



RESEARCH ARTICLE

Mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* izolatlarının plazmid profillerinin incelenmesi

Mehmet Öztürk¹, Süheyla Türkyılmaz^{2,*}

¹Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, ²Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Geliş: 15.11.2016, Kabul: 26.12.2016

*sturkyilmaz@adu.edu.tr

Investigation of plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* isolated from mastitic cow milks

Eurasian J Vet Sci, 2017, 33, 1, 54-59

DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2016.136

Öz

Amaç: Bu çalışmada mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* izolatlarının plazmid profillerinin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmanın materyalini geçmiş yıllarda izole edilmiş olan 54 *E. faecalis* izolatı oluşturdu. Bakterilerden plazmid izolasyonunda alkali lizis yöntemi modifiye edilerek kullanıldı.

Bulgular: Plazmid izolasyonu sonucunda, izolatların 19'unun bir ile sekiz arasında plazmid taşıdığı, plazmid boyutlarının da yaklaşık olarak 0.6 kb ile 41 kb arasında değiştiği tespit edildi. Çalışmada, 5 izolat tek plazmid ve 14 izolatın ise birden fazla plazmid taşıdığı saptandı. Plazmid izolasyonunu takiben, profil içerikleri kontrol edilerek, plazmidler arasında kümeleme analizi yapıldı. Benzer plazmid profilinde olan iki veya daha fazla suş içeren 6 küme belirlendi.

Öneri: Bundan sonraki çalışmalarda, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen diğer enterokok türlerinin plazmitleri araştırılıp, bu plazmitlerin antibiyotik dirençliliğine katkıları incelenebilir.

Anahtar kelimeler: Sığır, mastitis, plazmid, *Enterococcus faecalis*

Abstract

Aim: The purpose of this study was to investigate the plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* isolated from cow milk samples with mastitis.

Materials and Methods: As a material, 54 *E. faecalis* strains isolated in the past years from milk samples with mastitis were used. Modified alkaline lysis method was used for plasmid isolation from bacteria.

Results: Results revealed that 19 of isolates have plasmids varying one to eight and lengths of those were ranged approximately between 0.6 kb and 41 kb. It was determined that five isolates had only one plasmid while the other 14 had more plasmids. Following the plasmid isolation, cluster analysis was performed between the same and similar plasmids after their profile contents checked. Six clusters that containing two or more strains with similar plasmid profile were formed.

Conclusion: Further studies should be designed to investigate the plasmids of other enterococci strains isolated from mastitis cow's milks whether plasmids are responsible for antibiotic resistance.

Keywords: Cow, mastitis, plasmid, *Enterococcus faecalis*



Giriş

Geniş bir konakçı dağılımına sahip olan enterokoklar, hayvanların sindirim sisteminin doğal flora bakterileri olup, özellikle sağım hijyenine özen gösterilmediği ve altlık temizliğinin iyi yapılmadığı sürülerde memeleri infekte ederek mastitise sebep olurlar. Meme başı kanalından giren etkenler meme kanalı boyunca yerleşip kolonize olurlar ve meme bezinde enfeksiyona ilişkin klinik bulgular meydana getirirler. Enterokoklar, tek başlarına mastitis oluşturabilmelerine rağmen, genellikle diğer mikroorganizmalarla birlikte izole edilmektedirler (Smith ve Hogan 2009). Çevresel bir epidemiyolojiye sahip olan enterokoklar, insanlarda nozokomiyal enfeksiyonlarda önemli bir problem haline gelmelerine rağmen epidemiyolojileri konusunda bilgiler yetersizdir (Petersson-Wolfe ve ark 2007). Türkiye'de mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokoklarla ilgili olarak yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır (Kuyucuoğlu 2011).

Plazmidler bakterilerde bulunan ekstra-kromozomal DNA molekülleridir. Her bakteride mutlaka bulunmaları gerekmez. Ancak bir bakteride plazmid bulunması, içerdikleri genler sayesinde, seçici ortam koşullarında konakçılarının daha kolay hayatta kalmalarına ve çeşitli antibiyotiklere karşı dirence neden olabilir. Plazmidler bakteriden bakteriye aktarılabilir ve taşıdıkları özellikleri diğer bakterilere kazandırabilirler. Sonuç olarak, bakterilerde antibiyotik direncinin ve patojenitelerinin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca plazmid profilendirmesi çalışmaları suşların klonal yayılımına sahip olup olmadığını anlamamızı sağlamaktadır. Suşların plazmid içerikleri ne kadar plazmid taşıdıklarını ve ne kadar patojen olduklarını anlamamız açısından önemlidir (Coleri ve ark 2004).

Bu çalışmada, Aydın yöresinde mastitisli sığır sütlerinden elde edilen *Enterococcus faecalis* izolatlarının plazmid profillerinin incelenmesi amaçlandı. Böylece, yöredeki saha izolatları arasındaki plazmid yayılımı belirlenerek, izole edilen enterokok suşlarının patojenitesi ve klonal yayılımı hakkında bilgi elde edilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Örnekler

Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na çeşitli işletmelerden, son iki yıl içerisinde getirilen 620 (klinik veya subklinik) mastitisli sığır süt örneğinden izole edilmiş olan 54 adet *E. faecalis* izolatı materyal olarak kullanıldı. Çalışmada plazmid DNA'sının izolasyonunda TEG ve alkali solüsyonları kullanıldı. 100 mL TEG (Tris-HCl, EDTA, Glukoz) solüsyonu 0.786 g Tris HCl, 0.354 g EDTA ve 1.8 g glikoz içerir. 20 mL alkali lizis solüsyonu içerisinde 1 mL %20'lik SDS, 8 mL 0.5 N NaOH ve 11 mL dH₂O bulunmaktadır.

Marker

Plazmid DNA'sının elektroforezinde EcoRI (Fermentas) ve HindIII (Fermentas) enzimi ile kesilmiş lambda (λ) faj DNA'sı (Fermentas), diğer elektroforez işlemlerinde 100 bp DNA ladder (Fermentas) kullanıldı. EcoRI ve HindIII enzimi ile kesilmiş Lambda Faj DNA'sının hazırlanışı: 30 μ L λ DNA, 30 μ L 10X buffer, 4 μ L EcoRI enzimi ve 4 μ L HindIII enzimi, 232 μ L enjeksiyonluk distile su ile karıştırıldı. Bir saat 37°C'de bekledikten sonra 60 μ L loading dye eklendi. Her elektroforez reaksiyonu için 7 μ L Lambda Faj DNA'sı kullanıldı.

Enterococcus sp. izolasyonu

Mastitisli sığırlardan alınan süt örnekleri laboratuvara getirildikten sonra ilk olarak selektif enterokok M buyyona bir öze dolusu inokule edildi. Buyyonlar aerobik koşullarda 37°C'de, besiyerinin parlak sarı rengi mavi-yeşil renge dönüşünceye kadar, yaklaşık 24-72 saat bekletildi. Mavi-yeşil renk olan buyyonlardan bir öze dolusu alınarak, selektif enterokokosel agara ekimleri yapıldı. Besiyeri 37°C'de aerobik koşullarda 24-48 saat süreyle inkube edildi (besiyerinde renk değişimi enterokok üremesinin göstergesi olarak değerlendirildi). Besiyerinde üreyen siyah, koyu kahverengi koloniler *Enterococcus* sp. yönünden şüpheli kabul edilerek, incelemek üzere tekrar BBL™ Enterococcosel Agar (EA)'a pasajlandı (Özkuyumcu ve ark 1998, Yıldız ve Türkyılmaz 2015).

Enterococcus sp. ve E. faecalis identifikasyonu

Enterokokların cins düzeyinde ayırımı için ekilen selektif besiyerinde üreyen *Enterococcus* sp. 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 Nutrient Broth (NB)'da üreyebilen ve katalaz negatif olan kolonilerin identifikasyonları için EA pasajları yapıldı ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Süre sonunda şüpheli koloniler moleküler yöntemler kullanılarak tanıya edilmeye kadar -20°'de %20 gliserinli BHIB içerisinde saklandı. Elde edilen enterokok şüpheli izolatları ve bunlar içerisindeki *E. faecalis* olanları tanıya etmek için spesifik primer çifti kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gerçekleştirildi.

Bakteriyel DNA ekstraksiyonu

Enterokoklardan DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. DNA saflık kontrolü ve miktar tayinleri yapıldıktan sonra PZR'da kullanıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonu

Fenotipik olarak *Enterococcus* sp. olduğu belirlenen izolatların cins düzeyinde identifikasyonları spesifik primerler kul-





lanılarak PZR ile doğrulandı. Bunun için Ke ve ark (1999)'nın belirttikleri metoda göre *Enterococcus* cins spesifik tuf genin 112 bp bölgesinin çoğaltılmasında Ent F [5'-TACTGACAAAC-CATTCATGATG-3'] ve Ent R [5'-AACTTCGTCACCAACGCGA-AC-3'] primerleri kullanıldı. Genotipik olarak *Enterococcus* sp. oldukları doğrulanan izolatların tür düzeyinde identifikasyonları Vilela ve ark (2006)'nın belirttikleri metoda göre *Enterococcus faecalis* spesifik ddLE. *faecalis* genin 475 bp bölgesinin çoğaltılmasında DD F [5'-CACCTGAAGAAACAGGC-3'] ve DD R [5'-ATGGCTACTTCAATTTTCACG-3'] primerleri kullanıldı. PZR'da pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212, negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 suşları kullanıldı. Her iki PZR'da ürününün çoğaltılmasında, elde edilen bakteriyel DNA'dan 3 µL olacak şekilde toplam 30 µL reaksiyon miktarı için son konsantrasyon Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, magnesium klorür (MgCl₂) 2 mM, dNTP 0.2 mM, primer (her biri için) 0.4 pmol, Taq DNA polymerase (Fermentas) 1.5 U olacak şekilde gerçekleştirildi. Her iki PZR reaksiyonu için tüpler thermal döngüleme cihazına (Boeco Thermal Cycler) yerleştirildikten sonra sikluslar 95°C'de 5 dk başlangıç denatürasyonu, 30 döngü 95°C'de 30 sn denatürasyon, 53°C 30 sn primerlerin bağlanması, 72°C 60 sn uzama ve 72°C'de 15 dk son zincir uzaması ile gerçekleştirildi. Yüz voltda 45 dk elektroforez süresinin ardından PZR ürünlerinin görüntülenmesi 0.5 µg/mL etidyum bromid içeren %2'lik agaroz jelde elektroforezi ile gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi sonucunda *Enterococcus* sp. için 112 bp (Ke ve ark 1999) *E. faecalis* için 475 bp (Vilela ve ark 2006) bant uzunluğu pozitif olarak değerlendirildi.

Plazmid DNA'sının izolasyonu

Plazmid izolasyonunda alkali lizis yöntemi modifiye edilerek kullanıldı (Ehrenfeld ve Clewell 1987). Bu yöntem aşağıdaki gibi gerçekleştirildi: Her bir izolatın 5 mL Brain Heart Infusion Broth (BHIB)'a ekim yapıldı ve 37°C'de etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonra santrifüj edilip, bakteri hücreleri çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Dipte oluşan peletin üzerine sırasıyla 200 µL TEG (Tris-EDTA-Glikoz) ve içerisine 3 mg/mL lizozim eklendi. Örnekler, 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İçerisine 300 µL alkali lizis solüsyonu eklenip 5 dk buz içerisinde bekletildi ve sonra üzerine %30'luk potasyum asetat eklenerek, tekrar 5 dk buz içerisinde bekletildi. Buz içerisinde çıkardıktan sonra 5 dk +4°C 13000 g'de santrifüj yapıldı. Süpernatant 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. Süpernatant 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. Süpernatant atılıp, oluşan pellet 20 µL (50 mM) Tris HCL ile sulandırıldı. Elde edilen plazmid DNA'sı

kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

Elde edilen plazmid DNA'sının elektroforezi için 2 µL 6x loading dye boyası ile 10 µL elde edilen plazmid DNA'sı karıştırıldı. Oluşturulan karışımdan 12 µL alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi. Hazırlanan %0.8 jelle istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 60V 400A akımda 300 dakika yürütüldü. Elektroforez süresinin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde içerisinde etidyum bromür olan tanka konuldu. Burada 15 dk boyanmaya bırakıldı. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. Marker plazmid DNA'sının bant boyutları baz alınarak, izolatlar için plazmid DNA bantlarının boyları hesaplandı. Değerlendirme için jel UV ışığı altında InfinityCapt programında fotoğraflandı. Bant profillerinin, PyElpH 1.4 programı kullanılarak UPGMA (Unweighted Pair Group Average) analiz yöntemi ile dendogramı oluşturuldu. Bantlara bağlı benzerlik katsayısına göre izolatlar arasında ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısı hesaplamasında bant profil toleransı %1.5 olarak belirlendi.

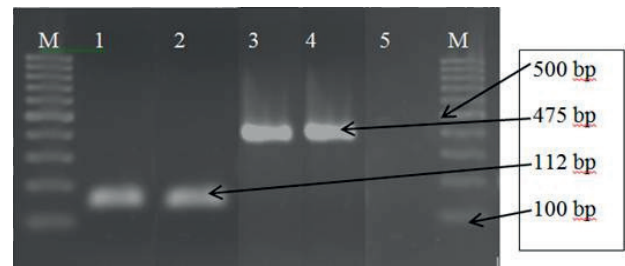
Bulgular

Enterococcus sp. ve *E. faecalis* identifikasyonu

Çalışmada 620 (klinik veya subklinik) mastitisli sığır süt örneğinin incelenmesi sonucunda 96 (%15.4) *Enterococcus* sp. ve bu izolatlar içerisinde 54 (%56.2) *E. faecalis* identifikasyonu yapıldı (Şekil 1).

Bakteriyel plazmid DNA'sının izolasyonu

Çalışmada incelenen 54 *E. faecalis* suşunun 19 (%35.2) tanesinin plazmid taşıdığı belirlendi. İzole edilen plazmidlerin sayılarının, bir suşta 1-8 arasında değiştiği tespit edildi. Bu izolatların 5 tanesi tek plazmid içermesine rağmen, kalan 14 izolat birden fazla plazmidde sahipti. Vilber Lourmat'ın Infinity Capt adlı programı ve moleküler büyüklüğü bilinen marker temel alınarak *E. faecalis*'lerden izole edilen plazmid DNA'larının boyutlarının yaklaşık 0.6 kb ile 41 kb arasında

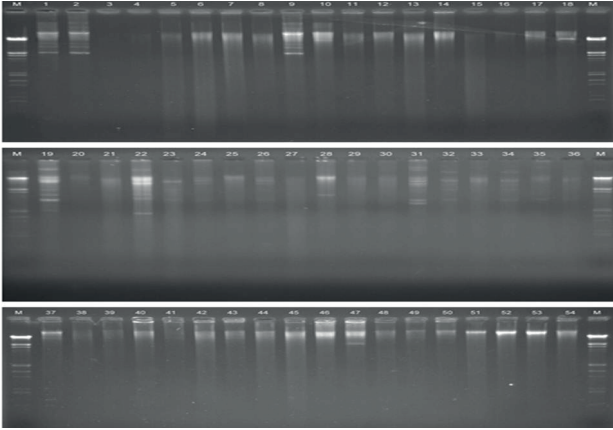


Şekil 1. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp DNA marker, 1: *Enterococcus* sp. saha izolatu 2: Pozitif Kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212), 3: *E. faecalis* saha izolatu 4: Pozitif Kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) 5: Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922).



Tablo 1. İzolatların içerdiği plazmitlerin sayıları ve boyutları.

No	Suş no	Plazmid sayısı	Plazmid Boyutu
1	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	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	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
4	10	1	17.990 kb
5	18	1	20.575 kb
6	19	7	34.765 kb; 20.424 kb; 11.114 kb; 4.654 kb; 3.184 kb; 2.912 kb; 1.924 kb
7	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
8	23	3	17.250 kb; 5.260 kb; 2.676 kb
9	24	4	23.200 kb; 18.035 kb; 10.484 kb; 2.639 kb
10	26	4	23.200 kb; 18.035 kb; 10.484 kb; 2.639 kb
11	28	2	23.200 kb; 3.339 kb
12	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
13	32	5	29.970 kb; 17.250 kb; 10.484 kb; 5.148 kb; 2.753 kb
14	33	2	22.354 kb; 18.035 kb
15	34	5	29.970 kb; 17.250 kb; 10.484 kb; 5.148 kb; 2.753 kb
16	35	2	24.893 kb; 2.953 kb
17	36	1	2.953 kb
18	37	1	9.930 kb
19	47	1	4.830 kb



Şekil 2. E. faecalis 1-54 nolu örnekler plazmid profili görüntüsü, M: Marker (Lamda-EcoRI /HindIII) (Markerin içerdiği baz boyutları: 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).

değiştirdiği saptandı. İdentifiye edilen *E. faecalis* izolatlarının içerdikleri plazmidlerin görüntüsü ve plazmidlerin büyüklükleri aşağıda verilmiştir (Şekil 2, Tablo 1). Plazmid izolasyonu takiben, profil içerikleri kontrol edilerek, benzer ve aynı plazmidler arasında kümeleme analizi yapıldı. Aynı uzunlukta bant taşıyan 3 grup izolat (1. Grup: 1-2-9, 2. Grup: 24-26, 3. Grup: 32-34) bulunmaktaydı. İzolatlar farklı örneklerden izole edilmiş olmasına rağmen aynı plazmid profillerini göstermeleri klonal yayılımın bir göstergesi olarak kabul edile-

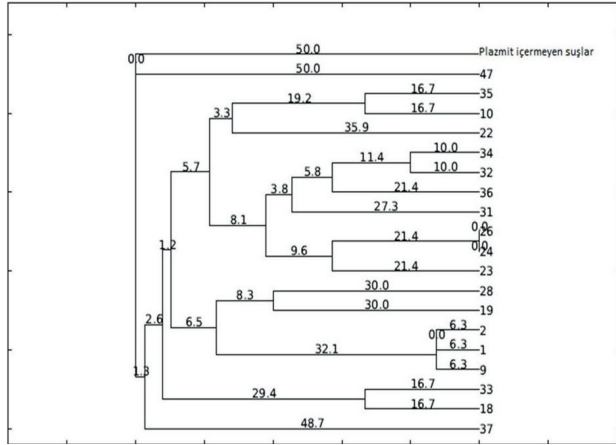
bilir. Tüm izolatların klonal ilişkileri toplu olarak değerlendirildiğinde ise benzer plazmid profilinde olan, birbirleri ile yakın ya da uzak ilişkili, iki veya daha fazla izolat içeren 6 küme oluşturuldu (1. Küme: plazmid içermeyen grup, 2. Küme: 47 nolu izolat, 3. Küme: 35, 10, 22, 34, 32, 36, 31, 26, 24, 23 nolu izolatlar, 4. Küme: 28, 19, 2, 1, 9 nolu izolatlar, 5. küme: 33, 18 nolu izolatlar, 6. küme: 37 nolu izolat) (Şekil 3).

Tartışma

Plazmid profil analizi, plazmid içeren bakterilerin akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden birisidir. Plazmidler birçok direnç geni ve virulens faktör genlerini taşıdıkları için plazmid aktarımı sonucu plazmidler gittikçe daha dirençli ve daha patojen hale gelmektedirler. İzolatlar plazmid profilleri ile karakterize edilebilir. Ancak, plazmid içeren izolatlar için genetik bir istikrar yoktur. İzolatlar genomlarına yeni plazmidler ekleyebilir ya da plazmidler eliminasyona uğrayabilirler. Bu nedenle izolatlar arasındaki klonal ilişkinin diğer epidemiyolojik ve moleküler yöntemler ile birlikte değerlendirilmesinde yarar vardır (Uçan ve ark 2005).

Enterekokların genellikle çok sayıda plazmid içerikleri bilinmektedir. Rosvoll ve ark (2010) *E. faecium* klinik vakalardan elde ettikleri vankomisin dirençli izolatlarının %94'ünün 1 ile 7 arasında plazmid taşıdığını belirlemişlerdir. Rosvoll ve





Şekil 3. Suşların PyHelp 1.4 programı ile çizilmiş UPGMA dendrogramı.

ark (2010) yaptıkları çalışmada suşlarda plazmid bulunma oranı %94 iken, bizim yaptığımız çalışmada %33.9 olarak bulunmuştur. Klinik kaynaklı vankomisin dirençli *E. faecium* izolatları önemli hastane enfeksiyonu etkenlerindedirler (Eroğlu ve ark 2003). Bu nedenle Rosvoll ve ark (2010)'nın yaptıkları çalışmada elde ettikleri *E. faecium* izolatları bizim izolatlarımızdan daha yoğun antibiyotik etkisine maruz kalmış olabilir. Bundan dolayı plazmid içermeye oranlarının daha fazla olduğu düşünülmektedir.

Coleri ve ark (2004) insanlardan izole ettikleri klinik enterokok örneklerinde büyüklükleri 2.08 kb-56.15 kb arasında ve sayıları 1 ile 11 arasında değişen plazmid içeriği saptamışlardır. Ayrıca bu çalışmada enterokoklarda plazmid üzerinde kodlanan bir antibiyotik direnç geni tespit edilmiştir. Bizim yaptığımız mastitisli sığırlardan izole edilen *E. faecalis* suşlarındaki plazmid izolasyonunda, izolatların içerdiği oldukları plazmid miktarı 1-8 arasında bulunmuştur ve büyüklükleri de yaklaşık 0.6 kb ile 41 kb arasında değişmektedir (Tablo 1, Şekil 2 ve 3). Yine bu çalışmada incelenen klinik izolatların daha fazla antibiyotik baskısına uğraması, bakteriler açısından yaşam gücünü arttıracak genleri içeren plazmidlerin daha çok bulunmasına sebebiyet vermiş olabilir.

Abriouel ve ark (2006) ise gıda kaynaklı izolatların 2.5 kb-53 kb büyüklüğünde plazmidler barındırdığını ve enterokoklardaki virulens determinantları ve antibiyotik direnç özelliklerinin plazmid kaynaklı olabileceğini belirtmişlerdir. Yüksel (2012) *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında sayıları 3-15 arasında değişen plazmidlere sahip olduğu belirlenmiştir. Plazmid büyüklükleri ise 35.8 ile 2.4 kb arasında değiştiği belirtilmiştir. Çalışmada 10 tane suşta aynı plazmid içeriğine sahip olduğu gözlenmiştir. Aynı plazmid içeriğine sahip suşların farklı kaynaklardan izole edilmesi klonal yayılımı işaret ettiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 1-8 arasında plazmid içeriği tespit edilmiştir ve plazmidlerin boyutları yaklaşık 0.6 ile 41 kb arasında oldukları bulunmuştur (Tablo 1). 1-2-9, 24-26, 34-36 nolu izolatların aynı plazmid içeriklerine sahip izolatlar olduğu görüldüğünden ve bu durum da

klonal yayılımı desteklemektedir.

Öneriler

Gıda sektöründe özellikle virulens genleri kodlayan plazmidlere sahip izolatların starter kültür olarak kullanımı ciddi riskler oluşturmaktadır. Bu nedenle enterokoklar için plazmid analizleri oldukça önemlidir. Enterokokların plazmid incelemeleri genel olarak gıda kaynaklı izolatlarda yapılmıştır. Özellikle süttten elde edilen fermente gıdalardan izole edilen enterokok izolatlarında plazmid profillendirme çalışmaları bulunmaktadır. Süttten direkt olarak izole edilen enterokoklarda plazmid profillerinin incelenmesi ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum enterokokal mastitisli sığırlardaki enterokokal plazmidler hakkındaki bilgilerimizi sınırlı kılmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, mastitisli sığırlardan elde ettiğimiz *E. faecalis* izolatlarındaki plazmid varlığı araştırılmış ve bu yönü ile literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz bulguları değerlendirdiğimizde izolatların %35.1 (19 izolat)'inde plazmid rastlanmıştır. Saha suşlarından elde ettiğimiz plazmid profilleri ile yaptığımız analizde izolatlar 6 kümeye toplanmıştır ve bazı izolatlarda klonal yayılım saptanmıştır. Buda enterokokların belli odaklardan yayıldığına göstergesidir. Ayrıca, yaptığımız bu çalışmada plazmid jel elektroforez görüntülerinde bazı plazmidlerin güçlü bazılarının daha zayıf banta sahip oldukları belirlenmiştir. Bu durum, bazı plazmidlerin yüksek kopya sayısına sahip olmaları bazılarında düşük kopya sayısına sahip olmaları ile açıklanabilir. Bundan sonraki çalışmalarda, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen diğer enterokok türlerinin plazmitleri araştırılıp bu plazmitlerin antibiyotik dirençliliğine katkıları olup olmadığı incelenebilir.

Teşekkür

Bu proje Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No: VTF-14032) desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Abriouel H, Ben Omar N, Lucas R, Martinez-Canamero M, Galvez A, 2006. Bacteriocin production, plasmid content and plasmid location of enterocin P structural gene in enterococci isolated from food sources. *Lett Appl Microbiol*, 42, 331-337.
- Coleri A, Cokmuş C, Özcan B, Akçelik M, Tükel C, 2004. Determination of antibiotic resistance and resistance plasmids of clinical *Enterococcus* species. *J Gen Appl Microbiol*, 50, 213-219.
- Ehrenfeld EE, Clewell DB, 1987. Transfer functions of the *Streptococcus faecalis* plasmid pAD1: organization of plasmid DNA encoding response to sex pheromone. *J Bacteriol*, 169, 3473-3481.



- Eroğlu C, Aydoğan S, Pekbay A, 2003. Nozokomiyal *Enterococcus faecium* menenjitisi: Olgu sunumu. İnfeksiyon Derg, 17, 205-207.
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG, 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. J Clin Microbiol, 37, 3497-3503.
- Kuyucuoğlu Y, 2011. Antibiotic resistances of enterococci isolated from bovine subclinical mastitis. Eurasian J Vet Sci, 27, 231- 234.
- Lanthier M, Scott A, Lapen D, Zhang Y, Topp E, 2010. Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* sp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals, birds and wildlife. Can J Microb, 56, 715-729.
- Özkuyumcu C, Köseoğlu Ö, Günalp A, 1998. Hastanede yatan hastalarda vankomisin ve yüksek düzey aminoglikozid dirençli enterokok kolonizasyonunun araştırılması. Mikrobiyoloji Bül, 32, 185-194.
- Petersson-Wolfe CS, Wolf SL, Hogan JS, 2007. In vitro growth of enterococci of bovine origin in bovine mammary secretions from various stages of lactation. J Dairy Sci, 90, 4231-4246.
- Rosvoll TC, Pedersen T, Sletvold H, Johnsen PJ, Sollid JE, Simonsen GS, Jensen LB, Nielsen KM, Sundsfjord A, 2010. 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 Immunol Med Microbiol, 58, 254-268.
- 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, OH USA http://cals.arizona.edu/extension/dairy/conference/proceedings/environmental_mastitis.pdf, Accessed at: 08.09.2009.
- Uçan US, Açık L, Çelebi A, Erganiş O, Arslan E, 2005. Plasmids and protein patterns of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Konya, Turkey. Turk J Vet Anim Sci, 29, 475-480.
- Vilela MA, Souza SL, Palazzo ICV, Ferreira JC, Morais Jr MA, Darini ALC, Morais MMC, 2006. Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 101, 716-719.
- Yıldız Ö, Türkyılmaz S, 2015. Investigation of virulence genes of *Enterococcus faecalis* strains isolated from mastitic bovine milk. Isr J Vet Med, 70, 16-22.
- Yüksel FN, 2012. Gıda kaynaklı *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarında virülans faktörlerin berlieni, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye.

