleri baklagillerde nodülasyon yaparlar ve azot fiske edebilmek için *nod*, *sym*, *fix* genlerini taşıyan plazmite ihtiyaç duyarlar (Ahmad 2001).

Plazmit SCP1 (*Streptomyces coelicolor*), methylenomycin sentezini kodlayabilmektedir. Kasugamycin ve chloramphenicol da plazmitler tarafından spesifiye edilirler. Rizobiumlarda bulunan plazmitler de legumine bitki köklerine nitrojen fikzasyonunda etkin fonksiyonlara sahiptirler (Arda 2000).

1.3.1.2.5. Kolisin Plazmitler

Kolisin plazmitler küçük boyutlu plazmitlerdir ve kolisin sentez genleri içerirler (Riley ve ark 2000). Kolisinler bir bakterinin diğerini öldürebilmesini sağlayan letal proteinlerdir. Bakteriyosinin üretiminden sorumlu tüm genler plazmit yada transpozonlarca taşınır (Jerman ve ark 2005). Kolisinler pre-former ve nukleaz kolisin olmak üzere iki gruba ayrılır.

1.3.1.2.6. İntegratif plazmitler

Eski adı ile epizom olarak anılan bu plazmitler bazen kromozoma integre olabilirler. *Bacteroides uniformis*, te kromozomun bazı bölümleri kromozomdan ayrılır ve plazmit haline dönüşür ve bu plazmitler konjugasyon yapabilme yeteneğindedirler (Mazodier ve Davies 1991).

1.3.2. Enterekoklarda bulunan plazmitler

Geleneksel olarak enterekokkal plazmitler 3 grupta toplanmıştır:

1. Inc18 plazmit grubu (rep grubu1 ve pIP501 ile temsil edilir ve kısmen replikasyon grubu 2 pRE25 ile temsil edilir),
2. RCR plazmitleri (genellikle rep ailesi 4 ve rep ailesi 6 sırası ile pMBB ve p586 ile temsil edilir),
3. Feromon responsive plazmitler, rep ailesi 8 ve 9, sırası ile pAM373 ve pCF10 ile temsil edilir (Weaver ve ark 2009).

Karışık ölçütler kullanılarak oluşturulmuş bu sınıflandırma sistemi plazmitleri gruplandırırken çok netleştirici değildir. Geleneksel enterekokkal plazmit grupları, yeni PCR replikon tiplendirme sistemine uyumlu olmasına rağmen pRUM, pHTB ve mega

plazmit pL61 gibi plazmitleri gözden geçirir. Bu gibi plazmitler için RepA_N ismi önerilmiştir.

4. RepA_N, replikasyon ailesi 8 ve 9' u içerdiği gibi replikasyon ailesi 17' yi ve pL61 plazmitinde içerir (Weaver ve ark 2009).

Enterococcus faecium'da yaygın olarak bulunan mega plazmitler, son yıllarda belirginlik kazanmıştır. Bu plazmitler *Enterococcus faecium*'un kolonizasyonunu ve virulens kapasitesini arttırarak, enfeksiyon yeteneklerini arttırdığı görülüyor. Ek olarak mega plazmitler hem direnç genlerini taşımaktadır hemde yaymaktadır (Arias ve ark 2009, Rice ve ark 2009, Panesso ve ark 2011).

1. 3. 2. 1. RepA_N Plazmitleri

RepA_N plazmitleri büyük ölçüde düşük G+C bulunan Gram pozitif (+) bakterilerde bulunur. Konjugatif ve konjugatif olmayan türleri vardır. Plazmit boyutları 3.3 kb *Lactobacillus helveticus* pLJ1 (Takiguchi ve ark 1989) dan 281 kb *Enterococcus faecium*' un pLG1 plazmitine (Laverde- Gomez ve ark 2011) kadar değişir. RepA_N in korunmuş bölgeleri protein içermektedir ve streptokokal bakteriyofajlar ve ICE elementleri ile ilişkilendirilmiştir. Replikon ailesi yaygın olarak gözükse de tek başına plazmitler dar bir konakçı aralığına sahiptir ve sıklıkla türedikleri türlerle sınırlandırılmıştır.

RepA_N plazmitlerinin başlatıcı proteinlerinin 3 bölgesi bir organizasyonu vardır (Weaver ve ark 2009). N terminal bölgesi aile üyeleri arasında en korunmalı bölge ve kendi adını taşıyan bölge içerir. C terminal bölgesi, nispeten zayıf filogenetik sınırları vardır fakat aynı cins plazmitler arasında daha korunulmuştur. Bu korunma paternine göre; N terminal bölgesi tüm plazmit ailesi üyelerinde DNA' nın bağlanması ve/veya zincir ayrımı gibi ortak bazı işlevleri gerçekleştirir. C terminali ise bazı konak spesifik fonksiyonları gerçekleştirir. Gram negatif bakterilerde bulunan plazmitlerde konakçı özgüllüğü, konakçı replikasyon proteinlerinin etkileşimi özellikle konakçı replikatif helikazın (DnaB) bağlanması ile ilişkilendirilmiştir. RepA_N plazmitlerinin merkez bölgesi oldukça değişkendir ve karşılık gelen genler çok karmaşık bir nükleotid tekrarı içerir ve bu tekrar bölgeleri 5-12 nükleotitten oluşan ters tekrar bölgeleridir. Bu bölgenin birçok plazmitte, feromon responsive plazmit pAD1 de olmak üzere replikasyon orjini

fonksiyonu olduğu gösterilmiştir. İn vitro çalışmalar göstermiştir ki pAD1, RepA_N proteini RepA merkez bölgesi içindeki ters tekrarlar bağlanır ve bu N terminal bölgesi bağlanması için yeterlidir. C terminal bölgesi iki tekrar içermesine rağmen orijine bağlanmaz (Francia ve ark 2004). İlginçtir ki, birçok RepA_N plazmit ailesi, feromon responsive plazmit pAD1 ve pCF10 ve non- konjugatif *E. faecium* plazmit pRUM, ters tekrarları 3-5 nukleotitlik polyA üzerinde birleşir. *S. aureus* un RepA_N plazmiti pSK41' in RepA bağlanma çalışmalarında polyA yerine korunmasız tek bir singleA kaldığı gösterilmiştir (Kwong ve ark 2004). Bu merkez tekrarlar, pAD1 in uyumsuzluk gruplarının belirlenmesinde işlev gördüğü ortaya koyulmuştur (Francia ve ark 2004). *Bacillus subtilis* plazmidi pLS32 (Tanaka ve Ogura. 1998) ve *S. aureus* plazmid pSK1 (Kwong ve ark 2008) bu bölge içindeki yüksek dizi değişikliği aynı konaktaki benzer plazmitler arasındaki rekabeti önlemek için olduğu düşünülmektedir.

Kopya kontrol mekanizması enterekokal RepA_N plazmitlerinde bilinmemektedir. pSK41 plazmitinde bir antisense RNA, RepA' nın regülasyonu ve translasyonundan sorumlu tutulmuştur. (Kwong ve ark 2008, Kwong ve ark 2006, Kwong ve ark 2004). Fakat bir çalışmada pAD1' in sekans incelemesinde benzer bölgelerde, benzer düzenleyici RNA kanıtları gösterilmiştir (Weaver ve ark 2009). pLS32 nin, bazı mutasyonlar plazmitlerin kopya sayısını arttırmıştır. Benzer mutasyonlar enterekokal RepA_N lerin merkez bölgelerinde görülmemiştir (Tanaka ve ark 2005).

1.3.2.2. Inc18 Plazmitleri

Uyumsuzluk grubu terimi geleneksel uygulamada, replikasyon fonksiyonları çok benzer olan plazmitlerin aynı hücre kültüründe bulunamamasıdır (Novick 1987). Bu geleneksel tanım doğrultusunda Inc18 uyumsuzluk grubu orijinal olarak *Streptococcus agalactiae*' nin pIP501, *Streptococcus pyogenes*' in pSM19035 ve *E. faecalis* in pAMβ1 içerir (Brantl ve ark 1990). O zamandan beri Inc18 benzeri ya da Inc18 plazmit ailesi terimi grubun orijinal 3 plazmidinin replikasyon başlatıcı kodunda sekans benzerliği olan plazmitler kullanılmıştır. Bu benzerlik muhtemelen benzer bir replikasyon başlatma mekanizmasını işaret etsede, bu replikonlar uyumsuzluk grubu olarak kabul edilecek kadar yakından ilişkili olduğu anlaşılmaz.

Bu uyarı ile Inc18 plazmit ailesi, gerçek uyumsuzluk özellikleri dikkate alınmadan ilişkili, benzer başlatıcı proteinleri olan plazmitleri ifade etmek için kullanılır. Inc18 plazmit ailesi nispeten düşük kopya sayısına sahiptir (< 10 kopya/ Hücre). Plazmit büyüklüğü 25-50 kb arasındadır. Çoklukla antibiyotik direnç genleri taşırlar ve geniş konakçı aralığına sahip kendi başına transfer olabilirler. Vankomisin direncinin enterokoklarda ve diğer türlerde yayılmasında özellikle Inc18 plazmitlerinin önemli olduğu görülmüştür (Flannagan ve ark 2003, Freitas ve ark 2013, Freitas ve ark 2012; Freitas ve ark 2010, Rosvoll ve ark 2010, Zhu ve ark 2008). Enterokok izolatlarının PCR tabanlı taramasında *E.faecalis* ve *E. faecium* 'da en çok bulunan plazmitin Inc18 ailesi plazmitleri olduğu gösterilmiştir (Jensen ve ark 2010). Ayrıca Inc18 plazmitleri enterokoklar için kullanılan bazı klonlama vektörlerinin omurgasını oluşturur.

1.3.2.3. RCR Plazmitleri

RCR plazmitleri, plazmitlerin en çok bulunan ailesidir. Orijinal olarak *S. aureus* ta belirlenmiştir. Gram pozitif bakteriler, Gram negatif bakteriler ve arkealar olmak üzere geniş bir yayılım gösterir. RCR plazmitlerinin replikasyon başlatma proteinleri, Enterokoklarda 3 sınıfta belirlenmiştir. pT181 familyası Rep-trans korunmuş bölgesi, pMV158 ailesi Rep-2 korunmuş bölgesi ve pUB110 Rep-1 korunmuş bölgesi.

Yalnızca iki doğal enterokok izolatında ayrıntılı olarak tanımlanmıştır, *E. faecium* pRI1 (Rep-trans) (Garcia-Migura ve ark 2009) ve pJB01 (Rep_2) (Kim ve ark 2006). Rep-1 başlatıcısı enterokoklarda tespit edilmiş olmasına rağmen genellikle alternatif replikonlar ile ilgilidir ve fonksiyonel olmayabilir. pAM α 1, Rep-1 başlatıcısının fonksiyonu *E. faecalis* 'te bilinmemektedir ve replikasyon Rep-3'e bağlıdır. Yaygın olarak kullanılan çeşitli enterokok klonlama vektörü, diğer organizmalardan izole edilmiş RCR plazmitlerinden elde edilmiştir.

Dönen çember replikasyonu orijinal olarak tek zincirli DNA ya sahip phix174 gibi kolifajlarında tanımlanmıştır. Temel mekanizma olarak ssDNA fajları ve RCR plazmitleri benzerdir fakat kopya sayısı limitasyonu ve replikasyon frekansını düzenleyen sistemler farklıdır.

Replikasyon, tüm RCR plazmitlerinde çift zincirli orjinde (dso) başlatıcı proteinin tarafından tek zincire bir çentik atılması ile başlar. Çentik açılması RCR başlatıcı proteininde aktif tyrozin bölgesi aracılığı ile gerçekleşir. Dso iki ayrı dizi elementi içerir bir tanesi başlatıcı proteinin bağlanması için spesifik bölge ve diğeri çentik bölgesini içerir. Başlatıcı proteinde (initiator protein) ise DNA' ya bağlanmak için bir bölge ve çentik açabilmek için gerekli aktif tyrosine bölgesi içerir. Supercoil yapıdaki plazmitlere başlatıcı bağlandığı zaman dso' da çentik bölgesini ssDNA olarak çıkaran konformasyonal değişimler olur. Akif tyrozin bölgesi nükleotidlerin 5' bölgesinden bağlanır ve replikasyon tamamlanana kadar bağlı kalır. DNA helikaz (PcrA Gram pozitiflerde) ve DNA polimeraz III replikasyon orjininin 3' –OH ucundan çentik bölgesinden tutunurlar. Bağlı başlatıcı protein tarafından çentik/tekrar ligasyonun katelizlenmesi ile replikasyon sonlanır.

RCR plazmitlerinde konakçı proteinlerin etkileşimlerine ihtiyaç yoktur (DnaA ya da primaz gibi). Bu durum sayesinde geniş konak aralığına sahiptirler. Bu plazmitlerin bazıları hem Gram negatif hemde Gram pozitifte replike olabilirler. Dönen çember replikasyonunda bir ara ürün olan ssDNA bir sınırlama getirmiştir. Çoğu doğal kaynaklı RCR plazmidi 12 kb den daha küçüktür. Muhtamelen daha büyük boyutlarda ssDNA aşamasında delesyonlar ya da rekombinasyonlar olmasına yol açacaktır (Clewell ve ark 2014)

1. 3. 2. 4. Rep-3 Plazmitleri

Plazmit replikasyonunu başlatma proteinleri Rep-3 korunmuş bölgesidir ve hemen hemen tüm bakterilerde bulunabilir. Bazı çok iyi çalışılmış plazmitler içerir. Enterobakteriyel plazmitler, F, P, pSC101, R6K (del Solar ve ark 1998). Enterokoklarda tanımlanmış Rep_3 başlatıcı bölgesi içeren pek çok plazmit tanımlanmıştır. *E. faecium* plazmitleri pMBB1, pDT1 (Todokoro ve ark 2006) ve pCIZ2 (Criado ve ark 2008), and *E. faecalis* plazmitleri pS86 (Martinez Bueno ve ark 2000), pAMα1 (Francia ve Clewell 2002), and pEF1071 (Balla ve Dicks 2005). Bu plazmitleri arasında pCIZ2 en iyi karakterize edilendir. 2D jel analizi replikasyonun teta modundan daha çok dönen çember mekanizması olduğunu doğrulamıştır.

Pekçok Rep-3 plazmidi Gram pozitif klonlama vektörü oluşturmak için kullanılmıştır. Bu plazmitler teorik olarak iyi klonlama vektörleridir çünkü RepA-N plazmitlerinde genellikle daha kısa ve replikasyon yapısı olarak dönen çember replikasoyonuna sahip olmaları daha stabil olmalarını sağlamaktadır (Clewell ve ark 2014).

1. 3. Genetik bilgi transferi

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarında, virulens genleri veya ilaç direnci ile ilgili genetik bilgi transferinde rol oynayan, çok sayıda plazmit, transpozon, patojenite adası, integre plazmid geni ve faj bölgesi ile oldukça fazla sayıda insersiyon dizileri, bulunmuştur. Enterokoklarda Rolling Circle Replicating plazmid (RCR), Inc18 plazmit ve feromon-responsive plazmid ve RepA_N plazmitleri olmak üzere dört sınıf plazmit tanımlanmıştır. RCR ve Inc18 plazmidleri pek çok cinsten replike olabilirken, feromon-responsive plazmid replikasyonu sadece enterokoklarla özellikle de *E. faecalis* ile sınırlıdır. Plazmidi bulunmayan alıcı suşlar ekstraselüler feromon sentezleyerek, verici hücre dış yüzeyinde agregasyon faktör denilen proteinöz maddenin oluşumunu sağlar. AF alıcı hücrenin yüzeyine bağlanır ve alıcı ile verici hücrenin yakınlaşması sonucu plazmid değişimi oluşur. Feromon ile indüklenmiş transfer, plazmid geçişini 10^5 - 10^6 kat artırır. Enterokoklar ayrıca konjugatif transpozonlar ile de genetik bilgi değişimi yapabilir. Bunun için hücre-hücre teması gereklidir. Transpozonlar sıklıkla tetrasiklin, eritromisin, gentamisin, kanamisin ve diğer aminoglikozidler gibi antimikrobiyal ilaçlara direnç genleri taşırlar. Transpozonlar çok geniş bir konak spektrumuna sahip olup enterokokların yanı sıra streptokoklar, laktokoklar ve diğer Gram pozitif bakterilerde de bulunurlar. Konjugasyon ile ilgili belirli moleküller, infeksiyon sırasında immun modülatör rol oynayabildiğinden patojeniteye katkıda bulunurlar (Facklam ve Teixeira 1998, Tendolkar ve ark 2003).

1.4. Enterokoklarda Antibiyotik Direnci

Klasik bir virulens faktörü olmamasına rağmen, enterokokların çoklu antimikrobiyal ajanlara geliştirdiği direnç, hayatta kalmalarını ve çoğalmalarını kolaylaştırır (Sood ve ark 2008). Enterokokların en ilgi çekici özelliklerinden birisi yüksek antibiyotik dirençlilikleridir. Bu durum aynı zamanda enterokok infeksiyonlarındaki yüksek oranda

mortalitenin de nedenlerinden birisidir. Enterokoklarda görülen antibiyotik direnci, suşların intestinal florada seçilip çoğalmasını kolaylaştırırken, sitolitik toksin ve jelatinaz gibi faktörler de doku invazyonunu kolaylaştırmaktadır. Enterokok enfeksiyonlarının tedavisi güç olmaktadır; çünkü, enterokoklar diğer Gram pozitif bakterilerin duyarlı olduğu birçok antibiyotiğe kısmen veya tamamen dirençlidir. Enterokoklar da antibiyotiklere direncin mekanizması iki ana grupta incelenebilir (Aktaş ve Derbentli 2009).

1-İnterensek (doğal/kromozomal) Direnç

2-Eksterensek (kazanılmış) Direnç

1.4.1. İnterensek Direnç

İnterensek direnç türe/cinse özgüdür. Enterokok türlerinin tamamında görülen kromozomal direnci ifade eder. Mesela enterokok türleri penisilinlere, sefalosporinlere, linkozamidlere, trimetoprim-sulfametaksazol (TMP-SMX)'e, aminoglikozidlere (düşük düzeyde), polimiksinlere, monobaktamlara ve kinopristin/dalfopristin'e karşı kalıtsal olarak dirençlidir (Çetinkaya ve ark 2000, Klare ve ark 2003).

1.4.1.1. B-Laktam direnci

Enterokoklar β -laktam antibiyotiklere karşı karakteristik olarak tolerans gösterirler, yani tedavi dozunda Minimum Bakterisidal Konsantrasyon/Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MBK/MİK) oranı 1/32'nin üzerindedir. Bu nedenle β -laktam antibiyotikler enterokoklara karşı bakterisidal değil, bakteriyostatik etkilidir. Enterokoklarda interensek penisilin direnci, β -laktam antibiyotiklere düşük bağlanma afinitesi gösteren penisilin bağlayan protein 5 (PBP-5) enziminin varlığına bağlıdır. Ampisilin direnci *E. faecium* suşlarının %85–90'ında, *E. faecalis* suşlarının ise %2-3'ünde görülmektedir (Çetinkaya ve ark 2000, French ve ark 1998).

1.4.1.2. Aminoglikozid direnci

Enterokok türlerinin, antibiyotikleri hücre içine alabilmeleri için gerekli olan enerjiyi üretecek sitokrom enzimlerine sahip olmamaları, aminoglikozidlerin düşük konsantrasyonlarına doğal direnç göstermelerine neden olur (Fisher ve ark 2009).

Enterokoklarda görülen düşük düzeyde aminoglikozid direnci, bu grup ilaçların bakteri içerisine girişinin az olmasından kaynaklanır. Aminoglikozidler bakteri hücre duvarından enerji bağımlı mekanizma ile geçtiklerinden ve enterokoklarda sitokrom enzimleri olmadığından geçirgenlik azalmaktadır (French ve ark 1998).

1.4.1.3. Diğer antibiyotikler

Enterokoklar linkozamid grubu antibiyotiklere karşı da düşük düzeyde direnç gösterirler. Ayrıca enterokokların eksojen folatı kullanma yetenekleri olduğundan TMP/SMX'e de intrensek olarak dirençlidirler. İn-vitro şartlar da duyarlı görülseler de, invivo şartlarda etkisiz olduklarından antibiyotik duyarlılık testlerinde TMP-SMX kullanılmamalıdır. *E. faecalis* intrensek olarak quinupristin/dalfopristine'de dirençlidir. (Çetinkaya ve ark 2000, Klare ve ark 2003).

1.4.2. Eksterensek Direnç

Kazanılmış direnç genellikle DNA mutasyonları veya transpozon, plazmid veya patojenite adaları gibi yeni bir DNA segmentinin genoma transferi sonucu gelişir. En sık görülen mekanizma konjugasyondur. β -laktam, Aminoglikozid, Kloramfenikol, tetrasiklin, kinolon, Makrolid, Linkozamid ve B tipi Streptogramin, Glikopeptit en çok görülenlerdendir (Çetinkaya ve ark 2000, Klare ve ark 2003) .

1.4.2.1. β -laktam Direnci

β -laktam direnci Enterokok cinsi bakterilerin tipik özelliğidir. Enterokoklar iki ayrı direnç mekanizması ile β -laktam antibiyotiklere direnç kazanır. Direncin major mekanizması, kromozomal olarak düşük afiniteli PBP5 miktarının artması sonucu penisilinin hücre içine girişinin azalmasıdır (Çetinkaya ve ark 2000).

1.4.2.2. Aminoglikozid Direnci

Enterokoklarda aminoglikozidlere karşı direnç iki farklı mekanizma ile ortaya çıkar.

- a. İlmli seviyede direnç (MIK= 62-500 µg/ml) : Genellikle düşük permeabiliteden dolayı gelişir. Aminoglikozidlerin hücre duvarı sentezini inhibe eden β-laktam grubu antibiyotiklerle kombine edilerek kullanımı ile bu tip direnç problemi aşılabilir.
- b. Yüksek seviyede direnç (MIK>2000 µg/ml): Aminoglikozidlerin ribozomdaki bağlanma bölgelerindeki değişiklik sonucu veya aminoglikozidleri inaktive eden enzimlerin sentezi sonucu oluşur (Murray ve ark 1998).

1.4.2.3. Kloramfenikol direnci

Enterokokların %20-42'si kloramfenikole dirençlidir ve dirençten sorumlu esas mekanizma, plazmid üzerinde “*cat*” geni ile kodlanan kloramfenikol asetil transferaz üretimidir. Ayrıca efluks mekanizması da dirençte rol alabilir (Klare ve ark 2003).

1.4.2.4. Tetrasiklin direnci

Dirençten sorumlu *tetM*, *tetQ* ve *tetN*, *tetL* gibi çok sayıda gen tanımlanmıştır. *tetL* geni bir plazmid de taşınır. Bu genler efluks sistemini kodlayabildiği gibi ribozomal kaynaklı dirence de sebep olabilir (Klare ve ark 2003). Tetrasiklinlerin hücre dışına pompalanmasını sağlayan gen, tetrasiklin ile temas sonucu indüklenir. Tetrasiklin direnci enterokoklarda konjugasyon yolu ile kazanılan direncin en tipik örneğidir (Murray 1998).

1.4.2.5. Kinolon direnci

Direnç *gyrA* (giraz) ve *parC*(topoizomeraz) genlerindeki mutasyonlara bağlı gelişir (Klare ve ark 2003).

1.4.2.6. MLSB (Makrolid, Linkozamid ve B tipi Streptogramin) direnci

Genellikle 23S rRNA'nın metilasyonundan sorumlu *ermB* geni ile ilişkilidir ve metilasyon sonucu eritromisin ribozomlara bağlanamaz. *ermB* geni *Tn917* transpozonu ile çeşitli plazmidler üzerinde taşınabilmektedir. Ayrıca asetil transferaz veya efluks mekanizması sonucu da oluşabilir (Klare ve ark 2003).

1.4.2.7. Oksazolidinon direnci

Çoklu ilaç direnci gösteren enterokoklar ile oluşan enfeksiyonlarda oksazolidinon grubu antibiyotik olan linezolid iyi bir seçenektir (Klare ve ark 2003, Murray 1998).

1.4.2.8. Glikopeptit Direnci

Enterokoklarda vankomisin ve teikoplanin en çok kullanılan glikopeptitlerdir. Enterokoklarda, normal şartlar altında, peptidoglikan sentezinde, iki molekül D-Alanin bir ligaz enzimi ile bağlanır ve “D-Ala-D-Ala” yı oluşturur. Daha sonra UDP-N-asetil muramil tripeptide eklenerek UDP-N-asetil muramil pentapeptit meydana getirir. Bu peptid oluşmaya başlayan peptidoglikana bağlanır, kros bağların oluşumunu sağlar ve peptidoglikan tabakanın gücüne katkıda bulunur. Vankomisin pentapeptit prekürsör ününün D-Ala-D-Ala kısmına yüksek affinite ile bağlanır ve peptidoglikan zincire bağlanmasını bloke ederek kros bağların oluşumunu önler. Ancak peptidoglikan yan zincirine D-Ala-D-Ala yerine ligaz enzimi ile D-Ala-D-Laktat veya D-Ala-D-Serinin sentezlenerek bağlanması sonucunda, vankomisinin buraya bağlanma yeteneği azalır, hücre duvarı sentezi devam eder ve sonuç olarak vankomisine karşı direnç gelişir (Çetinkaya ve ark 2000, Klare ve ark 2003)

1.5. Epidemiyoloji

Enterokoklar genel olarak insan ve hayvanların sindirim sisteminde, ürogenital sistemde ve deride normal flora mikroorganizması olarak bulunurlar. Konakçı dağılımı oldukça geniştir. Bağırsak içeriğinde özellikle de orta bağırsak bölümünde yüksek düzeylerde bulunabilirler (10^5 - 10^7 bakteri/g). Ayrıca topraktan, besin maddelerinden, yüzey sulardan ve lağım sularından izole edilebilirler (Diker ve ark 2011).

Yakın zamanlara kadar enterokok enfeksiyonlarının, insanların kendi floralarından endojen olarak kaynaklandığı düşünülmekteydi. Ancak son zamanlarda, enterokoklar hastane enfeksiyon patojeni olarak adlandırılmaya başlamışlardır. Enterokokların insan sağlığı açısından önemi; özellikle, hastane enfeksiyonlarından izole edilen suşlarda antibiyotik direncidir. Enterokoklar, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinin üyeleridir. İnsanlarda, esas olarak gastrointestinal florada bulunmaları nedeni ile gerek

hastane gerekse hastane dışı ortamda endojen kaynaklı infeksiyonlara yol açmaktadırlar (Gültekin 2004).

Enterokokların insanlara bulaşmasında hayvanların rolü, ekzojen bulaşmanın anlaşılmasından ve hayvansal enterokok suşlarında da antibiyotik dirençliliğinin artmasından sonra dikkati çekmiştir. İnsanlarda infeksiyona neden olan suşlar ile hayvan suşlarının genetik düzeyde karşılaştırılmaları sonucunda, tavuk domuz ve ev hayvanlarının ve hayvansal ürünlerin enterokokların insanlara bulaşmasında önemli kaynak olabileceği ortaya konulmuştur (Eaton ve Gasson 2001).

Başta vankomisin olmak üzere diğer antibiyotiklere dirençli enterokoklara bağlı infeksiyonların tedavisi problem oluşturmaktadır. Enterokoklarda vankomisin direnci, kanatlılarda avoparsin kullanımıyla ilişkili olarak artmış ve bu yem katkısı büyütme faktörünün yasaklamasından sonra vankomisin dirençli enterokokların azaldığı gözlenmiştir (Diker ve ark 2013).

Enterokok plazmit profillerinin incelenmesi, virülens ve direnç genlerinin nasıl aktarıldığının, klonal yayılımının nasıl olduğu hakkında bilgiler vermesi açısından bizleri bilgi sahibi yapıcaktır

1.6. Enterokokların Önemi

Enterokoklar, hayvanların bağırsak florasındaki yaygınlığa bağlı olarak özellikle hayvansal gıdalar başta olmak üzere pek çok gıdada bulunabilmektedir. Bu nedenle bazı kaynaklarda *E. faecalis* ve *E. faecium*'un fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirildiği görülmektedir. Ancak pek çok gıdada *E. faecalis*'in yaygın bulunuşunun her zaman için doğrudan fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirilmemesi gereğine de değinilmektedir. Enterokokların gıdalarda sadece yetersiz hijyen indikatörü olarak değil ayrıca gıdanın bir parçası olarak da göz önüne alınması gerektiği belirtilmektedir (Klein 2003). Bununla birlikte enterokoklar diğer pek çok laktik asit bakterileri gibi ısıl işlem görmüş et ürünlerinde yüksek sıcaklığa karşı dirençli olma özelliğinden dolayı pastörizasyon sonrası canlı kalarak ya da dilimleme ve paketleme gibi işlem basamaklarında çapraz kontaminasyona bağlı olarak üründe bozulma yapabilmektedirler. Enterokoklar ayrıca fermente gıdalarda kontaminasyon düzeyini ya

da krleme işleminin yetersizliğini de yansıtmaktadır (Hugas 2003). Bu bakteriler, yukarıda açıklanan istenmeyen özelliklerinin yanında sahip oldukları pek çok yararlı özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde starter, yardımcı kültür (adjunct) ve probiyotik olarak da kullanılmaktadır. Pastörizasyon sıcaklıklarına direnci ve farklı sıcaklıklara ve üreme koşullarına adapte olabilme yeteneği enterokokların özellikle peynir ve et ürünleri gibi fermente gıdaların mikrobiyasının önemli bir parçasını oluşturmalarını sağlamaktadır. Fermente gıdaların organoleptik özelliklerine katılması ve bakteriyosin (enterosin) üretim yetenekleri enterokokların gıda teknolojisinde kullanımı açısından önem taşımaktadır (Klein 2003). Enterokokların ürettikleri bakteriyosinler ise enterosin olarak isimlendirilmektedir (Hugas ve ark 2003).

Bazı suşlarının iyi bilinen yararlı etkilerinin yanında enterokokların en yaygın hastane kaynaklı patojenlerin arasında yer aldığı, özellikle de *E. faecium* ve *E. faecalis*'in fırsatçı patojen olduğu, bakteriyemi ve endokarditisin yanında üriner sistemde ve merkezi sinir sistemi gibi dokularda enfeksiyonlara neden olabildiği bildirilmektedir (İşleroğlu 2008). Gıdaların doğal florasında bulunmasının yanında sahip oldukları fonksiyonel özelliklerden dolayı gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip olan enterokoklar insanlarda bakteriyemi, endokarditis, üriner sistemde ve diğer dokularda enfeksiyonlara yol açabilmekte ve taşıyabilecekleri virülens genleri ve antibiyotik dirençlilik özelliklerinden dolayı önem taşımaktadırlar.

Enterokoklar insan ve hayvanların normal bağırsak florasında doğal olarak bulunurlar. Dışkıda bol miktarda enterokok olduğundan çevreye yayılmaları da çok kolaydır. Su ve yiyeceklerden izole edildiklerinden indikatör mikroorganizma olarak kullanılırlar. Enterokoklar zor şartlar altında yaşayabilmekte değişik çevre koşullarına uyum sağlayabilmektedirler. Birçok antimikrobiyal ajana karşı doğal veya kazanılmış direnç göstermeleri nedeniyle son yıllarda hastane kaynaklı infeksiyon etkenleri arasında üst sıralara yükselmişlerdir.

Plazmitler bakterilerde bulunan ekstra kromozomal DNA molekülleridir. Bakterilerin içinde özellikle bulunması gerekmez; fakat, konakçılarının içerdikleri genler sayesinde seçici ortam koşullarında hayatta kalmalarını sağlayabilirler. Bu seçici ortamlarda hayatta kalmayı sağlayan genleri içeren plazmitler bakteriden bakteriye aktarılabilir bu da bakterilerin çevreye adaptasyonunu kolaylaştırmaktadır. Sonuç olarak,

bakterilerde antibiyotik direncinin ve patojenitelerinin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca plazmit profillendirmesi çalışmaları suşların klonal yayılıma sahip olup olmadığını anlamamızı sağlamaktadır. Suşların plazmit içerikleri ne kadar plazmit taşıdıklarının ve ne kadar patojen olduklarını anlamamız açısından önemlidir. Şu anki bilgilerimize göre, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının plazmit profillerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada Aydın yöresinde mastitisli sığırlar sütlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının plazmit profilleri ilk kez incelenmesi amaçlanmıştır. Böylece, yöredeki saha izolatları arasındaki plazmit yayılımı belirlenerek, izole edilen enterokok suşlarının patojenitesi ve klonal yayılımı hakkında bilgi sahibi olunacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. İzolasyon Örnekleri

Çalışmada geçmiş yıllarda, Aydın İl'inde bulunan özel sektöre ait süt sığır yetiştiriciliği yapılan 38 işletmedeki 242 inekten, uzman veteriner hekim tarafından alınmış olan, 600 mastitisli süt örneği kullanıldı. Subklinik mastitisli olan ineklerin belirlenebilmesi amacı ile Kalifornia Mastitis Testi (CMT) yapıldı. Çalışmada hepsi laktasyon döneminde olan, son bir ayda antibiyotik tedavisi almamış, en az bir doğum yapmış, 3–9 yaşlı, Holştayn ırkı, fiziksel muayenede anormallik bulunan (meme loblarında şişkinlik, sıcaklık, ağrı, kızarıklık ya da sulu, kanlı, pıhtılı süt gibi) ve CMT ile pozitif reaksiyon (1+, 2+, 3+) veren ineklerin sütleri çalışmaya dahil edildi. İşletmelerin hepsinde makine ile sağım işlemi yapılmaktaydı.

2.1.2. Referans suşlar

Polimeraz zincir reaksiyonunda pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, negatif kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

2.1.3. Besiyerleri, Ayıraç ve Solusyonlar

2.1.3.1. Besiyerleri

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

Nutrient Broth (NB) (Oxoid) ve suşların saklanması için %20 gliserinli Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Merck) kullanıldı.

2.1.3.1.1. Chromocult® Enterococci Broth (EB)

Pepton karışımı.....	8,6 g/L
NaCl.....	6,4 g/L
Sodyum azide.....	0,6 g/L
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside (X-GLU)....	0,04 g/L
Tween 80.....	2,2mL/L

Dehidre besiyeri 18,0 g/L olacak şekilde ısıtılarak çözüldü. 5 mL olacak şekilde tüplere dağıtılıp otoklavda 121 °C 'de 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanan besiyeri berrak ve sarı renkli olup, pH 'sı 25 °C 'da 7,5±0,2 'dir. Besiyeri bileşiminde bulunan sodyum azid özellikle Gram negatiflerin 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 ve D grup streptokoklar için karakteristiktir.

2.1.3.1.2. Chromocult® Enterococci Agar (EA)

Pankreatik kazein.....	17 g/L
Hayvansal pepton.....	3 g/L
Maya Ekstraktı.....	5 g/L
Oxgall.....	10 g/L
Eskulin.....	1 g/L
Sodium azide.....	0.25 g/L
Demir amonyum sitrat.....	0.5 g/L
NaCl.....	5 g/L
Sodyum sitrat.....	1 g/L

Dehidre besiyeri 56 g/L olacak şekilde ısıtılarak çözüldü. Karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlandı, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra, 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 saptanmasını sağlar. 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.

2.1.3.1.3. Brain Hearth Infusion Agar

BHIA..... 52 g/L

Karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanıp, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra, 50 °C'ye kadar soğutulup petrilere döküldü.

2.1.3.1.4. Brain Hearth Infusion Broth

BHIB..... 37 g/L

Karışımın pH' sı 7,2-7,4'e ayarlanıp, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra, 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldı.

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

BHIB..... 3,7 g

Gliserin..... 20 ml

Distile su..... 80 ml

Karışımın pH' sı 7,2-7,4'e ayarlanıp, 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra, 500µl miktarda ependorf tüplere dağıtıldı.

2.1.3.1.6. %6.5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB)

NB..... 8 g/l

NaCl..... 6.5 g

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

2.1.3.2. Ayıraç ve Solusyonlar

2.1.3.2.1. %3'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

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

2.1.3.2.2. TEG (Tris-HCl, EDTA, Glukoz) solüsyonu

100 ml TEG solüsyonu

Tris HCL.....	0.786 g
EDTA.....	0.354 g
Glukoz.....	1.8 g

2.1.3.2.3 %20' lik SDS Çözeltisi

100 ml % 20' lik SDS çözeltisi hazırlamak için

SDS.....	20 g
dH ₂ O.....	80 ml

2.1.3.2.4 0,5 N NaOH Çözeltisi

100 ml, 0,5 N NaOH hazırlamak için

NaOH.....	4 gr
dH ₂ O.....	100 ml

2.1.3.2.5 Alkali Liziz Solusyonu

20 ml Alkali Liziz Solusyonu için

%20' lik SDS.....	1 ml
0,5 N NaOH.....	8 ml
dH ₂ O.....	11 ml

2.1.3.2.6 %30'luk Potasyum Asetat

Potasyum Asetat	30 gr
dH ₂ O.....	70 ml

2.1.3.2.7 Fenol Kloroform

V/V hazırlanmış Fenol- Kloroform çözeltisi kullanılmıştır.

2.1.3.2.8 İsoopropanol

Çalışmada % 100 saflıkta İsoopropanol kullanılmıştır.

2.1.3.2.9 125 mM TrisHCl + 300 mM Sodyum Asetat Solusyonu

100 ml Stok solüsyonu için,

Tris- HCl	1.7 g
Sodyum Asetat	2.46 g
dH ₂ O.....	100 ml

2.1.3.2.10 50 mM' lık Tris- HCl Solusyonu

Tris HCl.....	0.68 g
dH ₂ O.....	100 ml

2.1.3.2.11. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH: 8.0) Buffer

10X TBE Stok Solusyonu:

Tris Base.....	121.1 g
Borik Asit.....	61.83 g
EDTA.....	5.84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121°C'de 15 dk otoklav edilip, pH 8,0 ayarlanarak buzdolabında saklanır.

0,5X TBE Kullanma Solusyonu:

10X TBE.....	50 ml
Distile su.....	950 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlanır.

2.1.3.2.12. Gel Loading Buffer (6X)

Bromfenol Mavisi.....	25 mg
Sükroz	4 g
H ₂ O.....	10 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlanır (Anderesson 2011)

2.1.3.2.13. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma).....	0.8 ve 1.5g
TBE (0,5X).....	100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatılan 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.

2.1.3.2.14. Marker

Marker olarak 100 bp (Vivantis ve Fermentas) ve EcoRI ve HindIII enzimi ile kesilmiş lambda (λ) faj DNA'sı (Fermentas) kullanıldı.

EcoRI ve HindIII enzimi ile kesilmiş Lambda Faj DNA'sının Hazırlanışı:

- 30 μ l λ DNA (Fermentas),
- 30 μ l 10X Buffer,
- 4 μ l EcoRI enzimi (Fermentas) ve
- 4 μ l HindIII enzimi (Fermentas),

232 µl enjeksiyonluk distile su karıştırıldı. Bir saat 37°C’de bekledikten sonra 60 µl loading dye eklendi. Her elektroforez reaksiyonu için 7 µl kullanıldı.

2.1.3.2.15. Etidium Bromür

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka % 1’ lik Ethidium Bromür 500 ml 0,5X TBE içersine 100 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

2.1.4. PZR

2.1.4.1. 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.

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

25mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl), 100mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas) kullanıldı.

2.1.4.3. Primer

Çalışmada *Enterococcus faecalis* suşlarını tanımlamak için kullanılan primerin, dizisi, amplikon büyüklüğü, kaynaklağı Çizelge 2. 1’de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Tanımlamada kullanılan primer, dizisi, amplikon büyüklüğü, kaynağı

Primer	Dizi (5’-3’)	Amplikon Uzunluğu (bp)	Kaynak
DDF DDR	CACCTGAAGAAACAGGC ATGGCTACTTCAATTTCACG	475	Vilela ve ark 2006

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Alınması

2.2.1.1. Süt Örnekleri

Her süt örneği alınırken, meme başları su ve sünger yardımı ile temizlenip kurulandı ve %70'lik alkol ile silindi. Eller sabunla yıkandıktan sonra eldiven giyilip meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak için ilk birkaç ml süt atılıp (Baştan 2002) steril enjektörler içine 5 ml miktarda alındı. Alınan tüm örnekler soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvar'ına aynı gün getirilip izolasyon çalışmalarına başlandı.

2.2.2. Enterokok İzolasyonu

Mastitisli sığırlardan alınan süt örnekleri en kısa sürede laboratuvara getirildikten sonra örnekler selektif enterokok M buyyona öze dolusu inokule edildi. Buyyonlar aerobik koşullarda 37°C'de, besiyerinin parlak sarı rengi mavi-yeşil renge dönüşünceye kadar, yaklaşık 24-72 saat, bekletildi. Renk değişimi besiyerinde enterokok üremesinin göstergesi olarak değerlendirildi. Mavi-yeşil renk olan buyyonlardan bir öze dolusu alınarak enterokokosel agara ekimleri yapıldı. Besiyeri 37°C'de aerobik koşullarda 24-48 saat süreyle inkube edildi. Sürenin sonunda üreyen siyah-koyu kahverengi koloniler *Enterococcus* spp. yönünden incelenmek üzere EA(Enterokok Agar)'a pasajlandı.

2.2.3. Enterokok İdentifikasyonu

Enterokokların cins düzeyinde ayrımı için ekilen selektif besiyerinde siyah-koyu kahverengi üreyen *Enterococcus* spp. şüpheli kolonilere Gram boyama, % 6.5 tuz içeren NB'da üreme ve lam üzerinde katalaz testleri yapıldı (Lanthier ve ark 2010). 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 tüm şüpheli koloniler moleküler yöntemler kullanılarak identifiye edilinceye kadar -20°C'de %20 gliserinli BHIB içerisinde saklandı.

2.2.3.1. Katalaz Testi

Bu test mikroorganizmalar tarafından sentezlenen katalaz (hidrojen peroksit oksido redüktaz) enziminin varlığını saptamak amacıyla yapıldı. Enzim hidrojen peroksidi (H_2O_2), su (H_2O) ve oksijene (O_2) ayrıştırır. Mikroorganizmaların taze yatık TSA kültürleri üzerinden öze yardımıyla alınarak lam üzerine yayılması ve %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunun lam üzerine damlatılmasıyla hava kabarcıklarının oluşup oluşmadığının kontrolü esasına dayanır (Temiz 2000).

2.2.3.2. % 6.5 NaCl'de Büyüme

Enterokoklar için ayırt edici testlerden biridir ve identifikasyonda önemlidir. %6.5 oranında NaCl içeren NB ortamına ve aynı şekilde NaCl içermeyen NB ortamına da inokule edilen mikroorganizmaların, 24 saatlik inkübasyondan sonra büyümeleri kontrol edildi. Nutrient broth'daki kadar bulanıklık gözlenen NaCl'lü NB içeren tüplerdeki suşlar için sonuç pozitif olarak kaydedildi ve bu türlerle identifikasyona devam edildi. Kontrol mikroorganizma olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kullanıldı (Gerhardt ve ark1994).

2.2.3.3. *E. faecalis* suşlarının tür düzeyinde identifikasyon

Elde edilen enterokok izolatlarından *E. faecalis* türünü tanımlamak için spesifik primer çifti kullanılarak PZR yapıldı.

2.2.3.3.1. DNA İzolasyonu

Öncelikle enterokok izolatlarından PZR'da kullanılmak üzere DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (InstaGene Matrix, BIO-RAD, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

*Bir öze dolusu stafilokok kültürü 1 ml steril bir ependorf tüp içerisinde steril enjeksiyonluk distile su ile süspanse edildi. 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.

*200 µl InstaGene matrix pelet üzerine ilave edildikten sonra 56°C'de yarım saat inkübe edildi. Yüksek hızda 10 sn vortekslendi. Tüpler benmaride 100°C'de 8 dk inkübe edildi.

*Yüksek hızda 10 sn vortekslendi. 12.000 rpm.de 3 dk santrifüj yapıldı. 30 µl'lik bir PZR reaksiyonu için 2 µl süpernatant kullanıldı.

2.2.3.3.2. DNA'nın Elektroforezi

Agaroz jel elektoroforezi, 5µg/ml etidyum bromid'li %1 agaroz içeren mini jelde gerçekleştirildi. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde TBE tamponu kullanıldı 5µl DNA solüsyonu, 2µl yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 50V'ta 45 dakika süreyle yürütüldü. Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu gösterdi (Sambrook ve ark 1989).

2.2.3.3.3. DNA'nın Saflık Kontrolü ve Miktar Tayinleri

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometre ile yapıldı (Sambrook ve ark 1989). Spektrofotometrede DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorpsanları 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. Saflık kontrolleri yapılan genomik DNA miktarlarının hesaplanması için OD260 değeri kullanıldı ve DNA miktarları; $DNA(\mu g/ml) = OD260 \times Seyreltme\ Oranı \times 50$ formülü ile hesaplandı.

2.2.3. PZR

PZR reaksiyonunda kullanılan master miks aşağıdaki gibi hazırlandı.

Master Miksin Hazırlanışı: PZR reaksiyonunda bir örnek için PZR amplifikasyonu 30 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, magnesium klorür (MgCl₂) 2 mM, dNTP 0,2 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polimerase 1,5 U olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2. 2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2. 2. Mastermiksın 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
TOPLAM		300

Mastermiksler hazırlandıktan sonra 0,2 mL’lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 28’er µl hazırlanan mastermiksden 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. *E. faecalis* izolatlarının tespiti için kullanılan PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı sırası ile Çizelge 2. 3’te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. *E. faecalis* PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94	4 dk
Denatürasyon	30	94	30 sn
Bağlanma		53	30 sn
Uzama		72	30 sn
Son Uzama	1	72	5 dk

2.2.3.1. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

6x loading dye boyasından pipet yardımıyla alınıp her bir örnek için 1 µl kadar dağıtıldı, daha sonra elde edilen 5 µl PZR ürünleriyle loading dye karıştırıldı. Oluşturulan karışımdan 6 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi.

2.2.3.2. Yürütme

Hazırlanan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 100V 400A akımda 30 dakika yürütüldü.

2.2.3.3. Görüntüleme ve Değerlendirme

Yüz voltda otuz 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 daha önce bildirildiği şekilde (Çizelge 2. 1.) yapıldı.

2.2.4 Plazmit DNA' sının İzolasyonu

Plazmit izolasyonu Ehrenfeld ve Clewell' in 1987 de kullandıkları yöntem modifiye edilerek kullanıldı;

- İzolasyon işlemine başlamadan bir gece önce 5 ml BHIB ekim yapıldı ve 37° C de evtüvde bir gece inkübasyona bırakıldı.
- Gecelik kültür santrifüj edilip, bakteri hücreleri çöktürüldü ve supernatant atıldı.
- Dipte oluşan pelletin üzerine 200 µl TEG (Tris-EDTA-Glikoz) çözeltisi eklenip süspanse edildi ve içerisine 3 mg/ml lizozim eklendi. Örnekler, 37° C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra içerisine, 300 µl içinde alkali liziz solusyonu eklenip 5 dk buz içerisinde bekletildi.
- Sonra üzerine % 30'luk Potasyum Asetat eklenerek, tekrar 5 dk buz içerisinde bekletildi.
- Buz içerisinde çıkardıktan sonra 5dk +4° C 13000 g'de santrifüj yapıldı.
- Supernatant yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı.
- Üzerine V/V Fenol/Kloroform izoamilalkol eklenip, 5 dk 13000 g'de santrifüj yapıldı.
- Üst faz yeni bir ependorf tüpüne alınıp, üzerine v/v izopropanol eklendi.
- Oda sıcaklığında (25°C) 30 dk bekletildi.
- Daha sonra oda sıcaklığında 30 dk 13000 g' de santrifüj yapıldı.
- Supernatant atılıp, dipteki pelletin üzerine 100 µl 125 mM Tris-HCL ve 300 mM Sodyum Asetat içeren çözeltiden ve 200 µl %95 etanol eklenip ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.

- Oda sıcaklığında 8-20 dk 13000 g de santrifüj edildi.
- Supernatant atılıp, oluşan pellet 20 µl (50 mM) Tris HCL ile sulandırılarak izolasyon işlemi tamamlanmıştır (Ehrenfeld ve Clewell 1987).

2.2.4.1. Plazmitlerin Elektroforez Tankına Yüklenmesi

6x loading dye boyasından pipet yardımıyla alınıp her bir örnek için 2 µl kadar dağıtıldı, daha sonra elde edilen 10 µl plazmit ürünleriyle loading dye karıştırıldı. Oluşturulan karışımdan 12 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi.

2.2.4.2. Yürütme

Hazırlanan %0.8 jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 60V 400A akımda 300 dakika yürütüldü.

2.2.4.3. Görüntüleme ve Değerlendirme

60 voltda 300 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 InfinityCapt programı kullanılarak fotoğraflandıktan sonra, Marker'ın bantlarının bant boyutları baz alınarak plazmitlerin boyları hesaplandı.

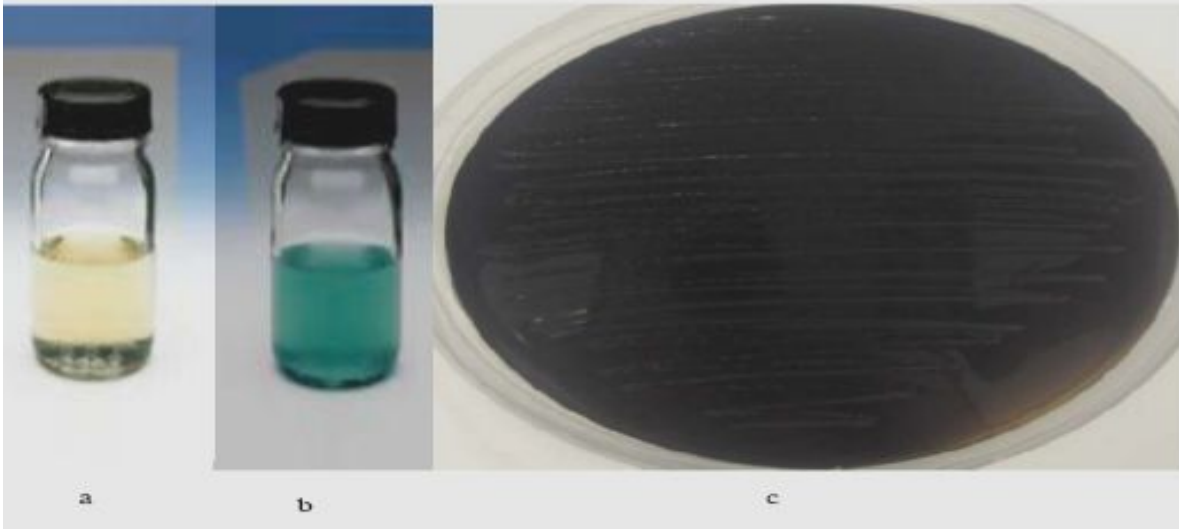
2.2.4.4. UPGMA Analizi (Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu)

PyElpH 1.4 programı kullanılarak bant profilleri UPGMA (Matematiksel ortalama ile ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması) yöntemi ile dendogram oluşturuldu. Bantlara bağlı benzerlik katsayısına göre suşlar arasında ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısı hesaplamasında bant profil toleransı % 1.5 olarak belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon

Çalışmada 38 işletmedeki 242 inekten alınan 600 mastitisli süt örneğinin incelenmesi sonucunda, EA'da referans suşla (*E. faecalis* ATCC 29212) uygun görünümdeki (Resim 3. 1.) bakteri kolonileri seçilerek toplam 96 enterokok şüpheli suş izole edildi.

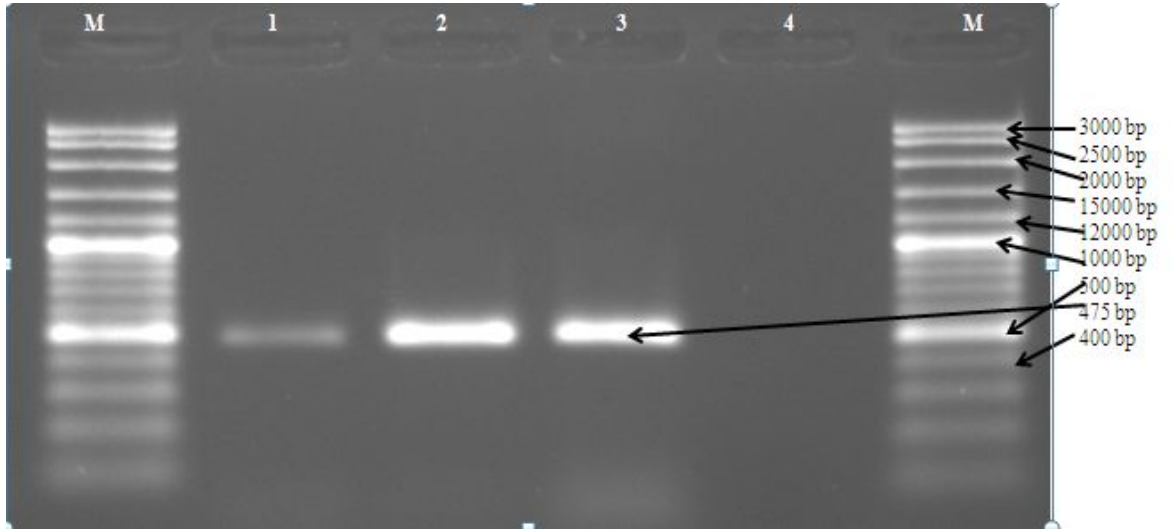


Şekil 3. 1: Ekim yapılmamış EB **b.** EB'da *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun görünümü **c.** EA'da *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun görünümü

Bu isolatların hepsi % 6.5 tuzlu NB'da üreyebilen, katalaz negatif, Gram pozitif kok görünümünde oldukları belirlendikten sonra çalışmaya dahil edildiler.

3.2. PZR

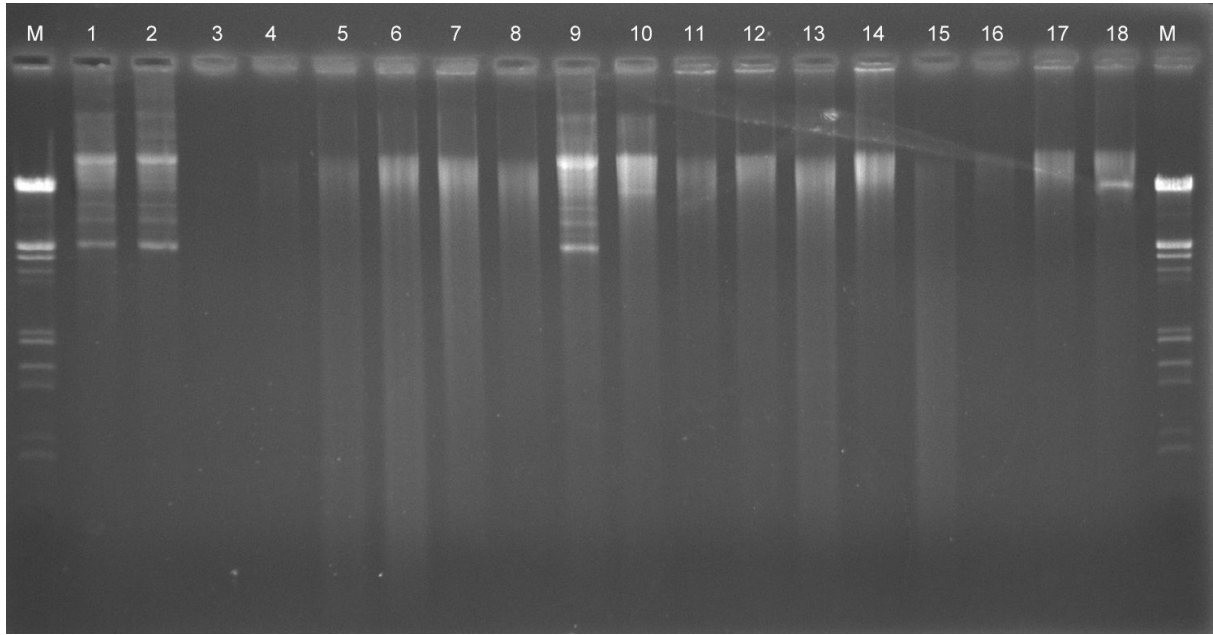
İzole ve identifiye edilen 96 izolata spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonrasında 475 bp uzunluğunda ampikon elde edilen 56 izolata (% 58.3) *E. faecalis* olduğu belirlendikten sonra plazmit profilleri incelendi (Şekil 3.2)



Şekil 3. 2. *E. faecalis* PZR elektroforez görüntüsü **1-2:** *E. faecalis* saha izolatları **3:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) **4:** Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 100 bp DNA ladder (Vivantis)

3.3. Plazmit Profillerinin incelenmesi

Çalışmada incelenen 56 *E. faecalis* suşunun 19 (%33,9) tanesinin plazmit taşıdığı belirlendi. İzole edilen plazmitlerin sayılarının, bir suşta 1-8 arasında değiştiği tespit edildi. Bu izolatların 5 tanesi tek plazmit içermesine rağmen, kalan 14 izolat birden fazla plazmite sahiptir. Vilber Lourmat'ın Infinity Capt adlı programı ve moleküler büyüklüğü bilinen marker temel alınarak, *E. faecalis* suşlarından izole edilen plazmitlerin boyutları yaklaşık 1.7 kb ile 41 kb arasında değişmektedir. İzole edilen 56 *E. faecalis* suşunun içerdikleri plazmitlerin görüntüsü (Şekil 3.1,3.2 ve 3.3) ve plazmitlerin büyüklükleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.1, 3.2 ve 3.3).



Şekil 3. 3. *E. faecalis* 1-18 nolu örnekler plazmit profili görüntüsü. M: Marker (Lamda –EcoRI /HindIII)

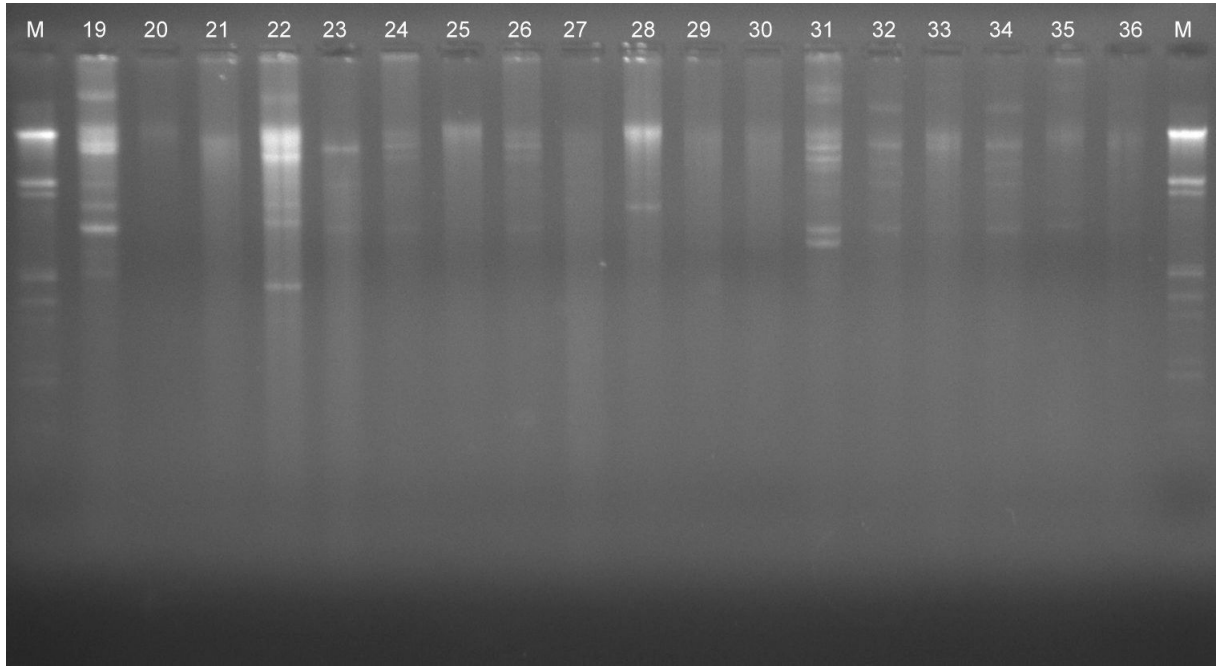
Aşağıda suşların ve moleküler marker'ın içerdikleri plazmit miktarı ve plazmitleri baz boyutları verilmiştir.

Çizelge 3. 1. 1- 18 arası izolatların içerdği plazmitlerin sayıları ve boyutları.

Suş No	P.S	Plazmitlerin Boyutu
M	12	21,226 kb; 5,148 kb; 4,973 kb; 4,268 kb; 3,530 kb; 2,027 kb; 1,904 kb; 1,584 kb; 1,375 kb; 0,947 kb; 0,831 kb; 0,564 kb
1	8	40,979 kb; 34,088 kb; 28,346 kb; 23,063 kb; 19,277 kb; 12,822 kb; 8,783 kb; 5,13 kb
2	8	40,979 kb; 34,088 kb; 28,346 kb; 23,063 kb; 19,277 kb; 12,822 kb; 8,783 kb; 5,13 kb
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	8	40,979 kb; 34,088 kb; 28,346 kb; 23,063 kb; 19,277 kb; 12,822 kb; 8,783 kb; 5,13 kb
10	1	17,990 kb
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	1	20,575 kb
M	12	21,226 kb; 5,148 kb; 4,973 kb; 4,268 kb; 3,530 kb; 2,027 kb; 1,904 kb; 1,584 kb; 1,375 kb; 0,947 kb; 0,831 kb; 0,564 kb

*Plazmit içermeyen izolatlara (-) işareti koyulmuştur.

*PS: Suşun içerdği plazmit sayısı, M, Kullanılan moleküler marker ve bant boyutları



Şekil 3. 4. *E. faecalis* 19-36 nolu örnekler plazmit profili görüntüsü , M: Marker (Lamda – EcoRI /HindIII)

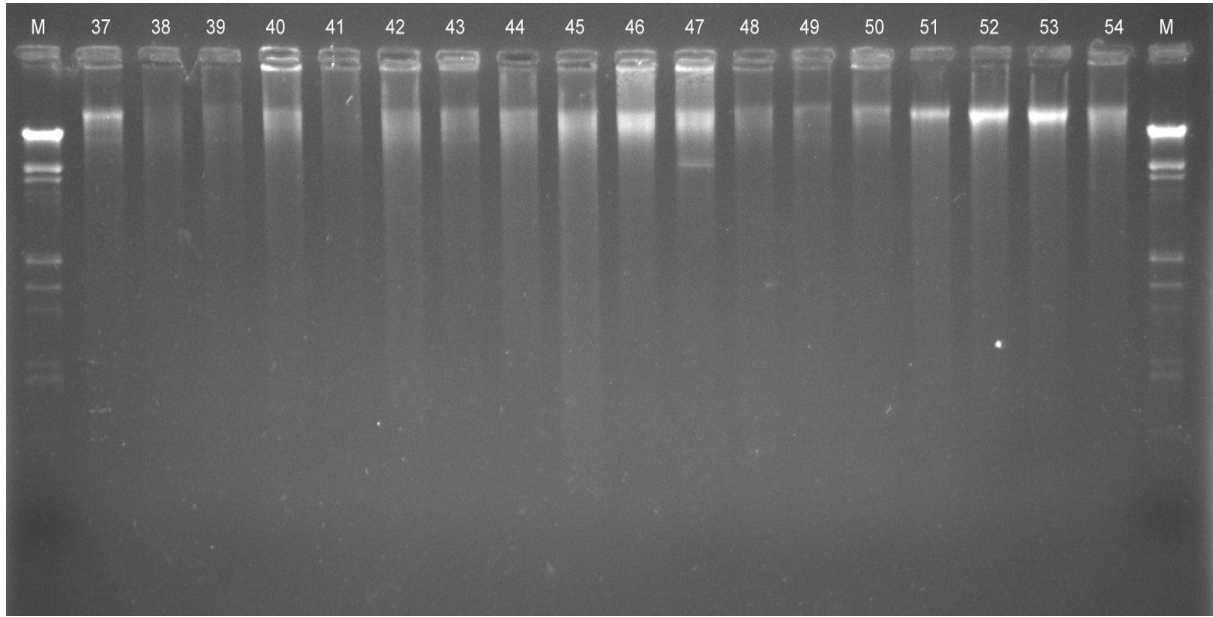
Aşağıda suşların ve moleküler marker'ın içerdikleri plazmit miktarı ve plazmitleri baz boyutları verilmiştir.

Çizelge 3. 2. 19-36 arası izolatların içerdği plazmitlerin sayıları boyutları

Suş No	P.S	Plazmitlerin Boyutu
M	12	21,226 kb; 5,148 kb; 4,973 kb; 4,268 kb; 3,530 kb; 2,027 kb; 1,904 kb; 1,584 kb; 1,375 kb; 0,947 kb; 0,831 kb; 0,564 kb
19	7	34,765 kb; 20,424 kb; 11,114 kb; 4,654 kb; 3, 184 kb; 2,912 kb; 1,924 kb
20	-	-
21	-	-
22	8	36,458 kb; 23,200 kb; 17,250 kb; 11,438 kb; 5,148 kb; 3,270 kb; 2,872 kb; 1,735 kb
23	3	17,250 kb; 5,260 kb; 2,676 kb
24	4	23,200 kb; 18,035 kb; 10,484 kb; 2,639 kb
25	-	-
26	4	23,200 kb; 18,035 kb; 10,484 kb; 2,639 kb
27	-	-
28	2	23,200 kb; 3,399 kb
29	-	-
30	-	-
31	8	39,843 kb; 33,637 kb; 22,354 kb; 14,954 kb; 11,114 kb; 4,973 kb; 2,792 kb; 2,443 kb
32	5	29,970 kb; 17,250kb; 10,484 kb; 5,148 kb; 2,753 kb
33	2	22,354 kb; 18,035 kb
34	5	29,970 kb; 17,250kb; 10,484 kb; 5,148 kb; 2,753 kb
35	2	24,893 kb; 2,953 kb
36	1	2,953 kb
M	12	21,226 kb; 5,148 kb; 4,973 kb; 4,268 kb; 3,530 kb; 2,027 kb; 1,904 kb; 1,584 kb; 1,375 kb; 0,947 kb; 0,831 kb; 0,564 kb

*Plazmit içermeyen izolatlara (-) işareti koyulmuştur.

*PS: Suşun içerdği plazmit sayısı, M, Kullanılan moleküler marker ve bant boyutları



Şekil 3. 5. *E. faecalis* 37-54 nolu örnekler plazmit profili görüntüsü , M: Marker (Lamda – EcoRI /HindIII)

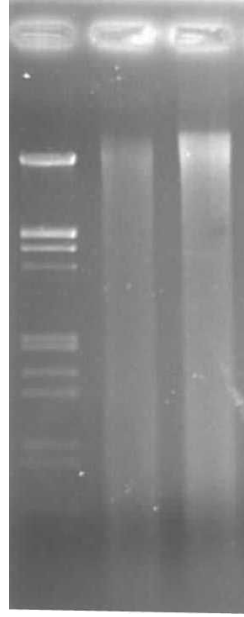
Aşağıda suşların ve moleküler marker'ın içerdikleri plazmit miktarı ve plazmitleri baz boyutları verilmiştir.

Çizelge 3. 3. 37- 54 arası izolatların içerdği plazmitlerin sayıları ve boyutları

Suş No	P.S	Plazmitlerin Boyutu
M	12	21,226 kb; 5,148 kb; 4,973 kb; 4,268 kb; 3,530 kb; 2,027 kb; 1,904 kb; 1,584 kb; 1,375 kb; 0,947 kb; 0,831 kb; 0,564 kb
37	1	9,930 kb
38	-	-
39	-	-
40	-	-
41	-	-
42	-	-
43	-	-
44	-	-
45	-	-
46	-	-
47	1	4,830 kb
48	-	-
49	-	-
50	-	-
51	-	-
52	-	-
53	-	-
54	-	-
M	12	21,226 kb; 5,148 kb; 4,973 kb; 4,268 kb; 3,530 kb; 2,027 kb; 1,904 kb; 1,584 kb; 1,375 kb; 0,947 kb; 0,831 kb; 0,564 kb

*Plazmit içermeyen izolatlara (-) işareti koyulmuştur.

*PS: Suşun içerdği plazmit sayısı, M, Kullanılan moleküler marker ve bant boyutları



Şekil 3. 6. *E. faecalis* 55-56 nolu örnekler plazmit profili görüntüsü, M: Marker (Lamda – EcoRI /HindIII)

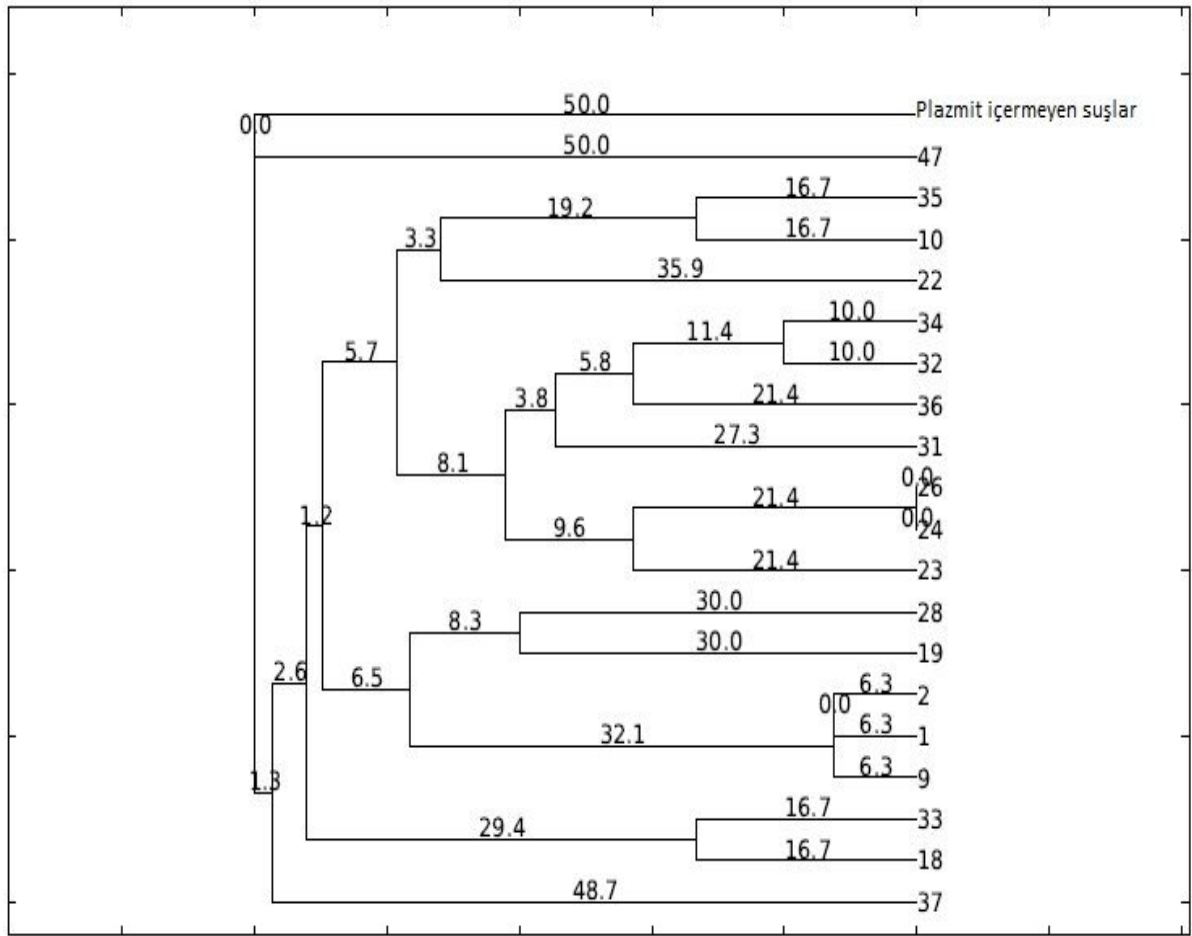
Aşağıda suşların ve moleküler marker'ın içerdikleri plazmit miktarı ve plazmitleri baz boyutları verilmiştir.

Çizelge 3. 4. 55- 56 arası izolatların içerdikleri plazmitlerin sayıları ve boyutları

Suş No	P.S	Plazmitlerin Boyutu
M	12	21,226 kb; 5,148 kb; 4,973 kb; 4,268 kb; 3,530 kb; 2,027 kb; 1,904 kb; 1,584 kb; 1,375 kb; 0,947 kb; 0,831 kb; 0,564 kb
55	-	-
56	-	-

*Plazmit içermeyen izolatlara (-) işareti koyulmuştur.

*PS: Suşun içerdikleri plazmit sayısı, M, Kullanılan moleküler marker ve bant boyutları



Şekil 3. 7. Suşların PyHelp 1.4 programı ile çizilmiş UPGMA dendogramı

Yapılan UPGMA analizi ve gözle yapılan kontrollerde, plazmit içeren 2 veya daha çok izolattan oluşturulmuş 6 küme (cluster) belirlenmiştir. 1-2-9 numaralı isolatlar aynı plazmit içeriğine sahiptirler ve aynı kümede yer almaktadırlar. Bu durum aynı zamanda 24-26 numaralı isolatlar ve 32-34 numaralı isolatlar içinde geçerlidir. İzolatlar farklı örneklerden izole edilmiş olmasına rağmen aynı plazmit profillerini göstermeleri klonal yayılımın bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

4. TARTIŞMA

Bakteriyel genlerin yatay gen transferi ile yayılımından sorumlu etkenler; bakteriyofajlar, plazmitler ve transpozonlardır. Plazmitler bakterilerde bulunan ekstra kromozomal DNA molekülleridir. Bakterilerin içinde özellikle bulunması gerekmez fakat konakçılara içerdikleri genler sayesinde seçici ortam koşullarında hayatta kalmalarını sağlayabilirler. Bu seçici ortamlarda hayatta kalmayı sağlayan genleri içeren plazmitler bakteriden bakteriye aktarılabilir bu özellik bakterilerin çevreye adaptasyonunu kolaylaştırmaktadır. Bakterilerdeki plazmitleri belirleyerek bakterilerin yayılımını incelenilmektedir. Bu şekilde klonal yayılım hakkında bilgi sahibi olabiliriz. Ayrıca bir bakteride bulunan plazmitler, bakterilerin antibiyotik direncinin ve patojenitesinin artmasına neden olmaktadır. Enterokoklarda antibiyotik direnci ve virulans determinantlarının transferinde plazmitlerin etkin bir rolünün olması, bu kromozom dışı DNA elementlerini çok önemli bir hale getirmiştir (Gilmore 2002). Şimdiye kadar ki bilgilerimize göre, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının plazmit profillerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, yöremizdeki mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokok suşlarının plazmit profillerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Enterokokların genellikle çok sayıda plazmit içerikleri bilinmektedir. Rosvoll ve ark (2010) 93 klinik *E. faecium* izolatının 88'inde, 1 ile 7 arası plazmitin olduğu belirlenmiştir. Rosvoll ve ark yaptıkları çalışmada suşlarda plazmit bulunma oranı % 94'lerde iken, bizim yaptığımız çalışmada % 33,9 olarak bulunmuştur. Klinik izolatlar saha izolatlarından daha çok antibiyotik etkisinde kaldıklarından dolayı izolatların plazmit içermesi oranının daha fazla olduğu düşünülebilir.

Coleri ve ark (2004), klinik enterokok izolatlarında büyüklükleri 2.08 ile 56.15 kb arasında ve sayıları 1 ile 11 arasında değişen plazmit içeriği saptamıştır. Ayrıca bu araştırmada enterokoklarda plazmit üzerinde kodlanan bir antibiyotik direnç geni tespit edilmiştir. Bizim yaptığımız mastitisli sığırlarda *E. faecalis* suşlarındaki plazmit izolasyonunda, izolatların içermiş oldukları plazmit miktarı 1-8 arasında bulunmuştur ve

büyüklikleride yaklaşık 1,73 kb ile 41 kb arasında değişmektedir. Yine klinik izolatların daha fazla antibiyotik baskısına uğraması, bakteriler açısından yaşam gücünü arttıracak genleri içeren plazmitlerin daha çok bulunmasına sebebiyet vermiş olabilir.

Abriouel ve ark (2006) ise gıda kaynaklı izolatların 2,5 ve 53 kb büyüklüğünde plazmitler barındırdığını ve enterekoklardaki virulans determinantlar ve antibiyotik direnç özelliklerinin plazmit kaynaklı olabileceğini belirtmiştir. Toğay ve ark (2010) fermente gıdalarda yaptıkları çalışmada, *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında 1 ile 4 adet plazmit içerdikleri, boyutlarının ise 5148-21226 bp arasında ya da daha büyük olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada *vanA* geni içeren ve orta düzeyde vankomisin direncine sahip iki suşun, 21 kb veya daha büyük plazmit içerdiği bildirilmiştir. Çalışmada *vanA* direnç geni içeren suşların aynı bezer plazmit içeriklerine sahip olmaları, direnç geninin plazmit aracılığı ile taşındığını düşündürmektedir.

Mannu ve ark (1998) yöresel bir İtalyan peynirinden izole ettikleri enterekoklar'la yapmış oldukları çalışmada 49 enterekok suşunun 24 tanesi, iki ya da daha fazla izolatın aynı plazmit paternini gösterdiği 7 kümeye toplanmıştır. 16 izolat ise diğer plazmitlerle uyuşan bir plazmit paternine sahip değildirler. Çalışmada 9 izolatta ise yapılan plazmit izolasyonu sonucu plazmitten yoksun oldukları belirlenmiştir. Ekstra kromozomal DNA izolasyonu atasal suşun klonal nesillerini tam anlamı ile vurgulamak için bize izin vermiştir. 22 enterekokal izolat 11 yakından ilişkili grup halinde gruplandırılmış bu gruplandırma aynı plazmitleri içeren 2 ve daha fazla suş ile yapılmıştır. Aralarından en fazla plazmit içeren suşları saha tipi suş olarak belirtilmiş, içerdiği plazmit sayısı ise 12-2,7 kb arasında 6 plazmit olarak bildirmişlerdir. Mastitisli sığırlardan izole ettiğimiz *E. faecalis* suşlarında ise 19 izolatta plazmite rastlanmıştır. Saha suşlarından elde ettiğimiz plazmit profilileri ile yaptığımız analizde izolatlar 6 kümeye toplanmıştır ve bazı suşlarda klonal yayılım gözlenmiştir. Buda enterokok etkeninin bir noktadan yayıldığıının göstergesi olabilir.

Mastitisli sığırlarda genel olarak *S. aureus*'izolatlarında plazmit profilendirmesi çalışmaları yapılmıştır. Enterokok etkenleri tek başlarına mastitis oluşturabilmelerine rağmen mastitis olgularından genellikle streptokokkal etkenlerle birlikte izole edilmektedirler (Smith ve Hogan 2003). Aslantaş ve ark (2006) mastitisli sığırlardan izole edilen *S. aureus* suşlarındaki plazmit profilendirme çalışmasında 50 ornekten 47'

sinde plazmite rastlamışlardır ve plazmit boyutlarının ise 1.7 kb ve 24 kb ve daha büyük olan plazmitler olarak gözlenmiştir. En yaygın olarak gözlenen plazmit boyutu ise 19.3 kb plazmit olarak gözlenmiş ve bu plazmit 38 suşta tek olarak gözlenmiştir diğerlerinde ise 2 ile 4 arasında değişen plazmit gözlemlenmiştir.

Arslan ve ark (2009) mastitisli sığırlardan izole edilen 77 *S. aureus* suşunun 75' nin ve 36 *S. intermedius* suşunun hepsi plazmit taşıdığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, benzer antibiyotik direncine sahip suşların benzer plazmit içerdiği gözlenmiştir. *S. aureus* suşlarında bu kadar yüksek oranda plazmite rastlamak düşündürücüdür. Ülkemizde yapılan çalışmalarda stafilokok türlerinde plazmit içeriği oranlarının yüksek olması, enterokok ile stafilokok türleri ile birlikte bulunması durumunda birbirleri ile plazmit aracılığı ile gen transferi yapabilirler ve bu da hem Stafilokokların hemde enterokokların patojenitelerinin artmasına neden olabilir. Buna karşın yurtdışında yapılan Lange ve ark (1999) ve Baumgartner ve ark (1984) yapmış oldukları mastitisli sığırlardan izole edilen *S. aureus* suşlarından plazmit profillerndirmesi çalışmalarında, plazmit içermeyen suşların yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Yüksel (2012), *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında sayıları 3- 15 arasında değişen plazmitlere sahip olduğu belirlenmiştir. Plazmit büyüklükleri ise 35,8 ile 2,4 kb arasında değiştiği belirtilmiştir. Çalışmada 10 tane suşta aynı plazmit içeriğine sahip olduğu gözlenmiştir. Aynı plazmit içeriğine sahip suşların farklı kaynaklardan izole edilmesi klonal yayılımı işaret ettiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 1-8 arasında plazmit içeriği tespit edilmiştir ve plazmitlerin boyutları yaklaşık 1.7 ile 41 kb arasında oldukları bulunmuştur. 1-2-9, 24-26, 34-36 nolu izolatların aynı plazmit içeriklerine sahip izolatlar olduğu tespit edilmiştir ve bu klonal yayılımı desteklemektedir.

Uçan ve ark (2003) mastitisli sığırlardan izole edilmiş *E. coli* suşlarında yaptıkları plazmit profillendirme çalışmasında 30 *E. coli* suşunun 28 tanesinde plazmit tespit etmişler ve bu suşların 11 farklı moleküler büyüklüğe sahip olduğunu belirlemişlerdir. Göz ile hizalayarak ve POPGENE programı ile yaptıkları plazmit profillendirmesinde izolatları 5 kümeye ayrıldığını gözlemlemişlerdir. 2 izolatta plazmit bulunmadığı için aynı kümede ve birbiri ile %100 aynı çıktığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda

kümeleme çalışması sonucunda en az iki ve daha fazla plazmit içeren 6 küme oluşturulmuştur. Plazmit içermeyen suşlar ise tek bir dal olarak gösterilmiştir.

İzolatlar plazmit profilleri ile karakterize edilebilir. Ancak plazmit içeren izolatlar için genetik bir istikrar yoktur. İzolatlar genomlarına yeni plazmitler ekleyebilir yada plazmitler eliminasyona uğrayabilirler. Plazmit profillendirmesi farklı kaynaklardan izole edilen yakın ilişkili izolatlarının antimikrobiyal maddelere karşı ve direncini ve transferi hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayan kullanışlı bir yöntemdir. Plazmit profili analizi, plazmit içeren bakteri suşlarının akrabalık ilişkilerini belirlenimde çok kullanışlı yöntemlerden biridir. Diğer epidemiyolojik ve moleküler yöntemler ile birlikte çalışılmasında yarar vardır (Uçan ve ark 2003).

Yaptığımız bu çalışmada elektroforez jel görüntüsünde bazı plazmitlerin güçlü bazılarının daha zayıf banta sahip oldukları belirlenmiştir. Bu durum, bazı plazmitlerin yüksek kopya sayısına sahip olmaları bazılarında düşük kopya sayısına sahip olmaları ile açıklanabilir.

Plazmitler birçok direnç geni ve virulans faktör genlerini taşıdıkları için plazmit aktarımı sonucu plazmitler gittikçe daha dirençli ve daha patojen hale gelmektedirler. Bu da enterokoklardaki plazmitlerin izlenmesi ve bu konu hakkında daha çok araştırılma yapılması gerekmektedir. Ayrıca plazmit profil analizi yaparak suşların klonal olarak yayılıp yayılmadığını ve atasal suşun nereden kökenlendiğini bulabiliriz. Ayrıca plazmitlerin incelenmesi hayvanlarda, plazmitler açısından hayvanların rezervuar olup olmadıklarını değerlendirmede kullanılabilir.

Gıda sektöründe özellikle virulans genleri kodlayan plazmitlere sahip suşların starter kültür olarak kullanımı ciddi riskler oluşturmaktadır. Bu nedenle plazmit analizleri enterokoklar için tıbbi bir öneme sahiptir (Coleri ve ark 2004, Abriouel ve ark 2006, Rosvoll ve ark 2010). Enterokokların plazmid incelemeleri genel olarak gıda kaynaklı izolatlarda yapılmıştır. Özellikle süttten elde edilen fermente gıdalardan izole edilen enterokok izolatlarında plazmit profillendirmesi çalışmaları yapılmaktadır. Süttten direkt olarak izole edilen enterokoklarda plazmit analizi çalışmalarına rastlamamaktayız. Bu durum mastitis olgusuna sahip hayvanlardaki plazmit aktarımını, plazmit yoğunluğunu gibi plazmit hakkındaki bilgilerimiz sınırlı kalmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Aydın yöresinde enterokoklar mastitislerin etiyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Enterokokların üzerine yapılacak olan her çalışma, bu mikroorganizmanın patogenezinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Enterokokların plazmit profillerinin incelenmesi enterokokların yayılımı ve patojeniteleri hakkında da bilgi edinmemizi sağlamaktadır.

Bu çalışmada mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının plazmit profilleri incelenmiş ve 56 suştan gerçekleştirilen plazmit izolasyonu sonucunda 19 (%33,9) izolatın plazmit taşıdığı belirlenmiştir. Plazmit bulunan suşlarda, 1-8 arasında plazmite rastlanmıştır. Plazmitlerin baz boyutları yaklaşık 1,7 kb ile 41 kb arasında değişmekle birlikte; 1-2-9, 24-26, 32-34 numarlı suşlar kendi aralarında aynı plazmit profillerine sahip oldukları belirlenmiştir. Bu suşlar farklı kaynaklardan izole edilmiş olmalarına rağmen aynı plazmit içeriğine sahip olmaları klonal yayılımın bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Plazmit profillendirme çalışmaları izolatlar arasında ilişkiyi belirleyebilir. Plazmit içeriğine bakarak aynı plazmite sahip suşların klonal yayılımı hakkında bilgi sahibi olabiliriz. Plazmit profillendirilmeleri daha çok farklı kaynaklardan izole edilen birbirleri ile ilişkili suşların direnç genleri, virulans genleri gibi genlerin transferi hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar. İzolatlar plazmit profilleri ile karakterize edilebilir, fakat aynı durum plazmit içermeyen suşlar için geçerli değildir. Bu durum yöntemin en önemli dezavantajıdır. Bu nedenle, plazmit profillendirme çalışmalarının başka bir epidemiyolojik veya moleküler yöntemle birlikte çalışılmasında yarar vardır.

Plazmitler birçok direnç geni ve virulans faktör genlerini taşıdıkları için plazmit aktarımı sonucu plazmitler gittikçe daha dirençli ve daha patojen hale gelmektedirler. Bu da enterokoklardaki plazmitlerin izlenmesi ve bu konu hakkında daha çok araştırılma yapılması gerekmektedir. Ayrıca plazmit profil analizi yaparak suşların klonal olarak yayılıp yayılmadığını ve atasal suşun nereden kökenlendiğini bulabiliriz. Ayrıca

plazmitlerin incelenmesi hayvanlarda, plazmitler açısında hayvanların rezervuar olup olmadıklarını değerlendirmede kullanılabilir.

Gıda sektöründe özellikle virulans genleri kodlayan plazmitlere sahip suşların starter kültür olarak kullanımı ciddi riskler oluşturmaktadır. Bu nedenle plazmit analizleri enterokoklar için tıbbi bir öneme sahiptir (Coleri ve ark 2004, Abriouel ve ark 2006, Rosvoll ve ark 2010). Enterokokların plazmit incelemeleri, genel olarak gıda kaynaklı izolatlarda yapılmıştır. Özellikle süttten elde edilen fermente gıdalardan izole edilen enterokok izolatlarında plazmit profilendirmesi çalışmaları yapılmaktadır. Süttten direkt olarak izole edilen enterokoklarda plazmit analizi çalışmalarına rastlamamaktayız. Bu durum mastitis olgusuna sahip hayvanlardaki plazmit aktarımını, plazmit yoğunluğunu gibi plazmit hakkındaki bilgilerimizi sınırlamaktadır. Bu çalışmada mastitisli sığırlardan izole edilmiş *E. faecalis* suşlarının plazmitleri incelenmiştir ve bu konunun incelenmesi yurdumuzda ilk olma niteliği taşımaktadır.

ÖZET

Öztürk M. Mastitisli Sığır Sütlerinden İzole Edilen *Enterococcus faecalis* Suşlarının Plazmit Profillerinin İncelenmesi

Plazmitler, bakteriden bakteriye antimikrobiyal direnç ve virülans faktör genlerini aktarabilen ekstrakromozomal genetik elementlerdir. Suşlardaki plazmit sayısının artması, suşun patojenitesinin arttığını göstermektedir. Aynı zamanda plazmit profil analizi klonal yayılımı belirleyebilmek için iyi bir moleküler tiplerndirme yöntemi olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* suşlarının plazmit profillerinin incelenmesi amaçlandı. Çalışmada materyal olarak, 600 mastitisli sığır sütünden izole edilen 56 *E. faecalis* izolatu kullanıldı. Enterokok izolasyonu, selektif besiyerleri kullanılarak gerçekleştirildikten sonra, tür düzeyinde identifikasyon polimeraz zincir reaksiyonu ile yapıldı. Ellialtı izolattan plazmit izolasyonunda alkali liziz yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. Plazmid izolasyonu sonucunda, izolatların 19'unun 1 ile 7 arasında plazmit taşıdığı, plazmit boyutlarının da yaklaşık olarak 41 kb ile 1,7 kb arasında değiştiği tespit edildi. Çalışmada, 5 izolat tek plazmit, 14 izolatın ise birden fazla plazmit taşıdığı belirlendi. Plazmid izolasyonunu takiben, profil içerikleri kontrol edilerek, benzer ve aynı plazmitler arasında kümeleme analizi yapıldı. Benzer plazmit profilinde olan, iki veya daha fazla suş içeren 6 küme oluşturuldu.

Bu çalışmada Aydın yöresindeki mastitisli sığırların sütlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının plazmit profilleri ilk kez incelenmiş ve yöredeki saha izolatları arasındaki plazmit yayılımı belirlenerek, izole edilen enterokok suşlarının patojenitesi ve klonal yayılımı hakkında bilgi sahibi olunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Sığır, Mastitis, Plazmit, *Enterococcus faecalis*

SUMMARY

Ozturk M. The Investigation of Plasmid Profiles of *Enterococcus faecalis* Strains Isolated From Mastitic Cow Milks

Plasmids are extrachromosomal elements have capable of transmitting antimicrobial resistance and virulence factor genes from bacteria to bacteria. An increase in the number of plasmids in strains shows patogenicity of the strain is getting increased. Plasmid profile analysis is a one of the most practical molecular typing methods used for determining the clonal expansion in the flock.

The purpose of this study was to investigate the plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* isolated from cow milk samples with mastitis. As a material, 56 *E. faecalis* isolates isolated from 600 milk samples with mastitis were used. After the isolation of the enterococci in selective mediums, identifications on species basis were performed by polymerase chain reaction. Modified alkaline lysis method was used for plasmid isolation. Results revealed that 19 of 56 isolates have plasmids varying one to seven and lengths of those were ranged approximately between 1.7 kb and 41 kb. It was determined that five isolates have only one plasmid while the other 14 have more plasmids. Following the plasmid isolation, cluster analysis was performed between the same and similar plasmids after their profile contends checked. Six clusters that containing two or more strains with similar plasmid profile were formed. Some clues related to clonal expansion has been detected.

This study is the first in Aydın region that plasmid profiles of *E. faecalis* strains isolated from cows' milk with mastitis have been investigated. Briefly, plasmid expansion in the field isolates was determined while the patogenicity and clonal expansion traits of enterococ strains were also investigated.

Key words: Cow, mastitis, Plasmid, *Enterococcus faecalis*

KAYNAKLAR

Abriouel H, Ben Omar N, Lucas R., Martinez-Canamero M ve Galvez A Bacteriocin production, plasmid content and plasmid location of enterocin P structural gene in enterococci isolated from food sources. Letters in Applied Microbiology. 2006; 42: 331–337.

Ahmad G Biodiversity and performance of Rhizobia in relation to plasmid genes and their translation products. Journal of Biological Sciences. 2001; 1: 1134-1137.

Aktaş G, Derbentli Ş Vankomisine dirençli enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. İnfeksiyon Dergisi. 2009; 23: 201-209.

Anderesson MD DNA 6X Loading Dye. Cancer Center.

Erişim 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). Erişim Tarihi: 02.06.2014.

Arda M Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş İkinci Baskı Medisan Yayın Serisi, 2000, Ankara, Türkiye.

Arslan E, Celebi A, Açık L, Uçan US Characterisation of coagulase positive Staphylococcus species isolated from bovine mastitis using protein and plasmid patterns. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2009; 33: 493-500.

Arias, CA, D. Panesso, Singh KV Cotransfer of antibiotic resistance genes and a *hlyEfm*-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009; 53: 4240-4246.

Aslantaş Ö, Öztürk F, Çelebi A, Açık L, Ergün Y Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinic bovine mastitis by protein patterns, antibiotic resistance and plasmid profile, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2006; 53: 47-51.

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

Balla E Dicks LM Molecular analysis of the gene cluster involved in the production and secretion of enterocins 1071A and 1071B and of the genes responsible for the replication and transfer of plasmid pEF1071. International Journal of Food Microbiology. 2005; 99: 33–45.

Baumgartner A, Nicolet J, Eggimann M Plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. Journal of Applied Bacteriology. 1984; 56: 159-163

Baştan A İneklerde Meme Hastalıkları. Hatipoğlu Basımve Yayım San. Tic. Ltd. Şti., 2002, Ankara, Türkiye.

Bradley A Bovine mastitis: an evolving disease. The Veterinary Journal. 2002; 164: 116-128.

Brantl S, Behnke D, Alonso JC Molecular analysis of the replication region of the conjugative *Streptococcus agalactiae* plasmid pIP501 in *Bacillus subtilis*. Comparison with plasmids pAM β 1 and pSM 19035. Nucleic Acids Research. 1990; 18: 4783–4790.

Brown JH The use of blood agar for the study of streptococci. Monographs of the Rockefeller Institute for Medical Research 1919, No: 9.

Clewell DB, Weaver KE, Dunny GM, Coque TM, Francia MV, Hayes F Extrachromosomal and mobile elements in enterococci. Transmission, maintenance and epidemiology. U.S. National Institutes of Health NCBI Bookshelf 2014.

Coleri A, Cokmus C, Ozcan B, Akcelik M ve Tukel C Determination of antibiotic resistance and resistance plasmids of clinical *Enterococcus* species. The Journal of General and Applied Microbiology. 2004; 50: 213–219.

Criado R, Gutierrez J, Budin-Verneuil A, Hernandez PE, Hartke A, Cintas LM, Auffray Y, Benachour A Molecular analysis of the replication region of the pCIZ2 plasmid from the multiple bacteriocin producer strain *Enterococcus faecium* L50. Plasmid. 2008;60: 181–189.

Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG Vancomycin-resistant enterococci. Clinical Microbiology Reviews. 2000; 13: 686-707.

del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R Replication and control of circular bacterial plasmids. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1998; 62: 434–464.

Diker KS, Akan M, Çarlı T, Yardımcı H, Şen A, Ülgen M, Sareyyupoglu B, Çetin C Veteriner Mikrobiyoloji ve Epidemiyoloji. T.C. Anadolu Üniversitesi Yayını No: 2317. Açıköğretim Fakültesi Yayını No: 1314, 2011, Eskişehir, Türkiye.

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

Ehrenfeld EE, Clewell DB, Transfer Functions of the *Streptococcus faecalis* Plasmid pAD1: Organization of Plasmid DNA Encoding Response to Sex Pheromone, Journal of Bacteriology. 1987; 3473-3481

Facklam RR, Teixeria LM *Enterococcus*. In: Collier L, Bolows A, Sussman (eds). Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. Vol: 2 (Systematic Bacteriology). Ed: Edvard Arnold, 9th edition. 1998, Londra, İngiltere.

Fisher K, Phillips C The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology. 2009; 155: 1749-1757.

Flannagan SE, Chow JW, Donabedian SM, Brown WJ, Perri MB, Zervos MJ, Ozawa Y, Clewell DB Plasmid content of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47:3954–3959

Franzetti L, Pompei M, Scarpellini M, Galli A Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. of different origins. *Current Microbiology*. 2004; 49: 255–260.

Francia MV, Clewell DB Amplification of the Tetracycline Resistance Determinant of pAM α 1 in *Enterococcus faecalis* Requires a Site-Specific Recombination Event Involving Relaxase. *Journal of Bacteriology*. 2002;184 :5187–5193

Francia MV, Fujimoto S, Tille P, Weaver KE, Clewell DB Replication of *Enterococcus faecalis* Pheromone-Responding Plasmid pAD1: Location of the Minimal Replicon and oriV Site and RepA Involvement in Initiation of Replication. *Journal of Bacteriology*. 2004;186: 5003–5016

Freitas AR, Novais C, Tedim AP, Francia MV, Baquero F, Peixe L, Coque TM Microevolutionary events involving narrow host plasmids influences local fixation of vancomycin-resistance in *Enterococcus*. *PLoS ONE*. 2013; 8: 60589.

Freitas AR, Tedim AP, Francia MV, Peixe L, Novais C, Jensen LB, Willems RJ, Baquero F, Coque TM The spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (1986-2009): an historic view from the plasmid side. In editorial revision 2012

Freitas AR, Novais C, Cunha A, Silveira E, Peixe L, ve Coque TM Plasmid analysis of vancomycin-resistant enterococci isolates from Portuguese poultry and healthy humans. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna 2010.

French GL Enterococci and vancomycin resistance. *Clinical Infection Diseases*. 1998; 27: 75–83.

Garcia-Migura L, Hasman H, Jensen LB Presence of pRI1: a small cryptic mobilizable plasmid isolated from *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *Current Microbiology* 2009;58: 95–100.

Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, ABD. 1994

Gilmore M The Enterococci: Pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance. American Society for Microbiology. Washington DC, ABD. 2002

Grady, R. and F. Hayes Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Molecular Microbiology*. 2003; 47:1419-1432

Gültekin M Enterokoklar: Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenezi. Gram Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Ankara 2004: 121-140.

Hardesty C, Colon G, Ferran C, DiRienzo JM Deletion analysis of sucrose metabolic genes from a salmonella plasmid cloned in *Escherichia Coli* K12. *Journal of Plasmid*. 1987;18: 142-155

Hardie JM, Whiley RA Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology*. 1997; 83: 1-11.

Hugas M, Garriga M, Aymerich MT Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 88: 223-233.

İşleroğlu H, Yıldırım Z, Demirpençe Y, Yıldırım M Enterokoklar: biyokimyasal, fizyolojik ve fonksiyonel özellikleri ile patojenitesi. *Akademik Gıda*. 2008;6: 16-26.

Jensen LB, Garcia-Migura L, Valenzuela AJ, Lohr M, Hasman H, Aarestrup FM A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 2010;80: 25–43.

Jerman B, Butala M, Zgur-Bertik D Sub lethal concentration of ciprofloxacin induce bacteriocin synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49: 3087-3090.

Kim SW, Jeong EJ, Kang HS, Tak JI, Bang WY, Heo JB, , Jeong JY, Yoon GM, Kang HY, Bahk JD Role of RepB in the replication of plasmid pJB01 isolated from *Enterococcus faecium* JC1. *Plasmid*. 2006;55: 99–113.

Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 88: 269–290.

Klare I, Werner G, Witte W Enterococci. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. *Contributions to Microbiology*. 2001; 8:108–122.

Klein G Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 88: 123-131

Kwong SM, Lim R, Lebard RJ, Skurray RA, Firth N Analysis of the pSK1 replicon, a prototype from the staphylococcal multiresistance plasmid family. *Microbiology*. 2008;154:3084–3094.

Kwong SM, Skurray RA, Firth N Replication control of staphylococcal multiresistance plasmid pSK41: an antisense RNA mediates dual-level regulation of Rep expression. *Journal of Bacteriology*. 2006;188: 4404–4412.

Kwong SM, Skurray RA, Firth N *Staphylococcus aureus* multiresistance plasmid pSK41: analysis of the replication region, initiator protein binding and antisense RNA regulation. *Molecular Microbiology*. 2004;51: 497–509.

Lange C, Cardoso M, Senczek D, Schwarz S Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary Microbiology*. 1999; 67: 127-141.

Lancefield RC A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine*. 1933; 57: 571–595.

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.

Laverde-Gomez JA, van Schaik W, Freitas AR, Coque TM, Weaver KE, Francia MV, Witte W, Werner G A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a hyl(Efm) genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011; 301: 165–175.

LeBlanc, DJ, Crow VL, Lee LN, Garon CF Influence of the lactose plasmid on the metabolism of galactose by streptococcus lactis. *Journal of Bacteriology*. 1979; 137: 878-884

Lodish H, Berk A, Zipursky SL *Molecular Cell Biology*. 4th baskı Bölüm 7.1. DNA Cloning with Plazmit Vectors. New York: W. H. Freeman 2000.

Martinez-Bueno M, Valdivia E, Galvez A, Maqueda M pS86, a new theta-replicating plasmid from *Enterococcus faecalis*. *Current Microbiology*. 2000;41: 257–261.

Masson L ve Ray DS Mechanism of autonomous control of the *Escherichia coli* F plasmid: purification and characterization of the repE gene product. *Nucleic Acids Research* 1988; 1: 413–424.

Mazodier, P ve Davies J Gene transfer between distantly related bacteria. *Journal of Annual Reviews of Genetics*. 1991; 25: 147–171

Madigan MT ve Martinko JM Brock Mikroorganizmaların biyolojisi 11. Baskı 2010; 10: 274-279.

Moellering JC *Enterococcus* species. In: Mandell G. L, ve ark (Eds). Principles and Practise of Infectious Diseases, 5th Ed. NewYork: Churcill Livingstone 2000; 2147-2156.

Moellering RC *Enterococcus* Species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* Species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases (6th ed). Churchill Livingstone, Philadelphia 2005; 2411-2417

Murray BE Diversity among multidrug-resistant enterococci. Emerging Infectious Diseases Journal. 1998; 4: 37-47.

Murray BE The life and times of the Enterococcus. Clinical Microbiology Reviews. 1990; 3: 46–65

Novick RP Plasmid incompatibility. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1987; 51:381-395

Otten L, De Ruffray P *Agrobacterium vitis* nopaline Ti plasmid pTiAB4: relationship to other Ti plasmids and T-DNA analysis. Molecular Genetics and Genomics. 1994; 245: 493–505.

Panesso D, Montealegre MC, Rincon S, Mojica MF, Rice LB, Singh KV, Murray BE, Arias CA The *hlyEfm* gene in pHylEfm of *Enterococcus faecium* is not required in pathogenesis of murine peritonitis. BMC Microbiology. 2011; 11: 20-20

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: 4231-4246.

Pyörala S Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*. 2003; 34: 565-578

Rice LB, V. Lakticova, L.L. Carias, Rudin S, Hutton R, Marshall SH Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model. *The Journal of Infectious Diseases*. 2009; 199: 342-349.

Riley MA, Cadavid L, Collett MS, Neely MN, Adams MD, Phillips CM, Neel JV, Friedman D The newly characterized colicin Y provides evidence of positive selections in pore-former colicin diversification. *Journal of Microbiology*. 2000; 146: 1671-1677.

Rossitto PV, Ruiz L, Kikuchi Y, Glenn, K, Luiz K, Watts JL, Cullor JS Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. *Journal of Dairy Science*. 2002; 85: 132–138.

Rosvoll TC, Pedersen T, Sletvold H, Johnsen PJ, Sollid JE, Simonsen GS, Jensen LB, Nielsen KM, Sundsfjord A PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHTbeta-related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2010; 58: 254–268.

Sambrook J, Fritsch EF, Shuman HA *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.

Sherman JM THE STREPTOCOCCI. *Bacteriological Reviews*. 1937;1: 3–97

Sirard JC, Mock M, Fouet A The three *Bacillus anthracis* toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature. *Journal of Bacteriology*. 1994; 176: 5188–5192

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.

http://cals.arizona.edu/extension/dairy/conference/proceedings/environmental_mastitis.pdf accessed 2003.

Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A Enterococcal infections & antimicrobial resistance. Indian Journal of Medical Research. 2008; 128: 111-121.

Takiguchi R. Hashiba H. Aoyama K. Ishii S Complete nucleotide sequence and characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*. Applied and Environmental Microbiology. 1989; 55: 1653–1655.

Tanaka T. Ogura M A novel *Bacillus natto* plasmid pLS32 capable of replication in *Bacillus subtilis*. FEBS Letters. 1998; 422: 243–246.

Tanaka T, Ishida H, Maehara T Characterization of the Replication Region of Plasmid pLS32 from the Natto Strain of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology. 2005; 187: 4315–4326.

Teixeira LM, Carvalho MGS, Facklam RR *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology (9th ed) ASM Press, Washington DC 2007, 430-442.

Temiz A Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınevi. Ankara. 2000, Sayfa: 291

Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. Cellular and Molecular Life Sciences. 2003; 60: 2622–2636.

Todokoro D. Tomita H. Inoue T. Ike Y Genetic analysis of bacteriocin 43 of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Applied and Environmental Microbiology. 2006; 72: 6955–6964.

Uçan US, Açık L, Çelebi A, Erganiş O, Arslan E Plasmids and Protein Patterns of *Escherichia coli* Isolated from Bovine Mastitis in Konya, Turkey Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2005; 29: 475-480

Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umapathy BL Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. Indian Journal of Medical Microbiology. 2009; 27: 301- 305.

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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2006; 101: 716-719.

Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Ohnishi M, Murata T, Nakayama K, Asakawa K, Ohara M, Komatsuzawa H, Sugai M Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. Infection and Immunity. 2001; 69: 7760–7771.

Yüksel FN Gıda kaynaklı *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarında virülans faktörlerin berlieni, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye 2012.

Zhu W, Clark NC, McDougal LK, Hageman J. McDonald LC, Patel JB Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like vanA plasmids in Michigan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2008;52: 452–457.

Watts JL Characterization and identification of Streptococci isolated from bovine mammary glands. Journal of Dairy Science 1988; 71: 1616-1624.

Watanabe T Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriological Reviews. 1963; 27: 87-115.

Weaver KE, Kwong SM, Firth N, Francia MV The RepA_N replicons of Gram-positive bacteria: a family of broadly distributed but narrow host range plasmids. Plasmid. 2009; 61: 94–109.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İstanbul’da doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini İstanbul’da bitirdi. Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde 2011 yılında lisans eğitimi tamamladı. 2011 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Done Genetik ve Biyoinformatik AŞ.’nde 2014 yılından beri çalışmaya devam etmektedir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca yardımlarını benden esirgemeyen, danışman hocam Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ' a, sahip olduğuengin bilgi ve tecrübelerini tüm öğrencilerle ve öğretim üyeleriyle paylaşan bizlere daima destek olan sorularımızla sürekli başını ağrıttığımız değerli hocamız ADÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, çalışmalarım da her an desteklerini gördüğüm başta ADÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA, Prof. Dr. Şükrü KIRKAN, Doç. Dr. Serap SAVAŞAN, Yrd. Doç. Dr. Göksel ERBAŞ ve özellikle de Yrd. Doç. Dr. Uğur PARIN'a, tercüme ler konusunda destek olan ADÜ Veteriner Fakültesi Zoote kni Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet Kenan Türkyılmaz'a, tez im için materyal toplamama yardımcı olan Uzm. Vet. Hek. Seyhan KAYNARCA ve Uzman Hemşire Emel İNEGÖL'e, tez sürecim boyunca manevi desteğini eksik etmeyen arkadaşlarım Kamil Candan, Nurettin Beşer, Ekrem Tınaz, Uzm. Biyolog Ömer Yıldız, Dr. Erman Oryaşın' a ve çalışmam boyunca koşulsuz yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.