



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Lactococcus garvieae'de VİRULANS GENLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

Tuğba TEKER

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Tülay AKAYLI

Haziran, 2017

İSTANBUL

Bu çalışma 1.06.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Kadir TURAN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Doç. Dr. Bedia PALABIYIK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2016-23352 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince sınırsız sevgi ve sabrıyla her zaman yanımda olan, desteğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a,

Çalışmam boyunca bilgi ve deneyimini benimle paylaşarak değerli vaktini bana ayıran değerli ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tülay AKAYLI'ya,

İ.Ü. Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü mensubu saygıdeğer öğretim üyeleri başta olmak üzere eğitimimde emeği geçen tüm değerli Hocalarıma,

Çalışmalarım süresince bana destek olan Araş. Gör. Dr. Çiğdem ÜRKÜ ve Uzm. Aylin GAZDAĞLI'ya,

Bu çalışmada projeyi destekleyen İ.Ü. Bilimsel Araştırma Fonuna ve çalışmalarım süresince imkânlarından yararlandığım İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanlığına,

Fedakârlıkları ile her zaman yanımda olan canım aileme ve özellikle biricik kardeşime,

Teşekkürü bir borç bilir ve en içten şükranlarımı sunarım.

Haziran 2017

Tuğba TEKER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
ÖZET.....	vi
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. LAKTOKOKKOZİS VE BELİRTİLERİ.....	2
2.1.1. Hastalığın Tarihçesi	3
2.2. <i>Lactococcus garvieae</i>	4
2.2.1. Genom Projesi.....	4
2.3. BAKTERİ PATOJENİTESİ VE VİRULANS	6
2.3.1. <i>Lactococcus garvieae</i> 'de Virulans.....	8
2.3.1.1. Adezyondan Sorumlu Genler.....	9
2.3.1.2. Hemoliz'in Genleri	11
2.3.1.3. Diğer Virulans Genleri.....	11
2.3.2. <i>Lactococcus garvieae</i> 'de Virulanstan Sorumlu Yeni Gen Adaylarının Belirlenmesi	12
2.4. <i>Lactococcus garvieae</i> İLE MÜCADELE YÖNTEMLERİ.....	13
3. MALZEME VE YÖNTEM	16
3.1. <i>Lactococcus garvieae</i> SUŞLARI VE ÜRETİMİ.....	16
3.2. GENOMİK DNA İZOLASYONU	17
3.3. DNA MOLEKÜLLERİNİN NİTEL VE NİCEL ANALİZİ	18
3.4. ÇALIŞILACAK GENLERİN BİYOİNFORMATİK TARAMASI.....	19
3.5. PRİMER TASARIMI	19
3.6. GENLERİN PZR İLE ÇOĞALTILMASI.....	20
3.7. PZR ÜRÜNLERİNİN AGAR OZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE ANALİZİ.....	21
3.8. DİZİLEME YÖNTEMİNE DAYALI VERİ ANALİZİ.....	22

3.9. ANTİBİYOGRAM TESTİ	22
4. BULGULAR	24
4.1. GENOMİK DNA'NIN KALİTATİF VE KANTİTATİF ANALİZİ	24
4.2. BİYOİNFORMATİK ANALİZ VERİLERİ	24
4.2.1. PATRIC Veribankasından Seçilen Genler.....	24
4.2.2. Çoğaltımda Kullanılan Oligonükleotid Primerler.....	24
4.3. TÜR TANI BULGULARI.....	25
4.4. VİRULANS GENLERİNİN PZR ÇOĞALTIMI	26
4.4.1. Hemolizin Genlerinin Analizi	27
4.4.2. Adezin Genlerinin Analizi	28
4.4.3. Virulansdan Sorumlu Yeni Gen Adaylarının Analizi	29
4.5. ANTİBİYOGRAM TESTİ BULGULARI	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
KAYNAKLAR	41
EKLER.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	52

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Bakteri-konak etkileşimi.7
- Şekil 2.2:** LPxTG motifine sahip protein yapısı.10
- Şekil 4.1:** Sekiz *L. garvieae* suşuna ait genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezi sonrası UV ışık altındaki görüntüleri. M: λ Hind III (Thermo, ABD).....24
- Şekil 4.2:** *L. garvieae* suşlarında tür tanımlamasını sağlayan 1100 bç boyutlu ürünlerin agaroz gel elektroforezi görüntüsü. M: 1kb (Thermo Scientific), NK: Negatif kontrol26
- Şekil 4.3:** *L. garvieae* suşlarının tür tanısı için PZR ile çoğaltılan *16S rRNA* genlerinin çoklu hizalanan kısmi bölgesine ait nükleotid dizileri. * identik bazları göstermektedir.....26
- Şekil 4.4:** 21 *L. garvieae* suşunda özgün primerlerle çoğaltılan *hyl1* genine ait 522 bç'lik; *hyl2*'ye ait 796 bç'lik; *hyl3*'e ait 549 bç'lik DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1kb (Thermo Scientific), NK: Negatif kontrol28
- Şekil 4.5:** *L. garvieae* suşlarında çoğaltılan *adhPsaA* genine ait 522 bç'lik; *adhPav*'a ait 1048 bç'lik; *LPxTG-1*'e ait 947 bç; *LPxTG-2*'e ait 767 bç, *LPxTG-3*'e ait 231bç; *adhCI*'e ait 490 bç; *adhCII*'e ait 732 bç ve *adh* genine ait 398 bç'lik DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi analizi. M: 100 bç (Thermo Scientific); M: 1kb (Thermo Scientific); NK: Negatif kontrol29
- Şekil 4.6:** *purB* ve *SP_0121*genlerinin 21 *L. garvieae* suşunda çoğaltılan sırasıyla 864 bç ve 966 bç boyutlu ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi. M: 1kb (Thermo Scientific), NK: Negatif kontrol.....30
- Şekil 4.7:** FMB-F12 suşunda antibiyogram test bulguları. →: antibiyotik zonu; --> : zon gözlenmeyen alan.....31

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>L. garvieae</i> suşları ve elde edilen kaynaklar.....	16
Tablo 3.2: <i>L. garvieae</i> suşlarının üretiminde ve antibiyogram testinde kullanılan besi ortamları ve bileşenleri. * Ek 1.....	17
Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon bileşenleri ve derişimleri.	18
Tablo 3.4: Sırasıyla biraraya getirilen PZR bileşenleri ve son derişimleri.	21
Tablo 3.5: PZR koşulları ve döngü sayısı	21
Tablo 4.1: Kullanılan primerler ve özellikleri. i: İleri primer, g: geri primer, ÜB: ürün boyutu, BS: bağlanma sıcaklığı	25
Tablo 4.2: <i>L. garvieae</i> suşlarında <i>hly1</i> , <i>hly3</i> , <i>adhPav</i> , <i>LPxTG-2</i> , <i>LPxTG-3</i> , <i>adhCII</i> , <i>adh</i> ve <i>SP_0121</i> genlerinin varlığı. +: gen var; -: gen yok ve/veya null allel.....	27
Tablo 4.3: Antimikrobiyal çevresinde oluşan zonların aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri.....	31
Tablo 4.4: Antibiyotik direncine göre 21 suşun standartlara göre değerlendirilmesi. R: dirençli; I: orta derece duyarlı; S:duyarlı	32
Tablo 4.5: Antibiyotiklere karşı dirençli, orta derecede duyarlı ve duyarlı olan <i>L. garvieae</i> suş sayılarının yüzde değerleri. R: dirençli; I: orta derece duyarlı; S:duyarlı	33

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Lactococcus garvieae'de VİRULANS GENLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Tuğba TEKER

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

II. Danışman : Prof. Dr. Tülay AKAYLI

Bu tez çalışmasında laktokokkosiz etmeni olan *Lactococcus garvieae* suşlarının moleküler düzeyde tür doğrulaması gerçekleştirildi ve virulansın moleküler mekanizması genomik düzeyde araştırıldı. Bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri de belirlendi.

Yurdumuzdaki ticari alabalık çiftliklerindeki hasta balıklardan izole edilmiş 19 *L. garvieae* suşu, bir insan patojeni ve bir referans ATCC 43921 suşu çoğaltım temelli analiz edildi. İlk olarak 21 *L. garvieae* suşunun 16S rRNA geni türe özgün primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. 21 suş ile gen bankasında kayıtlı Lg2 NC_017490.1 referans suşu arasında yüksek dizi homolojisinin varlığı nükleotid dizi hizalamaları ile belirlendi. Tüm suşlar tür düzeyinde *L. garvieae* olarak doğrulandı.

Üç hemolizin (*hly1*, *hly2*, *hly3*) ve dokuz adezin geni (*adhPav*, *adhPsaA*, *LPxTG-1*, *LPxTG-2*, *LPxTG-3*, *LPxTG-4*, *adhCI*, *adhCII*, *adh*) tüm suşların genomik DNA'larından PZR analizi kullanılarak tarandı. Ek olarak, *Streptococcus pneumoniae* virulans genlerinin (*purB* ve *SP_0121*) *L. garvieae* genomunda varlığı ilk kez bu çalışma ile araştırıldı.

hly2 (796 bç), *adhPsaA* (522 bç), *LPxTG-1* (947 bç), *adhCI* (490 bç) ve *purB* (864 bç) genlerinin tüm suşlarda taşındığı bulundu. Geriye kalan *hly1* (522 bç), *hly3* (549 bç), *adhPav* (1048 bç), *LPxTG-2* (767 bç), *LPxTG-3* (231 bç), *adhCII* (732 bç), *adh* (398 bç) ve *SP_0121* (966 bç) genlerinin bazı izolatlarda var olduğu, diğerlerinde bulunmadığı belirlendi. Ek olarak, beklenen 1021 bç boyutlu *LPxTG-4* gen fragmenti suşlardan çoğaltılamadı. Çalışma sonuçları *L. garvieae* suşlarının genomlarından çoğaltılan genlerin bakteri virulansında esansiyel olabileceğini gösterdi. Buna karşın, suşlar arasında polimorfik olarak taşınan genlerin ilgili bakteri virulans faktörlerini kodlayabilecekleri ancak kodlamadıkları belirlendi. Bu nedenle, bu genlerin patogeneze doğrudan katılmadıkları düşünülmektedir. Ayrıca, *purB* ve *SP_0121* genlerinin *L. garvieae*'nin virulansından sorumlu olabileceği ilk defa gösterildi.

Antibiyoqram testleri tüm *L. garvieae* suşlarının ampisiline duyarlı iken klindamisin ve streptomisine dirençli olduğunu ortaya koydu. Eritromisin, florfenikol, kanamisin, enrofloksasin, siprofloksasin, kloramfenikol, oksitetrasiklin, sulfametoksazol-trimetoprim, flumekuın hassasiyeti değişen oranlardaydı. Antibiyotiklere karşı direçli suş yüzdesi %5-83 aralığında değişmektedir. Antibiyoqram test sonuçlarına göre bakterilerin orta duyarlı ve hassas olduğu antibiyotikler terapötik ajan olarak kullanım potansiyeline sahiptir.

Virulans genlerinin belirlenmesi *L. garvieae*'nin patojenitesinin anlaşılmasında önemlidir. Karakterize edilen bu virulans genleri bakteriyel patojenlerine karşı mücadelede yeni terapötik ve aşuların geliştirilmesinde dikkate alınmalıdır.

Haziran 2017, 62 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Lactococcus garvieae*, laktokokkozis, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), virulans genleri

SUMMARY

M.Sc. THESIS

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF VIRULENCE GENES IN

Lactococcus garvieae

Tuğba TEKER

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Co-Supervisor : Prof. Dr. Tülay AKAYLI

In this thesis study, the confirmation of *Lactococcus garvieae* strains which are causative agent of lactococcosis were carried out at molecular level and molecular mechanism of virulence were investigated at genomic level. Antibiotic susceptibility profiles of bacterial strains were also determined.

Nineteen *L. garvieae* strains, which were isolated from diseased fish in commercial fish farms of our country, as well as one human patogen and the reference strain ATCC 43921 were analyzed based on gene amplification approach. At first, *16S rRNA* genes of 21 *L. garvieae* strains were amplified by PCR using species-specific primers. Presence of high sequence homology among 21 strains and reference strain Lg2 NC_017490.1, registered in GenBank, were detected via alignments of nucleotide sequences. All strains were confirmed as *L. garvieae* at species level.

Three hemolysin (*hly1*, *hly2*, *hly3*) and nine adhesin genes (*adhPav*, *adhPsaA*, *LPxTG-1*, *LPxTG-2*, *LPxTG-3*, *LPxTG-4*, *adhCI*, *adhCII*, *adh*) were screened from genomic DNAs of all strains using PCR analysis. Additionally, the presence of *Streptococcus*

pneumoniae's virulence genes (*purB* and *SP_0121*) in *L. garvieae* genome were investigated for the first time, in this study.

It was found that *hly2* (796 bç), *adhPsaA* (522 bç), *LPxTG-1* (947 bç), *adhCI* (490 bç), and *purB* (864 bç) genes were carried in all strains. The presence of remaining *hly1* (522 bç), *hly3* (549 bç), *adhPav* (1048 bç), *LPxTG-2* (767 bç), *LPxTG-3* (231 bç), *adhCII* (732 bç), *adh* (398 bç) and *SP_0121* (966 bç) genes were detected in some of the isolates whereas others had not. In addition, *LPxTG-4* gene fragment with expected 1021 bp size could not be amplified from any strains. Results of the study revealed that the genes amplified from genomes of all *L. garvieae* strains can be essential for virulence of bacteria. However, it was detected that the genes which were carried polymorphically among strains could have coded the virulence factors of bacteria. Therefore, it was thought that these genes did not directly participate in pathogenesis. Moreover, it was specified that *purB* and *SP_0121* genes might be responsible for virulence of *L. garvieae*, for the first time.

Antibiogram tests indicated all *L. garvieae* strains are susceptible to ampicillin while resistant to clindamycin and streptomycin. The sensitivity of erythromycin, florfenicol, kanamycin, enrofloxacin, ciprofloxacin, chloramphenicol, oxytetracycline, sulfamethoxazole-trimethoprim, flumequine were at varying rates. The percentage of resistant strains against antibiotics ranged from 5 to 83%. According to the antibiogram test results, antibiotics which bacteria were intermediate or sensitive to has potential usage as a therapeutic agent.

The determination of virulence genes is important in understanding the pathogenicity of *L. garvieae*. Characterized virulence genes should be also considered for the development of new therapeutics and vaccines in the struggle against bacterial pathogens.

June 2017, 62 pages.

Keywords: *Lactococcus garvieae*, lactococcosis, polymerase chain reaction (PCR), virulence genes

1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği dünya besin ihtiyacını karşılamaya yönelik hızlı büyüyen sektörlerden biridir (FAO., 2015¹). Türkiye’de alabalık yetiştiriciliği 1970’li yıllarda yapılmaya başlamıştır. Günümüzde birçok işletme bu alanda faaliyet göstermektedir. *Lactococcus garvieae* ülkemizde yetiştiriciliği yapılan balık türleri arasında gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) başta olmak üzere çeşitli tatlı su ve deniz balıklarında laktokokkozis hastalığına neden olmakta, yol açtığı mortalite ciddi ekonomik kayıplarla sonuçlanmaktadır (TUIK., 2015²). Ayrıca etmenin çeşitli klinik vakalardan izole edilmesi potansiyel zoonotik bir tür olduğunu düşündürmektedir.

L. garvieae’nin hakkında sınırlı bilgi bulunan patojenite mekanizmasının anlaşılması, uygun antibiyotiklerin seçilerek yeterli doz ve süre ile uygulanması laktokokkosiz ile mücadele için gereklidir (Vendrell ve diğ., 2006; Gibello ve diğ., 2016).

Tez çalışmasında laktokokkozis etmeni 21 *L. garvieae* suşu moleküler düzeyde tanımlandıktan sonra patojenite ile ilişkili çeşitli virulans genleri PZR yöntemi ile moleküler düzeyde karakterize edilmiş ve antibiyotik duyarlılıkları da belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilecek bulguların *L. garvieae*’de virulansın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında literatüre katkı sağlayacaktır. Ayrıca, laktokokkozis ile mücadelede kullanılacak yeni ilaç ve aşı hedeflerinin belirlenmesine yardımcı olacaktır. Gerçekleştirilen tez çalışması *L. garvieae* ’nin virulans genlerinin aktivitesinin belirlenmesine yönelik yeni çalışmalara temel veri sağlamıştır.

¹ <http://www.fao.org/fishery/aquaculture/en>, [Ziyaret Tarihi: 1 Mayıs 2017]

² <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=97&locale=tr>, [Ziyaret Tarihi: 1 Mayıs 2017]

2. GENEL KISIMLAR

2.1. LAKTOKOKKOZİS VE BELİRTİLERİ

Laktokokkozis; *Lactococcus garvieae* enfeksiyonu sonucu hemorajik septisemi oluşması ile tanımlanan bir hastalıktır. *L. garvieae* balıkçılık sektörünün mücadele ettiği en önemli patojenlerden biridir. Bu patojenin genellikle yaz aylarında (Haziran-Eylül) neden olduğu endemik enfeksiyonlar, balık yetiştiriciliği sektörü ve balık endüstrisinde önemli ekonomik kayıplarla sonuçlanmaktadır (Vendrell ve diğ., 2006; Wang ve diğ., 2007).

Enfekte balıklarda düzensiz yüzme, gözün bulutlanmasıyla birlikte tek veya çift taraflı ekzoftalmus, deri renginde koyulaşma, operkula iç kısmında nokta biçiminde deri kanamaları, bağırsak, dalak, karaciğer ve böbrekte konjesyon (tıkanıklık) ve hemoraji (kanama) gibi semptomlara rastlanmaktadır (Kusuda ve diğ., 1991; Eldar ve Ghittino, 1999).

Laktokokkozis; *Seriola* türlerini etkileyen en önemli hastalıklardan biridir (Katao 1982; Kusuda ve diğ., 1991). Sarıkuyruk Japon amber balığı (*Seriola quinqueradiata*), amber balığı (*S. dumerili*) ve kral balığı (*S. lalandi*) türlerini içeren *Seriola* cinsi; kültürü yapılan balık türlerinin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır (Kawanishi ve diğ., 2005). Hastalık etmeni; gökkuşacağı alabalığı (*Onchorynchus mykiss*) (Eldar ve Ghittino, 1999; Diler ve diğ., 2002), siyah kaya balığı (*Sebastes schlegeli*) (Kang ve diğ., 2004), kefal (*Mugil cephalus*) (Chen ve diğ., 2002), pisi (*Paralichthys olivaceous*) (Lee ve diğ., 2001), Japon yılan balığı (*Anguilla japonica*) (Kusuda ve diğ., 1978), tatlı su karidesleri (*Macrobrachium rosenbergii*) (Chen ve diğ., 2001) gibi farklı sucul türlerden de izole edilmiştir (Evans ve diğ., 2009).

L. garvieae'nin konak olarak kullandığı canlılar sadece suda yaşayan türlerle sınırlı değildir. Bu tür, sığırlarda (Teixeira ve diğ., 1996), kurbağalarda (Mendoza ve diğ., 2012) da enfektif olabildiği gibi kedi ve köpek tonsillerinden (Pot ve diğ., 1996) de izole edilmiştir. Ayrıca hastalık etmeninin nehir ve kanalizasyon sularında (Aguado

Urda ve diğ., 2010); sebzelerde (Kawanishi ve diğ., 2007); et, süt ve peynir gibi çeşitli mandıra ürünlerinde (Ferrario ve diğ., 2013; Gibello ve diğ., 2016) de taşınabildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda *L. garvieae*'nin insan kanı, idrarı ve derisinden izole edilmesi bu bakterinin potansiyel zoonotik patojen olarak kabul edilmesine neden olmuştur (Vinh ve diğ., 2006; Wang ve diğ., 2007; Yiu ve diğ., 2007).

2.1.1. Hastalığın Tarihçesi

Gram pozitif kokların yol açtığı streptokokkozis hastalığı 1974 yılında Japonya'daki sarıkuyruk balıklarından bildirilmiştir. *Streptococcus* sp. YT-3 hastalıktan sorumlu etmen olarak tanımlanmıştır. Laktokokkozisin balıklar üzerindeki patojenik etkisi ise ilk olarak 1988 yılında İspanya'daki bir alabalık işletmesinde yetiştirilen balıklarda rapor edilmiştir (Palacios ve diğ., 1993; Vendrell ve diğ., 2006). Ancak gerçekleştirilen analizler *Streptococcus* sp. YT-3 olarak tanımlanan bakteri suşunun *L. garvieae* olduğunu ortaya koymuştur.

Hastalık ilk görülme tarihinden günümüze Bulgaristan, İsrail, Fransa (Eyingor ve diğ., 2004), Brezilya (Evans ve diğ., 2009), Yunanistan (Savvidis ve diğ., 2007), İngiltere (Algöet ve diğ., 2009), İtalya (Foschino ve diğ., 2008), Portekiz (Pereira ve diğ., 2004), Kore (Baeck ve diğ., 2006), Tayvan (Chen ve diğ., 2002) ve İran (Sharifiyazdi ve diğ., 2010) gibi farklı ülkelerden de bildirilmiştir. Türkiye'de ise bu hastalık ilk defa 2001 yılında Ege Bölgesi'ndeki bir alabalık işletmesinde yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarında büyük mortalite (ölüm) oranıyla etkili olmuştur (Diler ve diğ., 2002). Daha sonraki yıllarda hastalığın yayıldığı, ekonomik kayıplara yol açtığı birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Çağırğan, 2004; Özer ve diğ., 2008; Avcı ve diğ., 2010; Türe ve Savaş, 2010; Tanrikul ve Gultepe, 2011).

L. garvieae'nin insanda enfeksiyon hastalık etmeni olduğu ilk defa 1991 yılında bildirilmiştir (Elliott ve diğ., 1991). Bu patojen insanda karaciğer apsesi ve kemik iliği iltihabı gibi hastalıkların ortaya çıkmasından sorumlu olduğu belirtilmiştir (Fefer ve diğ., 1998; James ve diğ., 2000; Mofredj ve diğ., 2000).

2.2. *Lactococcus garvieae*

Streptococcaceae familyasının içerisinde yer alan *Lactococcus* genusu 1985 yılından sonra *Streptococcus*'dan ayrı bir genus olarak sınıflandırılmıştır (Schleifer ve diğ., 1985). Bu nedenle inek memesinden 1983 yılında izole edilen bakteri öncelikle *Streptococcus garvieae* olarak tanımlanmıştır (Collins ve diğ., 1983). Daha sonra ikili adlandırması *L. garvieae* şeklinde değiştirilen patojen, bakteriyal taksonomik sınıflandırmada yerini almıştır (Prieta ve diğ., 1993). 1974 yılında Japonya'da sarıkuyruktan hastalık etmeni olarak izole edilen "*Streptococcus* sp. YT-3" 1991 yılında *Enterococcus seriolicida* olarak bakteriyal sistematığe kazandırılmıştır (Kusuda ve diğ., 1991; Vendrell ve diğ., 2006). Kültürlemeye dayalı özellikleri, fizyolojik ve biyokimyasal yaklaşımlarla tanımlanan türün moleküler taksonomi çalışmaları sonucunda günümüzde *L. garvieae*'nin sinonimi olduğu ortaya konmuştur (Doménech ve diğ., 1993; Prieta ve diğ., 1993; Eldar ve diğ., 1996; Pot ve diğ., 1996; Teixeira ve diğ., 1996; Vendrell ve diğ., 2006).

L. garvieae Gram pozitif, kok şeklinde morfolojiye sahip (0.7- 1.4 µm çapında), kısa zincir düzeni oluşturan, sporsuz, hareketsiz bir bakteri olarak tanımlanır. Katı besi ortamında üretildiğinde beyaz ve gri renkli koloniler oluşturan tür; fakültatif anaerobiktir. Ayrıca ideal üreme sıcaklığı 37°C olan türün 4-45°C gibi çok geniş sıcaklık aralığında hayatta kalabildiği bilinmektedir (Kusuda ve diğ., 1991; Vendrell ve diğ., 2006). Hasta balıklardan izole edilen *L. garvieae* suşlarının kapsülsüz (KG+) ve daha virulan olan kapsüllü (KG-) serolojik tipleri bulunmaktadır (Barnes ve diğ., 2002; Kang ve diğ., 2004).

2.2.1. Genom Projesi

L. garvieae'nin genom projesi virulan Lg2 suşu ile virulan olmayan ATCC 49156 suşlarının genomları dizilenecek tamamlanmıştır. Lg2 suşu 2002 yılında Japonya'da lactokokkoz hastalığı semptomlarına sahip sarıkuyruk balığından izole edilmiştir. ATCC 49156 suşunun izolasyonu ise hasta sarıkuyruk balığından öncelikle *E. seriolicida* ATCC 49156^T olarak 1974 yılında Japonya'da gerçekleştirilmiştir (Kusuda ve diğ., 1991). Taksonomide yapılan düzenleme sonucu *L. garvieae* olarak sınıflandırılan tür yapılan alt kültürlemeler sonucu patojenik özelliğini kaybetmiştir (Teixeria ve diğ., 1996; Kawanishi ve diğ., 2006; Morita ve diğ., 2011). Lg2 ve ATCC

49156 suşlarına ait nükleotid dizilimleri tüm genom düzeyinde genom kitaplığının kurulması (İng., “shot-gun”) yaklaşımı ile elde edilmiştir. Lg2 suşunun genom boyutu 1963964 bç, ATCC 49156 suşununki ise 1950135 bç büyüklüğündedir. GC oranları %38.8 olan bu iki suş plazmid taşımamaktadır. Protein kodlanmasından Lg2 suşunda 1968 genin, ATCC 49156 suşunda ise 1947 genin sorumlu olduğu belirlenmiştir. Her iki suşta 62 tRNA geni ve 5 rRNA operonu bulunmaktadır. Psödogen sayısı Lg2’de 24 iken ATCC 49156’da 19 olarak belirlenmiştir. Aralarındaki nükleotid dizi benzerliği son derece yüksek (%99) olmasına karşın, Lg2’de belirlenen 16.5 kb’lık kapsül gen kümesinin (CGC gen kümesi) ATCC 49156’da bulunmadığı gösterilmiştir (Morita ve diğ., 2011; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/699>³).

İnsan kanından izole *L. garvieae* 21881 ve hasta alabalıktan izole *L. garvieae* 8831 ve UNIUD074 suşlarının da tüm genom düzeyinde nükleotid dizilimlerinin belirlendiği bildirilmiş olsa da genom projeleri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu suşların GC oranları sırasıyla %37.9, %38 ve %38.7; genom boyutları 2.16 Mb, 2.09 Mb ve 2.17 Mb’dır. *L. garvieae* 21881 ile 8831 suşları arasındaki 0.1 megabazlık genom boyut farkı 8831 suşunun plazmid bulundurmamasından kaynaklanmaktadır (Aguado-Urda ve diğ., 2011a; Aguado-Urda ve diğ., 2011b; Reimundo ve diğ., 2011).

L. garvieae suşlarının ortologlarının tanımlanması için yapılan araştırmalar 301 genin 21881 suşuna, 118 genin 8831suşuna, 312 genin UNIUD074’e ve 204 genin de Lg2’ye özgü olduğunu ve bu genlerin büyük bir kısmının hipotetik proteinlerin kodlanmasında görev aldığını göstermiştir. Kapsül gen kümesini şifreleyen 15 gen Lg2 suşuna özel 204 gen içersinde yer almaktadır ve diğer üç suş kapsül geni taşımamaktadır. Ayrıca 21881, 8831, UNIUD074, Lg2 suşlarında 1542 genin ortak bulunduğu ve bu genlerin %73’ünün (1.130 gen) *L. garvieae* ile aynı genusda yer alan *Lactococcus lactis* IL1403, KF147, MG1363, NZ9000, SK11, CV56 suşlarında da var olduğu bildirilmiştir (Miyachi ve diğ., 2012).

Ayrıca günümüzde alabalıktan (LG9) (Ricci ve diğ., 2012), mandıra ve et ürünlerinden (IPLA, 31405, TB25, I113, M14, Tac2) (Flórez ve diğ., 2012; Ricci ve diğ., 2012; Ricci ve diğ., 2013; Moumene ve diğ., 2016) ve yaban ördeği ince bağırsağından (DCC 43) (Gabrielsen ve diğ., 2012) izole edilmiş *L. garvieae* suşlarının taslak genom dizilim

³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/699>, [Ziyaret Tarihi: 8 Mart 2017]

bilgilerine de NCBI gen bankasından ulaşılmaktadır. *L. garvieae* suşlarının genom boyutunun 1.93-2.25 Mb arasında değiştiği; GC içeriklerinin %37.7-38.8 değerlerine sahip olduğu ve suşların farklı sayıda psödogen taşıdığı görülmektedir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/699>⁴).

2.3. BAKTERİ PATOJENİTESİ VE VİRULANS

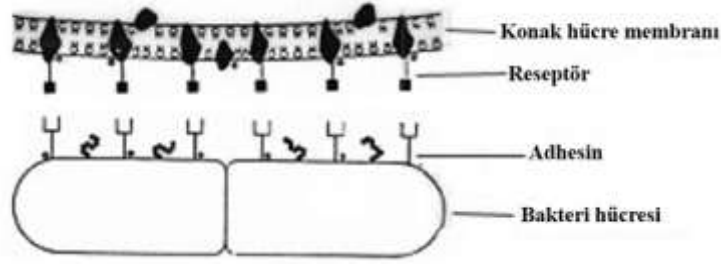
Bir etmenin konakta hastalık oluşturma yeteneği patojenite olarak bilinirken, virulans patojen organizmanın konak hücre ve/veya organizmada yol açtığı hastalık şiddetini ifade etmektedir (Willey ve diğ., 2008). Patojen mikroorganizmaya maruz kalan konakta mikrobiyal patogenez; patojenin hücreye tutunması ile başlar, mikroorganizmanın konakta invazyonu (giriş ve yayılması) ve kolonizasyonunu takiben ortaya konan hastalıklı durum ve/veya konağın hasar görmesi ile sonuçlanır. Çok sayıdaki virulans faktörü de bu süreçte görev yapmaktadır (Harvey ve diğ., 2001).

Enfeksiyon sürecinde mikroorganizma; solunum yolu, ürogenital ve sindirim sistemi, hasarlı deri gibi birçok farklı yolla konak organizmaya girerek konağın hücrelerine tutunmaktadır. Ancak patojenin, girmesi ile konakta etkinleştirdiği savunma sistemi yanıtından korunması gerekir. Organ ve sistemlerin asidik ortam koşulları; ağız, mide ve ince bağırsakta bulunan çeşitli hidrolitik ve proteolitik enzimler patojenin konakta karşılaştığı bariyerlerden bazılarıdır. Mikroorganizma sahip olduğu polisakkarit kapsül yapısını konağa karşı savunma stratejisi olarak kullanırken aynı zamanda bu yapı sayesinde konağın immün sistem bileşenlerini aşarak hayatta kalma şansını da arttırmaktadır. Epidemiler arasında da, kapsül, habitatı içerisinde diğer organizmaları kendisine bağlayarak patojenin hayatta kalma şansını arttırmasında da etkilidir (Harvey ve diğ., 2001).

Adezyon mikroorganizmanın doğada çeşitli yüzeylere tutunması olarak tanımlanmaktadır. Bu süreç; bakteri hücresi tarafından sentezlenen, ligand olarak isimlendirilen hücre bileşenlerinin prokaryotik ve/veya ökaryotik hücre ya da doku yüzeyinde bulunan reseptörlerle etkileşimi sonucu gerçekleşmektedir (Şekil 1). Kapsül yapısının unsurlarından olan ve adezin olarak da adlandırılan, çoğu Gram pozitif bakterinin de sentezlediği bu hücre yüzeyi bileşenleri, konağa tutunmadan sorumlu

⁴ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/699>, [Ziyaret Tarihi: 8 Mart 2017]

olduğu gibi bakteri invazyon ve kolonizasyonunun kolaylaştırılmasından da sorumludur (Chhatwal, 2002). *L. garvieae*'de olduğu gibi pek çok türün hem kapsüllü hem de kapsülsüz formları bulunmaktadır. Bu nedenle virulans rol oynayan adezin moleküllerine ek olarak kapsül yapısının da bulunması hastalık şiddetini arttırdığı gibi popülasyondaki letal etkiden de sorumludur.



Şekil 2.1: Bakteri-konak etkileşimi.

Bazı bakterilerin adezyonunda hücre yüzeyinde yer alan fimbriya ve pili olarak isimlendirilen protein yapıları da işlevseldir. Mikroorganizmanın konak hücre yüzeyi glikoproteinlerine bağlanmasında işlevsel olan bu yapılar virulans faktörleri olarak rol oynamaktadır (Willey ve diğ., 2008).

Patogeneze adezyonu invazyon olarak isimlendirilen, etmenin konak hücre ve dokularına girme ve yayılma süreci izlemektedir. Konağın hücreler arası matriks bileşenlerinin bakteri tarafından sentezlenen kollegenaz ve hiyaluronidaz enzimleri başta olmak üzere çeşitli enzimlerle yıkımı, “invazin” olarak adlandırılan membran proteinlerinin konak reseptörlerine bağlanmasını takiben tetiklenen sinyal kaskadı patojenin konağa alınmasında kullanılan iki farklı mekanizmadır. Patojen-konak etkileşimi sırasında artan enzim miktarları veya etkinleşen sinyal kaskadları patogeneze virulansın izlenmesini sağlayan belirteçler olarak kullanılmaktadır (Harvey ve diğ., 2001).

Kolonizasyon süreci, bakterilerin hayatta kalıp üreyebileceği alanlarda, ortam koşullarından doğrudan etkilenmektedir. Bu nedenle patojenik bakterinin ardışık bölünme potansiyeli ortamın pH, sıcaklık, oksijen miktarı gibi fiziksel şartlarına ek olarak, demir başta olmak üzere karbon ve azot kaynaklarının varlığına ve kombinasyonuna bağlıdır. Bakteriler kendileri için esansiyel olan demiri elde edebilmek için siderofor olarak bilinen demir taşıyıcı bileşenleri sentezlemektedir. Siderofor

konaktaki özgün reseptörlerine bağlanarak konakta bulunan demiri kıskaçlama (kenetleme) mekanizması ile alıkoyar ve demir endositoz yolu ile bakteri hücrelerine alınır. İz element olan demirin patojene alımı sadece demir rekabetinin ortaya çıkmasına yol açmakla kalmaz, aynı zamanda patojenin demir kazanım mekanizması aracılığıyla hayatta kalma şansını da arttırmaktadır. Konağın demir gereksinimini karşılayamaması hastalık şiddetini etkilediğinden siderofor epidemiyoloji çalışmalarında hedeflenen bir diğer virulans faktörüdür (Harvey ve diğ., 2001).

Bakteri toksinleri enfeksiyon sürecinde doğrudan hastalığa yol açarak patolojiden sorumlu olan ya da konağın hücre ve/veya dokularında hasar oluşturarak patojenin virulansını arttıran protein yapıları moleküllerdir. Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından üretilip hücre dışına salınan proteinler ekzotoksin, Gram negatif hücre tarafından sentezlenen ve lipopolisakkarid (LPS) olarak da bilinen hücre duvarı bileşeni olanlar da endotoksin olarak isimlendirilirler. Ekzotoksinler genellikle iki polipeptid bileşene sahip olup biri konak hücreye tutunmadan diğeri toksik özelliğinin ortaya konmasından sorumludur. Endotoksinler ise polisakkarit ve lipid moleküllerinin bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Dış membranın fosfolipid tabakasıyla etkileşim halinde olan lipid A, LPS'nin tekrarlı şeker altbirimlerini (çekirdek polisakkarit ve O-polisakkarit) taşıyan lipid tabiatlı bileşenidir ve aynı zamanda toksik özelliğinin ortaya konmasından sorumludur (Harvey ve diğ., 2001).

2.3.1. *Lactococcus garvieae*'de Virulans

Genom projesi tamamlanmasına karşın *L. garvieae*'nin virulan Lg2 (serotip KG-) ve virulan olmayan ATCC 49156 (serotip KG+) suşlarının patojenite mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Virulansdan sorumlu genlerin tanımlanmasında patojenik ve patojenik olmayan suşların genom dizilimlerinin karşılaştırılması büyük önem taşımaktadır. Karşılaştırmalı genom analizleri kapsül taşıyan suşların daha virulan olduklarını ve kapsül gen kümesinin genomdaki varlığının patogeneizde etkili olduğunu ortaya koymuştur (Morita ve diğ., 2011). Kapsül yapısı bakterinin konağın innat immün yanıtına karşı korunmasından sorumludur (Shin ve diğ., 2007). Türkiye, İspanya, İtalya, Fransa, USA, Japonya'da hasta balıklardan (alabalık ve sarıkuyruk) izole edilmiş suşlar kapsül geni taşımamaktadır (Gibello ve diğ., 2016). Kapsül sentezinden sorumlu genlerin varlığının tek başına patojenite ile ilişkili olmadığı; gökkuşağı alabalıklarının

(*O. mykiss*) kapsülsüz Lgper ve ATCC 49156 suşları ile inokülasyonundan sonra yüksek oranda (%89-98) mortaliteye neden olduğu gösterilerek de ortaya konmuştur (Türe ve diğ., 2014; Türe ve Altinok, 2016). Patojenin genomunda taşınan CGC kapsül gen kümesi dışında virulansdan sorumlu olan potansiyel genler, *L. garvieae* ile yakın ilişkili türlerin virulansında işlevsel olan ve veri bankalarında kayıt altına alınmış amino asit dizilimlerinin homologları belirlenerek ön görülmüştür. Karşılaştırmalı analizler; adezin gen kümesi 1, -2 (*adhCI*, *adhCII*), adezin geni (*adh*), adezin Pav (*adhPav*), adezin PsaA (*adhPsaA*), LPxTG içeren yüzey proteini 1, -2, -3, -4 genleri (*LPxTG-1*, *LPxTG-2*, *LPxTG-3*, *LPxTG-4*), hemolizin 1, -2, -3 genleri (*hly1*, -2, -3), NADH oksidaz, süperoksit dismutaz (*sod*), fosfoglukomutaz (*pgm*) ve enolaz (*eno*) genlerinin potansiyel virulans genleri olarak taranabileceğini ortaya koymuştur (Morita ve diğ., 2011; Miyauchi ve diğ., 2012; Türe ve Altinok, 2016). Bu genlere ek olarak *L. garvieae*'de LpxTG domenine sahip çeşitli proteinleri kodlayan; sortaz enzimini kodlayan; WLX domenine sahip proteinleri kodlayan; pili ve siderofor yapısı ve/veya oluşumu ile ilgili genlerin virulans belirteçleri olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir (Schmidtke ve Carson, 2003; Gibello ve diğ., 2016).

2.3.1.1. Adezyondan Sorumlu Genler

L. garvieae'de patogenezin ilk aşaması olarak değerlendirilen adezyonda çeşitli hücre yüzey proteinlerinin etkili olduğu bildirilmiştir (Türe ve Altinok, 2016). Adezyonla ilişkili hücre yüzey proteinleri; (1) sitoplazmik membran proteinleri, (2) membran lipitlerine kovalent bağlı lipoproteinler, (3) karboksil terminal LPxTG-benzeri motif içeren ve (4) bazı hücre duvarı bileşenlerini tanıyan özel domenlere sahip proteinler olmak üzere 4 ana grup altında tanımlanmıştır (Desvaux ve diğ., 2006; Kleerebezem ve diğ., 2010).

LPxTG motifine sahip proteinler amino-terminal sinyal peptid, karboksi-terminal hidrofobik bölge ve yüklü bir kuyruğa sahiptirler (Şekil 2). Bu motifi taşıyan proteinler, transpeptidaz olan sortaz yardımı ile peptidoglikan tabakaya kovalent olarak bağlanırlar. Proteinin hidrofobik bölgesine yerleşmiş olan bu motifin, çeşitli işlevlere sahip birçok proteinde bulunduğu ortaya konmuştur (Chhatwal, 2002). Farklı Gram pozitif bakterilerden elde edilen 70'den fazla proteinin bu mekanizma ile (LPxTG motifini kullanarak) hücre yüzeyine tutunduğu gösterilmiştir (Chhatwal, 2002). LPxTG

proteinlerinin *L. garvieae*'nin gökkuşağı alabalığının fagositik olmayan hücrelerine tutunma ve giriş sürecinde etkili olduğu Gibello ve diğ. (2016) tarafından bildirilmiştir.



Şekil 2.2: LPxTG motifine sahip protein yapısı.

L. garvieae'de *LPxTG-1*, *LPxTG-2*, *LPxTG-3*, *LPxTG-4* genlerinin LPxTG motifine sahip yüzey proteinlerinin kodlanmasından sorumlu olduğu bilinmektedir (Morita ve diğ., 2011; Miyauchi ve diğ., 2012). Ayrıca; LCGL_1585 proteini kollagen bağlanma altbirimini, LCGL_1005 ve LCGL_1672 musin bağlanma altbirimi taşımaktadır (Morita ve diğ., 2011).

Patojenik *Pneumococcus* türlerinin hücre yüzeylerinde bulunan Pav; konağın ekstraselüler immobilize fibronektinlerine bağlanarak adezyonda rol oynamaktadır (Chhatwal, 2002). *L. garvieae*'de tanımlanmış LCGL_1330 proteininin *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 suşuna ait Pav proteini ile %62 aminoasit benzerliğine sahip olduğu gösterilmiş ve proteinin virulans için oldukça önemli olduğu rapor edilmiştir (Morita ve diğ., 2011).

Pneumococcus yüzey antijeni A (PsaA) ise çok işlevli bir lipoproteindir. ABC taşıma sistemine ait olan protein iki değerlikli metal iyon geçişini sağlamaktadır (Rajam ve diğ., 2008). Konak hücreye tutunmadan sorumlu olan protein aynı zamanda virulansta da etkilidir. *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 PsaA proteini ile %49 homoloji oranına sahip *L. garvieae* LCGL_1533 proteini potansiyel virulans faktörüdür (Morita ve diğ., 2011).

İnsan ve balıktan izole edilmiş *L. garvieae* suşlarında *adh*, *adhCI*, *adhCII* genleri adezin genleri olarak rapor edilmiştir ve adezyon temelli virulansta önemli rol oynarlar (Miyauchi ve diğ., 2012; Ture ve Altinok, 2016). Bunlar arasından *adh*'ın kodladığı LCGL_0196 proteini çeşitli domenlere sahiptir ve bu domenlerden biri (PF05738) *Staphylococcus aureus*'un kollajene bağlanan yüzey proteininde son derece korunmuştur (Morita ve diğ., 2011). WxL domeni içeren proteinler; karboksil terminal ekstraselüler protein ve LPxTG benzeri motifleri de şifreleyen gen kümesi tarafından

kodlanır (Kleerebezem ve diğ., 2010). Düşük GC içerikli Gram pozitif bakterilerde son derece korunmuş olan bu motif ilk olarak *Lactobacillus* türlerinde *in silico* keşfedilmiştir (Chaillou ve diğ., 2005; Boekhorst ve diğ., 2006; Siezen ve diğ., 2006). *L. garvieae* Lg2 suşunda LCGL_0842-LCGL_0845 gen kümesi içerisinde bulunan *adhCI*, *adhCII* genleri karboksil ucu WxL domeni içeren proteinlere şifre verir (Morita ve diğ., 2011; Miyauchi ve diğ., 2012). Yapısında WxL domeni bulunduran proteinler bu alt birim ile hücre duvarına kovalent olmayan bir şekilde bağlanır (Brinster ve diğ., 2007).

2.3.1.2. Hemolizin Genleri

Hemolizinler birçok Gram pozitif ve negatif bakteri tarafından üretilen ekzotoksin olarak da bilinen ekstraselüler toksik proteinlerdir. Hemolizinler eritrosit, fagosit gibi kan hücrelerinin membran kararlılığını ya çeşitli boyutlarda gözenek oluşturarak ya da enzimatik etkileri ile fosfolipid yapılarını bozarak hücreleri lizise uğratmaktadırlar. Gösterdikleri bu sitolitik etkiden dolayı terminolojide sitolizin olarak da adlandırılırlar (Goebel ve diğ., 1988).

Yapılan analizler LCGL_0323 proteininin *Enterococcus faecalis*'in hemolitik aktiviteye sahip proteini ile %56; LCGL_0597'nin *Streptococcus suis*'in hemolitik aktiviteli proteini ile %72; LCGL_0374 proteininin *Streptococcus pyogenes*'in hemolitik aktiviteli proteini ile %59 amino asit benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Bu üç proteini kodlayan gen *L. garvieae* Lg2'de hemolizin kodlayan gen adayları olarak gösterilmiştir (Morita ve diğ., 2011).

2.3.1.3. Diğer Virulans Genleri

NADH oksidaz ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimlerini kodlayan genler oksijen ve reaktif süperoksit radikallerine karşı bakterinin toleransını artırıp aerobik koşullarda hayatta kalmasına yardımcı olduklarından; fosfoglukomutaz ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz da konağın koruyucu antikor miktarını arttırdıklarından virulans faktörü olarak araştırılmaktadır (Morita ve diğ., 2011; Gibello ve diğ., 2016).

Siderofor yapısının *L. garvieae*'de varlığı ve bu proteinin balıklarda enfeksiyon sürecinde demir alımında rol oynadığı gösterilmiştir (Schmidtke ve Carson, 2003). Benzer şekilde, insanlarda endokardite neden olan bu türün patojenitesinde siderofor üretiminin etkili olduğu literatürde belirtilmiştir (Gibello ve diğ., 2016).

Pili ve fimbria yapıları sarı kuyrukta laktokokkozis etmeni olan ve birçok alabalıktan izole edilmiş *L. garvieae* suşlarında gösterilmiştir (Ooyama ve diğ., 2002; Gibello ve diğ., 2016). Pili ve ilişkili proteinlerini kodlayan genler genelde aynı operonda kümelenmiştir. Karşılaştırmalı genomik analizler pili gen kümesinin farklı *L. garvieae* suşları arasında yüksek genetik çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymuştur. Gram pozitif bakterilerde pili ve fimbria oluşumunda genellikle sortaz C görev almaktadır. Dolayısıyla hem operon genleri hem de oluşumda görev alan özgün proteinleri şifreleyen ilişkili genler virulans genleri olarak taranmaktadır (Marraffini ve diğ., 2006; Spirig ve diğ., 2011; Gibello ve diğ., 2016).

2.3.2. *Lactococcus garvieae*'de Virulanstan Sorumlu Yeni Gen Adaylarının Belirlenmesi

Patosistem kaynak entegrasyon merkezi (PATRIC); bakteri enfeksiyon hastalıkları ile ilgili temel ve uygulamalı biyomedikal araştırmaları desteklemek için tasarlanmış “tüm-bakteriyel biyoinformatik kaynak merkezidir” (Gillespie ve diğ., 2011; Wattam ve diğ., 2014). PATRIC; çok çeşitli veri bankaları ile entegre bir sistem olup; genomik, transkriptomik, protein-protein etkileşimleri, protein 3D yapısı, DNA dizi tiplendirme verileri gibi çok çeşitli verilerin görüntülenmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda bu bilgi bankası karşılaştırmalı genomik ve transkriptomik analizlerin, hastalıkla ilişkili yolların analizlerinin yapılabilmesini ve konak-patojen ilişkisinin araştırılabilmesini desteklemektedir (Driscoll ve diğ., 2011). Bakterilerin virulans faktörlerine, kapsamlı koleksiyona sahip olan “Virulans Faktör Veri Bankası” (VFDB; <http://www.mgc.ac.cn/VFs>) ve “Victors” (<http://www.phidias.us/victors>)’dan PATRIC web arayüzü sayesinde kolayca erişim sağlanabilmektedir. Filogenetik olarak yakın türlerinde virulanstan sorumlu olduğu gösterilmiş olan ancak *L. garvieae*'de henüz virulansla ilişkilendirilmemiş aday faktörler ve ilgili gen dizilimleri PATRIC desteği ile öngörülebilir. Biyoinformatik platformların *L. garvieae*'de yeni gen adaylarının tespitinde güçlü yaklaşımlar olduğu ve genomik çalışmalarda kullanılabileceği belirlenmiştir. Ancak virulansdan sorumlu aday genlerin son aşamada deneysel çalışmalarla teyit edilmesi büyük önem arz etmektedir.

2.4. *Lactococcus garvieae* İLE MÜCADELE YÖNTEMLERİ

Balıklarda hastalıklara neden olan bakteri enfeksiyonları antibiyotik kullanımı ile kontrol edilebilmektedir. Ancak hastalıkla mücadelede bilinçsiz antibiyotik kullanımı bakterilerin o antibiyotiğe karşı direnç kazanmasına yol açmaktadır (Robinson ve Meyer, 1966; Katao, 1982; Vendrell ve diğ., 2006). Bu nedenle hastalık etmeninin diğer antibiyotiklere karşı duyarlılığının *in vitro* belirlenmesi hastalıkla mücadelede son derece önemlidir. *L. garvieae* enfeksiyonlarında da sıklıkla izlenen en ekonomik yol antibiyotik aracılı tedavidir. Ancak hasta balıkların ani gelişen beslenme bozuklukları nedeniyle yeterli antibiyotik dozunu alamamaları ve/veya bakterinin antibiyotiğe direnç kazanmış olması saha koşullarında enfeksiyonun kontrolünü güçleştirmektedir (Bercovier ve diğ., 1996). Gökkuşuğu alabalıklarında laktokokkozis salgınlarının kontrolünde sahada sıklıkla kullanılan antibiyotikler eritromisin, oksitetrasiklin, amoksisilin ve düşük doz doksasiklidir (Munday, 1994). Ancak bakterinin kazandığı antibiyotik direnci, tedavi için *in vitro* antibiyotik duyarlılığının belirlenmesini zorunlu kılmıştır. Farklı coğrafik bölgelerden kökenlenmiş tüm *L. garvieae* suşlarının enrofloksasin ve nitrofurantoinine hasas; oksolinik asit ve sulfametoksazol-trimetoprima dirençli olduğu; eritromisin, kloramfenikol, oksitetrasiklin ve ampisiline yanıtın ise suştan suşa farklılık gösterdiği Ravelo ve diğ. (2001) tarafından kaydedilmiştir.

Türkiye'deki salgınlardan izole edilmiş *L. garvieae* suşlarının antibiyogram testleri bu bakterinin gentamisin, neomisin, linkomisin, sulfametoksazol-trimetoprima dirençli olduğunu göstermiştir (Altun ve diğ., 2013). Ayrıca yine ülkemizden izole edilmiş bu patojene ait örneklerin eritromisin, ofloksasin, ampisilin ve kloramfenikole duyarlı; penisilin ve kilindamisine dirençli olduğu da saptanmıştır (Diler ve diğ., 2002). Enfeksiyonun yaygın olduğu alanlarda *L. garvieae* suşlarının antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi, alabalık yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde bu patojenin yol açtığı hastalığın tedavisi için önerilebilecek uygun antibiyotiklerin seçimine katkı sağlayacağından oldukça önemlidir.

Bakteriyofaj aracılı tedavi kültür balıklarında *L. garvieae* enfeksiyonu ile mücadelede kullanılan bir diğer alternatif uygulamadır. Bu yaklaşımda patojen üzerinde virulan etkisi olan ve patojenle aynı ortamdan izole edilmiş faj balık yemine eklenerek enfeksiyon kontrol altına alınmaktadır. Hasta sarı kuyruktan izole edilmiş, çift iplikli

DNA genomu taşıyan bakteriyofajın son derece konak özgün olduğu, *L. garvieae* dışında aynı ortamda yer alan diğer 22 akuatik/sucul patojeni enfekte etmediği gösterilerek kanıtlanmıştır. Fajların *L. garvieae* suşlarını enfekte etme yetenekleri çeşitlilik göstermekle birlikte (Park ve diğ., 1997), kültür balıklarına oral yolla verilen bakteriyofajın *L. garvieae* kaynaklı mortalite oranını düşürdüğü tesbit edilmiştir (Nakai ve diğ., 1999). Probiyotik kullanımı ile laktokokkozis ve streptokokkozisin kontrol altına alınabildiği, probiyotiklerin balığın innat bağışıklık sistemini uyararak hastalıkla mücadelede bir strateji olarak kullanılabilirler Brunt ve Austin (2005) tarafından gösterilmiştir.

Patojenle mücadelede enfeksiyon oluşmadan önce olası hastalık riskine karşı alınan önlemler hastalıktan korunmada büyük önem taşımaktadır. Balık yetiştiriciliği sektöründe meydana gelen *L. garvieae* salgınlarının önlenmesi amacıyla hijyen kuralları uygulanmalı ve periyodik kontroller yapılarak optimum şartların devamlılığı sağlanmalıdır. Kemoterapötiklerin saha koşullarında zayıf etkili olmaları ve suşlar arasında antibiyotik direncinin yayılma riskinden dolayı laktokokkozisin kontrolü için en iyi seçeneğin aşılama olduğu düşünülmektedir (Meyburgh ve diğ., 2017). İspanya'daki bir balık çiftliğinde inaktive edilmiş *L. garvieae* suşları ile aşılansız balıklardaki mortalite oranının aşılansız ve eritromisinle tedavi edilmiş balıklardakilere göre düşük olduğu belirlenmiştir (Prieta ve diğ., 1993). Aşılamanın diğer tedavi yöntemlerine alternatif bir yaklaşım olabileceği gösterilmiştir. Aşılama en etkili yöntemin intraperitoneal yol ile adjuvanlı (mineral yağlı) uygulama olduğu bildirilmiştir (Vendrell ve diğ., 2006). Alt ünite aşılarının koruyucu özelliğinin geleneksel bu tip aşılara kıyasla çok daha yüksek olabileceği yapılan birçok araştırma ile desteklenmiştir (Ra ve diğ., 2009; Zhou ve diğ., 2010). *L. garvieae*'de alt ünite aşılarının geliştirilmesinde daha çok bakteri dış membran proteinleri hedeflenmiştir (Kawai ve diğ., 2004; Meyburgh ve diğ., 2017). Ancak günümüzde *L. garvieae* epidemileri ile mücadelede uygulanan aşuların koruma süresinin kısıtlı olması ve/veya istenilen etkinlikte olmaması bu stratejiye yönelik yeni yaklaşımların ele alınmasını gerektirmektedir.

Virulans faktörlerinin tanımlanması patojenin ve aynı zamanda patojene karşı mücadelede kullanılabilir potansiyel hedeflerin anlaşılmasını kolaylaştıracak, enfeksiyon hastalıklarını önleyici ve tedavi edici metotların geliştirilmesine katkı

sağlayacaktır (Onderdonk, 1988; Wu ve diğ., 2008; Casadevall ve Pirofski, 2009; Keen, 2012). Bu kapsamda gerçekleştirilen yüksek lisans tezinde ülkemizde epidemilere yol açan *L. garvieae* suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri belirlenmiş; virulansından sorumlu çeşitli hemolizin ve adezin genlerinin karakterizasyonu yapılmıştır. Ek olarak virulanstan sorumlu olduğu düşünülen iki aday gen de bu türde ilk defa genomik düzeyde tanımlanmıştır. Bu şekilde genomik yaklaşımlarla türün patogenezi hakkında elde edilen verilerin geliştirilecek yeni koruma ve tedavi yöntemleri için kullanılacak ilaç hedeflerinin belirlenmesine ve aşı geliştirilmesine katkı sağlayacak bulgular olduğu düşünülmektedir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. *Lactococcus garvieae* SUŞLARI VE ÜRETİMİ

Bu tez çalışmasında kullanılan *L. garvieae* suşlarından 17'si Ege Bölgesi, 2'si Karadeniz Bölgesi'nde yer alan farklı ticari alabalık işletmelerinde hastalık belirtilerine sahip balıkların farklı organlarından (kalp, karaciğer, böbrek, kan, dalak) izole edilerek saflaştırılmıştır. İnsan patojeni olan suş İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nden sağlanmıştır. Projede kullanılan *L. garvieae* suşları ve ATCC 43921 (American Type Culture Collection) nolu referans suş İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü'nden sağlandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan *L. garvieae* suşları ve elde edilen kaynaklar.

Suş	Bölge-İşletme No	İzole edildiği organ	Suş	Bölge-İşletme No	İzole edildiği organ
FMB-F1	Fethiye-1	Dalak	FMB-F12	Fethiye-1	Karaciğer
FMB-F2	Fethiye-1	Karaciğer	FMB-F13	Fethiye-1	Böbrek
FMB-F3	Fethiye-1	Karaciğer	FMB-F14	Fethiye-2	Böbrek
FMB-F4	Fethiye-1	Kalp	FMB-F15	Fethiye-2	Kan
FMB-F5	Fethiye-1	Kan	FMB-16	Fethiye-2	Karaciğer
FMB-F6	Fethiye-1	Kan	FMB-BL1	Bafra Gölü-1	Karaciğer
FMB-F7	Fethiye-1	Kan	FMB-BL2	Bafra Gölü-1	Böbrek
FMB-F8	Fethiye-1	Kan	FMB-F	Fethiye	Bildirilmemiş
FMB-F9	Fethiye-1	Karaciğer	FMB-R	Birleşik Krallık	İnek memesi
FMB-F10	Fethiye-1	Karaciğer	FMB-H	İ.Ü CTF*	Kan
FMB-F11	Fethiye-1	Dalak			

*CTF: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Moleküler analizleri yapılacak suşlar doğrudan “Todd-Hewitt Broth” (THB) besi ortamında üretilirken, antibiyogram testi için THB’da üretilen suşlar “Müller Hinton Agar” (MHA) besi ortamına aktarıldı. Her iki besi ortamı içerikleri Tablo 3.2’de verilmektedir. Besi ortamı bileşenleri uygun derişimlerde bir araya getirildikten sonra pH ayarı yapıldı ve 121°C’de 1.2 atm basınç altında 15 dakika steril edildi. MHA besi ortamı 9 cm çapındaki steril petri kaplarına döküldü.

Bakteri suşları 25°C’de 24 saat inkübasyon ile üretildi. İnkübasyonu tamamlanan 1 ml’lik kültürler, üzerlerine 500 µl %20’lik gliserin eklenerek -70°C’de uzun süreli saklamaya alındı.

Antibiyoqram testi için THB besi ortamında inkübe edilen suşların hücre yoğunluğu bakteri süspansiyon kültürünün bulanıklığının McFarland standartları ile karşılaştırılmasıyla belirlendi. Altı adet standart %1.175'lik $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ 'in %1'lik H_2SO_4 ile 1:200, 1:100, 1:50, 1:33, 1:25, 1:20 seyreltilmesi ile hazırlandı. McFarland değeri 0.5 değerine ulaşan suşların süspansiyon kültürlerinden 200 µl alınarak MHA besi ortamına cam bagetle yayıldı. Çalışma steril hava akımlı kabin içerisinde gerçekleştirildi.

Tablo 3.2: *L. garvieae* suşlarının üretiminde ve antibiyoqram testinde kullanılan besi ortamları ve bileşenleri. * Ek 1

Besi ortamı	Bileşenler	Derişim (g/L)
Todd-Hewitt Broth (THB), pH 7.8	Sığır kalp infüzyonu	500*
	Hayvan doku (peptik parçalanmış)	20
	Dekstroz	2
	Sodyum klorid	2
	Sodyum fosfat	0.4
	Sodyum karbonat	2.5
Müller Hinton Agar (MHA), pH 7.3	Sığır eti ekstraktı	2
	Kazein asit hidrolizatu	17.5
	Niştasta	1.5
	Agar	17
	Koyun kanı (defibrinleştirilmiş)	50

3.2. GENOMİK DNA İZOLASYONU

Genomik DNA izolasyonu ticari kit (High Pure PCR Template Preparation Kit-Roche) kullanılarak gerçekleştirildi. 5 ml THB besi ortamı içeren steril falkon tüpte üretilen bakteri suşları 3000 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücrelere 200 µl PBS (Fosfat buffer saline) ve 5 µl lizozim (10 mg/ml) eklendikten sonra tüpler 15 dakika 37°C'de bekletildi. Süre sonunda örneklere 200 µl bağlama tamponu ve 10 µl RNaz (10 mg/ml) eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra tüplere 40 µl proteinaz K eklenip hızlıca karıştırıldı ve tüpler 70°C'de 10 dakika bekletildi. Örneklere 100 µl izopropanol eklendikten sonra tüp ters yüz edilerek karıştırıldı. İşlem sonunda elde edilen lizat toplama tüpüne yerleştirilen filtreli tüpe aktararak 8000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında yeni toplama tüpüne alınmış filtreli tüpe 500 µl inhibitör uzaklaştırma tamponu eklenerek 8000 xg'de 1 dakika süre ile santrifüj gerçekleştirildi. Daha sonra filtreli tüp yeni toplama tüpü içerisine alındı ve yıkama tamponu konduktan sonra 8000 xg'de 1 dakika süre ile santrifüj edildi. Filtreli tüp 1.5 ml'lik propilen mikrotüpe yerleştirildi. Genomik DNA izolasyonu örneklere elüsyon tamponu (70°C'de

ısıtılmış) eklendikten sonra 8000 xg'de 1 dakika santrifüj edilmeleri ile tamamlandı. İzole edilen genomik DNA'lar -20°C'de saklama altına alındı.

3.3. DNA MOLEKÜLLERİNİN NİTEL VE NİCEL ANALİZİ

Genomik DNA'nın nitel ve nicel analizi spektral ve elektroforetik yöntemlerle gerçekleştirildi. Bu amaçla spektrofotometrede DNA'nın UV ışığının 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldü. Çift iplikli DNA molekülü için 1 optik densite (OD) değeri 50 µg/ml'ye karşılık geldiği için DNA konsantrasyonları; DNA (µg/ml) = $A_{260} \times$ sulandırım oranı \times 50 formülüne göre hesaplandı. Saflık kontrolü için 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranı (A_{260}/A_{280}) hesaplandı. Bu oran 1.8-2.0 değer aralığında olduğunda genomik DNA'nın saf olduğu kabul edilmektedir (Maniatis ve diğ., 1982).

Buna ek olarak DNA miktar ve saflığı agaroz jel elektroforezi ile de kontrol edildi. Bu amaçla toplam hacim 70 ml olacak şekilde %1'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla 0.7 gr agaroz (Sigma) tartılarak 70 ml tris asetat (TAE) tamponunda (Tablo 3.3) çözdürüldü. Karışım bir miktar soğutulup içine etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml) eklenerek karıştırıldıktan sonra jel kasetine döküldü ve oda sıcaklığında polimerizasyon beklendi. İzole edilen genomik DNA örneklerinin 5 µl'si agaroz jele 1 µl yükleme tamponuyla (Tablo 3.3) birlikte uygulandı. Eş zamanlı olarak molekül ağırlığı bilinen standart DNA molekülü (GeneRuler 1kb DNA Ladder–SM0311, Thermo Scientific) de jele yüklendi ve 70 volt sabit güçte 30 dakika elektroforez gerçekleştirildi. Transilluminatörde UV ışık altında görüntülenen genomik DNA miktarı, boyutu ve saflığı jelde ayrılan standart fragmentleri ile karşılaştırılarak kontrol edildi ve jel görüntüleme cihazı (Avegene, X-lite 2000) kullanılarak fotorağraflandı.

Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon bileşenleri ve derişimleri.

Tampon	Bileşenler	Derişim
Tris-Asetat (TAE) Tamponu (50X)	Tris bazı	2 M
	Glisiyal asetik asit	% 0.571
	EDTA (pH 8.0)	0.05 M
Yükleme tamponu (6X)	Tris-HCl (pH 7.6)	10 mM
	Bromofenol mavisi	% 0.03
	Ksilen siyanol FF	% 0.03
	Gliserol	% 60
	EDTA	60 mM

3.4. ÇALIŞILACAK GENLERİN BİYOİNFORMATİK TARAMASI

Virulansla ilişkilendirilmiş dizilim bilgileri *L. garvieae*'ye filogenetik olarak yakın türlerde PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>⁵) web sayfasında tarandı. Bu amaçla PATRIC veritabanında bulunan "ORGANİZMA" sekmesine tıklandı, tarama kategorisi olarak "tüm bakteriler" seçildi. "Specialty genes" sekmesi tıklandıktan sonra arama butonuna çalışılacak türün ismi "*Lactococcus garvieae*" olarak yazıldı ve arama kriterinde kaynak olarak "Victor" sekmesi etkinleştirildi. Ekranda çıkan veriler çalışılacak bakteride ve bu türe filogenetik olarak yakın türlerde bildirilmiş virulans faktörlerine ait bilgileri içermektedir.

Analiz sonucunda görüntülenen genlerin ve literatürden alınan genlerin lokus etiketleri "<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=>"⁶ adresinde ayrı ayrı aratıldı. Genlerin FASTA formatları elde edildi. Her genin nükleotid dizilimi "RUN BLAST" sekmesine tıklanarak veritabanındaki nükleotid koleksiyonu ile uyumluluğu "More dissimilar sequences (discontiguous megablast)" kriterine göre taratıldı. BLAST analizi sonucunda ilgili gene ait nükleotid dizilimleri birkaç farklı dizilimle elde edildi. İlgili gene ait fark içeren nükleotid dizilimleri hizalamaları ile genin tüm nükleotid dizilim bilgisine ulaşıldı. Tarama sonucuna göre ulaşılan farklı *L. garvieae* suşlarının ve E değeri düşük olan türlerin gene ait nükleotid dizilimleri FASTA formatında çevrimiçi hizmet veren "CLUSTALW" (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)⁷ programıyla kriter "DNA" seçilerek ve çoklu karşılaştırma seçeneği tıklanarak hizalandı. Programa veri girişi, program veri giriş penceresine FASTA formatındaki nükleotid dizilim bilgilerinin satır atlanarak ardışık olarak girilmesi ile gerçekleştirildi. 60 nükleotidlik DNA parçaları şeklinde görüntülenen hizalamalarda identik bölgeler yıldız işaretiyle (*) vurgulanırken uyum yakalanamamış bölgelerle birlikte delesyonlu bölgeler yatay çizgi (-) ile gösterildi.

3.5. PRİMER TASARIMI

L. garvieae suşlarının tür düzeyinde tanımlanmasında Zlotkin ve diğ. (1998) tarafından bildirilmiş, 16S rDNA'ya özgün olarak geliştirilmiş oligonükleotid primer çiftine ait

⁵ <https://www.patricbrc.org/>, [Ziyaret Tarihi: 10 Kasım 2016]

⁶ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=>, [Ziyaret Tarihi:10 Kasım 2016]

⁷ <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>, [Ziyaret Tarihi: 10 Kasım 2016]

diziler (pLG-1: 5'- CATAACAATGAGATCGC-3'; pLG-2: 5'- GCACCCTCGCGGGTTG-3') kullanıldı.

Çoklu hizalamasıyla uyum yakalanmış gen bölgelerine ait nükleotid dizilim bilgileri FASTA formatında çevrimiçi primer tasarlama aracı olan “Primer 3” programına girildi. GC oranı %50 olarak seçildi. Primer çiftleri, her birinin Tm derecesi benzer sıcaklık değerlerinde (tercihen yaklaşık 60°C), boyutları da yaklaşık 20 nükleotid olacak şekilde tasarlandı. Tüm ileri ve geri primerlerin analizi “<http://eu.idtdna.com/calc/analyser>⁸” adresindeki “Oligo Analyser 3.1” programı ile çevrimiçi olarak gerçekleştirildi. Program veri giriş penceresine ileri primer oligonükleotit dizilim bilgisi doğrudan, geri primere ait dizi bilgisinin ters tamamlayıcı dizisi girildi. Geri primere ait ters tamamlayıcı iplik “ReverseComplement” (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html⁹) çevrimiçi aracına FASTA formatında veri girişi yapılarak elde edildi. Tasarlanan primer çiftlerinin “self-dimer”, “hetero-dimer” ve “hairpin” yapısı oluşumu ile ilişkili ΔG değerinin belli aralıkta (-2– +6 kcal/mol) olmasına dikkat edildi. Tasarımı yapılan primerler ALFAGENTM firması tarafından hizmet alımı ile sentezletirildi.

Bu çalışmada araştırılacak adezin gen kümesi 1, -2 (*adhCI*, *adhCII*), adezin geni (*adh*), adezin Pav (*adhPav*), adezin PsaA (*adhPsaA*), LPxTG içeren yüzey proteini 1, -4 genleri (*LPxTG-1*, *LPxTG-4*), hemolizin 1, -2, -3 genleri (*hly1*, *hly2*, *hly3*) ve PATRIC veri tabanı aracılığıyla ulaşılan *L. garvieae* için virulans geni olma potansiyeli taşıyan *purB* ve *SP_0121* genleri için oligonükleotid tasarlandı. 16S rRNA ve *LPxTG-2*, *LPxTG-3*, *LPxTG-4* genleri için kullanılan primerler literatürden alındı (Zlotkin ve diğ., 1998; Ture ve Altinok, 2016) (Tablo 4.1).

3.6. GENLERİN PZR İLE ÇOĞALTILMASI

Çalışmada 16S rDNA bölgesi ve virulans genlerinin varlığı *L. garvieae* suşlarında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tarandı. PZR analizi her bir primer çifti için Tablo 3.4’de verilen reaksiyon bileşenlerinin belirtilen sırayla 0.2 ml’lik mikrotüplerde bir araya getirilmesi ile toplam 25 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Negatif kontrol

⁸ <http://eu.idtdna.com/calc/analyser>, [Ziyaret Tarihi: 24 Kasım 2016]

⁹ http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html, [Ziyaret Tarihi: 24 Kasım 2016]

grubunda kalıp DNA yerine aynı miktarda iki kere arıtılmış su (ddH₂O) kullanıldı. Çoğaltım analizlerinin tümü üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.4: Sırasıyla biraraya getirilen PZR bileşenleri ve son derişimleri.

Bileşen	Son Derişim
ddH ₂ O	-
Reaksiyon tamponu	1X
MgCl ₂	2.5 mM
dNTP	0.4 mM
İleri Primer	15 pM
Geri Primer	15 pM
DNA	25 ng
Enzim	1 U

Negatif kontrolle birlikte 21 örneğin genomik DNA'larının 16 farklı primer çifti ile çoğaltımı Tablo 3.5'de verilen koşullar altında gerçekleştirildi.

Tablo 3.5: PZR koşulları ve döngü sayısı

Reaksiyon basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	2 dak	1
Denatürasyon	95	45 sn	
Primer bağlanma	Değişken*	45 sn	28
Uzama	72	1.5 dak	
Final uzama	72	7 dak	1
Saklama	4	∞	1

*Her gen için uygun sıcaklık değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

3.7. PZR ÜRÜNLERİNİN AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ İLE ANALİZİ

Özgün primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin 10 µl'si içeriği Tablo 3.3'de verilen 2 µl yükleme tamponu (6X) ile karıştırılarak %1'lik agaroz jel elektroforezine bölüm 3.3'te ayrıntılandırıldığı gibi uygulandı. Reaksiyon ürünlerinin boyutlarının anlaşılabilmesi için markır olarak 3 µl standart DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder–SM0311, Thermo Scientific) kullanıldı. Jel 70 V'ta 40 dakika süre ile yürütüldü ve çoğaltılan bölgelerin uzunluğu ile hedeflenen bölgelerin uzunlukları karşılaştırıldı. Sonuçlar jel görüntüleme cihazı kullanılarak fotograflandı (Avegene, X-lite 2000).

3.8. DİZİLEME YÖNTEMİNE DAYALI VERİ ANALİZİ

Nükleotid dizilimi çıkarılacak örnekler bölüm 3.6’da belirtilen koşullarda 50 µl hacimde çoğaltıldı ve PZR ürünleri ticari saflaştırma kiti (Agarose Gel DNA Extraction Kit) ile saflaştırıldı. Bu amaçla agaroz jelde ayrımı yapıldıktan sonra DNA fragmenti bisturi yardımıyla kesilerek mikrotüpe aktarıldı. 300 µl agaroz çözücü tampon ve 10 µl silika süspansiyonu eklenerek karıştırıldı ve iki dakika aralıklarla vorteksenerek 60°C’de 10 dakika bekletildi. İşlem sonrası örnekler 12000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpe 500 µl nükleik asit bağlama tamponu eklendi. Santrifüj işlemi bir önceki basamaktaki gibi tekrarlandı. Pellet kuruduktan sonra üzerine 50 µl çift steril edilmiş su eklendi ve her iki dakikada bir vorteksenerek 60°C’de 10 dakika bekletildi. Son aşama olarak gerçekleştirilen 12000 rpm de 30 sn santrifüj ile saf DNA molekülleri elde edildi.

Saflaştırılmış örnekler “Sanger Yöntemi” ile genlere ait çift yönlü nükleotid dizilim bilgisinin elde edilmesi amacıyla RefGen firmasına gönderildi. Dizileme işleminde hedef genlere özgün tasarlanmış primerler kullanıldı. Genlere ait ileri dizi verisi ve geri dizinin ters tamamlayıcı nükleotid dizilim bilgisine FASTA formatı halinde “Chromas Lite” programı kullanılarak ulaşıldı ve NCBI veri tabanından (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=>¹⁰) FASTA formatında elde edilmiş *L. garvieae* Lg2 NC_017490.1 referans suşuna ait dizilim bilgisiyle “CLUSTAL W” (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>¹¹) programı kullanılarak 3.4’te belirtildiği gibi hizalandı. İşlem sonrası referans suş ile uyum yakalanan ileri ve/veya geri nükleotid dizilim bilgisi kullanılarak seçilen suşlarda her bir gene ait DNA dizilim bilgisi kaydedildi. Suşların genlere ait dizilim bilgileri yine “CLUSTAL W” ile hizalanarak karşılaştırıldı.

3.9. ANTİBİYOGRAM TESTİ

Çalışmada hastalık etmeni olan ve ticari olarak satılan referans *L. garvieae* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyonu yöntemi ile belirlenmiştir. Suşlar Bölüm 3.1’de detaylandırıldığı gibi MHA besi ortamına yayıldı. Ardından her bir petriye 6 farklı ticari antibiyotik diski eşit aralıklarda olacak şekilde pens yardımıyla

¹⁰ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=>, [Ziyaret Tarihi: 01 Mayıs 2017]

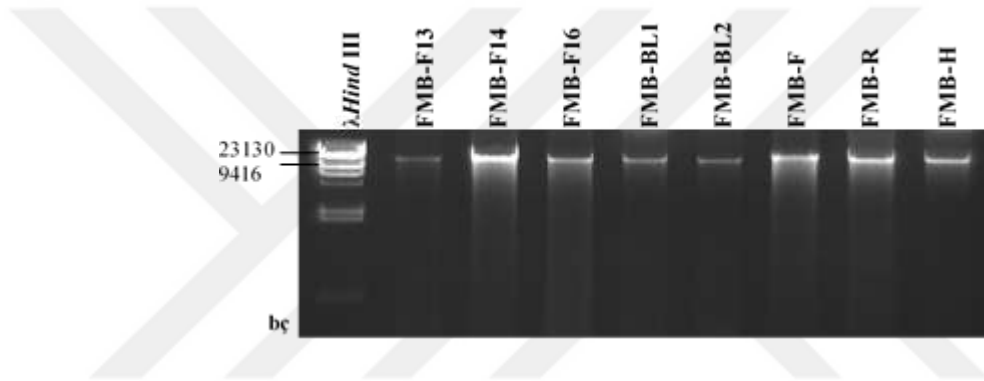
¹¹ <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>, [Ziyaret Tarihi: 01 Mayıs 2017]

yerleştirildi. Çalışmada kullanılan suşların 12 farklı antibiyotiğe (ampisilin (AMP 10 µg), eritromisin (E 5 µg), florfenikol (FFC 30 µg), klindamisin (DA 2 µg), kanamisin (K 30 µg), enrofloksasin (ENR 5 µg), siprofloksasin (CIP 1 µg), kloramfenikol (C 30 µg), oksitetrasiklin (OT 30 µg), sulfametoksazol/trimetoprim (SXT 25 µg), flumekuin (UB 30 µg), streptomisin (S 10 µg)) olan duyarlılığının gözlenmesi için petriler 25°C’de 24 saat boyunca kültürlendi. İnkübasyonu takiben antibiyotik diskleri çevresinde oluşan zon çapları cetvel ile milimetrik olarak ölçüldü. Üç tekrarlı gerçekleştirilen testte alınan milimetrik ölçümlerin aritmetik ortalaması hesaplanarak suşlar “Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI)” nin *Enterococcus* spp. için yayımladığı CLSI, 2009 ve CLSI, 2013 standartlarına göre dirençli (R), orta derecede duyarlı (I) ve duyarlı (S) olarak derecelendirildi.

4. BULGULAR

4.1. GENOMİK DNA'NIN KALİTATİF VE KANTİTATİF ANALİZİ

THB özgün besi ortamında 24 saat süre ile kültürlenmiş 21 *L. garvieae* suşundan izole edilen ve agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilen genomik DNA'ların yüksek miktarda (0.33-0.48 µg/µl) ve saflıkta (1.7-1.9) olduğu belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Sekiz *L. garvieae* suşuna ait genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezi sonrası UV ışık altındaki görüntüleri. M: λ Hind III (Thermo, ABD)

4.2. BİYOBİYOİNFORMATİK ANALİZ VERİLERİ

4.2.1. PATRIC Veribankasından Seçilen Genler

PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>¹²) web sayfasından yapılan tarama sonucu 132 veri elde edildi. BLASTP değerlerine göre sadece iki genin virulansla ilişkili olduğu öngörülmüştür. *S. pneumoniae* D39 suşunda virulansdan sorumlu *purB* (Lau ve diğ., 2001) geni *L. garvieae* TRF1 suşu ile %99, *S. pneumoniae* TIGR4 suşunda virulansdan sorumlu *SP_0121* (Hava ve Camilli, 2002) geni de *L. garvieae* Lg2 suşu ile %84 oranında aminoasit dizi benzerliği göstermektedir.

4.2.2. Çoğaltımda Kullanılan Oligonükleotid Primerler

Tez çalışmasında virulansdan sorumlu 14 genin çoğaltılması için 15 adet boyutları 18-21 baz arasında değişen oligonükleotid primer çiftlerinin tasarımı yapıldı (Tablo 4.1).

¹²<https://www.patricbrc.org/>, [Ziyaret Tarihi: 10 Kasım 2016]

Bunlar arasından 12 tanesi ilk defa bu çalışma ile tasarlanan orijinal nükleotid dizilimini içermektedir.

Tablo 4.1: Kullanılan primerler ve özellikleri. i: İleri primer, g: geri primer, ÜB: ürün boyutu, BS: bağlanma sıcaklığı

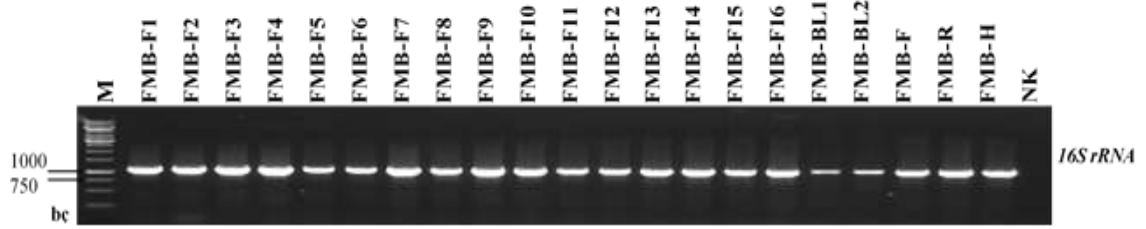
Hedef gen	Primer	Primer dizisi (5' -3')	ÜB (bp)	Lokus	BS (°C)
<i>16S rRNA</i>	pLG1/2*	CATAACAATGAGAATCGC	1100	-	57
		GCACCCTCGCGGGTTG			
<i>hly1</i>	p0323	i: TCCTCCGACTAGGAACCAAA	522	LCGL 0323	56
		g: GCCAGCTTCTCGTGCTTATC			
<i>hly2</i>	p0374	i: GAGCAAAAAGCGAGTGAAGG	796	LCGL 0374	58
		g: GCATCTGGAGCATCAAGTCA			
<i>hly3</i>	p0597	i: CGTGGAGTTATGGCTGGTTT	549	LCGL 0597	55
		g: CTTGTGGATCTTCGGGTCTT			
<i>adhPav</i>	p1330	i: GACACAGACCTTGCAGTCCA	1048	LCGL 1330	59
		g: GATGACGGACTCATCAGGTG			
<i>adhPsaA</i>	p1533	i: CGGGAAGGACCATGTTGATG	552	LCGL 1533	59
		g: AGTTGGGCTGGTGTACCTTG			
<i>adhCI</i>	p0842	i: CAGCTACTACAGGGTTCGC	490	LCGL 0842	58
		g: GCATCATCAGCTGCCAAGTTG			
<i>adhCII</i>	p0843	i: TGATTACACACCCAGCTCCA	732	LCGL 0843	57
		g: CTTTTCTAGCCCGAAAGC			
<i>Adh</i>	p0196	i: GTTGTACAGAACCAGGGGC	398	LCGL 0196	60
		g: TCTCCTGCGTTGACATGGAC			
<i>LPxTG-1</i>	p1005	i: TACGCATCCGCAAGGAGC	947	LCGL 1005	57
		g: CTGCAACATTACCACGCACT			
<i>LPxTG-2</i>	LP2*	i: GCCAGTGAGAGAACC GTTGA	767	LCGL 1410	57
		g: CAGGTTCAAGTGCAACTGCC			
<i>LPxTG-3</i>	LP3*	i: TTAAGCACAAACGGCAACAGC	231	LCGL 1585	55
		g: CACGCGAAATGATGGTGCAT			
<i>LPxTG-4</i>	p1672	i: TAAGCCGTGTTGGTCTGAAG	1021	LCGL 1672	57
		g: TCCGTTTACTGACAAAAGCCG			
<i>LPxTG-4</i>	LP4*	i: GGGAGCACCGGATTCAC TTT	928	LCGL 1672	52
		g: ACAAAGCCGCAGACCTTACA			
<i>SP_0121</i>	Psp	i: ACATGCGGTA CTCAACATGA	966	SP 0121	60
		g: ACGGACACGAGGACCACATC			
<i>purB</i>	PPur	i: CTGGTCCGACGAAAACAAAT	864	LCGL 0565	55
		g: CGTTCATGCCACAAAACAAC			

*: Literatürden alınan primerler.

4.3. TÜR TANI BULGULARI

L. garvieae suşlarının korunmuş kısmı 16S rRNA gen bölgesi 21 bakteri suşunda pLG1/2 primer çifti kullanılarak PZR ile çoğaltıldığında (bkz. Bölüm 3.6) beklenen

1100 bç'lik çoğaltım ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.2). Negatif kontrolün yüklendiği kuyuda çoğaltım gözlenmedi.



Şekil 4.2: *L. garvieae* suşlarında tür tanımlamasını sağlayan 1100 bç boyutlu ürünlerin agaroz gel elektroforezi görüntüsü. M: 1kb (Thermo Scientific), NK: Negatif kontrol

Dizilenen çoğaltım ürünlerinin *L. garvieae* Lg2 NC_017490.1 no ile kayıtlı referans genomu ile çoklu hizalaması sonucunda 1100 bç'lik çoğaltım ürününün 1018 bç'lik kısmi bölgesine ait dizilimlerin %100 homoloji gösterdiği belirlendi. İdentik olan bu dizilere sahip 21 suşun *L. garvieae* türüne ait olduğu doğrulandı (Şekil 4.3).

NC_017490.1_c1962600-1961047	AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAG
pLG1/2-FMB-F11	AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAG
pLG1/2-FMB-F12	AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAG
pLG1/2-FMB-F13	AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAG
pLG1/2-FMB-BL1	AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAG
pLG1/2-FMB-F	AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAG
pLG1/2-FMB-R	AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAG
pLG1/2-FMB-H	AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAG

Şekil 4.3: *L. garvieae* suşlarının tür tanısı için PZR ile çoğaltılan *16S rRNA* genlerinin çoklu hizalanan kısmi bölgesine ait nükleotid dizileri. * identik bazları göstermektedir.

4.4. VİRULANS GENLERİNİN PZR ÇOĞALTIMI

Virulansdan sorumlu olduğu düşünülen özgün kısmi gen bölgeleri Tablo 4.1'de verilen primer çiftleri kullanılarak 21 *L. garvieae* suşunda PZR ile çoğaltıldı (bkz. Bölüm 3.6). Tüm suşların *hly2*, *adhPsaA*, *LPxTG-1* ve *adhCI* virulans genlerine sahip olduğu belirlendi. Ek olarak, *S. pneumoniae*'de virulansla ilişkilendirilmiş *purB* geninin de tüm *L. garvieae* suşlarında bulunduğu ortaya kondu. Suşların, diğer yedi genin (*hly1*, *hly3*, *adhPav*, *LPxTG-2*, *LPxTG-3*, *adhCII* ve *adh*) ve *S. pneumoniae*'de virulansla ilişkili *sp0121* geninin varlığına göre farklılık gösterdiği belirlendi (Tablo 4.2). *hly1* geninin çoğaltım ürününün tek bir suşta (FMB-F13); *hly3* genine ait fragmentin de FMB-F13, FMB-BL2, FMB-F, FMB-R, FMB-H suşlarında bulunmadığı saptandı. *LPxTG-2* geni altı suştan (FMB-F1, FMB-F15, FMB-F16, FMB-BL2, FMB-F, FMB-R) çoğaltılırken,

LPxTG-3 geninin kısmi bölgesi ise bir suş hariç (FMB-H) tüm örneklerden çoğaltıldı. Ayrıca *adhPav*, *adhCII* ve *adh* genlerinin kısmi bölgeleri FMB-F13, FMB-BL-1, FMB-BL2, FMB-F, FMB-R, FMB-H suşlarından elde edilemedi. *SP_0121* geninin FMB-F13 ve FMB-BL-2 suşları dışında diğer tüm suşlarda taşındığı gösterildi *LPxTG-4* geninin çoğaltımı LP4 primer çifti ile başarısızken, p1672 primerinin kullanıldığı PZR ile 13 örnekte çoğaltım gerçekleştirildi.

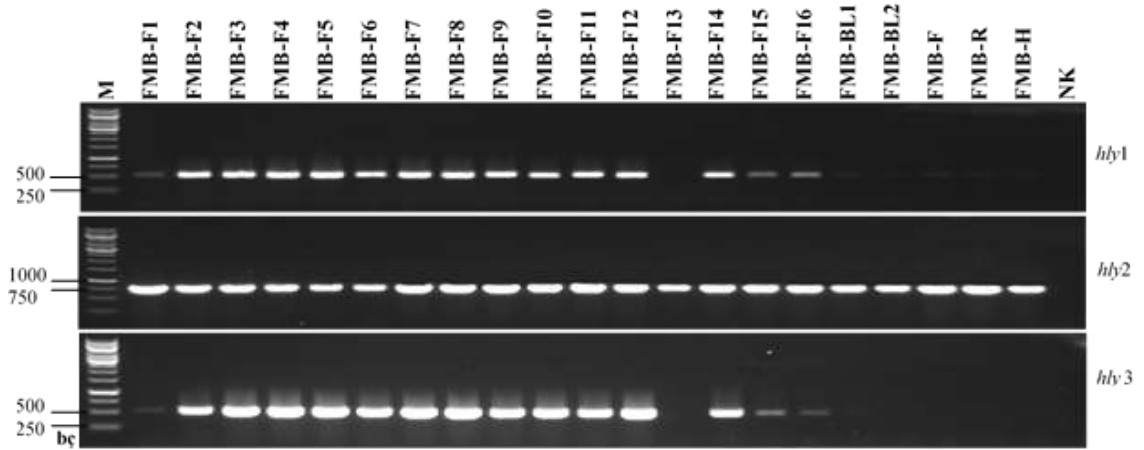
Tablo 4.2: *L. garvieae* suşlarında *hly1*, *hly3*, *adhPav*, *LPxTG-2*, *LPxTG-3*, *adhCII*, *adh* ve *SP_0121* genlerinin varlığı. +: gen var; -: gen yok ve/veya null allel

Gen/ Suş	<i>hly1</i>	<i>hly3</i>	<i>adh</i>	<i>adhCII</i>	<i>adhPav</i>	<i>LPxTG-2</i>	<i>LPxTG-3</i>	<i>SP_0121</i>
FMB-F1	+	+	+	+	+	+	+	+
FMB-F2	+	+	+	+	+	-	+	+
FMB-F3	+	+	+	+	+	-	+	+
FMB-F4	+	+	+	+	+	-	+	+
FMB-F5	+	+	+	+	+	-	+	+
FMB-F6	+	+	+	+	+	-	+	+
FMB-F7	+	+	+	+	+	-	+	+
FMB-F8	+	+	+	+	+	-	+	+
FMB-F9	+	+	+	+	+	-	+	+
FMB-F10	+	+	+	+	+	-	+	+
FMB-F11	+	+	+	+	+	-	+	+
FMB-F12	+	+	+	+	+	-	+	+
FMB-F13	-	-	-	-	-	-	+	-
FMB-F14	+	+	+	+	+	-	+	+
FMB-F15	+	+	+	+	+	+	+	+
FMB-F16	+	+	+	+	+	+	+	+
FMB-BL1	+	+	-	-	-	-	+	+
FMB-BL2	+	-	-	-	-	+	+	-
FMB-F	+	-	-	-	-	+	+	+
FMB-R	+	-	-	-	-	+	+	+
FMB-H	+	-	-	-	-	-	-	+

4.4.1. Hemolizin Genlerinin Analizi

Tez çalışması kapsamında araştırılan üç hemolizin geninden 0374 lokusunda yer alan 796 bç'lik *hly2* genine ait çoğaltım ürünü tüm *L. garvieae* suşlarında agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi (Şekil 4.4). Benzer şekilde 21 suшта LCGL 0323 lokusundan çoğaltılan *hly1* ve 16 suşun (Tablo 4.2) LCGL 0597 lokusundan çoğaltılan *hly3* genlerine ait sırasıyla 522 ve 549 bç'lik fragmentleri Şekil 4.4'de gösterildi.

Hemolizin genlerinin kısmi nükleotid dizilimlerinin *L. garvieae* Lg2 NC_017490.1 referans dizilimi ile hizlaması sonucu referansa en yakın suşun FMB-F11 olduğu belirlendi. En yüksek dizi homolojisi (%99) *hly1* gen diziliminden elde edildi. *hly2* ve *hly3* genlerinin benzerlikleri sırasıyla %98 ve 95 olarak hesaplandı.



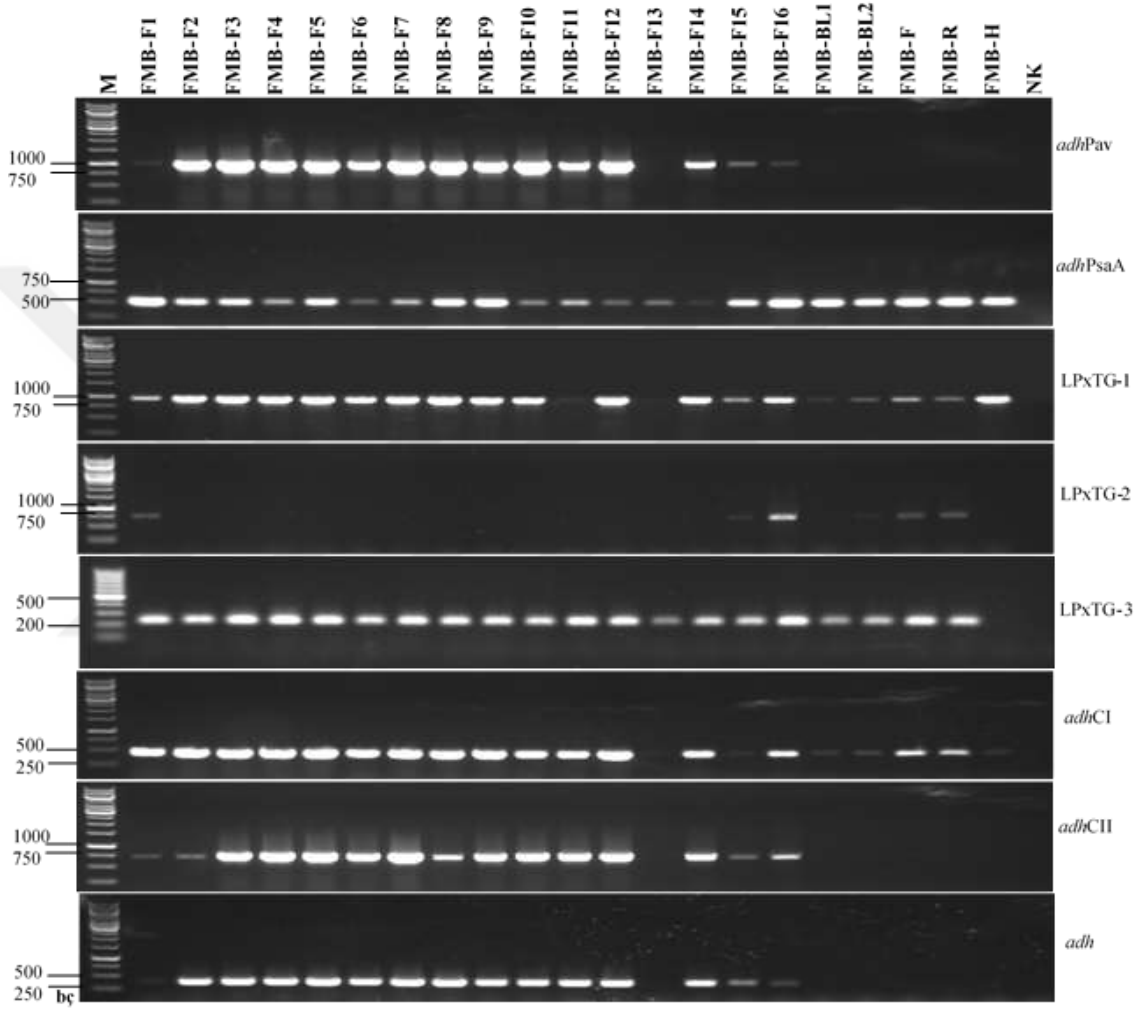
Şekil 4.4: 21 *L. garvieae* suşunda özgün primerlerle çoğaltılan *hly1* genine ait 522 bç'lik; *hly2*'ye ait 796 bç'lik; *hly3*'e ait 549 bç'lik DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1kb (Thermo Scientific), NK: Negatif kontrol

4.4.2. Adezin Genlerinin Analizi

Virulansda rol oynayan sekiz adet adezyondan sorumlu genin PZR çoğaltımından elde edilen bantların agaroz jel elektroforezi görüntüleri Şekil 4.5'de verilmektedir. Çalışmada kullanılan tüm bakteri suşlarının 522 bç boyutundaki *adhPsaA* genine, 947 bç'lik *LPxTG-1*'e ve 490 bç boyutlu *adhCI*'e sahip olduğu belirlendi. Bu genlerin tüm suşlarda adezyonda rol oynayabileceği gösterildi. Diğer adezyon genlerinden *adhPav* için beklenen 1048 bç'lik ürün boyutlu çoğaltım ürünü, *LPxTG-3* için 231 bç, *adhCII* için 732 bç ve *adh* için 398 bç'lik ampikonlar Tablo 4.2'de "+" ile işaretlenmiş suşlardan elde edildi. Bu dört adezyon geninin tür içerisinde bakteri suşları arasında çeşitlilik gösterebileceği ortaya kondu. *LPxTG-2* geninin beklenen 767 bç'lik ürünü 15 suşdan çoğaltılamadı. Diğer 6 suşun genomik DNA'sından ise az miktarda çoğaltım elde edildi. *LPxTG-4* geninin çoğaltımı LP4 primer çifti ile sağlanamadı. Bu çalışmada tasarlanan yeni oligonukleotid çifti (p1672 primeri) ile gerçekleştirilen PZR'nunda beklenen 1021 bç boyutundaki fragment yerine 10 suşta 1500 bç'lik tek bir fragment ve üç suşta da yaklaşık 250 ve 500 bç boyutlu iki bant elde edildi. *LPxTG-2* ve *LPxTG-4* adezyon genleri için dizileme hizmeti alınmadı.

adhCI, *adhCII*, *adh*, *adhPav*, *adhPsaA*, *LPxTG-1*, *LPxTG-3* nükleotid dizilimleri ve *L. garvieae* Lg2 NC_017490.1 referans dizileri arasındaki benzerlik oranı %85-99 olarak hesaplandı. Referansla en yüksek nükleotid dizi benzerliğine sahip suşların FMB-F11 ve FMB-F12 olduğu belirlendi. Varyasyondan tek nükleotid değişimlerine ek olarak

daha az sayıda taşınan çift nükleotid değişimleri ve delesyonun da sorumlu olduğu belirlendi. Çoğaltılan genler için gerçekleştirilen çoklu hizalama analizi bu yedi gene ait kısmi nükleotid dizilimlerinin referansın adezyon genleri ile uyumlu olduğunu gösterdi. Elde edilen bulgular bu yedi genin de adezyon aracılı virulansda rol oynayabileğini ortaya koydu.



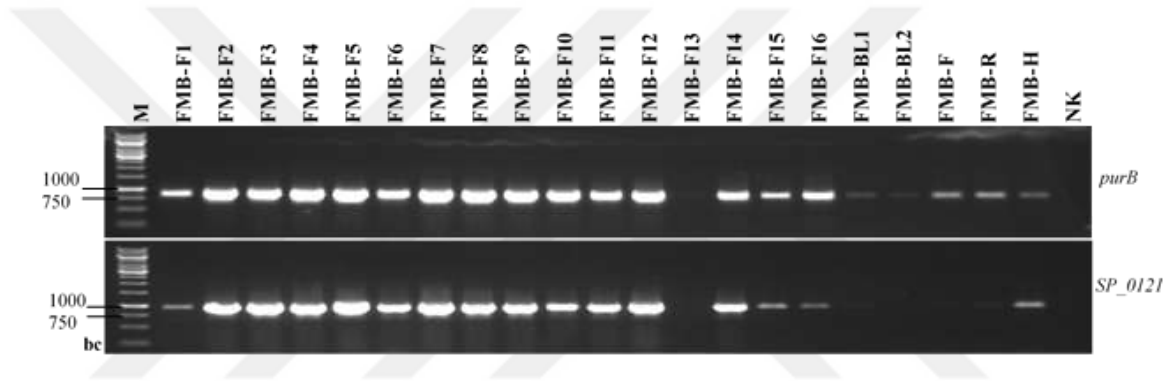
Şekil 4.5: *L. garvieae* suşlarında çoğaltılan *adhPsaA* genine ait 522 bç'lik; *adhPav*'a ait 1048 bç'lik; *LPxTG-1*'e ait 947 bç; *LPxTG-2*'e ait 767 bç, *LPxTG-3*'e ait 231bç; *adhCI*'e ait 490 bç; *adhCII*'e ait 732 bç ve *adh* genine ait 398 bç'lik DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi analizi. M: 100 bç (Thermo Scientific); M: 1kb (Thermo Scientific); NK: Negatif kontrol

4.4.3. Virulansdan Sorumlu Yeni Gen Adaylarının Analizi

S. pneumoniae'de virulansdan sorumlu olduğu gösterilmiş *purB* geninin *L. garvieae*'deki varlığı tüm suşlarda çoğaltılan 864 bç'lik ürün boyutu ile gösterildi. Aynı şekilde *S. pneumoniae*'de virulansla ilişkilendirilmiş *SP_0121* genine göre

tasarlanan primer çifti *L. garvieae*'de 966 bç'lik kısmi gen bölgesini PZR'nda çoğalttı (Tablo 4.2).

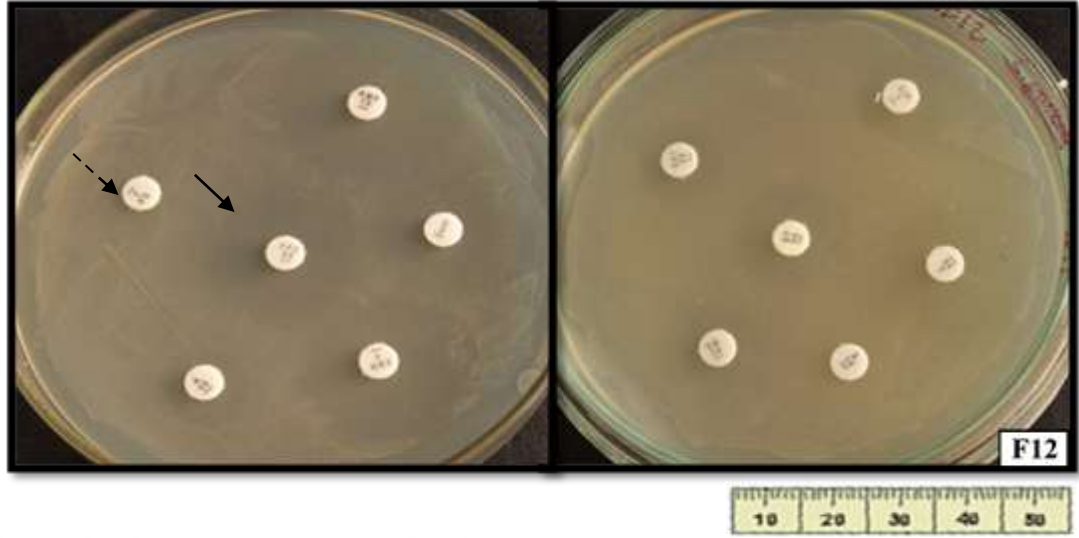
L. garvieae suşlarında çoğaltılan FASTA formatında elde edilen *purB*'e ait nükleotid diziliminin *S. pneumoniae purB* dizilimi ile hizalanması sonucu %71-73 arasında benzerlik oranı elde edildi. Aynı şekilde *SP_0121*'ne ait nükleotid diziliminin *S. pneumoniae*'ye ait dizilimlerle hizalandığında benzerliğin %65-67 aralığında olduğu saptandı. *L. garvieae*'den çoğaltılan bu iki gen bölgesi Lg2 NC_017490.1" referans suşu ile hizalandığında ise *purB* için %93-99; *SP_0121* için ise %95-97 oranında dizi benzerliği olduğu ortaya kondu.



Şekil 4.6: *purB* ve *SP_0121* genlerinin 21 *L. garvieae* suşunda çoğaltılan sırasıyla 864 bç ve 966 bç boyutlu ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi. M: 1kb (Thermo Scientific), NK: Negatif kontrol

4.5. ANTİBİYOGRAM TESTİ BULGULARI

L. garvieae suşlarının 12 farklı antibiyotik diskini içeren kültürlerinde duyarlı oldukları antibiyotiklerin civarında üremedikleri (siyah ok), ancak direnç kazanmış oldukları disklerin civarında üremenin olduğu (kesikli ok) gözlemlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: FMB-F12 suşunda antibiyogram test bulguları. →: antibiyotik zonu; --> : zon gözlenmeyen alan

Antibiyogram testinde 21 *L. garvieae* kültüründe 12 farklı antibiyotik çeşidi için de zon çapları ölçüldü. Üç farklı zamanda gerçekleştirilen tekrarlı denemelerden her bir antibiyotik diskinin etrafından kaydedilen değerlerin aritmetik ortalaması standart sapmaları ile birlikte hesaplandı. Tablo 4.3 standart sapmaları ile birlikte 21 suşun zon çapı ortalama değerlerini göstermektedir. Tüm suşlar arasından en büyük zon çapı (35 mm) FMB-F2'ye ait kültürlerdeki oksitetrasiklin (OT 30) antibiyotik diski çevresinde gözlemlendi. FMB-F1 ve FMB-BL1 kültürlerinden ölçülen 10 mm çaplı zonlar sırasıyla siprofloksasin (CIP 1) ve flumekuın (UB 30) antibiyotik disklerinin civarından elde edildi.

Tablo 4.3: Antimikrobiyal çevresinde oluşan zonların aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri.

Suş	Antibiyotik											
	AMP 10	E 5	FFC 30	DA 2	K 30	ENR 5	CIP 1	C 30	OT 30	SXT 25	UB 30	S 10
FMB-F1	28±0	16±1.323	20±1	0	12±0.354	18±1.041	10±1	23±1.803	23±1.732	12±1.768	0	0
FMB-F2	29±5.774	28±1.803	25±7.638	0	14±2.082	25±2.255	13±1.893	24±1.756	35±1	18±3.464	0	0
FMB-F3	26±0	14±3.329	14±0.354	0	0	15±3.786	16±1.155	16±2.517	25 ±1.041	15±1.323	0	0
FMB-F4	21±1.155	16±1	20±2.179	0	0	20±0	14±0.289	19±0.764	24±1	14±0.577	0	0
FMB-F5	24±1.756	21±1	20±1.155	0	12±1.528	22±1.528	17±1.528	19±1.155	25±1	14±1.528	0	0
FMB-F6	26±5.132	22±2.121	22±2	0	12±1.155	23±1.528	0	19±0	27±2.475	16±0	0	0
FMB-F7	28±1.528	23±1.040	25±0.866	0	13±1.803	24±1.155	16±0.764	21±1.803	24±1.323	13±2.082	0	0
FMB-F8	22±2.121	18±3.536	20±1	0	11±0.577	21±1.732	14±2.517	19±3.786	27±0.577	13±3	0	0
FMB-F9	24± 6.083	21±1.893	22±3.055	0	16±1.041	27±2.646	18±1.528	18±5.657	23±0.354	16±3.512	13±1.414	0
FMB-F10	25±0.577	17±1.155	22±1.528	0	12±0.866	21±0.577	15±2	17±3.512	23±2.082	13±0.866	0	0
FMB-F11	30±0.707	17±3.786	19±5.292	0	14±1.528	23±2.566	16±3	18±3.902	25±1.323	18±0.577	12±2.466	0
FMB-F12	32±0.577	22±2.082	25±0.764	0	16±2.646	27±0.5	16±0.764	21±1	23±1.607	19±7.234	0	0
FMB-F13	22±1.155	12±1.732	19±1.803	0	12±1	16±1.155	12±1.528	18±2.309	18±1.732	0	0	0
FMB-F14	25±1	18±1	18±2.646	0	11±0.764	20±1.607	15±1	18±1.041	24±1	14±2.255	0	0
FMB-F15	18±1.528	21±4.805	22±3.889	0	12±0.707	20±3.889	11±0.707	18±0	20±0.577	13±0.707	0	0
FMB-F16	25±3.547	18±1.5	19±1	0	11±0.764	19±0.764	12±2.363	20±2	23±0.577	14±2.082	0	0
FMB-BL1	24±0.764	16±5.033	18±2.363	0	11±0.5	17±2.517	11±0.707	15±1.528	25±0	15±0.354	10±0.354	0
FMB-BL2	25±1.528	14±1	17±3.215	0	11±1	15±2.082	11±0.354	21±1.155	20±3.329	0	0	0
FMB-F	21±1.155	20±1.893	22±1.258	0	11±0.577	18±1.443	13±1.732	18±4.163	24±1.528	12±1.528	0	0
FMB-R	25±1.528	18±0.577	22±0.764	0	13±1	20±1.323	12±0.289	17±2	24±1.732	14±1.893	0	0
FMB-H	24±1.155	24±2.121	25±1.528	0	0	16±5.292	12±2.082	26±3.215	11±2	0	0	0

Tablo 4.4 suşların zon çaplarına göre atanmış uluslararası CLSI standartları ile temsil edilen duyarlılık derecelerini göstermektedir. 21 suşun 12 çeşit antibiyotiğin antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi amacıyla yapılan antibiyogram testi ile elde edilen 252 çıktı sonucu; 92 duyarlı, 54 orta derecede duyarlı ve 106 direnç kazanmış bakteri belirlendi.

Tablo 4.4: Antibiyotik direncine göre 21 suşun standartlara göre değerlendirilmesi. R: dirençli; I: orta derece duyarlı; S:duyarlı

Suş	Antibiyotik											
	AMP 10	E 5	FFC 30	DA 2	K 30	ENR 5	CIP 1	C 30	OT 30	SXT 25	UB 30	S 10
FMB-F1	S	I	S	R	R	R	R	S	S	I	R	R
FMB-F2	S	S	S	R	I	S	R	S	S	S	R	R
FMB-F3	S	I	R	R	R	R	I	I	S	I	R	R
FMB-F4	S	I	S	R	R	I	R	S	S	I	R	R
FMB-F5	S	I	S	R	R	S	I	S	S	I	R	R
FMB-F6	S	I	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R
FMB-F7	S	S	S	R	R	S	I	S	S	I	R	R
FMB-F8	S	I	S	R	R	I	R	S	S	I	R	R
FMB-F9	S	I	S	R	I	S	I	S	S	S	S	R
FMB-F10	S	I	S	R	R	I	R	I	S	I	R	R
FMB-F11	S	I	S	R	I	S	I	S	S	S	I	R
FMB-F12	S	I	S	R	I	S	I	S	S	S	R	R
FMB-F13	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R
FMB-F14	S	I	I	R	R	I	R	S	S	I	R	R
FMB-F15	S	I	S	R	R	I	R	S	S	I	R	R
FMB-16	S	I	S	R	R	R	R	S	S	I	R	R
FMB-BL1	S	I	I	R	R	R	R	I	S	I	S	R
FMB-BL2	S	I	I	R	R	R	R	S	S	R	R	R
FMB-F	S	I	S	R	R	R	R	S	S	I	R	R
FMB-R	S	I	S	R	R	I	R	I	S	I	R	R
FMB-H	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R

Her bir antibiyotiğe karşı duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli bakterileri sayısı test edilen toplam bakteri suş sayısına (21) oranlandığında çalışmada kullanılan *L. garvieae* suşlarının klindamisin ve streptomisine dirençli; ampisiline ise duyarlı oldukları belirlendi. Bu üç antibiyotik dışındaki diğer antimikrobiyallere (eritromisin, florfenikol, kanamisin, enrofloksasin, siprofloksasin, kloramfenikol, sulfametoksazol/trimetoprim, flumequin, oksitetrasiklin) karşı suşların farklı düzeylerde duyarlı oldukları saptandı. Suşların %17-95'inin duyarlı; %19-81'inin orta derecede duyarlı; %5-83'nün de dirençli oldukları bulundu (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Antibiyotiklere karşı dirençli, orta derecede duyarlı ve duyarlı olan *L. garvieae* suş sayılarının yüzde değerleri. R: dirençli; I: orta derece duyarlı; S:duyarlı

Antibiyotik	%		
	R	I	S
AMP10	0	0	100
E5	5	81	14
FFC30	5	14	81
DA2	100	0	0
K30	80	19	1
ENR5	38	29	33
CIP1	71	29	0
C30	0	19	81
OT30	5	0	95
SXT25	14	62	24
UB30	83	0	17
S10	100	0	0

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Laktokokkozis etmeni olan *L. garvieae* aynı zamanda potansiyel zoonotik bir ajandır. Bu nedenle türün patojenite mekanizmasının ortaya konması ekonomik kayıplarla sonuçlanan hastalıklarına yönelik teşhis ve tedavi stratejilerinin, aynı zamanda hastalıktan korunma yollarının geliştirilmesinde son derece önemlidir. Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmasında ülkemizdeki alabalık çiftliklerinde yetiştirilen kültür balıklarından izole edilmiş laktokokkozis etmenleri ile birlikte hasta insandan izole edilmiş bir suşun ve *L. garvieae* ATCC 43921 referansının virulansında rol oynayan faktörler genomik düzeyde araştırılmıştır. Ayrıca hastalıkla mücadele stratejisi olarak kullanılan antibiyotiklere direnç kazanan bu bakterilerin çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları da test edilmiştir.

Günümüzde bakterilerin yol açtığı pek çok hastalığın ve/veya hastalık etmeninin teşhisinde daha çok tanı kitlerinin (API 20 STREP, Rapid ID 32 STREP ve API 50 CH gibi) kullanımı tercih edilmektedir. Bu kitlerin pek çok türü kısa sürede yüksek doğruluk oranı ile tanımlamaya olanak sağladığı bildirilmektedir (Türe ve Alp, 2016). Ancak birbiriyle yakın ilişkili türlerin, biyokimyasal analiz temelli olan bu kitlerle ayırt edilememesi, moleküler yaklaşımların bakterilerin karakterizasyonunda kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Multigen aileleri şeklinde ya da operonlarda taşınan *16S rRNA* geni evrimsel düzeyde son derece korunmuş dizilere sahip olduğundan bakteri filogenisi ve taksonomisi çalışmalarında etkin biçimde kullanılmaktadır (Janda ve Abbott, 2007). Gerçekleştirilen tez projesi kapsamında laktokokkozis etmeni *L. garvieae* suşları moleküler yaklaşımlardan 16S rDNA dizi temelli yöntem kullanılarak tanımlanmıştır. Evrensel primerlerin kullanıldığı PZR sonucu çoğaltılan ürünlerin (1100 bç) nükleotid dizileri ile referans genoma (*L. garvieae* Lg2 NC_017490.1) ait dizilerin 1018 bç'lik kısmi bölgede identik (%100 homolog) olduğunun belirlenmesi çalışmada kullanılan suşların tür düzeyinde doğrulanmasını sağlamıştır. Ek olarak, *L. garvieae* suşları biyokimyasal tanı kitleri (Rapid ID 32 STREP) ile de test edilmiş, 15 suşun tür düzeyinde tanısı gerçekleştirilmiştir. Ancak fenotipik karakterlerin temel alındığı bu yaklaşımla altı suşun (FMB-F3, FMB-7, FMB-F10, FMB-F11, FMB-F13, FMB-F) *L.*

garvieae'den çok *E. faecalis*'e yakın olduğu bulgusu elde edilmiştir (veriler tez kapsamında paylaşılmamıştır). Biyokimyasal testlerin ayırım gücünün zayıflığı nedeniyle *Lactococcus* genusunun *Streptococcaceae* ailesi içerisinde yakın ilişkili olduğu *Streptococcus* genusundan ve taksonomik olarak ilk dahil edildiği *Enterococcus* genusundan ayrı bir dalda yer alması ancak 20. yüzyılın sonlarında sağlanmıştır (Schleifer ve diğ., 1985; Doménech ve diğ., 1993; Cheng ve Chen, 1998). Biyokimyasal testlerin yakın ilişkili aile üyelerini ayırt etme gücünün sınırlı olması, moleküler yaklaşımların da doğruluğu bu çalışma sırasında da tecrübe edilmiş, suşların tür düzeyinde kesin tanısı moleküler temelli olarak gerçekleştirilmiştir.

Çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin veri bankasındaki referans genom dizilimi ile karşılaştırılmasında biyoinformatik araçlardan yararlanılmıştır. Tez kapsamında biyoinformatik araçlar, ek olarak PZR'de kullanılacak primer çiftlerinin tasarlanmasında, virulanstan sorumlu genlerin ve gen adaylarının veri bankasından taranmasında, elde edilen çıktıların hizalama analizleri ile karşılaştırılmasında etkili olarak kullanılmıştır.

Virulans faktörleri hastalık oluşturma kapasitesini bir başka ifade ile patojeniteyi etkileyen faktörlerdir. Virulanstan sorumlu başta hemolizin ve adezin virulans faktörlerini kodlayan genler olmak üzere iki aday virulans faktörünü şifreleyen genin *L. garvieae* suşlarındaki varlığı tez çalışması kapsamında araştırılmıştır.

Hücreler üzerindeki toksik etkileri *in vivo* ve *in vitro* gösterilmiş hemolizinlerin bakterilerin virulansında rol oynayan önemli faktörler oldukları bildirilmiştir (Goebel ve diğ., 1988). *hyl1*, *hyl2* ve *hyl3* genleri hemolitik etkinin ortaya konmasında genetik belirteçler olarak kullanılmaktadır (Miyachi ve diğ., 2012; Ture ve Altinok, 2016). Hemoliz etkili molekülleri kodlayan bu genlerin tanımlanması alfa hemolitik özellikteki *L. garvieae*'nin patojenite mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Çalışma kapsamında *hyl2* geninin tüm *L. garvieae* suşlarında taşındığının belirlenmesi genin bu suşların virulansında etkili rol oynadığını göstermesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Benzer şekilde *hyl1* geni tek suş dışında diğer tüm suşlardan çoğaltılmıştır. Genin tek bir örnekte çoğaltılamamasının null allel eldesinden kaynaklandığı, olası primer bağlanma bölgesindeki varyasyon nedeniyle çoğaltım ürününün gözlenemediği düşünülmektedir. Bu nedenle *hyl1* geninin de Ture ve Altinok (2016) tarafından

bildirildiği gibi virulansla ilişkili olabileceği bu çalışma ile de desteklenmiştir. Ture ve Altinok (2016) 1997-2015 yılları arasında izole edilmiş, yurdumuz, Avrupa ve İran'da etkili olan suşlarla genomik çalışmalarını gerçekleştirmişler ve *hyl3* geninin de virulansda etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ancak farklı olarak, bu çalışma kapsamında *hyl3* geni ATCC 43921 referansı ve insan patojenini de içeren beş suştan çoğaltılamamıştır. Suşlardan biri de Karadeniz izolatına aittir. Bu çalışma ile hemoliz etkili ürünleri kodlayan genlerden *hyl3*'ün varyasyonlu taşındığının gösterilmesi, *hyl3* genini taşımayan bakterilerin virulansından *hyl1* ve/veya *hyl2*'nin sorumlu olabileceğini düşündürmüştür.

Bakteri patojenleri tarafından sentezlenen adezinler konak-patojen etkileşiminde rol oynayan virulans faktörleridir. Adezyon ile ilişkili dokuz genin (*adhPsaA*, *adhPav*, *LPxTG-1*, *LPxTG-2*, *LPxTG-3*, *LPxTG-4*, *adhCI*, *adhCII* ve *adh*) *L. garvieae* genomunda tarandığı çalışmada *adhPsaA* ve *adhCI*'nin tüm suşlar tarafından taşındığı, *adh* geninin ise altı suşta bulunmadığı ve/veya bu gen bakımından bireylerin polimorfik olduğu da belirlenmiştir. Bu sonuçlar Ture ve Altinok (2016)'un çalışmasından elde edilenlerle uyumlu iken, *adhPav*, *LPxTG-2*, *adhCII* genlerinin bazı izolatlarda çoğaltılamaması literatürdeki bulgulardan farklılığı ortaya koyması bakımından önemlidir. Günümüzde popülasyon içerisinde bu genlerin polimorfik taşındığı gösterilmiştir. Bir diğer farklı profil de *LPxTG-1* geninden elde edilmiştir. Tüm suşlarda varlığı belirlenen bu gen Ture ve Altinok (2016) tarafından bazı *L. garvieae* suşlarında ve referans ATCC 43921'da çoğaltılamamıştır.

İnsan ve balıktan izole edilen bakteri suşlarının özgün adezyon genlerine sahip oldukları; *LPxTG-3* ve *LPxTG-4* genlerinin insandan izole *L. garvieae* suşlarında bulunmadığı rapor edilmiştir (Miyachi ve diğ., 2012). İnsan patojeni (FMB-H) olan *L. garvieae*'nin, balıklarda hastalık etmeni olan tüm suşlarda çoğaltılan *LPxTG-3* genine sahip olmadığı, *LPxTG-3*'ün potansiyel konak özgün virulans faktörünün kodlanmasından sorumlu olabileceği belirlenmiştir. *LPxTG-4* geninin balıktan izole edilen bazı suşlardaki varlığı Ture ve Altinok (2016) tarafından bildirilmesine karşın bu çalışma ile genin ne balık patojenlerinde ne de insan patojeninde bulunduğu gösterilmiştir. Çalışmada genin çoğaltımı iki farklı primer çifti kullanılarak hedeflenmiştir. Kullanılan primerlerden Ture ve Altinok (2016)'a ait olanla çoğaltım

sağlanamazken, biyoinformatik araçlarla tarafımızdan tasarlanan primerler bazı suşlarda beklenen (1021 bç) yerine daha uzun tek (1500 bç) bir ürünü veya insan patojeninin de dahil olduğu bazı izolatlarda daha kısa iki (500 ve 250 bç) farklı fragmenti çoğaltmıştır. Bulgular *LPxTG-4* geninin *L. garvieae*'nin konağa adezyonunda mutlak elzem bir gen olamayacağını düşündürmüştür. Yedi suşun benzer profile, referans ve insan patojenini içeren üç izolatin da aynı çoğaltım profiline sahip olması daha önce varlığı gösterilen *LPxTG-4*'ün hastalıktan sorumlu olduğu teyit edilmiş suşlarda bulunmadığı ortaya konmuş, bu genin olası pseudogenlerinin taşınabileceğini düşündürmüştür. Pseudogenler işlevsel bir genin tamamının ya da bir parçasının duplikasyonu ile oluşmuş, zamanla mutasyon birikiminin bir sonucu olarak işlev kaybına uğramış gen kopyalarıdır. Çalışmamız bulgumuz *LPxTG-4*'ün literatürde bildirilenin aksine konak özgün gen belirteci olarak kullanılamayacağını ortaya koyması bakımından büyük önem taşımaktadır.

Referans suş olarak kullanılan *L. garvieae* ATCC 49156'nın alt kültürlemeler sırasında kapsül gen kümesini kaybederek artık patojenite özelliği göstermeyebileceği Morita ve diğ. (2011) tarafından bildirilmiştir. Aynı referans suşun kullanıldığı farklı çalışmalarda farklı çoğaltım profillerinin elde edilmesinin alt kültürlemeler sırasında ilgili gen bölgelerinde meydana gelen varyasyonların etkisinden kaynaklandığı tarafımızca düşünülmektedir.

Gen işlevinin belirlenmesi amacıyla kullanılan mutagenез temelli yaklaşımla (ing., Signature tagged mutagenesis) *purB* geninin *S. pneumoniae* D39 suşunda (Lau ve diğ., 2001), *SP_0121* geninin de TIGR4 suşunda (Hava ve Camilli, 2002) patogeneze görevli virulans faktörü olduğu ortaya konmuştur. Bakterilerin yaşamı için gerekli olan temel metabolik yollardan (nükleotid, şeker, aminoasit metabolizması vb.) sorumlu birçok gen bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarla bu temel süreçlerde görevli genlerin de virulans belirteçleri olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir. *purB* geni pürin biyosentezinde görevli adenil süksinat liyaz enzimini şifrelemektedir. *SP_0121* ise metallo-beta-laktamaz beta laktam antibiyotiklerinin hidrolizini katalizyen metallo-beta-laktamaz protein ailesini kodlamaktadır. Her iki gen ürünü ile yüksek amino asit homolojisine sahip dizilimlerin varlığının *L. garvieae*'de *in silico* belirlenmesi iki genin de *L. garvieae*'nin virulansından sorumlu olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle tez

çalışması kapsamında bu iki genin *L. garvieae* genomundaki varlığı çoğaltım temelli yaklaşımla taranarak patojenin virulansındaki potansiyel rolü araştırılmıştır.

L. garvieae'de LCGL 0565 lokusundan kodlandığı bilinen (Morita ve diğ., 2011), ancak virulansla ilişkisi hakkında literatürde veri bulunmayan *purB* geni bu çalışmada tüm suşlarda çoğaltılmıştır. PATRIC veribankasının aminosit benzerliğini temel alarak sunduğu *purB* geninin tüm suşlarda taşındığının ortaya konması bu genin virulans çalışmalarında kullanılabilir aday hedef gen olduğunu gösterir niteliktedir. İki suş dışında diğer tüm suşlarda çoğaltımı gerçekleştirilen *SP_0121* geni ilk defa bu çalışma ile *L. garvieae* genomunda tanımlanmıştır. Gerçekleştirilen hizalama çalışmaları çoğaltılan genlerin nükleotid dizileri ile *L. garvieae* Lg2 NC_017490.1 referans genomunun nükleotid dizileri arasında yüksek oranda uyumun olduğunu ortaya koymuştur. Bakteri virulansından sorumlu olduğu düşünülen 14 genin *L. garvieae* genomunda PZR çoğaltımı temelli olarak varlığının araştırıldığı bu tez çalışmasında genlerin farklı kopya sayıları ile genomda temsil edildikleri de belirlenmiştir. Bulgular genlerin bazı suşlarda gen duplikasyonlarının bir sonucu olarak çok kopyalı taşındığını düşündürmektedir.

Konak-patojen etkileşiminin bir sonucu olarak gözlenen patojenite patojenin hastalık oluşturma yeteneğidir. Bakteri enfeksiyon hastalıklarının neden olduğu sağlık problemleri ve hatta ölümlerin önüne geçme yolu ancak virulansın genetik mekanizmasının aydınlatılması ile gerçekleştirebilir. Hastalık etmeninin virulansı ile ilişkili temel özelliklerinin tanımlanması, virulansın ortaya konması da etkili faktörlerin ve bu faktörleri şifreleyen genlerin belirlenmesi ile gerçekleştirilebilir. Ancak patojenite çeşitli virulans faktörlerinin etkileşiminin bir sonucu olarak ortaya konmaktadır (Zecconi ve diğ., 2006). Bu nedenle *L. garvieae*'de belirlenen virulans genlerinin prevalansının da belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Tez kapsamında virulans genlerinin karakterizasyonu bu genlerin aktivitelerinin belirlenmesine yönelik sunulacak yeni projelere kaynak sağlamıştır. Bir sonraki aşama kültür koşullarında ve patojen-konak etkileşimi sırasında bu genlerin anlatım ürünlerinin gerçek zamanlı PZR ve proteom çalışmaları ile ortaya konması olacaktır. Bu şekilde virulans genlerinin prevalansının belirlenecek olması uzun vadede hastalıkla mücadelede kullanılacak yeni terapötiklerin geliştirilmesinde uygun genomik hedeflerin tanımlanmasını sağlayacaktır.

Günümüzde *L. garvieae* ile etkin mücadele stratejisi antibiyotik kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Ancak antibiyotiklerin aşırı ve bilinçsiz kullanımı, balık yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde dirençli bakteri sayısının artmasına ve aynı zamanda direnç genlerinin halk sağlığı açısından ciddi sorunlara yol açmasına neden olmaktadır. Balık yetiştiriciliğinde bilinçsiz antibiyotik kullanımının bir sonucu olarak antibiyotik direnci kazanan bakteri patojenleri ile mücadele her geçen gün daha da güçleşmektedir. Bu nedenle enfektif ajanın antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Gerçekleştirilen çalışma ile tüm *L. garvieae* suşlarının klindamisin ve streptomisine dirençli; ampisiline ise duyarlı oldukları belirlenmiştir. Ek olarak suşların %80'inin kanamisine, %38'inin enrofloksasine, %71'inin siprofloksasine, %83'ünün flumequine direnç geliştirdiği de tespit edilmiştir. Ayrıca suşların %81'inin eritromisin, %62'sinin sulfametoksazol/trimetoprim karşı orta derece duyarlı olduğu; %95'inin oksitetrasikline, %81'inin kloramfenikol ve florfenikole duyarlılığı da belirlenmiştir.

Diler ve diğ. (2002) gerçekleştirdikleri antibiyogram testlerinde ülkemiz suşlarının klindamisine direnç; kloramfenikol ve ampisiline duyarlı olduklarını belirlemişlerdir. Antibiyogram analiz sonuçlarımız bu üç antibiyotik için duyarlılık profilinin *L. garvieae*'de devam ettiğini göstermektedir. Ayrıca *L. garvieae* suşlarının florfenikol ve oksitetrasikline duyarlı; sulfametoksazol-trimetoprim karşı dirençli olduğu da çeşitli çalışmalarda ortak olarak rapor edilen çıktılardır (Kav ve Erganiş, 2007; Raissy ve Ansari, 2011; Türe ve diğ., 2012; Didinen ve diğ., 2014). Çalışmamızda da suşların çoğunluğunda florfenikol ve oksitetrasikline duyarlılığın belirlenmesi literatürdeki verileri destekler niteliktedir. Ancak *L. garvieae* suşlarının sulfametoksazol-trimetoprim orta derece duyarlılığını ortaya koymamız literatürde bu antibiyotiğe karşı suşların direnç geliştirmiş olduğu verisi ile uyumsuzlukta, duyarlılığın türün farklı suşlarında hala devam ettiğini ortaya koymaktadır. Sadece insandan izole edilen suşun oksitetrasikline dirençli olduğunu belirlememiz balıkçılık sektöründe bu antibiyotiğin mücadelede önerilebileceğini, ancak antibiyotiğin kazanılmış dirençten dolayı enfektif insan klinik uygulamalarında kullanılamayacağını ortaya koymuştur.

Altun ve diğ. (2013) ülkemizden izole ettikleri laktokokkozis etmeni çeşitli suşlar ve 3 referans suşa yaptıkları antibiyogram testlerinde çalışmamızdan farklı bulgular elde etmişlerdir. Orta düzeyde duyarlılığını belirlediğimiz sulfametoksazol/trimetoprim ve

eritromisin antibiyotiklerine; duyarlı olduğunu belirlediğimiz oksitetrasiklin ve florfenikol antibiyotiklerine karşı suşların dirençli olduklarını rapor etmişlerdir. Gerçekleştirilen farklı çalışmalarla *L. garvieae* suşlarının eritromisine duyarlı (Diler ve diğ., 2002; Kav ve Erganiş, 2008; Raissy ve Ansari, 2011; Türe ve diğ., 2012; Didinen ve diğ., 2014) olduğu rapor edilmiştir. Ancak bulgularımız bu türün eritromisine karşı orta derecede duyarlı hale geldiğini, ülkemizde kullanılan antibiyotiklere karşı bakterinin zamanla duyarlılığının azaldığını göstermesi bakımından büyük önem taşımaktadır.

Gerçekleştirilen çalışma ile tüm *L. garvieae* suşlarının streptomisine direnç kazanmış oldukları; ampisiline ise duyarlı olduklarının belirlenmesi bu patojenle hem balık hem de insanda mücadelede bakterisid etkili streptomisinin değil aynı etkiye sahip ampisilinin kullanılması gerektiğini göstermektedir. Antibiyogram testleri ile duyarlılığı ortaya konan tüm antimikrobiyal ajanların terapötik kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Tüm bu bulgular ışığında; antibiyotik aracılı mücadele stratejisinin kullanımında her bir işletmeden elde edilen enfektif ajanın antibiyogram testlerinin yapılmasının, bununla birlikte optimum antibiyotik dozunun antibiyotik direnç gelişimini engellemek amacıyla belirlenmesinin bir gereklilik olduğu görülmüştür. Ancak yine de yetiştiriciliğin yapıldığı alanlarda probiyotikler başta olmak üzere yararlı mikroorganizmaların aynı ortamda varolduğu da düşünüldüğünde hastalık ve/veya hastalık etmeni ile mücadele için antibiyotik kullanımı dışında etkin bir stratejinin geliştirilmesi amaçlanmalıdır. Bu bağlamda *L. garvieae*'nin hakkında sınırlı bilgi olan patojenite mekanizmasının anlaşılması laktokokkozise karşı geliştirilecek yeni ilaç ve aşı hedeflerinin belirlenmesinde anahtar rol oynayacaktır. Araştırmamızda moleküler genomik yaklaşımlarla laktokokkozis etmeninin virulans faktörlerinin belirlenmesi literatüre katkı sağlamış, uygulamaya yönelik yeni çalışmalara da temel oluşturmuştur.

KAYNAKLAR

- Aguado Urda, M., Cutuli Simón, M.T., Blanco Gutiérrez, M., Aspiroz, C., Tejedor, J.L., Fernández Garayzábal, J.F., Gibello Prieto, A., 2010, Utilization of lactose and presence of the phospho- β -galactosidase (*lacG*) gene in *Lactococcus garvieae* isolates from different sources, *International microbiology: the official journal of the Spanish society for microbiology*, 13(4), 189-193.
- Aguado-Urda, M., López-Campos, G.H., Blanco, M.M., Fernández-Garayzábal, J.F., Cutuli, M.T., Aspiroz, C., López-Alonso, V., Gibello, A., 2011a, Genome sequence of *Lactococcus garvieae* 21881, isolated in a case of human septicemia, *Journal of bacteriology*, 193(15), 4033-4034.
- Aguado-Urda, M., López-Campos, G.H., Gibello, A., Cutuli, M.T., López-Alonso, V., Fernández-Garayzábal, J.F., Blanco, M.M., 2011b, Genome sequence of *Lactococcus garvieae* 8831, isolated from rainbow trout lactococcosis outbreaks in Spain, *Journal of bacteriology*, 193(16), 4263-4264.
- Algöet, M., Bayley, A.E., Roberts, E.G., Feist, S.W., Wheeler, R.W., Verner-Jeffreys, D.W., 2009, Susceptibility of selected freshwater fish species to a UK *Lactococcus garvieae* isolate, *Journal of fish diseases*, 32 (10), 825-834.
- Altun, S., Onuk, E.E., Ciftci, A., Büyükekiz, A.G., Duman, M., 2013, Phenotypic, genotypic characterisation and antimicrobial susceptibility determination of *Lactococcus garvieae* strains, *Kafkas üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 19, 375-381.
- Avci, H., Aydogan, A., Tanrikul, T.T., Birincioglu, S.S., 2010, Pathological and Microbiological Investigations in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Naturally Infected with *Lactococcus garvieae*, *Kafkas üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 16, 313-318.
- Baeck, G.W., Kim, J.H., Gomez, D.K., Park, S.C., 2006, Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island, *Journal of veterinary science*, 7(1), 53-58.
- Barnes, A.C., Guyot, C., Hansen, B.G., Mackenzie, K., Horne, M.T., Ellis, A.E., 2002, Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.), *Fish and shellfish immunology*, 12 (2), 155-168.
- Bercovier, H., Ghittino, C., Eldar, A., 1996, Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms, *Developments in biological standardization*, 90, 153-160.

- Boekhorst, J., Wels, M., Kleerebezem, M., Siezen, R.J., 2006, The predicted secretome of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sheds light on interactions with its environment, *Microbiology*, 152(11), 3175-3183.
- Brinster, S., Furlan, S., Serror, P., 2007, C-terminal WxL domain mediates cell wall binding in *Enterococcus faecalis* and other gram-positive bacteria, *Journal of bacteriology*, 189(4), 1244-1253.
- Brunt, J., Austin, B., 2005, Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of fish diseases*, 28(12), 693-701.
- Casadevall, A., Pirofski, L.A., 2009, Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework, *Journal of water and health*, 7(S1), S2-S18.
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A.M., Dudez, A.M., Martin, V., Beaufils, S., Darbon-Rongère, E., Bossy, R., Loux, V., Zagorec, M., 2005, The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K, *Nature biotechnology*, 23(12), 1527-1533.
- Chen, S.C., Liaw, L.L., Su, H.Y., Ko, S.C., Wu, C.Y., Chaung, H.C., Tsai, Y.H., Yang, K.L., Chen, Y.C., Chen, T.H., Cheng, S.Y., Lin, Y.D., Lee, J.L., Lai, C.C., Weng, Y.J., Chu, S.Y., Lin, G.R., 2002, *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan, *Journal of fish diseases*, 25(12), 727-732.
- Chen, S.C., Lin, Y.D., Liaw, L.L., Wang, P.C., 2001, *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing, *Diseases of aquatic organisms*, 45(1), 45-52.
- Cheng, W., Chen, J.C., 1998, Isolation and characterization of an *Enterococcus*-like bacterium causing muscle necrosis and mortality in *Macrobrachium rosenbergii* in Taiwan, *Diseases of aquatic organisms*, 34(2), 93-101.
- Chhatwal, G.S., 2002, Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors, *Trends in microbiology*, 10(5), 205-208.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)., 2009, *Antibiyotik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları; Ondokuzuncu Bilgi Eki*, Bilimsel tıp, Ankara, ISBN: 978-975-6058-74-9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)., 2013, “Disc diffusion supplemental tables” Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, the Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19807.
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Kandler, O., 1983, *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov., *Microbiology*, 129(11), 3427-3431.

- Çağırğan, H., 2004, Biotyping of *Lactococcus garvieae* Isolated from Turkey, *Su ürünleri dergisi*, 21 (3), 267-269.
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., Hebraud, M., 2006, Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure, *FEMS microbiology letters*, 256(1), 1-15.
- Didinen, B. I., Yardimci, B., Onuk, E.E., Metin, A., Yildirim, P., 2014, Naturally *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792): new histopathological observations, phenotypic and molecular identification, *Revue de medecine veterinaire*, 165, 12-19.
- Diler, O., Altun, S., Adiloglu, A.K., Kubilay, A., Istkl, B., 2002, First occurrence of streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, *Bulletin-European association of fish pathologists*, 22(1), 21-26.
- Doménech, A., Prieta, J., Fernández-Garayzabal, J.F., Collins, M.D., Jones, D., Domínguez, L., 1993, Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolicida*, *Microbiologia-Madrid*, 9, 63-68.
- Driscoll, T., Gabbard, J.L., Mao, C., Dalay, O., Shukla, M., Freifeld, C.C., Gatewood Hoen, A., Brownstein, J.S., Sobral, B.W., 2011, Integration and visualization of host-pathogen data related to infectious diseases, *Bioinformatics*, 27(16), 2279-2287.
- Eldar, A., Ghittino, C., 1999, *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases, *Diseases of aquatic organisms*, 36, 227-231.
- Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Gorla, M., Prearo, M., Bercovier, H., 1996, *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish, *Current microbiology*, 32(2), 85-88.
- Elliott, J.A., Collins, M.D., Pigott, N.E., Facklam, R.R., 1991, Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns, *Journal of clinical microbiology*, 29(12), 2731-2734.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., 2009, First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplathystoma corruscans* (Spix and Agassiz), *Journal of fish diseases*, 32 (11), 943-951.
- Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D.G., Chilmonczyk, S., Eldar, A., 2004, Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries, *Applied and environmental microbiology*, 70(9), 5132-5137.

- Fefer, J.J., Ratzan, K.R., Sharp, S.E., Saiz, E., 1998, *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of the literature, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 32(2), 127-130.
- Ferrario, C., Ricci, G., Milani, C., Lugli, G.A., Ventura, M., Eraclio, G., Borgo, F., Fortina, M.G., 2013, *Lactococcus garvieae*: where is it from? A first approach to explore the evolutionary history of this emerging pathogen, *PLoS one*, 8(12), e84796.
- Flórez, A.B., Reimundo, P., Delgado, S., Fernández, E., Alegría, Á., Guijarro, J.A., Mayo, B., 2012, Genome sequence of *Lactococcus garvieae* IPLA 31405, a bacteriocin-producing, tetracycline-resistant strain isolated from a raw-milk cheese, *Journal of bacteriology*, 194(18), 5118-5119.
- Foschino, R., Nucera, D., Volponi, G., Picozzi, C., Ortoffi, M., Bottero, M.T., 2008, Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing, *Journal of applied microbiology*, 105 (3), 652-662.
- Gabrielsen, C., Brede, D.A., Hernández, P.E., Nes, I.F., Diep, D.B., 2012, Genome sequence of the bacteriocin-producing strain *Lactococcus garvieae* DCC43, *Journal of bacteriology*, 194(24), 6976-6977.
- Gibello, A., Galán-Sánchez, F., Blanco, M. M., Rodríguez-Iglesias, M., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2016, The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: An overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods, *Research in veterinary science*, 109, 59-70.
- Gillespie, J.J., Wattam, A.R., Cammer, S.A., Gabbard, J.L., Shukla, M.P., Dalay, O., Driscoll, T., Hix, D., Mane, S.P., Mao, C., Nordberg, E.K., Nordberg, E.K., Scott, M., Schulman, J.R., Snyder, E.E., Sullivan, D.E., Wang, C., Warren, A., Williams, K.P., Xue, T., Seung Yoo, H., Zhang, C., Zhang, Y., Will, R., Kenyon, R.W., Sobral, B.W., 2011, PATRIC: the comprehensive bacterial bioinformatics resource with a focus on human pathogenic species, *Infection and immunity*, 79(11), 4286-4298.
- Goebel, W., Chakraborty, T., Kreft, J., 1988, Bacterial hemolysins as virulence factors, *Antonie van leeuwenhoek*, 54(5), 453-463.
- Harvey, R.A., Fisher, B.D., Cornelissen, C.N., 2001, *Pathogenicity of Microorganisms*, Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology, In: Harvey, R.A. (ed.), Chapter 11, Lippincott Williams & Wilkins Health, China, 11-14.
- Hava, D.L., Camilli, A., 2002, Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors, *Molecular microbiology*, 45(5), 1389-1406.
- James, P.R., Hardman, S.M., Patterson, D.L., 2000, Osteomyelitis and possible endocarditis secondary to *Lactococcus garvieae*: a first case report, *Postgraduate medical journal*, 76(895), 301-303.

- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2007, 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls, *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Kang, S., Shin, G., Shin, Y., Palaksha, K.J., Kim, Y., Yang, H., 2004, Experimental Evaluation of Pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in Black Rockfish (*Sebastes schlegeli*), *Journal of veterinary science* 5(4), 387–390.
- Katao H., 1982, Erithromycin: the application to streptococcal infections in yellowtails., *Fish pathology*, 17, 77–82.
- Kav, K., Erganiş, O., 2007, Konya Bölgesinde Bulunan Gökkuşığı Alabalığı (*Onchyrnus mykiss*) Çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi, *Veteriner bilimleri dergisi*, 23, 7-17
- Kawai, K., Liu, Y., Ohnishi, K., Oshima, S.I., 2004, A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate, *Vaccine*, 22(25), 3411-3418.
- Kawanishi, M., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Kijima, M., Takahashi, T., Suzuki, S., Tamura, Y., 2005, Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan, *Letters in applied microbiology*, 40(5), 322-328.
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Kijima, M., Yagyū, K., Nakai, T., Okada, S., Endo, A., Murakami, M., Suzuki, S., Morita, H., 2007, Characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from radish and broccoli sprouts that exhibited a KG+ phenotype, lack of virulence and absence of a capsule, *Letters in applied microbiology*, 44 (5), 481-487.
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Yagashiro, S., Kijima, M., Yagyū, K., Nakai, T., Murakami, M., Morita, H., Suzuki, S., 2006, Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization, *Journal of applied microbiology*, 101(2), 496-504.
- Keen, E.C., 2012, Paradigms of pathogenesis: targeting the mobile genetic elements of disease, *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 161.
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., Bron, P. A., 2010, The extracellular biology of the lactobacilli, *FEMS microbiology reviews*, 34(2), 199-230.
- Kusuda, R., Komatsu, I., Kawai, K., 1978, *Streptococcus* sp. isolated from an epizootic of cultured eels, *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*, 44, 295.

- Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R., Fryer, J.L., 1991, *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 41(3), 406-409.
- Lau, G.W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S. E., Marra, A., Bryant, A.P., McDevitt, D., Morrison, D.A., Holden, D.W., 2001, A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence, *Molecular microbiology*, 40(3), 555-571.
- Lee, D.C., Lee, J.I., Park, C.I., Park, S.I., 2001, The study on the causal agent of Streptococciosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fishes, *Journal of fish pathology*, 14(2), 71-80.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory press, NY.
- Marraffini, L.A., DeDent, A.C., Schneewind, O., 2006, Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria, *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(1), 192-221.
- Mendoza, G.M., Pasteris, S.E., Ale, C.E., Otero, M.C., Bühler, M.I., Nader-Macías, M.E.F., 2012, Cultivable microbiota of *Lithobates catesbeianus* and advances in the selection of lactic acid bacteria as biological control agents in raniculture, *Research in veterinary science*, 93(3), 1160-1167.
- Meyburgh, C.M., Bragg, R.R., Boucher, C.E., 2017, *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish, *Diseases of aquatic organisms*, 123(1), 67-79.
- Miyauchi, E., Toh, H., Nakano, A., Tanabe, S., Morita, H., 2012, Comparative genomic analysis of *Lactococcus garvieae* strains isolated from different sources reveals candidate virulence genes, *International journal of microbiology*, 2012.
- Mofredj, A., Baraka, D., Cadranel, J.F., LeMaitre, P., Kloeti, G., Dumont, J.L., 2000, *Lactococcus garvieae* septicemia with liver abscess in an immunosuppressed patient, *The American journal of medicine*, 109(6), 513-514.
- Morita, H., Toh, H., Oshima, K., Yoshizaki, M., Kawanishi, M., Nakaya, K., Suzuki, T., Miyauchi, E., Ishii, Y., Tanabe, S., Murakami, M., Hattori, M., 2011, Complete genome sequence and comparative analysis of the fish pathogen *Lactococcus garvieae*, *PLoS one*, 6(8), e23184.
- Moumene, M., Drissi, F., Croce, O., Djebbari, B., Robert, C., Angelakis, E., Benouareth, D.E., Raoult, D., Merhej, V., 2016, Complete genome sequence and description of *Lactococcus garvieae* M14 isolated from Algerian fermented milk, *New microbes and new infections*, 10, 122-131.
- Munday B.L., 1994, *Antimicrobial Prescribing Guidelines for Veterinarians: a Post Graduate Foundation Publication*, Fish, In: Coopert, S.B., (ed), University of Sydney, Australia, In association with the National Health and Medical Research Council, 1994, 305–325.

- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K.H., Matsuoka, S., Mori, K.I., Nishioka, T., Maruyama, K., 1999, Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail, *Diseases of aquatic organisms*, 37(1), 33-41.
- Onderdonk, A.B., 1988, Host-microbe interactions: virulence mechanisms of bacterial pathogens, *Science*, 240, 1352–1360.
- Ooyama, T., Hirokawa, Y., Minami, T., Yasuda, H., Nakai, T., Endo, M., Ruangpan, L., Yoshida, T., 2002, Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*, *Diseases of aquatic organisms*, 51(3), 169-177.
- Özer, S., Bulduklu, S., Dönmez, E., 2008, Streptococcosis occurrence at rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultivated in province Mersin-Turkey, *Journal of fisheries sciences.com*, 2 (3), 272-283.
- Palacios, M.A., Zamora, M.J., Vasquez, J., Zamora, E., Duran, A., 1993, Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain, *Bollettino societa Italiana di patologia ittica*, 5 (13), 11-16.
- Park, K.H., Matsuoka, S., Nakai, T., Muroga, K., 1997, A virulent bacteriophage of *Lactococcus garvieae* (formerly *Enterococcus seriolicida*) isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*, *Diseases of aquatic organisms*, 29(2), 145-149.
- Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., 2004, *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture, *Bulletin of the European association of fish pathologists*, 24 (8), 274-279.
- Pot, B., Devriese, L.A., Ursi, D., Vandamme, P., Haesebrouck, F., Kersters, K., 1996, Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals, *Systematic and applied microbiology*, 19(2), 213-222.
- Prieta, J., Doménech, A., Fernández-Garayzábal, J.F., Collins, M.D., Rodríguez, U.M., Jones, D., Rodríguez, A., Domínguez, L., 1993, Lactococcosis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), *Medicina veterinaria*, 10, 367-373.
- Ra, C.H., Kim, Y.J., Park, S.J., Jeong, C. W., Nam, Y.K., Kim, K.H., Kim, S.K., 2009, Evaluation of optimal culture conditions for recombinant ghost bacteria vaccine production with the antigen of *Streptococcus iniae* GAPDH, *Journal of microbiology and biotechnology*, 19, 982-986.
- Raissy, M., Ansari, M., 2011, Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran fish farms, *African journal of biotechnology*, 10(8), 1473-1476.
- Rajam, G., Anderton, J.M., Carlone, G.M., Sampson, J.S., Ades, E.W., 2008, Pneumococcal surface adhesin A (PsaA): a review, *Critical reviews in microbiology*, 34(3-4), 131-142.

- Ravelo, C., Magariños, B., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., 2001, Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains, *Bulletin-European association of fish pathologists*, 21(4), 136-144.
- Reimundo, P., Pignatelli, M., Alcaraz, L. D., D'Auria, G., Moya, A., Guijarro, J. A., 2011, Genome sequence of *Lactococcus garvieae* UNIUD074, isolated in Italy from a lactococcosis outbreak, *Journal of bacteriology*, 193(14), 3684-3685.
- Ricci, G., Ferrario, C., Borgo, F., Eraclio, G., Fortina, M.G., 2013, Genome sequences of two *Lactococcus garvieae* strains isolated from meat, *Genome announcements*, 1(1), e00018-12.
- Ricci, G., Ferrario, C., Borgo, F., Rollando, A., Fortina, M.G., 2012, Genome sequences of *Lactococcus garvieae* TB25, isolated from Italian cheese, and *Lactococcus garvieae* LG9, isolated from Italian rainbow trout, *Journal of bacteriology*, 194(5), 1249-1250.
- Robinson, J.A., Meyer, F.P., 1966, Streptococcal fish pathogen, *Journal of bacteriology*, 92(2), 512.
- Savvidis, G.K., Anatoliotis, C., Kanaki, Z., Vafeas, G., 2007, Epizootic outbreak of Lactococcosis disease in rainbow trout culture in Greece, *Bulletin of the European association of fish pathologists*, 27 (6), 223.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D., Fischer, W., 1985, Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov, *Systematic and applied microbiology*, 6(2), 183-195.
- Schmidtke, L.M., Carson, J., 2003, Antigen recognition by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of whole cell proteins expressed by *Lactococcus garvieae* when obtained directly from fish and under iron limited culture conditions, *Veterinary microbiology*, 93(1), 63-71.
- Sharifiyazdi, H., Akhlaghi, M., Tabatabaei, M., Mostafavi Zadeh, S.M., 2010, Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultured in Iran, *Iranian journal of veterinary research*, 11 (4), 342-350.
- Shin, G.W., Palaksha, K.J., Kim, Y.R., Nho, S.W., Cho, J.H., Heo, N.E., Heo, G.J., Park, S.C., Jung, T.S., 2007, Immunoproteomic analysis of capsulate and non-capsulate strains of *Lactococcus garvieae*, *Veterinary microbiology*, 119, 205-212.
- Siezen, R., Boekhorst, J., Muscariello, L., Molenaar, D., Renckens, B., Kleerebezem, M., 2006, Lactobacillus plantarum gene clusters encoding putative cell-surface protein complexes for carbohydrate utilization are conserved in specific gram-positive bacteria, *BMC genomics*, 7(1), 126.
- Spirig, T., Weiner, E.M., Clubb, R.T., 2011, Sortase enzymes in Gram-positive bacteria, *Molecular microbiology*, 82(5), 1044-1059.

- Tanrikul, T.T., Gultepe, N., 2011, Mix Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) *Lactococcus garvieae* and *Vibrio anguillarum* O1, *Journal of animal and veterinary advances*, 10 (8), 1019-1023.
- Teixeira, L.M., Merquior, V.L.C., Vianni, M.D.C.E., Carvalho, M.D.G.S., Fracalanza, S.E.L., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.C., Facklam, R.R. ,1996, Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 46(3), 664-668.
- Ture, M., Altinok, I., 2016, Detection of putative virulence genes of *Lactococcus garvieae*, *Diseases of aquatic organisms*, 119(1), 59-66.
- Türe, M., Alp, H., 2016, Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey, *Journal of veterinary research*, 60(2), 141-146.
- Türe, M., Haliloğlu, H.I., Altuntaş, C., Boran, H., Kutlu, I., 2014, Comparison of experimental susceptibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), turbot (*Psetta maxima*), Black Sea trout (*Salmo trutta labrax*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to *Lactococcus garvieae*, *Turkish journal of fisheries and aquatic sciences*, 14, 507–513.
- Türe, M., Işıdan, H., Savaş, H., Kutlu, İ., 2012, PFGE Metodu kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin genetik çeşitliliğinin ve yayılımının belirlenmesi, *Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü-Trabzon (TAGEM/HS/10/09/02/179) Proje Sonuç Raporu*, 68.
- Türe, M., Savaş, H., 2010, Karadeniz Bölgesinde gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) lactococcosis (*L. garvieae*), *Yunus araştırma bülteni*, 3, 19-20.
- Vendrell, D., Balca'zar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Girone's, O., Múzquiz, J. L., 2006, *Lactococcus garvieae* in fish: a review, *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 29 (4), 177–198.
- Vinh, D.C., Nichol, K.A., Rand, F., Embil, J.M., 2006, Native-valve bacterial endocarditis caused by *Lactococcus garvieae*, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 56 (1), 91-94.
- Wang, C.Y.C., Shie, H.S., Chen, S.C., Huang, J.P., Hsieh, I.C., Wen, M.S., Lin, F.C., Wu, D., 2007, *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks, *International journal of clinical practice*, 61(1), 68-73.
- Wattam, A.R., Abraham, D., Dalay, O., Disz, T.L., Driscoll, T., Gabbard, J.L., Gillespie, J.J, Gough, R., Hix, D., Kenyon, R., Machi, D., Mao, C., Nordberg, E.K., Olson, R., Overbeek, R., Punsch, G.D., Shukla, M., Schulman, J., Stevens, R.L., Sullivan, D.E., Vonstein, V., Warren, A., Will, R., Wilson, M.J.C., Seung

- Yoo, H., Zhang, C., Zhang, Y., Sobral, B.W., 2014, PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource, *Nucleic acids research*, 42, 581-591.
- Willey, J., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J., 2008, *Pathogenicity of Microorganisms*, Prescott, Harley, and Klein's Microbiology, In: Willey, J., Sherwood, L.M., Woolverton. (ed.), Chapter 7, McGraw-Hill Higher Education, New York, 820-821.
- Wu, H.J., Wang, A.H., Jennings, M.P., 2008, Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria, *Current opinion in chemical biology*, 12(1), 93-101.
- Yiu, K.H., Siu, C.W., To, K.K.W., Jim, M.H., Lee, K.L.F., Lau, C.P., Tse, H.F., 2007, A rare cause of infective endocarditis; *Lactococcus garvieae*, *International journal of cardiology*, 114 (2), 286-287.
- Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V., Piccinini, R., 2006, Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland, *Microbial pathogenesis*, 40(4), 177-183.
- Zhou, L., Wang, X., Liu, Q., Wang, Q., Zhao, Y., Zhang, Y., 2010, A novel multivalent vaccine based on secretory antigen-delivery induces protective immunity against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila*, *Journal of biotechnology*, 146(1), 25-30.
- Zlotkin, A., Hershko, H., Eldar, A., 1998, Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish, *Applied and environmental microbiology*, 64 (10), 4065-4067.

EKLER**Technical Data****Todd Hewitt Broth****M313**

Todd Hewitt Broth is recommended for the cultivation of group A haemolytic streptococci used for serological studies.

Composition**

Ingredients	Gms / Litre
Beef heart, infusion from	500.000
Peptic digest of animal tissue	20.000
Dextrose	2.000
Sodium chloride	2.000
Disodium phosphate	0.400
Sodium carbonate	2.500
Final pH (at 25°C)	7.8±0.2

**Formula adjusted, standardized to suit performance parameters

Ek 1: Todd Hewitt Broth besi ortamı içeriği¹³.

¹³ <http://www.himedialabs.com/intl/en/products/Microbiology/Dehydrated-Culture-Media-General-Animal-based-Media-Bacterial/Todd-Hewitt-Broth-M313>, [Ziyaret Tarihi: 01 Mayıs 2017]

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Tuğba Teker
Doğum Yeri	Eskişehir
Doğum Tarihi	29.07.1992
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	00 90 537 436 82 28
E-Posta Adresi	tuteker1@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	2015

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Tarihi	2017