

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM**  
**DALI**

**DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticileri

Prof. Dr. Hamdi Murat TUĞRUL

Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ

***SALMONELLA ENTERICA* KÖKENLERİNİN**  
**VİRULANS FAKTÖRLERİ İLE ANTİBİYOTİK**  
**DİRENCİNİN MOLEKÜLER OLARAK İNCELENMESİ**  
**VE KÖKENLER ARASINDAKİ KLONAL İLİŞKİLERİN**  
**BELİRLENMESİ**

(Doktora Tezi)

**Özge ÜNLÜ**

Referans no: 10109256

EDİRNE – 2016

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM**  
**DALI**

**DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticileri

Prof. Dr. Hamdi Murat TUĞRUL

Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ

***SALMONELLA ENTERICA* KÖKENLERİNİN**  
**VİRULANS FAKTÖRLERİ İLE ANTİBİYOTİK**  
**DİRENCİNİN MOLEKÜLER OLARAK İNCELENMESİ**  
**VE KÖKENLER ARASINDAKİ KLONAL İLİŞKİLERİN**  
**BELİRLENMESİ**

(Doktora Tezi)

**Özge ÜNLÜ**

**Destekleyen Kurum: TÜBAP – 2014/76**

**Tez No: 10109256**

**EDİRNE – 2016**

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve Prof. Dr. H. Murat TUĞRUL ve Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ danışmanlığında doktora öğrencisi Özge ÜNLÜ tarafından tez başlığı "*Salmonella enterica* kökenlerinin virulans faktörleri ile antibiyotik direncinin moleküler olarak incelenmesi ve kökenler arasındaki klonal ilişkilerin belirlenmesi" olarak teslim edilen bu tezin savunma sınavı 23/06/2016 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Doktora Tezi**" olarak kabul edilmiştir.

İmza	Unvanı Adı Soyadı	İmza
	JÜRİ BAŞKANI	
İmza	Prof. Dr. H. Murat TUĞRUL	İmza
Unvanı Adı Soyadı		Unvanı Adı Soyadı
ÜYE		ÜYE
Prof. Dr. Şaban GÜRCAN		Prof. Dr. H. Figen KULOĞLU
İmza		İmza
Unvanı Adı Soyadı		Unvanı Adı Soyadı
ÜYE		ÜYE
Prof. Dr. Müzeyyen MAMAL TORUN		Prof. Dr. Mustafa Derya AYDIN

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Doç. Dr. Tammam Sipahi  
Enstitü Müdürü



## **TEŞEKKÜR**

Çalışmalarım süresince bilgisi, tecrübesi ve desteği ile hep yanımda olan değerli tez hocam sayın Prof. Dr. H. Murat TUĞRUL'a, bilgisi, başarıları ve azmi ile bana hem yardımcı hem de rol model olan eş danışman hocam sayın Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ'a, emekli olduktan sonra bile yardımlarını hiç esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Şaban ÇAVUŞLU'ya, bana güvenen ve destek olan Trakya Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalının ve Üsküdar Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünün tüm hocalarına, destekleri için TÜBAP birimine, başta bugünlere gelme sebebim olan çok değerli annem olmak üzere varlıklarıyla bana güç veren tüm aile ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<i>SALMONELLA</i> 'LARIN GENEL ÖZELLİKLERİ .....	3
TARİHÇE .....	4
<i>SALMONELLA</i> 'LARIN İDENTİFİKASYONU VE TIPLENDİRİLMESİ .....	7
PATOGENEZ VE <i>SALMONELLA</i> PATOJENİTE ADALARI .....	14
<i>SALMONELLA</i> ENFEKSİYONLARINA GENEL BAKIŞ .....	19
ANTİMİKROBİYAL DİRENCİ .....	21
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	25
<b>BULGULAR</b> .....	35
<b>TARTIŞMA</b> .....	45
<b>SONUÇLAR</b> .....	57
<b>ÖZET</b> .....	59
<b>SUMMARY</b> .....	61
<b>KAYNAKLAR</b> .....	63
<b>RESİMLEMELER LİSTESİ</b> .....	72
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	74
<b>EKLER</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>bç</b>	: Baz çifti
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleotit Trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
<b>GSBL</b>	: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
<b>kb</b>	: Kilobaz
<b>LB</b>	: Luria Bertani
<b>MİK</b>	: Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>sn</b>	: Saniye
<b>SPA</b>	: <i>Salmonella</i> Patojenite Adası
<b>SS</b>	: <i>Salmonella</i> Shigella
<b>PBRT</b>	: Plazmit Temelli Replikon Tiplendirmesi
<b>PFGE</b>	: Pulsed Field Jel Elektroforezi
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>TBE</b>	: Tris/Borat/EDTA
<b>UV</b>	: Ultra viyole

## GİRİŞ ve AMAÇ

*Salmonella*'lar besin ve su kaynaklı enfeksiyonlara yol açan önemli insan ve hayvan patojenleridir. Sıklıkla gastroenterit olgularında etken olan kökenler, altta yatan hastalığı olanlar ve immunsupresif ilaç kullanan hastalarda ciddi sistemik enfeksiyonlara ve ölümlere yol açabilmektedir. Bu nedenle *Salmonella*'ların virulansında etkili olan faktörlerin genetik boyutunun araştırılması önem kazanmıştır. Son yıllarda ortaya çıkan çoklu ilaç dirençli kökenler ise antibiyotik direncinde etkili olan genlerin araştırılmasının önemini ortaya koymaktadır.

Günümüze kadar farklı ülkelerde *Salmonella*'ların taşıdığı virulans ve antibiyotik direnç genleri üzerine yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (1-5). Özellikle klinik örneklerden izole edilen kökenlerde virulans faktörlerinin yüksek oranda bulunması ve antibiyotik direnç genlerinin yayılımının yıldan yıla artması endişe vericidir. Antibiyotik direnç genlerinin sıklıkla horizontal gen transferi yoluyla aktarıldığı bilinmektedir. Daha önce *Salmonella* kökenlerinde bulunmayan *Enterobacteriaceae*'nin diğer üyelerinde görülen plazmitlerin günümüzde *Salmonella*'larda da görülüyor olması ileride gelişebilecek yeni antibiyotik direnç paternlerinin tahmini için bu alanda yapılacak araştırmaların önemini göstermektedir (4,5). Toplumda sık görülen kökenlerin belirlenmesi, antibiyotik direncinin kökenler arasındaki akrabalık ilişkilerine etkisinin gösterilmesi ve salgınların değerlendirilmesi için sürveyans sistemlerinin kurulmasının gerekliliği bilinmektedir. Bu amaçla pulsed field jel elektroforezi altın standart olarak kabul edilmek üzere birçok moleküler teknik uzun yıllardır kullanılmaktadır (6).

2009-2012 yılları arasında Edirne ve çevresinden klinik örneklerden izole edilen 50 adet *Salmonella enterica* kökeninin klasik virulans faktörleri moleküler yöntemlerle incelenerek, bakterinin hastalık yapma yeteneğinin genetik boyutunu araştırmak, daha önce

antimikrobiyal direnci otomatize sistemlerle araştırılan bu kökenlerin antimikrobiyal direnç genlerini araştırmak bu sayede direnç açısından fenotip- genotip ilişkilendirmesi yapmak, direnç gelişmesinde en önemli faktörlerden biri olan kökenler arasında plazmitlerin bulunma oranının polimeraz zincir reaksiyonu tabanlı replikon tiplendirmesi ile araştırılması ve son olarak da tüm bu kökenler arasındaki genetik çeşitliliği ve klonal ilişkiyi moleküler tekniklerde altın standart kabul edilen pulsed field jel elektroforezi ile ortaya koymak bu tezin amacını oluşturmaktadır.





## GENEL BİLGİLER

### **SALMONELLA'LARIN GENEL ÖZELLİKLERİ**

*Salmonella* türleri *Enterobacteriaceae* familyasına ait Gram negatif, sporsuz, fakültatif anaerob, 0.5-1.0 (en) x 1-5 (boy) µm boyutlarında çubuk şekilli bakterilerden oluşmaktadır. Optimum üreme sıcaklıkları 37°C olmasına rağmen türler 7-48 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında da üreyebilmektedir. Üremeleri için optimum pH değeri 6.5-7.5 civarındadır ancak pH 4.5-9.0 arasında da üreyebilirler (7,8).

*Salmonella*, glukoz, mannitol ve genellikle sorbitolden asit ve çoğunlukla gaz oluşturmaktadır. Genellikle sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanabilmekte H<sub>2</sub>S oluşturabilmekte, lizin ve ornitini dekarboksile edebilmektedir. Üre hidrolizi ve fenilalanin deaminasyonu görülmemektedir. Biyokimyasal özelliklerin plazmite bağlı olması atipik biyokimyasal özelliklere sahip kökenlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır ve doğru identifikasyonu zorlaştırmaktadır. Oysa doğru tanımlama hem hasta hem de salgınların doğru değerlendirilmesi ile toplum sağlığı açısından önemli olmaktadır (7,8).

Günümüzde World Health Organization (WHO), Centers for Disease Control and Prevention (CDC), American Society for Microbiology (ASM) tarafından kullanılan güncel *Salmonella* sınıflandırma sistemi Kauffmann ve White tarafından temeli oluşturulan yüzey antijenlerine göre sınıflandırmaya dayanır. Tüm *Salmonella* serotiplerinin antijenik formülleri liste halinde Kauffmann-White şemasında yer alır. 2007'de yayınlanan rapora göre *Salmonella* cinsi içerisinde 2579 adet serotip bulunmaktadır (9).

CDC'nin sistemine göre *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki tür bulunmaktadır, 2005'te tanımlanan *S.subterranea*'nin gelecekte listeye dahil edilmesi planlanmaktadır. *Salmonella enterica* ise biyokimyasal özelliklerine göre altı alttüre

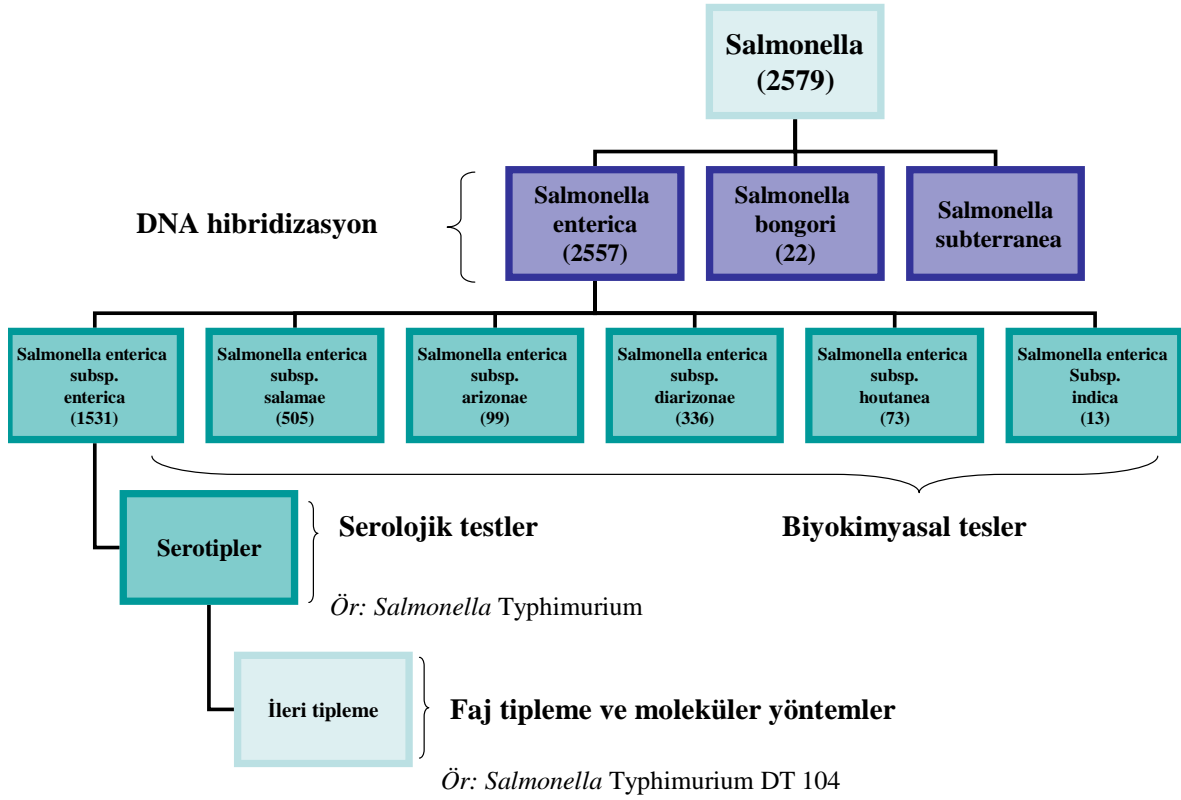
ayrılmıştır. *Salmonella* serotiplerinin % 99'u *Salmonella enterica* türü içinde, *Salmonella enterica* içinde serotiplerinde yaklaşık olarak % 60'ı *Salmonella enterica* subsp. *enterica*'da yer almaktadır. *S.enterica* subsp. *enterica*' da yer alan serovarlar ilişkili oldukları hastalıklar, coğrafik orijinleri ve buldukları habitatlara göre isimlendirilirken, diğer alttürler ve *S.bongori* türünün serotipleri Kauffmann-White şemasındaki antijenik formüllere göre isimlendirilmiştir. Serotip ve tür arasındaki karışıklığın ortadan kaldırılması adına serotip italik veya altı çizili yazılmamakta ve büyük harfle başlamaktadır (örneğin, *Salmonella* ser. *Cholerasuis* veya *S. Cholerasuis*). 2005'ten önce tip tür ismi onaylanmamış olduğu için serotipler söylenirken tür ismi vurgulanmaz cins adından hemen sonra serotip adı verilir (örneğin, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium yerine *Salmonella* serovar Typhimurium veya *Salmonella* Typhimurium ya da sadece Typhimurium denmektedir) (10) (Şekil 1).

## TARİHÇE

*Salmonella* türleri ilk izole edildikleri tarihten bu yana adlandırılmasında problem yaşanan bakteriler olmuşlardır. Bu bakteriyi ilk olarak 1884'te D.E.Salmon izole etmiş ve *Bacillus cholerasuis* olarak isimlendirmiştir. 1900'de Lignieres bu bakterinin *Bacillus* cinsine ait olmadığını göstermiş ve *Salmonella cholerasuis* olarak yeniden adlandırmıştır. Bu tarihten 1966'ya kadar *Salmonella* türleri yaptıkları hastalıklara (örneğin *Salmonella typhi*) ve izolasyon orijinlerine (örneğin *S.london*, *S.panama*) göre isimlendirilmişlerdir. 1941 yılında identifikasyon için özgül antiserumlar kullanılmaya başlanmış ve *Salmonella* türlerinin karmaşıklığı nedeniyle üç tür modeli geliştirilmiştir. Bu modele göre tüm *Salmonella* serotipleri *S.cholerasuis*, *S.typhosa*, *S.kauffmannii* türleri altında toplanmıştır. İsimlendirilemeyecek kadar çok *Salmonella* serotipinin izolasyonu 1966 yılında antijenik formüle göre isimlendirme yönteminin doğmasına neden olmuştur. Ayrıca *S.typhi*, *S.cholerasuis* ve *S.enteritidis*' ten oluşan benzer üç tür modeli geliştirilmiş bu modele göre *S.typhi* ve *S.cholerasuis* dışındaki serotipler *S.enteritidis* türü altında toplanmıştır (10).

1970'te gelen diğer bir öneri ise Kauffmann'ın subgenuslarının tür olarak kabul edilmesi olmuştur ve Subgenus I – *S.kauffmannii*, Subgenus II – *S.salamae*, Subgenus III – *S.arizonae*, Subgenus IV – *S.houtenae* türleri olarak kabul edilmiştir. Bu isimlendirmeye göre *S.kauffmannii* içinde yer alan serotipler tür adının arkasından serotip adının yazılmasıyla adlandırılır (örneğin *S.kauffmannii* serovar *typhi*) diğer türler içinde yer alan serotipler isimlendirilirken ise tür adının ardından serotipe ait antijenik formül yazılır. 1973'te Crosa ve ark. (10) DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları mevcut tüm *Salmonella*'ların tek bir türde

toplanması gerektiğini göstermiştir. Sonraki yıllarda Le Minor ve ark. DNA akrabalık ilişkileri ve nümerik taksonomi çalışmalarına göre düzenlenen yeni adlandırmaya göre *S.cholerauis* tek tür adı olarak öne sürülmüş ve bu türe bağlı altı alttür tanımlanmıştır. Ayrıca serovar adının italik yazılmadan büyük harfle başlayarak yazılması öne sürülmüştür (örneğin *Salmonella choleraeuis* subsp. *choleraeuis* ser. Typhimurium). Sonraki yıllarda yapılan DNA tabanlı akrabalık ilişkileri çalışmaları 1989'da *Salmonella choleraeuis* subsp. *bongori* alttürlerden ayrılması ve ayrı bir tür olması gerektiğini öne sürmüştür. Choleraeuis'in hem tür hem serovar adı olmasından kaynaklanan karışıklığın ortadan kaldırılması için 14. Uluslararası Mikrobiyoloji Kongresinde (1986) International Committee of Systematic Bacteriology'e *S.enterica* yeni tür adı olarak önerilmiştir. *S.enterica* tür adı ve yedi alttür sistemi (I, II, IIIa, IIIb, IV, V, VI) resmi olarak 1987'de Judicial Commission of The International Committee of Systematic Bacteriology'e sunulmuş ancak bu öneri *Salmonella* serovar Typhi'nin klinik öneminin gözden kaçmasına neden olabileceğinden ötürü Adli Komisyon tarafından reddedilmiştir. Bunun üzerine 1999'da Euzéby *Salmonella enterica*'nın *Salmonella choleraeuis*'in yerini almasını *Salmonella typhi*'nin ise klinik adını vurgulamak adına korunmasını önermiştir. Euzéby'nin önerisi ancak 2005'te kabul edilmiştir. Adli komisyonun kararına göre *Salmonella* cinsi içinde *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki tür bulunmaktadır. *Salmonella enterica* türü ise, "*arizonae*", "*diarizonae*", "*enterica*", "*houtenae*", "*indica*", "*salamae*" olmak üzere altı alttürü kapsamaktadır. *Salmonella subterranea* yeni tür olarak tanımlanmıştır (10).



Şekil 1. *Salmonella* türlerinin sınıflandırılması

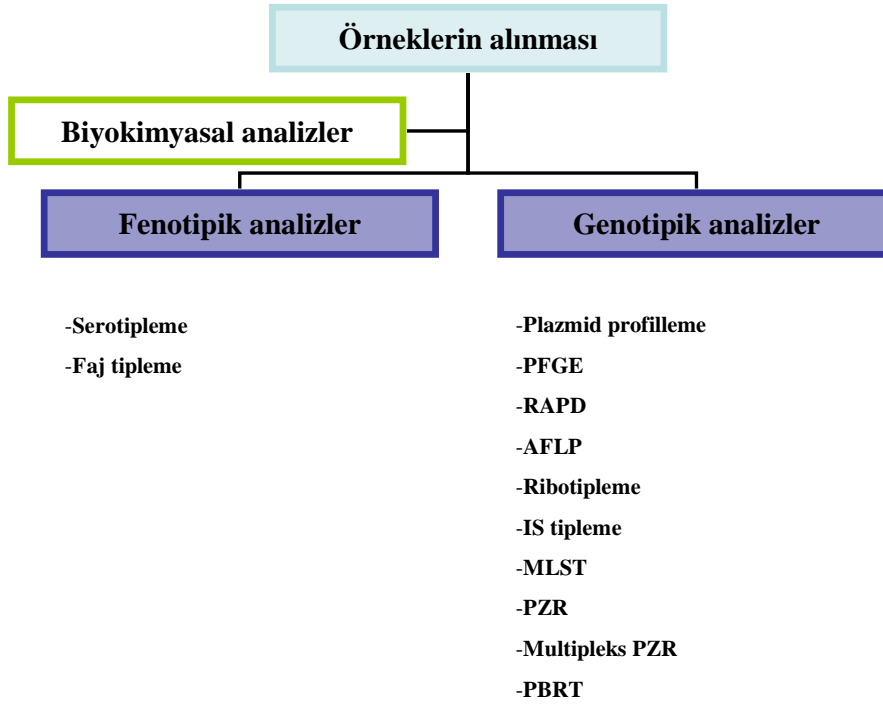
Önceden O grupları harflerle isimlendirilmekteydi. Ancak tüm grupları isimlendirmeye yeterli harf bulunmadığı üzere, grup spesifik O faktörlere göre isimlendirme bunun yerini almıştır (9) (Tablo 1). Antijenik formülüne göre belirlenen serotipler; alttür ismi Roma harfleri ve bunu izleyen antijenik formül şeklinde yazılmaktadır (örneğin, *Salmonella* serovar II 1,4,[5],12, [27]: a : e,n,x) (10).

Tablo 1. O-grupların eski ve yeni isimleri

Eski	Yeni	Eski	Yeni	Eski	Yeni
A	2	G1-G2	13	Q	39
B	4	H	6,14	R	40
C1-C4	6,7	I	16	S	41
C2-C3	8	J	17	T	42
D1	9	K	18	U	43
D2	9,46	L	21	V	44
D3	9,46,27	M	28	W	45
E1-E2-E3	3,1	N	30	X	47
E4	1,3,19	O	35	Y	48
F	11	P	38	Z	50

## SALMONELLA'LARIN İDENTİFİKASYONU VE TİPLENDİRİLMESİ

*Salmonella* türlerinin neden olduğu salgınların belirlenmesi ancak gastroenterit şikayeti ile hastanelere başvuran hastalarda etkenin izole ve tanımlanmasıyla mümkün olmaktadır. Birçok ülkede olası bir salgının epidemiyeye dönüşmemesi için sürveyans sistemi kurulmuştur. Olası salgınları önceden tanımlamaya çalışan bu sürveyans projelerinin çoğu konvansiyonel serotipleme ya da faj tiplemeye dayanmaktadır. Salgınlar genelde birkaç serotip etrafında kümeleşmektedir bu nedenle ileri tipleme yapılması daha fazla önem kazanmaktadır (11). Ancak ülkemizdeki laboratuvar olanaklarının sınırlı olması nedeniyle *Salmonella* kökenlerinin tiplendirilmesinde yetersiz kalmaktadır (9). Oysa doğru tiplendirme, hastalıkla bakteri serotipi arasında ilişki kurmasının yanı sıra bulaşma kaynağı hakkında bilgi verir, salgınların doğru değerlendirilmesine ve epidemiyolojik çalışmalara katkıda bulunur ve yeni serotiplerin bulunmasına olanak verir (11). *Salmonella* türlerinin tiplendirilmesine ilişkin şema Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. *Salmonella* türlerinin identifikasyon şeması

### Biyokimyasal Analizler

Dışkı örnekleri Hektoen agar, Eosin-methylene-blue (EMB) agar ve/veya SS agara ve ön zenginleştirme için selenite broth'a ekilir 37°C'de 24 saat inkübe edilir. Ön zenginleştirme kültüründen 6-8 saat inkübasyon sonrası Hektoen ve/veya SS agara tekrar ekim yapılır ve 24

saat daha inkübe edilir. Şüpheli koloniler biyokimyasal testlere tabi tutulur. *Salmonella* türleri SS ve Hektoen agarda H<sub>2</sub>S oluşturmaları nedeniyle siyah koloniler, EMB agarda ise laktozu fermente etmemeleri nedeniyle renksiz koloniler oluştururlar. *Salmonella* şüpheli kolonilerden triple sugar iron agar (TSI), lysine iron agar (LIA), motility indol ornithine agar (MIO), sitrat agar, üre agar, fenilalanin deaminaz (FAD) besiyerlerine ekilerek ileri biyokimyasal özellikleri incelenir. Kültür sonuçları 24 saat sonra değerlendirilir. Laktoz, üreaz, fenil alanin deaminaz negatif, hareketli, H<sub>2</sub>S, sitrat, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz test sonuçları pozitif bulunan izolatlar *Salmonella* şüpheli olarak kabul edilir. Bu testlere ek olarak bazı diğer şekerlerin fermentasyonunu da test eden API 20E (bioMerieux, Inc., Fransa) test kitleri ticari olarak mevcuttur ve kullanılmaktadır (11).

Salgınlarda *Salmonella* serotipi içindeki kökenler arasındaki ilişkinin belirlenmesi, enfeksiyon kaynağının ve yayılım yollarının belirlenmesi açısından önemlidir. Ancak biyokimyasal metotlar *S. enterica* alt türlerini ayırmada yetersiz kalmaktadır. Bu amaçla ileri fenotipik ve genotipik analizlere ihtiyaç bulunmaktadır (11,12).

### **Fenotipik Analizler**

**Serotipleme:** Rutin *Salmonella* tanısında ilk basamak, polivalan, monovalan antiserumlar kullanılarak aglütinasyon testi yapmaktır. Kauffman-White şemasına göre 2500'den fazla serotip bulunmaktadır. Bu serotipleri ayırırken kullanılan antijenler O (somatik) antijen, H (flagella) faz 1 ve faz 2 antijenleri ile Vi (kapsül) antijenleridir. Her serogrupun bir grup spesifik O antijeni mevcuttur. Farklı O ve H antijenlerinin kombinasyonu ile farklı serotipler oluşur. Kapsül taşıyan gruplarda ilgili antijen de formüle eklenir (11,16).

Polivalan antiserumla aglütinasyon gözlenen örnekler, serogrupsu için tek tek grup spesifik O antiserumları ile test edilir. Eğer hiçbir grup spesifik antiserumla aglütinasyon gözlenmiyorsa Vi (kapsül) antiserumu ile test tekrarlanır. Kapsül antiserumu ile aglütinasyon veren köken kaynatılır ve O grup antiserumları ile tekrar test edilir. O antijeni belirlenen kökenin, H antiserumları ile faz 1 ve faz 2 antijenleri araştırılır. Elde edilen sonuçlar uygun antijenik formül ile yazılır.

**Faj tiplendirmesi:** *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* sürveyansında kullanılmıştır. Köken karakterizasyonu ve salgınlarda kaynağın belirlenmesinde, serotipleme ile kombine kullanıldığında faydalı olmaktadır. 200'den fazla *S. Typhimurium* faj tipi tanımlanmıştır (3,17).

Uluslararası epidemilere yol açan çoklu ilaç dirençli *S.Typhimurium* DT104 klonunun tanısı da bu yöntemle belirlenmiştir (11,14,15).

### **Genotipik Analizler**

**Plazmit profil analizi:** En eski DNA-bazlı tiplendirme testlerindedir. Çoğu plazmit virulans ve antimikrobiyal dirençle ilişkili olduğundan bu tiplendirmenin kısmi bir öneme sahip olduğu söylenebilir. *Salmonella* türlerinde 2-200 kb büyüklükte ve farklı özelliklerde plazmitler mevcuttur. Metot plazmitin izolasyonu ve agaroz jel elektroforezinde yürütülüp UV altında görüntülenmesini içermektedir. Sonuçta elde edilen profil veri tabanındaki diğer plazmit profilleri ile karşılaştırılır (11).

**Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE):** Moleküler tiplendirme metotları arasında altın standart olarak kabul edilir. Bakteriyel DNA agaroz gömülür restriksiyon endonükleazlarla rastgele kesilir, belli aralıklarla polariteyi değiştiren darbeli akım kullanılan özel bir elektroforezle büyük DNA fragmentlerini ayırılır ve köken özgül paternleri ortaya çıkarılır (11). *Salmonella* için en sık kullanılan restriksiyon endonükleazlar; XbaI, SpeI, NotI'dir. Farklı enzimlerle yapılan çalışmalar sonunda ortaya çıkan farklı paternlerin karşılaştırılmasıyla hem yeni alttipler saptanabilir hem de yöntemin ayırıcı gücü artırılabilir (7).

**Ribotiplendirme:** rRNA'yı kodlayan dizilerin parmakizi analizi olarak tanımlanabilir. rRNA genleri kendi içlerinde oldukça homologtur ancak aradaki diziler uzunluk ve nükleotid kompozisyonu açısından değişkendir (11). Yöntemde restriksiyonla parçalanmış DNA fragmentlerinin, rDNA özgül prolarla hibridizasyonu ile gerçekleştirilir. Önce endonükleazlarla parçalanmış kromozomal DNA agaroz jellerde ayırılır, sonra bir membrana aktarılır ve 16S ve 23S rRNA'yı hedefleyen bir proba hibridlenir. Bu yolla belli serotipler ve faj tiplerinde alttiplendirmeye gidilebilir (11,16,17).

**İnseriyon sekans (IS) tiplendirme:** IS200 *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Vibrio*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Helicobacter* ve *Actinobacillus* dahil bir çok bakteride bulunabilen mobil bir elementtir. Oldukça küçük (707-711 bp) olan bu elementler tek bir gen içerir. Diğer mobil elementlerden farklı olarak nadiren transpoze olurlar bu nedenle sayıları ve dağılımları göreceli olarak popülasyon içinde sabittir. Bu özelliklerinden dolayı uygun moleküler marker olabilecekleri düşünülmüştür. IS200 tiplemesi farklı *Salmonella* izolatlarının moleküler

ilişkilerini ortaya koymak üzere özellikle *Salmonella enterica* alttürlerinde çalışılmıştır. *Salmonella* kromozomu 708 bp'lik IS elementinden birçok kopya içermektedir. Parçalanmış kromozomal DNA'nın IS200 probu ile hibridizasyonu bakterinin diğer serotiplerle akrabalığını açıklamada yararlı bulunmuştur. Faj tiplene kadar iyi bir ayırım yapmadığı ancak bu yöntemle belli faj tipleri içinde daha ileri düzeyde ayırım yapılabileceği ortaya konmuştur.

**Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD):** Genomik DNA'nın rastgele kısa oligonükleotid primerlerle (ortalama 10 bazlık) nanogram boylarında düşük bağlanma (annealing) sıcaklıklarında PZR ile amplifiye edilmesi, etidyum bromürle boyanması ve ürünlerinin agaroz jelde ayrılması ve UV ile görüntülenmesi esasına dayanır. Kısa primerlerle yapılan bu yöntemde daha kompleks DNA parmak izi profilleri ortaya çıkar. Uygun bağlanma sıcaklığında primerler DNA'da farklı bölgelere bağlanırlar ve farklı boyutlarda ürünler oluştururlar. Farklı kalıp DNA'lardaki nükleotid varyasyonları bantların oluşup oluşmamasında esastır. Kromozomal düzenlenmeler, nokta mutasyonlar RAPD polimorfizmlerine neden olabilir.

**Amplified fragment length polymorphism (AFLP):** Seçili restriksiyon fragmentlerinin amplifikasyonuna dayalı bir tekniktir. Uygun AFLP primerleri ve restriksiyon enzimleri seçilerek 50-100 bant elde etmek mümkündür bu nedenle güçlü bir parmakizi tekniğidir. İdentifikasyon, epidemiyoloji ve taksonomide kullanılabilir.

Teknik 3 aşamada gerçekleşmektedir. İlk olarak DNA'nın restriksiyon enzimleri ile parçalanır ve adaptörlerin bu parçalara bağlanır, sonra adaptör spesifik primerlerin bağlanması ile ardışık iki selektif amplifikasyon gerçekleştirilir. En son poliakrilamid jel elektroforezle ampliconlar ayrılır ve bant paternleri görüntülenir.

Farklı kökenlerden elde edilen paternler; restriksiyon bölgelerindeki mutasyonlara, restriksiyon bölgelerine bitişik bölgelerdeki ve primerin komplementeri olan bölgedeki mutasyonlara, çoğaltılan fragmentlerdeki insersiyon ve delesyonlara bağlı olarak polimorfiktir. Yöntemin otomatize hali de mevcuttur. Fluorescent amplified fragment length polymorphisms (FAFLP) denilen bu yöntemde adaptör spesifik primerler floresans işaretlidir ve otomatize dizileme cihazında kesin uzunluk elde edilebilir. Bu yolla oluşturulan veritabanı sayesinde laboratuvarlar arası patern karşılaştırması yapmak mümkündür.



**Multilocus Sequence Typing (MLST):** Minimum işgücü ile yüksek ayırım gücü ve güçlü veri analizi elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Korunmuş (housekeeping) genler, virulans genleri veya rRNA dizilerinin karşılaştırılması esasına dayanır.

Tek bir gendeki tek bir nükleotitteki farklılık, kökenlerin birbiriyle ilişkilendirilmesinde kullanılabilir. Uzun süreli epidemiyolojik çalışmalar ve filogenetik analizler için uygundur. 16S rRNA, pduF, glnA ve manB genlerindeki dizi farklılıklarına göre 230 *Salmonella* izolatu karakterize edilmiştir ve PFGE'den daha iyi ayırım yaptığı sonucuna varılmıştır. Kökenlerin kesin ayırımında ve verilerin laboratuvarlar arası paylaşımında umut vaat eden ancak dizileme cihazı gerektirmesi nedeni ile pahalı bir yöntemdir.

**Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Multipleks PZR):** İki ya da daha fazla gen bölgesinin amplifikasyonuna bağlı, PZR'nin modifiye halidir. 1988'de yöntemin ilk kez tanımlanmasından sonra; delesyon analizleri, mutasyonlar, polimorfizm çalışmaları, kantitatif çalışmalar ve ters transkriptaz PZR gibi bir çok alanda kullanılmıştır. Optimizasyon yöntemin en önemli basamağı olarak kendini göstermektedir. Birden fazla primer kullanılıyor olması yanlış amplifikasyon ürünlerinin ya da primer dimerlerinin oluşumuna neden olabilir. İlk şart primerler arasında uyum olmasıdır bu nedenle uzunlukları 18-24 bp ya da daha uzun ve G-C içerikleri %35-60 arasında olmalı ve buna bağlı olarak da bağlanma sıcaklığı 55-58°C arasında veya daha fazla olmalıdır. İdeal olarak her bir primer seti hedeflediği bölge ile eşit derecede ilişkili olmalı ve optimum bağlanma sıcaklıkları çok yakın olmalıdır. Ayrıca primer-hedef bölge hibridinin uzama basamağı, enzimin aktivitesi ve dNTPlerin ortamda yeterli miktarda bulunmasına bağlıdır. Daha fazla lokus amplifikasyona uğradığı için enzim konsantasyonları, PZR tamponu, nükleotidler sınırlayıcı faktör olabilmektedir.

Yöntem öncelikle bakteriden DNA'nın izole edilmesini, sonra polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutulmasını ve amplikonların agaroz jel elektroforezinde UV altında görüntülenmesini içerir. Yapılan çalışmalarda bu yöntem kullanılarak tıbbi önemi olan *Salmonella* A, B, C1, D ve E gruplarının ayırımının yapılması sağlanmıştır (18).

**Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Replikon Tiplendirmesi (PBRT):** Plazmitler hemen hemen tüm bakterilerde bulunan kendini eşleyebilen eksta kromozomal DNA parçalarıdır. Çoğu plazmit kendi replikasyonunu ve hücre içindeki kopya sayısını kontrol eden sistemlere sahiptir bu şekilde hücre bölünmesi sırasında kalıtımlarını garanti altına alır. Buna ek olarak bazı plazmitler toksin-antitoksin faktörleri tabanlı bağımlılık sistemleri kodlarlar, bu

sisteme göre plazmiti aktarmayan yavru hücre yok edilir. Bu şekilde konjugasyon veya diğer gen aktarım yolları ile alınmış olan plazmit konak içindeki ömrünü koruma altına almış olur (19,20).

Bazı sistemler plazmitlerin bakteri içindeki sürekliliğini sağlarken bazı plazmitler de buldukları konaklara direnç genleri, virulans ve adhezyon faktörleri taşımaları ile avantaj sağlarlar. Gram negatif bakterilerde antibiyotik direnci gelişiminin en önemli nedenlerinden biri plazmit üzerinde bulunan direnç genlerinin horizontal gen transferi yolu ile tür içi ve türler arası aktarılmasıdır. *Enterobacteriaceae* ailesinde plazmitler tarafından kodlanan genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, karbapenemazlar ve kinolon direncine neden olan metilazların varlığı bilinmektedir. Tüm plazmitler enterik bakterilerde aynı sıklıkta bulunmaz, buna karşın bazı gruptaki plazmitler belli enterik bakterilerde daha sık bulunur, bu özellik bakterilerdeki klonal ilişkileri açıklamada anlamlı veriler sağlar (21-23).

Plazmitleri filogenetik ilişkilerine göre PZR tabanlı olarak gruplandırmak mümkündür. PBRT olarak adlandırılan teknikle plazmit replikasyon kontrolleri (replikonlar) hedef alınmaktadır. Replikonlar plazmit replikasyonunu ve kopya sayısını kontrol eden replikaz geni ve düzenleyici elementleri kodlama yolu ile replikasyonun kontrolünü sağlarlar. PBRT sistemi PZR tabanlı replikonların saptanmasıyla, plazmit karakterizasyonu yapan hızlı ve kolay bir moleküler tekniktir (19). PBRT kiti (Diatheva, İtalya) ile *Enterobacteriaceae* türleri arasında aktarılan ve direnç genleri üzerinde bulunan 25 ayrı replikonun varlığı 8 multipleks PZR deneyi ile test edilebilir (19-23). Test *Enterobacteriaceae* ailesinde en sık karşılaşılan plazmit ailelerinin replikonlarını (HI1, HI2, I1, I2, X1, X2, L/M, N, FIA, FIB, FIC, FII, FIIS, FIIK, W, Y, P, A/C, T, K, U, R, B/O, HIB-M, FIB-M) hedef alır. Bu plazmitlerin birçoğu genişlemiş spektrumlu sefalosporin, florokinolon ve aminoglikozid direnci ile ilişkilendirilmekte ve çoklu ilaç direnci gösteren *Enterobacteriaceae* kökenlerinde gözlenmektedir (23). *Salmonella* serovarlarında tanımlanmış olan replikonlar, kaynakları ve ilgili enzimler Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2. *Salmonella* serotiplerinde tanımlanmış replikonlar ve ilgili enzimler (20)**

Enzim	Replikon	Serotip
CMY-2	A/C	<i>S. enterica</i> [Agona, Anatum, Bredeney, Heidelberg, Newport, Typhimurium]
	I1	<i>S. enterica</i> [4,5,12:I:_, Ajiobo, Heidelberg, Thompson, Typhimurium]
	NT	<i>S. Heidelberg</i>
CMY-4	A/C	<i>S. Senftenberg</i>
CMY-31	ColE	<i>S. Newport</i>
CTX-M-3	L/M	<i>S. enterica</i>
	N	<i>S. Virchow</i>
	I1	<i>S. enterica</i> [Anatum, Potsdam]
CTX-M-9	HI2	<i>S. Virchow</i>
CTX-M-14	NT	<i>S. Stanley</i>
CTX-M-15 [TEM-1, AAC(6')-IB-CR]	FII, FIA, FIB	<i>S. Enteritidis</i>
CTX-M-53	I1	<i>S. enterica</i> [Anatum, Ohio, Infantis, Typhimurium]
	Q	<i>S. Westhampton</i>
	FII, FIA	<i>S. Senftenberg</i>
DHA-1	FII, FIA	<i>S. Senftenberg</i>
TEM-1	I1	<i>S. enterica</i>
	HI1	<i>S. enterica</i>
	ColE	<i>S. Typhimurium</i>
TEM-52	I1	<i>S. enterica</i> [Agona, Derby, Infantis, Paratyphi B, Typhimurium]
IMP-13	A/C, P	<i>S. enterica</i> [Anatum, Typhimurium]
QnrB2 [CTX-M-3, AAC(6')-IB-CR]	N	<i>S. Bredeney</i>
QnrB19 (SHV-12)	N	<i>S. Typhimurium</i>
QnrS1 [LAP-2, AAC(6')-IB-CR]	L/M	<i>S. Typhimurium</i>
AAC(6')-IB-CR]	ColE	<i>S. enterica</i> [Typhimurium, Virginia, Corvallis, Anatum]
	N	<i>S. enterica</i> [Virchow, Kentucky, Saintpaul]
	R	<i>S. Montevideo</i>
	HI2	<i>S. Stanley</i>
	NT	<i>S. enterica</i> [Stanley, Virginia, Virchow]

Plazmitlerin filogenetik ilişkilerinin araştırılması ve gruplandırılması; plazmitlerin yayılım şekilleri, konakları ile ilişkileri, evrimsel orijinleri en önemlisi ise antimikrobiyal direncin yayılımını izleme ve açıklama yolunda önemli bilgiler verir (19-21).

## **PATOGENEZ VE *SALMONELLA* PATOJENİTE ADALARI**

Birçok enterik patojenden farklı olarak tümü virulan kabul edilen *Salmonella*'lar doğaları gereği hastalık oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Hastalığın tipi ve derecesi, başlangıç dozu, kökenin virulansı, enfeksiyon yolu ve konağın duyarlılığına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bazı durumlarda konak immun sistemi patojeni elimine edebilirken, bazı durumlarda bakteri konağın bağışık yanıtından kaçmayı başarır ve enflamasyon yanıtlarının, hastalık belirtilerinin devam etmesine yol açabilir (24).

Enfeksiyonun ilk basamağı bakterinin konağa alınmasıdır. Fekal oral yolla bulaşan *Salmonella*'ların öncelikle kontamine yiyecek veya içecekler ile ağızdan alınması gerekir. Bu aşamadan sonra lokal bağırsak enfeksiyonu oluşturabilmesi için pek çok fizyolojik ve immunolojik bariyeri aşması için çeşitli stratejiler geliştirmiştir (25). Bu stratejilerden ilki asit tolerans cevabıdır. Bakteri kademeli olarak düşük pH değerlerine maruz bırakıldığında (pH 7.6'dan pH 5.5'e ve pH 3.3'e) asite karşı direnç oluşturması uyarılır ve bu onun daha düşük pH değerlerinde hayatta kalmasını sağlar. Bu cevap pH 5.5 ve 6 arasında indüklenir ve sonraki daha düşük pH değerlerinde iç homeostazının korunmasının sonucu olarak ortaya çıkar (26-29). Mide ve fagozom asiditesine rağmen hayatta kalan *Salmonella* kökenleri, enfeksiyon yerleri olan terminal ileuma göç eder ve buradaki epitel hücreleri ve M hücrelerine tutunurlar. Tutunmada fimbriaların rol oynadığı düşünülmektedir. Tutunma konak hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine neden olur ve patojen bakteriyel aracılı endositozla konak hücrelerini invaze eder. Bu invazyon sürecinde *Salmonella* Patojenite Adaları olarak isimlendirilen farklı genetik lokuslar rol oynar (24).

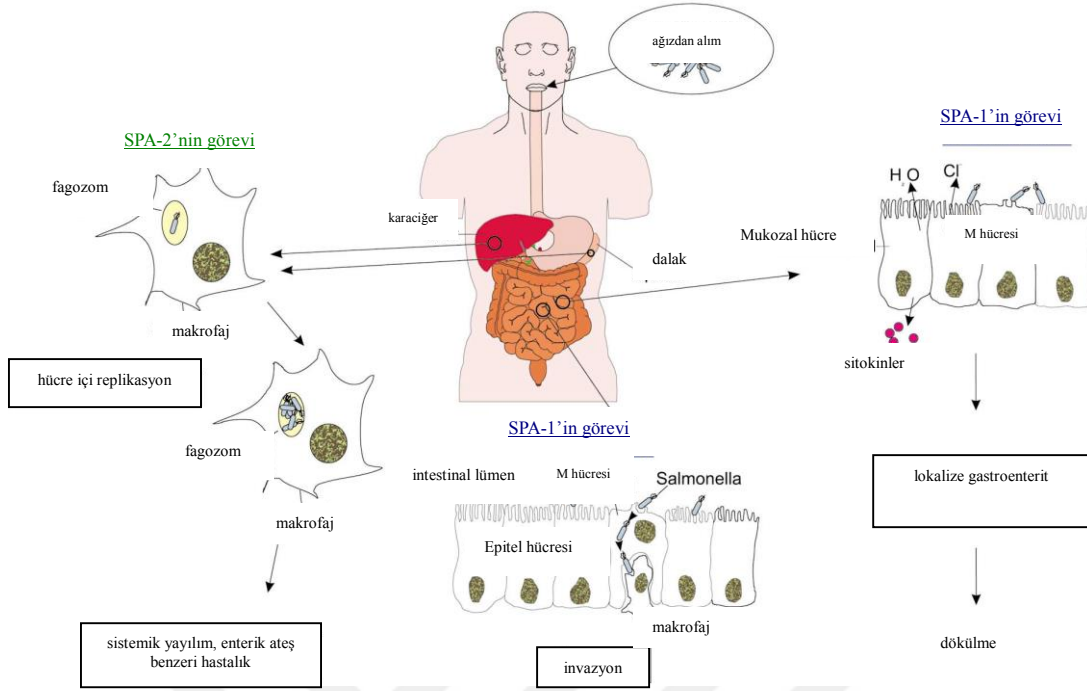
Patojenite adaları, patojen bakterilerde bulunan bakterinin virulans düzeyini belirleyen genler kodlayan kromozom üzerindeki büyük ve ayrı oluşumlardır ve guanin sitozin bileşimi genomun geri kalanından farklıdır. *Salmonella* enfeksiyonlarının farklı dönemlerinde rol alan ve günümüze kadar tanımlanmış 18 adet *Salmonella* Patojenite adası bulunmaktadır, ancak çoğunun virulanstaki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır (25,27). 10-200 kilobazlık bu genomik bölgeler, bakterinin organizmaya adezyonu, kolonizasyonu, invazyonu, immün sistemden kaçışı ve toksin üretimi gibi özellikleri sağlayan virülans faktörleri kodlayan çok sayıda gen içerir. Bazı patojenite adaları cins içerisinde korunmuşken bazı patojenite adaları serotipe özgüdür, bu farklılık oluşturulan enfeksiyonun derecesinde de kendini gösterir (27).

### ***Salmonella* Patojenite Adası-1 (SPA-1)**

*Salmonella* patojenite adaları içinde en iyi tanımlanmış olanıdır ve nonfagositik hücrelerin invazyonundan sorumlu genleri içerir (25). SPA-1, en az iki farklı elemandan oluştuğu gösterilmiştir. İlk eleman 30 farklı genden oluşmuş olup tip III sekresyon sisteminin (TTSS) birleşmesi ve fonksiyon göstermesinden sorumludur. Diğer eleman demir alım sistemini kodlar fakat invazyonda görev almaz (24). TTSS konak hücre zarına efektör proteinler salgılayarak aktin sitoskeleton düzenlenmesine membran çökmesi ve sonuçta bakterinin konağı invazyonunda rol alır (28). Tip III sekresyon sistemi (TTSS) için gerekli proteinler, *invA*, *invB*, *invC*, *invF*, *invG*, *hilA*, *sipA*, *sipC*, *sipD*, *spar*, *orgA*, *sopB* ve *sopE* genleri tarafından kodlanmaktadır. InvG bir dış membran proteini olup, protein sekresyonu ve bakterinin hücre içine alımında rol oynarken bir iç membran proteini olan *invA*, polipeptidlerin dışarı atılmasında görev alır. InvH ve *hilD* adezyonda görevli aksesuar proteinlerdir (27). Diğer proteinler, polipeptit sekresyonunu sağlayan *orgA* ve *sipC* ile aktin polimerizasyonunda görevli *sptP*, *sipA*, *sopE* olarak gruplanabilir. *SopE* aynı zamanda sitokin salgılanmasında görevli iken *sipB* proteininin ise makrofaj apoptozundan sorumlu olduğu gösterilmiştir (28). Yapılan moleküler çalışmalar SPA-1'in, *Salmonella* enfeksiyonlarının enterik ateş (tifo) veya yangılı ishallerin görüldüğü intestinal faz için önemli olduğunu göstermektedir (24).

### ***Salmonella* Patojenite Adası-2 (SPA-2)**

*Salmonella* hücre içine alındıktan sonra *Salmonella* taşıyan veziküllerde (SCV) yaşamlarını sürdürürler. SPA-2 tarafından kodlanan TTSS ile SCV'den konak hücre sitosolüne salgılanan efektör proteinler vakuolde modifikasyona yol açarak *Salmonella*'nın fagosit içinde hayatta kalışı ve replikasyonuna olanak verir (24,29). *Salmonella* içeren makrofajlarda fagozom lizozom birleşmesi önlenir ve reaktif oksijen radikalleri nötralize edilerek fagozom içinde hayatta kalma sağlanır. SPA-2 efektörleri aynı zamanda dalak ve karaciğerde üremeden de sorumludur (25). SifA tanımlanan ilk SPA-2 efektör proteindir ve iç membran yerleşimli bir bazal salgı aparatı olan *ssaR* ile birlikte epitel hücreleri ve makrofajlarda replikasyonda görevlidir (25,29). SPA-1 hücre invazyonu ve gastroenterit bulgularının ortaya çıkmasından sorumlu iken SPA-2 sistemik enfeksiyon oluşumu için önemlidir (27) (Şekil 3).



**Şekil 3.** *Salmonella* patogenezinde konak-patojen ilişkisini gösteren şema. SPA-1 fagositoz yapmayan hücrelerin invazyonu ve gastrointestinal epitele penetrasyon gibi enfeksiyonun başlangıç evrelerinde etkili olurken, aynı zamanda lokalize gastrointestinal enfeksiyonlarda diyare semptomlarının ortaya çıkmasında da rol alır. SPA-2 ise sistemik yayılım ve konak organlara kolonizasyon gibi enfeksiyonun daha geç safhalarında gereklidir. SPA-2'ye ait fagositik hücreler içinde hayatta kalma ve replikasyon patogenezin geç safhası için şarttır (30).

### ***Salmonella* Patojenite Adası-3**

*Salmonella* Typhimurium, *S. Typhi* ve *S.bongori*'de bulunan SPA-3 tarafından kodlanan majör virulans faktörü, yüksek afiniteli magnezyum transport sistemidir. *Salmonella* türlerinin gerek hücre içinde gerekse makrofajların içinde canlı kalabilmesi için gerekli  $Mg^{2+}$  naklini sağlamaktadır (25,27).

### ***Salmonella* Patojenite Adası-4**

Tip I Sekresyon Sistemini (TOSS) kodlayan genlerin bulunduğu patojenite adasıdır. TOSS tarafından salgılanan sitotoksinler immün hücrelerde apoptozu indükler (25,27).

### ***Salmonella* Patojenite Adası-5**

SPA-1 ve SPA-2 tarafından kodlanan TTSS için gerekli efektör proteinlerin kodlanmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Örneğin, bir inositol fosfataz olan Sop B proteini ishale neden olan klor iyonları salgılamasını tetikler, klor iyonu salgılanması da sıvı

sekresyonuna neden olur. Bu nedenle SPA-5'in enteropatogenezden sorumlu olduğu düşünölmektedir (25,27).

#### ***Salmonella* Patojenite Adası-6**

*S. enterica* subsp. *enterica* serovarlarında bulunan fimbriyayı ve invazini kodlayan gen bölgelerinin bulunduğu adacıktır. Hem *S. Typhi* hem *S. Typhimurium* serotiplerinde gösterilmiştir, ancak bu lokusun yok edilmesi *in vivo* bir etki yapmazken, *in vitro* çalışmalarda invazyonda azalışa neden olmuştur (25,27).

#### ***Salmonella* Patojenite Adası-7**

*Salmonella* serovar Typhi, Dublin ve Paratyphi C için özgül olup en büyük patojenite adasıdır, bu nedenle Majör Patojenite Adası (MPA) olarak da adlandırılır. Ekzopolisakkarit yapısındaki kapsüler Vi antijeninin kodlandığı bölgedir. Vi antijeni tifo sırasında ateşin yükselmesinden sorumludur (25,27) (Şekil 4).

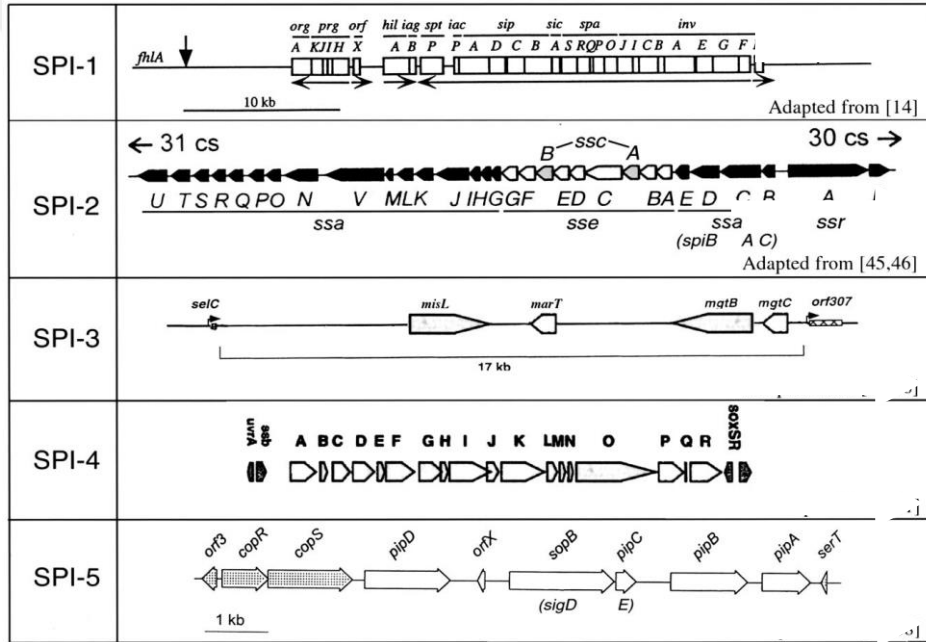
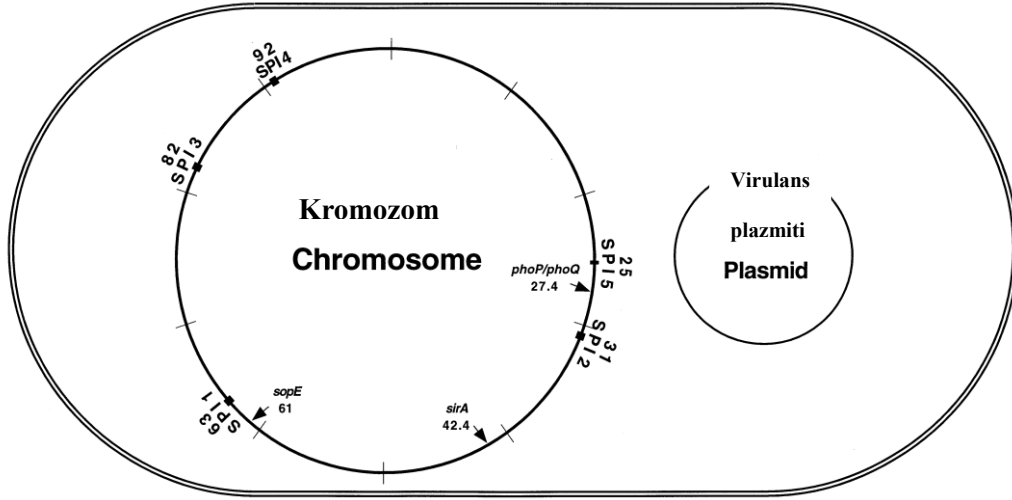
#### ***Salmonella* Genomik Adası-1 (SGA-1)**

*Salmonella enterica* olup kökenli çoklu antibiyotik direnç genlerini taşıyan integronları içerir. Kromozom üzerinde *thdf* ile *int2* genleri arasında bulunur. Dünyanın birçok yerinde salgınlara yol açan *S. Typhimurium* DT 104 kökeninde de gösterilmiş olan bu gen bölgesine sahip kökenlerin tetrasiklin, ampisilin, kloramfenikol, streptomisin ve sulfonamid direnci gösterdiği saptanmıştır (27).

#### **Yüksek Patojenite Adası**

*S. enterica* serotiplerinin yanında *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyelerinde de gösterilmiş olan bu ada, demir eksikliğinde demir alımı için gerekli olan siderofor biyosentezini yapan genleri içerir (27).

A



**Şekil 4. A.** *S. Typhimurium*'da bilinen patojenite adalarının kromozom üzerinde şematik dağılımı. SPA'ların yerleşimi kromozomun dışında gösterilirken bazı virulans genleri ve transkripsiyon regülatörlerin kromozomun iç kısmında gösterilmiştir.

**B.** *Salmonella* Patojenite Adalarının ve ilgili genlerin şematik gösterimi (31)

### Virulans Plazmitleri

Sadece birkaç *Salmonella* serotipinde bulunan virulans plazmitleri, büyüklükleri 50-90 kb arasında değişen ekstrakromozomal DNA parçalarıdır. Horizontal gen transferi ile aktarılabilen bu elementlerin büyüklükleri serotipler arasında değişebilse de 6 ayrı geni (*spvR*, *spvA*, *spvB*, *spvC*, *spvD* ve *spvE*) kodlayan 8 kb'lık bir bölüm, tüm serotipler içinde korunmuştur. *Spv* (*Salmonella* plazmit virulansı) genleri olarak adlandırılan bu bölgeyi taşıyan



kökenlerde bağırsak dışı yayılımın virulans plazmiti taşımayan kökenlere göre daha fazla olduğu gösterilmiş ve spv bölgesinin gastroenterit gibi erken enfeksiyonlardan ziyade septisemi gibi geç enfeksiyonlarda rol aldığı sonucuna varılmıştır (4,25,24,31,32).

İntestinal hücrelerin invazyonunu takiben TTSS aracılığı ile SCV içindeki bakterilerin replikasyonu uyarılır. Hücrelerin sitoplazmasına salgılanan sopB inositol fosfat sinyalleme yollarını bozarak klorür kanallarının kapanmasını engeller ve bazal klorür sekresyonunda artışa yol açar. Sonuçta intestinal inflamasyona ve sıvı sekresyonuna neden olur. Enfekte hücrelerden salgılanan kemokin ve prostoglandinler diğer enflamasyon hücrelerini enfeksiyon odağına toplar. Enflamasyon hücreleri *Salmonella*'ları fagosite eder ve bu hücrelerin bir bölümü lenf dolaşımına katılarak sistemik yayılıma neden olur (24,25,33).

### **SALMONELLA ENFEKSİYONLARINA GENEL BAKIŞ**

Sıklıkla gastroenterit etkeni olarak karşımıza çıkan *Salmonella* türleri asemptomatik enfeksiyon veya taşıyıcılıktan, enterik ateş (tifo) ve bakteriyemiye kadar çok çeşitli klinik tablolara neden olabilmektedir (1).

İlk 1884 yılında izole edilen bu patojen tarihte büyük kayıplara neden olmuştur (10). Günümüzde gelişmiş ülkelerde insidansında düşüş görülmekle birlikte hala tam anlamıyla kontrol altına alınamamasıyla hala halk sağlığını meşgul eden bir patojendir (11).

Bulaşma yolu fekal-oraldir bu nedenle insan dışkılarının çevreye bulaştığı, hijyen koşullarının yetersiz bulunduğu alt yapı sorunu olan ülkelerde hala ciddi morbidite, mortalite ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hayvanlar önemli rezervuarlar ve kontamine gıdalar başlıca bulaş kaynağıdır. *Salmonella*'lar hemen hemen tüm gıdalarda bulunabilmektedir, meyve, sebze, et ve süt ürünleri bu gıdalardan sadece birkaçıdır (34). Son yıllarda çoklu antibiyotik dirençli kökenlerin ortaya çıkması, bu patojenlerin tekrar gündeme gelmesine neden olmuştur (10,35).

Gıda kaynaklı salgının ortaya çıkışında ilk halka hayvanların dışkı, kıl, deri ve bağırsak sistemlerinin bulaşlı yemlerden, meralardan, su havzalarından kontamine olmasıdır. Bu kontaminasyon kesim sırasında ete bulaşabilir, ayrıca kesim sırasında kullanılan alet, ekipman ve insanlar da etlerin kontaminasyonuna neden olabilirler (34). Bu aşamadan sonra gıda kontrol programlarının önemi büyüktür ancak kontamine gıdanın orijinini gösterebilecek basit belirteçlerin bulunmaması nedeniyle bu gıdalarla oluşturulan besin stoklarının izlenebilirliği kolay değildir. Bu nedenle kontamine gıdaların bulunduğu besin stoklarının farklı bölgelere

transferleri ile üretim bölgesinden çok uzak bölgelerde de enfeksiyonlar ve salgınlar gözlenebilmektedir (10).

*Salmonella* taşıyıcısı olan gıda endüstrisi çalışanlarının el hijyenlerine dikkat etmemelerinden kaynaklanan birçok salgın tanımlanmıştır. Genellikle asemptomatik taşıyıcı olan ev hayvanları ile enfekte olduklarında idrar ve diğer çıkartılarıyla ortamı, yem ve gıdaları kontamine edebilen sıçan ve fareler ise diğer bulaş kaynaklarını oluşturmaktadır (1,36).

*Salmonella* serotiplerinin insanda gastroenterite neden olabilmesi için enfektif doz kişisel faktörlerle değişmekle beraber, 1 milyon basilin üzerindedir (36). İnsanlarda bakterinin vücuda alınmasından 8-48 saat sonrasında karın ağrısı, bulantı, kusma, bazen ateş ile titreme ve ishal görülür. Hasta tedavi edilmezse semptomlar 2-5 gün içinde yok olur. ABD’de her yıl yaklaşık 1.4 milyon *Salmonella* kökenleri tarafından indüklenen enterokolit, 15.000 hastaneye yatış ve 400’ün üzerinde ölüm vakasının belirlendiği ve ölümle sonuçlanan en yaygın gıda kaynaklı hastalık olduğu bildirilmiştir (1,37).

Enterik ateş, *Salmonella* Typhi’nin neden olduğu tifo ile *Salmonella* Paratyphi A, B ve C’nin neden olduğu paratifo tablolarına verilen addır. Patogenez ve epidemiyolojileri benzemekle beraber genellikle tifo, paratifoya göre daha ağır bir klinik tablo oluşturmaktadır. Tifo genellikle yüksek ateş, halsizlik, baş ve karın ağrısı, deride döküntüler ile karakterize ortalama 4 hafta süren bir klinik tablodur. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde bilinç problemleri, ishal ve kanama görülebilir. Genellikle hastalığın dördüncü haftasında iyileşme süreci başlar, ancak ciddi komplikasyonların olduğu durumlar ölümle sonuçlanabilir. Olguların %0.5-5’inde ince bağırsaklarda görülen perforasyon tifonun en korkulan komplikasyonlarından biridir. Bakteri iyileşme döneminde dışkıdan atılmaya devam eder (1,38).

*Salmonella* türlerinin neden olduğu bir diğer klinik tablo olan bakteriyemi, enterik ateş veya gastroenterit belirtileri bulunmaksızın, kan kültüründe *Salmonella* serotiplerinden birinin üremesiyle karakterize uzun süren ateşli tablodur. *S. Typhimurium* ve *S. Choleraesuis* bakteriyemi tablosundan sorumlu tutulan serotiplerin başında gelmektedir. Bakteriyemi sırasında *Salmonella* kökenleri vücutta değişik doku ve organlara yerleşerek yerleştikleri bölgeleri invaze edebilirler. İç organlarda apse gelişimi, menenjit, endokardit, osteomyelit *Salmonella* bakteriyemisi sonucunda gelişen enfeksiyonlara örnek olarak verilebilir (1,38,39).

Bireyin ishal olmaksızın dışkısında *Salmonella* izolatlarının saptanmasına taşıyıcılık denir. *Salmonella* gastroenteriti sonrası dışkıdan 3 aydan daha kısa bir süre ile bakterinin atılması geçici taşıyıcılık, bir yıldan uzun bir süre ile atılması ise kronik taşıyıcılık olarak adlandırılır. Bu kişiler enfeksiyon için önemli bulaş kaynaklarını oluşturmaktadırlar. (1,38-40)

## ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ

Antimikrobisyonların hem hastaların tedavisinde hem de büyümei teşvik ettiği ve verimi arttırdığı gerekçesiyle hayvan yemlerinde gereksiz kullanılması, dirençli bakteri kökenlerinin toplumda yayılmasına neden olmuştur. Son yıllarda ortaya çıkan çoklu ilaç direnci gösteren kökenler ise önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bakterilerde antimikrobiyal direnci değişik mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır. Bunlar hücre duvarı geçirgenliğinin azalması, antimikrobisyonların aktif efluks pompalarıyla hücre dışına atılması, ilacın hedefinin modifikasyonu ve çeşitli enzimlerle antimikrobisyonların inaktivasyonudur. Direnç fenotipi sıklıkla konjugasyon yoluyla dirençli kökenlerden plazmit kazanılmasıyla ortaya çıkmaktadır. Enterik bakterilerde karşılaşılan direnç plazmitlerinde bulunan sınıf I integronlar çoklu ilaç direncinin artmasına neden olan hareketli DNA parçalarıdır. İntegronların transpozonlar (Tn402 ve Tn21) ve plazmitler (IncF gibi) üzerinde taşınması horizontal gen transferi yoluyla bakteriler arasında yayılımına neden olmaktadır (41).

*Salmonella* enfeksiyonlarının erken tanısı ve doğru ilaçla tedavisi ciddi komplikasyonların önüne geçmeye olanak verir. Ancak gelişen antimikrobiyal direnci çoğunlukla ilacın enfeksiyona karşı etkisiz kalmasına neden olmaktadır. Uygun antimikrobiyal seçiminde coğrafi bölgede gözlenen antibiyotik direnç paternlerinin yanı sıra enfeksiyona neden olan serotipin belirlenmesi de etkili olmaktadır (42-45).

### Klasik İlaç Direnci

Ampisilin, kloramfenikol, tetrasiklin, trimetoprim ve sülfametoksazol klasik ilaç grubunda değerlendirilir. 1960 öncesine kadar çoğu antimikrobiyale duyarlı olan *Salmonella*'lar antibiyotiklerin kullanmasının yaygınlaşması ile hızla plazmit aracılı başta olmak üzere çeşitli mekanizmalarla direnç kazanmaya başlamışlardır (43,44). 1990ların başında direnç %20-30 seviyelerinde iken 21.yüzyıla geldiğimizde direncin %70'lere kadar yükseldiğini görüyoruz. En sık karşılaşılan serotiplerin başında gelen *S. Enteritidis* diğer serotiplere kıyasla daha duyarlı iken *S. Typhimurum*'da direncin daha sık karşılaşılan bir problem olduğunu söylemek mümkündür. 1990'ların başında ortaya çıkan *S. Typhimurium* DT 104 faj tipi çoklu ilaç direnci (ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfonamid, ve tetrasiklin) göstermesi ile epidemilere sebep olmuş, direncin varlığı bu faj tipi içerisinde ACSSuT dirençlilik plazmitlerin kazanılmış olmasına bağlanmıştır. Konvansiyonel antibiyotiklere gelişen direnç invazif *Salmonella* enfeksiyonlarında bu antibiyotiklerin kullanımdan kalkmasına neden olmuş ve klinisyenleri yeni antibiyotik arayışına itmiştir (45).

## **Kinolon Direnci**

Klasik ilaçlara gelişen dirençten sonra 1990'larda kinolonlar *Salmonella* kökenleri ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde alternatif olarak kullanılmaya başlanmış, ancak 1990'ların sonunda kinolon dirençli kökenler bildirilmeye başlanmıştır (43). Kinolonlara azalmış duyarlılığı tespit etmek üzere tedavi öncesi nalidiksik tarama testi önerilmiştir. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) standardına göre "Barsak dışı salmonelloz olgularından izole edilen nalidiksik aside dirençli, florokinolon duyarlı kökenler eğer florokinolonlarla tedavi edilirse tedavi gecikme ya da başarısızlıkla sonuçlanabilir. Bu nedenle barsak dışı *Salmonella* kökenlerinde mutlaka nalidiksik aside duyarlılık araştırılmalıdır. Nalidiksik aside dirençli olgularda hekim, florokinolonlarla bakteri eradikasyonu elde edemeyeceği konusunda bilgilendirilmelidir." ifadesiyle nalidiksik asit tarama testi kabul görmüştür (43,46).

Kinolon direnci genellikle diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde de olduğu gibi DNA giraz genlerindeki kinolon direnci belirleme bölgesinde (QRDR) meydana gelen mutasyonlar ile ilgilidir. GyrA, gyrB ve parC genlerinde meydana gelen nokta mutasyonlar aminoasit ürünlerin değişmesine ve direnç gelişmesine neden olmaktadır. Mutasyonların sayısı ve hangi genler üzerinde gerçekleştiği direnç fenotipinde etkili olmaktadır (43). Florokinolon direnci gelişmesinde diğer bir mekanizma ise ilacın AcrAB-TolC efluks pompası ile hücre dışına atılmasıdır. Hem efluks pompasını sentezleyen hem de düzenleyici marRAB ve soxRS genlerde meydana gelen mutasyonların ve inaktivasyonların dirençte azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Dış membran proteinleri (OmpF gibi) ve lipopolisakkaritlerin ifadesinde değişimin de kinolon direncinde etkili olduğu düşünülse de bu alanda daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır (46).

Kinolonlara karşı direnç gelişmesinden sorumlu diğer önemli bir mekanizma ise ilk olarak bir *Klebsiella pneumoniae* kökeninde tanımlanan plazmit aracılı kinolon direncidir. Dirençten sorumlu qnrA geninin ürünü olan peptidler, DNA giraz ve topoizomerez IV enzimlerini kinolonların etkisine karşı koruyarak nalidiksik asite karşı dirence ve florokinolonlara 20 kata kadar azalmış duyarlılığa neden olmaktadır. Yakın zamanda tanımlanan qnrB ve qnrS ise sırasıyla %41 ile %60 qnrA ile aminoasit benzerli göstermesiyle plazmit aracılı kinolon direncine ortak olmaktadır. Qnr pozitif kökenlerin genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten kökenlerle yakın ilişkili olması plazmit aracılı kinolon direncinin belirlenmesinin toplum sağlığı açısından önemini ortaya koymaktadır (47).

## **Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlara Bağlı Direnç**

Kinolonlara direncin artmasını takiben enterik ateş tedavisinde üçüncü kuşak sefalosporinler kullanılmaya başlanmış ancak sefalosporin direnci de hızla gelişmiştir (43). *Salmonella* türlerinde bildirilen sefalosporinazlar CTX-M, SHV, TEM, CMY-2 ile daha az sıklıkla karşılaşılmakla beraber ACC, PER, OXA ve DHA türevleridir. Dirençten sorumlu genler plazmit, transpozon ya da integronlar üzerinde bulduklarından horizontal gen transferi yoluyla diğer serotiplere ya da diğer enterik bakterilere yayılım söz konusudur (45). Bunun yanında GSBL enzimlerinin bu kadar çeşitli olması invazif enfeksiyonların yaygın olduğu ülkelerde antibiyotik seçeneklerini kısıtlamaktadır (43).

## **Aminoglikozit Direnci**

Ribozomların 30S alt ünitelerine bağlanarak etkili olan aminoglikozitlere direnç farklı mekanizmalarla gelişmektedir. 16S rRNA'da meydana gelen mutasyonlar antibiyotiğin ribozoma bağlanmasını engelleyerek yüksek düzey dirence yol açarken, 16S rRNA'nın metillenmesi ise düşük düzey dirence neden olmaktadır. Antibiyotiğin hücre içine alınımının azalmasına bağlı direnç, ilacın enzimatik modifikasyonu ve dışa atım pompaları aminoglikozit direncinden sorumlu diğer mekanizmalardır. Aminoglikozit aminotransferazı kodlayan kromozomal aadA geninin ifadesindeki artış basit besiyerlerinde üreyen kökenlerde görülmekte ve aminoglikozit direncine yol açmaktadır. Zengin besiyerinde üreyen kökenlerde gen ifadesinde artış gözlenmemesi çevresel faktörlerin direnç aktivasyonundaki etkisini ortaya koymaktadır. gidB ve armA genleri 16S rRNA'nın metilasyonundan sorumlu enzimlerdir ve sıklıkla CTX-M, TEM, sulI genleriyle birlikte saptanırlar (43).

## **Karbapenem Direnci**

İnvazif *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisinde son seçenek ilaç olarak karşımıza çıkan karbapenemler çoklu ilaç dirençli kökenlere karşı kullanılabilir. Ancak 2010 yılında Tayvan'dan bildirilen OmpC mutasyonuna bağlı karbapeneme dirençli *S. Typhimurium* olgusu yakın zamanda karbapenem direncinin de yaygınlaşacağını habercisi olabileceği düşünülmektedir (43,48).

*Salmonella*'ların neden olduğu gastroenteritlerde enfeksiyon genellikle 5-7 gün içinde kendini sınırlamakta ve bu durumlarda tedaviye gerek olmamaktadır. Kaybedilen sıvı ve elektrolitler ağız veya damar yoluyla takviye edildiği takdirde olgular kendiliğinden

iyileşmektedir. Ancak ateşin 5 günden uzun sürdüğü durumlarda, altta yatan hastalığı olanlar, immunsupresif ilaç kullananlar veya yenidoğanlarda invazyonu önlemek amacı ile antibiyotik tedavisi başlanır. Kloramfenikol, ampisilin ve trimetoprim- sülfometoksazol yıllardır *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmakta ve yıllar içinde bahsi geçen ilaçlara direnç geliştiği gözlenmektedir. Bu nedenle erişkinlerde ampirik tedavide siprofloksasin veya ofloksasin gibi bir kinolon türevidir, çocuklarda ise üçüncü kuşak sefalosporinlerden biri tercih edilmektedir. Enterik ateş tedavisinde de klasik antibiyotiklere karşı gelişen direnç nedeniyle erişkinlerde kinolonlar, çocuklar, gebeler ve emziren kadınlarda üçüncü kuşak sefalosporinler ilk tercih ilaçlar olarak kabul edilmektedir. Tifonun ciddi komplikasyonlarından biri olan bağırsak perforasyonunda tedavide cerrahi girişim, kanamalarda ise kan transfüzyonu da gerekebilmektedir (49).

*Salmonella* enfeksiyonları “önlenebilir ve eradike edilebilir” olarak kategorize edilmekte ve korunma ve kontrol birbirini izleyen üç aşamanın uygulanması ile gerçekleşmektedir. Birinci basamak enfeksiyon kaynaklarının sınırlandırılması, ikinci basamak bulaş yollarının kontrol altına alınması ve son basamak ise konak ile ilgili tedbirlerin alınmasıdır (38,39).

Antibiyotik stresine bağlı olarak kolayca direnç kazanabilen *Salmonella* kökenleri önemli bir halk sağlığı problemidir. Dirençli kökenlerin yayılmasının önlenmesi ancak gıda ve hayvancılık sektöründe hijyen önlemleri alınması, kontrolsüz antibiyotik kullanımı ve antibiyotiklerin hayvancılıkta büyüme faktörü olarak kullanılmasının önüne geçilmesiyle mümkün olabilir. Antibiyotik duyarlılık testlerinin doğru yapılması, direnç genotip ve fenotiplerinin bildirilmesiyle toplumda dolaşan bakterilerin direnç durumu ortaya konarak uygun tedavi için önlemler alınması sağlanabilir (43).

## **GEREÇ ve YÖNTEM**

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2014 yılında 76 numaralı proje olarak desteklenmiştir. Çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında yapılmıştır.

## **KÖKENLERİN KLASİK BİYOKİMYASAL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE İDENTİFİKASYONU**

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama merkezine 2009-2012 yılları arasında gastroenterit şikayeti ile başvuran hastaların klinik örneklerinden izole edilen ve -80°C derin dondurucuda saklanan 50 adet *Salmonella* kökeni canlandırma için Luria-Bertani (LB) besiyerine (Biomatik, ABD) ekilerek 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün kültürlerden *Salmonella* Shigela (SS) agar (Merck, ABD) besiyerine pasaj alındı.

SS agarda laktoz negatif siyah koloniler oluşturan bakteriler biyokimyasal identifikasyonları yapılmak üzere Triple Sugar Iron (TSI) agar, Lysine Iron Agar (LIA), Motility Indol Ornithine (MIO) agar, sitrat agar, üre agar, fenilalanin deaminaz (FAD) agar besiyerlerine ekilerek 37°C'de inkübe edildi. Yirmi dört saat sonra kültürler değerlendirildi. Laktoz, üreaz, fenil alanin deaminaz negatif, hareketli, H<sub>2</sub>S, sitrat, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz testleri pozitif olan koloniler *Salmonella* olarak değerlendirildi (7).

Biyokimyasal yöntemlerle identifikasyonları yapılan *Salmonella* kökenlerinin polivalan ve grup spesifik (*Salmonella* Poly A-I + Vi, *Salmonella* O:2, O:4, O: 6,7,8, O:7,8, O:8, O:9, O:3,10,15, O:1,3,19) antiserumlarla (Plasmatec, İngiltere) O grup antijenlerine göre serogruplandırılması lam aglütinasyon yöntemi ile yapıldı.

Lam aglütinasyon yöntemi için öncelikle temiz bir lamın bir ucuna negatif kontrol için %0,85 steril NaCl çözeltisi, diğer ucuna bir damla *Salmonella* polivalan antiserum damlatıldı. Bir gecelik kültürden bir öze dolusu alınan bakteri bu iki damlada ayrı ayrı süspanse edildi. Lam iki ucundan tutularak 30 saniye dairesel hareketlerle çevrildi ve aglütinasyon yönünden negatif kontrolle karşılaştırıldı. Aynı işlemler *Salmonella* gruba özgül antiserumlar için de tekrar edildi ve sonuçlar kaydedildi.

## **POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İÇİN ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI**

### **DNA izolasyonu**

Kökenler *Salmonella* Shigela (SS) agar (Merck, ABD) besiyerine ekildi ve 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün SS agarda tek koloni halinde üreyen bakterilerden kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu yapıldı. Her bir köken için tek koloni seçilip 50 µl ultra saf su içinde süspanse edildi, vortekslendikten sonra 95°C'de 10 dakika boyunca ısı bloğunda tutularak kaynatıldı. Kaynatma sonrasında tüpler 14000 rpm (Microfuge 16, Beckman Coulter, Inc., ABD) devirde 10 dakika boyunca santrifüj edildi. 30 µl supernatan DNA örneği olarak kullanıldı.



### Klasik virulans faktörlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile gösterilmesi

Araştırılacak gen bölgeleri; kromozom üzerinde yer alan SPA-1'de bulunan ve bakterinin hücreleri istila etmesini sağlayan *invA*, *sipA*, *sipD*, *sopB*, *sopD*, *sopE2* genleri, SPA-2'de bulunan ve konak hücrede yaşamaya ve replike olmaya yardımcı *ssaR*, *sifA* genleri ile plazmit üzerinde bulunan ve derin dokularda kolonizasyonda yardımcı *spvB*, *Prot6E* gen bölgeleri olarak belirlendi.

Her biri 100 nmol olan liyofilize primerler (Biomatik, ABD) 1000 µl ultra saf su ile sulandırıldı. Set halindeki her biri 100 mM olan dNTP'lerden (Geneon, Almanya) 25 µl alınarak bir ependorf tüpüne eklendi, karışım beş kat sulandırıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) 25 µl 'lik hacimde çalışıldı. Her bir reaksiyon için 2.5 µl 10X Taq Polimeraz Tamponu (Thermo Scientific, ABD), 1.6 µl MgCl<sub>2</sub>, 1.25 µl dNTP 0.5 µl ileri primer, 0.5 µl geri primer, 15.15 µl ultra saf su, 0.5 µl Taq polimeraz (5 U/µl) ve 3 µl DNA eklendi. Her gen bölgesi için ayrı olan koşullarda PZR gerçekleştirildi. (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Ltd. Hemel Hempstead, İngiltere)

Toplam 10 farklı gen bölgesine ait 10 ayrı primerin optimum çalışma sıcaklıklarına ilişkin PZR profilleri, ilgili referanslar ve reaksiyon sonrası ortaya çıkan ampikonların uzunlukları Tablo 3'te belirtilmiştir.

**Tablo 3. Araştırılan klasik virulans genlerine ait primer dizileri, çalışılan PZR profilleri, ampikon uzunlukları ve ilgili referanslar**

Gen bölgeleri	Primer Dizileri (5'-3')	Ampikon (bp)	PZR Profili	Referanslar
<b>invA</b>	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT	244	94°C'de 5 dk	4
	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT			
		94°C 30 sn	} x 30	
		60°C 30 sn		
		72°C 2 dk		
		72°C 10 dk		
<b>sipA</b>	ATGGTTACAAGTGTAAGGACTCAG	2055	95°C'de 3 dk	50
	ACGCTGCATGTGCAAGCCATC			
		95°C 30 sn	} x 30	
		53°C 30 sn		
		72°C 40 sn		
		72°C 5 dk		
<b>sipD</b>	ATGCTCCTTGCAGGAAGCTTTTG	1029	95°C'de 3 dk	50
	TTAATATTCAAATTATTCCG			
		95°C 30 sn	} x 30	
		53°C 30 sn		
		72°C 40 sn		
		72°C 5 dk		

<b>sopB</b>	CCTCAAGACTCAAGATG TACGCAGGAGTAAATCGGTG	1987	95°C'de 3 dk 95°C 30 sn 58°C 30 sn 72°C 40 sn 72°C 5 dk	x 35	4
<b>sopD</b>	ACGACCATTGCGGC G GAGACACGCTTCTTCG	1291	95°C'de 3 dk 95°C 30 sn 58°C 30 sn 72°C 40 sn 72°C 5 dk	x 35	4
<b>sopE2</b>	TACTACCATCAGGAGG GAATGTTTTATGTGACGCAG	995	95°C'de 3 dk 95°C 30 sn 55°C 30 sn 72°C 40 sn 72°C 5 dk	x 35	4
<b>ssaR</b>	GTTCGGATTCATTGCTTCGG TCTCCAGTGACTAACCCTAACCAA	1628	95°C'de 5 dk 94°C 30 sn 50°C 60 sn 72°C 120 sn 72°C 10 dk	x 35	4
<b>sifA</b>	ATGCCGATTACTATAGGCAATGG TTATAAAAAACAACATAAACAGCCG	1011	95°C'de 10 dk 94°C 30 sn 52°C 60 sn 72°C 60 sn 72°C 10 dk	x 35	4
<b>spvB</b>	CGTTATAGAAGAGCTCCTGT CCGGTATACGACTCTGTGATC	349	95°C'de 5 dk 94°C 30 sn 60°C 90 sn 72°C 60 sn 72°C 10 dk	x 30	51
<b>Prot6E</b>	GGCACCGCAGCAATGGTTGG GGTCGAGCTACAGAGATCACAC	135	94°C'de 5 dk 94°C 30 sn 56°C 30 sn 72°C 40 sn 72°C 5 dk	x 35	52

Elektroforezde kullanılacak agaroz jel 100 ml 1X Tris-borat-EDTA (TBE) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD) (pH=8,3) tamponu içinde %2 (ağırlık/hacim) agaroz (Prona Biomax, İspanya) olacak şekilde, sekiz µl etidyum bromür eklenerek hazırlandı. PZR sonrası ampliconlar 1:4 oranında 6X jel yükleme solüsyonu ile karıştırılarak agaroz jelin kuyularına yüklendi. invA, spvB ve prot6E çalışılırken 100 bç (0,1 µg/µl) DNA ladder (Geneaid, Tayvan) kullanılırken, diğer gen bölgeleri için 1 kb (100 ng/µl) DNA ladder (Thermo Scientific, ABD)

kullanıldı. Elektroforez 100 volt (v) ve 400 miliamper (mA) akımda, 40 dakika yürütülerek tamamlandı. (Thermo Scientific Owl D2 elektroforez sistemi, Waltham, Massachusetts, ABD). Elektroforez sonrası jeller jel görüntüleme sisteminde (FUSION Gel documentation system, Almanya) UV ışığı altında görüntülenerek fotoğraflandı. Her bir örnekteki farklı gen bölgelerine ait pozitif ve negatif sonuçlar excel dosyasına kaydedildi. Negatif bulunan örneklerin deneyleri kültür ve DNA izolasyonundan başlanarak tekrarlandı ve tüm sonuçların kontrolleri yapıldı.

### **Antibiyotik Direnç genlerinin PZR ile Gösterilmesi**

Otomatize sistem (VITEK2, Biomerieux, Fransa) ile minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) değerleri bilinen (53), *Salmonella* kökenlerinden, ampiciline orta ya da yüksek düzey direnç gösteren kökenlerde TEM-1, SHV-1, CTX-M-1 genleri PZR ile tarandı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) 25 µl 'lik hacimde çalışıldı. Her bir reaksiyon için 2.5 µl 10X Taq Polimeraz Tamponu, 1.6 µl MgCl<sub>2</sub>, (Thermo Scientific, ABD), 1.25 µl dNTP (Geneon, Almanya), 0.5 µl ileri primer, 0.5 µl geri primer, (Biomatik, ABD), 15.15 µl ultra saf su, 0.5 µl Taq polimeraz ve 3 µl DNA eklendi. PZR profili 95°C'de 10 dakika, 30 döngü; 95°C'de 30 saniye, primerlerin bağlanma sıcaklığında 60 saniye, 72°C'de 60 saniye ve son döngü 72°C'de 7 dakika olarak uygulandı. Primerlerin bağlanma sıcaklığı *bla*TEM-1 ve *bla*SHV-1 primerleri için 55°C, *bla*CTX-M-1 primeri için ise 57°C olarak belirlendi.

Trimetoprim sulfometoksazol'e dirençli kökende ise sulI ve sulII genlerinin varlığı PZR ile araştırıldı. PZR profili 95°C'de 5 dakika, 30 döngü; 95°C'de 60 saniye, primerlerin bağlanma sıcaklığında 60 saniye, 72°C'de 60 saniye ve son döngü 72°C'de 10 dakika olarak uygulandı. Primerlerin bağlanma sıcaklığı sulI primeri için 55°C, sulII primeri için ise 67°C olarak belirlendi.

Beta laktamaz genleri araştırılan kökenlerde aynı zamanda plazmit kökenli kinolon direncinden sorumlu *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* genleri PZR ile araştırıldı. PZR 25 µl 'lik hacimde çalışıldı. Her bir reaksiyon için 2.5 µl 10X Taq Polimeraz Tamponu, 1.6 µl MgCl<sub>2</sub>, 1.25 µl dNTP, 0.5 µl ileri primer, 0.5 µl geri primer, 15.15 µl ultra saf su, 0.5 µl Taq polimeraz ve 3 µl DNA eklendi. PZR profili 95°C'de 10 dakika, 35 döngü; 95°C'de 60 saniye, 54°C'de 60 saniye, 72°C'de 60 saniye ve son döngü 72°C'de 10 dakika olarak uygulandı. Tüm antimikrobiyal direnç genlerinin araştırıldığı deneylerde ikişer adet ilgili antimikrobiyale duyarlı köken çalışmaya dahil edildi. Çalışılan primerlerin dizileri ampikon uzunlukları Tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4. Araştırılan antimikrobiyal direnç genlerine ait primer dizileri, ampikon uzunlukları ve ilgili referanslar**

Gen Bölgeleri	Primer Dizileri (5'-3')	Ampikon (bç)	Referanslar
<i>blaSHV-1</i>	GGC CGC GTA GGC ATG ATA GA CCC GGC GAT TTG CTG ATT TC	714	41
<i>blaTEM-1</i>	CAG CGG TAA GAT CCT TGA GA ACT CCC CGT CGT GTA GAT AA	643	41
<i>blaCTX-M-1</i>	AAC CGT CAC GCT GTT GTT AG TTG AGG CTG GGT GAA GTA AG	766	41
<i>qnrA</i>	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580	47
<i>qnrB</i>	GGMATHGAAATTCGCCACTG TTTGCYGYGCGCCAGTCGAA*	264	47
<i>qnrS</i>	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428	47
<i>sulI</i>	ATG GTG ACG GTG TTC GGC ATT CTG GCT AGG CAT GAT CTA ACC CTC GG	841	4
<i>sulII</i>	AGG GGG CAG ATG TGA TCG AC GCA GAT GAT TTC GCC AAT TG	249	4

- M =A veya C; H = A veya C veya T; Y = C veya T.

Elektroforezde kullanılacak agaroz jel 100 ml 1X TBE (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD) (pH=8,3) tamponu içinde %2 (ağırlık/hacim) agaroz (Prona, Madrid, İspanya) olacak şekilde sekiz µl etidyum bromür eklenerek hazırlandı. PZR sonrası ampikonlar agaroz jelde 100 volt (v) ve 400 miliamper (mA) akımda, 40 dakika yürütüldü (Thermo Scientific Owl D2 elektroforez sistemi, Waltham, Massachusetts, ABD). Elektroforez sonrası jeller jel görüntüleme sisteminde (FUSION Gel documentation system, Eberhardzell, Almanya) UV ışığı altında görüntülenerek fotoğraflandı.

## **PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZİ**

PZR çalışmaları devam ederken kökenler arasındaki klonal ilişkinin araştırılması için Pulsed Field Jel Elektroförez (PFGE) yöntemi kullanıldı. Deneylere başlamadan önce gerekli olan aşağıda listelenen çözeltiler hazırlandı.

### **1 M Tris Tamponu hazırlanışı:**

12.11 gr Tris base (Merck, ABD) pH 8'e ayarlanacak ve toplam hacim 100 ml olacak şekilde ultra saf su ile hazırlandı. Otoklavda steril edildi.

### **1 M Tris-HCl Tamponu hazırlanışı:**

15.67 gr Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorür (Fisher Scientific, ABD) pH 8'e ayarlanacak ve toplam hacim 100 ml olacak şekilde ultra saf su ile hazırlandı. Otoklavda steril edildi.

### **Cell Suspension Buffer (CSB) Tamponu hazırlanışı:**

1 M Tris tamponundan (pH 8) 10 ml, 0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma-Aldrich, Almanya) çözeltisinden 20 ml alınarak toplam hacim 100 ml'ye ultra saf su ile tamamlandı.

### **Lizis Tamponu hazırlanışı:**

0.5 M EDTA (pH 8) çözeltisinden 9 ml, %10 Na- lauril sarkozin çözeltisinden 1 ml alınarak karıştırıldı, kullanılacağı zaman 800'er µl mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

Her bir tüp için 10 mg/ml konsantrasyondaki lizozim enziminden (Sigma-Aldrich, Almanya) 100 µl, 10mg/ml konsantrasyondaki Proteinaz K (Sigma-Aldrich, Almanya) enziminden 100 µl ve 2 mg/ml konsantrasyondaki RNAz (Biomatik, ABD) enziminden 2 µl eklendi. Dondurup çözme enzimlerin yapısını bozacağından, enzimler belirtilen konsantrasyonlarda birer ml taze olarak hazırlanarak kullanıldı.

Tek seferde en fazla 12 örneğin çalışılabildiği ve toplamda 5 gün süren protokole göre, ilk gün çalışılacak örnekler 5 ml LB broth besiyerine ekildi ve 1 gece 37°C'de çalkalamalı etüvde (SI500 Çalkalamalı İnkübatör, Stuart, İngiltere) 80 rpm'de inkübe edildi. Ertesi gün örneklerden 1.2 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve çökelti tekrar 13.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi ve üst sıvı tekrar atıldı. Çökelti üzerine 500 µl CSB çözeltisi ilave edildi ve vortekslenerek iyice çözünmesi sağlandı. Tüpler 13.000 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine 1000 µl CSB

çözültüsü ilave edildi ve vortekslendi. Tüpler önceden 55<sup>0</sup>C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 15 dakika bekletildi. 55<sup>0</sup>C'de bekletilen %2'lik düşük erime ısılı agarozdan (low melting agaroz) ve bakteri süspansiyonundan 150'şer µl alınarak ayrı bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı ve karışımdan 100 µl alınarak agaroz kalıbına döküldü. Tüm örnekler için aynı işlem tekrarlandıktan sonra kalıp içindeki agarozun katılaşması için +4<sup>0</sup>C'de 30 dakika bekletildi. Her bir örnek için birer mikrosantrifüj tüpüne 1000 µl lizis solusyonundan ilave edildi ve üzerine donmuş olan agaroz plakları aktarıldı. Tüpler su banyosunda (NB 5/9/20 Su Banyosu, Nüve, Türkiye) 55<sup>0</sup>C'de 1 gece inkübe edildi.

Ertesi gün agaroz plakları 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 55<sup>0</sup>C'lik su banyosunda bekletilmiş ultra saf su ile 15'er dakika aralıklarla 3 kez yıkandı. Aynı yıkama işlemleri 55<sup>0</sup>C'de bekletilmiş TE-10 solusyonu ile 3 kez tekrarlandı. Sonrasında agaroz blokların yarısı bistüri ile kesilerek mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı üzerlerine 15 µl XbaI Buffer (Thermo Scientific, ABD) ve 135 µl ultra saf su ilave edildi, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda sıvı pipet yardımıyla agaroz plaklarına zarar vermeden buffer boşaltıldı ve üzerilerine 85 µl ultra saf su, 10 µl 10X XbaI tamponu ve 5 µl XbaI enzimi (10 U/µl) ilave edildi. Tüpler 37<sup>0</sup>C'de bir gece inkübe edildi.

Elektroforezin yapılacağı gün plaklar tarak dişlerine uygun ölçülerde kesildi. Tarağın 1., 7. ve 15. dişlerine Lambda PFG ladder (Biolabs, ABD) marker olarak eklendi. Diğer dişlerin üzerilerine örnekler sırayla yerleştirildi. Agaroz plakların üst ve alt kısımlarına erimiş düşük erime ısılı agarozdan pipet yardımıyla eklenerek plakların dişlere yapışması sağlandı. Pulsed Field çalışmaya uygun agaroz jel %1'lik konsantrasyonda 0.5X TBE tamponunda (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD) hazırlandı ve 10'ar saniye aralıklarla çıkartılıp çalkalanarak mikrodalgada eritildi. Jel 55-60<sup>0</sup>C'ye kadar soğutulduktan sonra tarak jelin içine döküleceği kasete yerleştirildi, jel yavaşça kasete boşaltıldı, donması için 30 dakika beklendi. CHEF-DR III drive modüle (Bio-Rad Laboratories Ltd. Hemel Hempstead, İngiltere) cihazı, jel yüklenmeden 2 saat önce çalıştırılarak içine konulan 2 litre 0.5X TBE tamponunun 14<sup>0</sup>C'ye soğutulması sağlandı. Jel donduktan sonra cihaza yüklendi, elektroforez başlangıç zamanı 6 saniye ve fragmanların ayrılması için bitiş zamanı 22 saniye olacak şekilde 18 saat olarak ayarlandı. Protokolün son günü jel cihazdan alınarak 30 dakika boyunca etidyum bromür (1µl/ml) eklenmiş distile su içinde boyandı ve jel görüntüleme sistemi ile bantlar UV altında incelendi.

Reaksiyonu çalışmayan örnekler üçer kez tekrarlandı, yine jelde sürüntü yapan ve sonuç alınamayan örnekler elektroforez tamponuna elektroforez başlatılmadan hemen önce 50 µM

tiyöüre (10mg/ml'lik stok çözeltiden 873 µL) eklenerek tekrarlandı.

PFGE ile elde edilen bant sayı ve ilişkileri GelCompar II (Applied Maths, Belçika) jel analiz programı kullanılarak; küme analizi Dice benzerlik katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) ilişki kuralı parametreleriyle değerlendirildi ve kökenlere ait filogenetik dendogram oluşturuldu.

## **POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TABANLI REPLİKON TİPLENDİRMESİ (PBRT)**

PBRT kiti (PBRT kit-Diatheva, İtalya) ile *Enterobacteriaceae* türleri arasında aktarılan ve direnç genleri üzerinde bulunan 25 ayrı replikonun kökenler içinde bulunma durumu sekiz ayrı multipleks PZR deneyi ile test edildi.

Kit ile verilen karışımlara (M1-M8) göre araştırılan plazmitler Tablo 5'de belirtilmiştir.

**Tablo 5. PBRT yöntemi ile araştırılan replikonların karışımlara göre dağılımı ve amplikon uzunlukları**

<b>Karışım</b>	<b>Replikonlar</b>	<b>Amplikon uzunluğu (bç)</b>
M1	HI1	534
	HI2	327
	I1	139
M2	L/M	741
	N	514
	I2	316
	BO	159
M3	FIB	683
	FIA	462
	W	242
M4	L	854
	P	534
	FIC	262
M5	T	750
	A/C	418
	FIIS	259-260

M6	U	843
	X1	370
	R	251
	FIIK	142-148
M7	Y	765
	X2	376
	K	160
M8	HIIB-M	570
	FIIB-M	440
	FII	258-262

---

Kaynatma yöntemi ile DNA'ları izole edilen izolatların plazmit tabanlı replikon tiplendirmesi PBRT kiti ile sekiz karışım için (M1-M8) ayrı multipleks PZR ile yapıldı. Her bir reaksiyon için PBRT mix 21.8 µl, DNA 3 µl, Taq polimeraz 0.2 µl kullanılarak 25 µl hacimde çalışıldı. Her multipleks PZR için ilgili karışımın pozitif kontrolü çalışmaya eklendi.

PZR profili 95°C'de 10 dakika, 30 döngü; 95°C'de 60 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 60 saniye ve son döngü 72°C'de 5 dakika olarak uygulandı.

Elektroforezde kullanılacak agaroz jel 100 ml 1X TBE tamponu içinde %2.5 (ağırlık/hacim) agaroz olacak şekilde 8 µl etidyum bromür eklenerek hazırlandı. Amplikonlar 5 µl yükleme tamponuyla karıştırıldı 10 µl karışım kuyulara yüklendi, 100 bç'lik ladder DNA standardı olarak kullanıldı. Amplikonlar jelde 100 v ve 400 mA akımda, 40 dakika yürütüldü. Elektroforez sonrası jeller jel görüntüleme sisteminde UV ışığı altında görüntülenerek fotoğraflandı.



## BULGULAR

### KÖKENLERİN KLASİK BİYOKİMYASAL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE İDENTİFİKASYONU

Biyokimyasal testlerin sonucunda tüm kökenlerin *Salmonella* olduğuna karar verildi. Serogruplama sonucunda 50 kökenden 36'sının (%72) D, 8'inin (%16) C ve 6'sının (%12) B serogruplarına ait olduğu belirlendi. VITEK2 sisteminde yapılan antimikrobiyal test sonuçlarına göre yedi kökenin en az bir antibiyotiğe direnç gösterdiği saptandı. İlgili kökenler ve dirençli oldukları antibiyotikler Tablo 6'da verilmiştir.

**Tablo 6. En az bir antibiyotiğe dirençli olan kökenlerin listesi ve MİK değerleri**

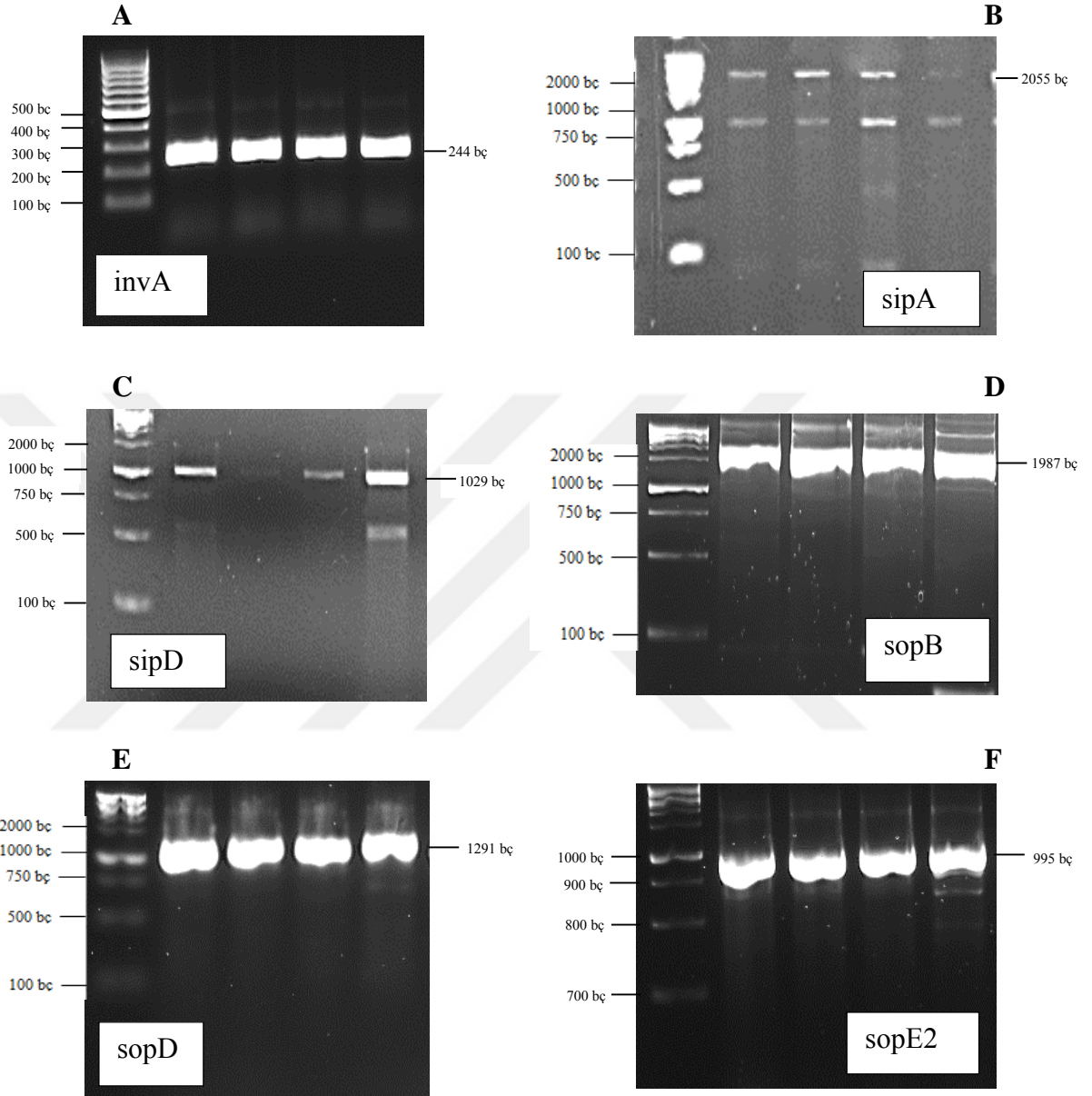
Köken no	Serogrup	Ampisilin	Amoksisilin/ Klavulanik asit	Piperasilin/ Tazobaktam	Seftazidim	Seftriakson	Trimetoprim/ Sulfometoksazol	Levofloksasin	İzolasyon Yılı
6	D	$\geq 32^*$	$\geq 32$	$32^{**}$	$\geq 64$	<b>16</b>	$\leq 20$	$\leq 0.12$	2012
9	C	<b>4</b>	$\leq 2$	16	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 20$	<b>4^{**}</b>	2012
34	D	$\geq 32$	4	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 20$	$\leq 0.12$	2012
59	B	$\geq 32$	8	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 20$	1	2011
87	B	$\geq 32$	8	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 20$	$\leq 0.12$	2011
99	D	$\leq 2$	$\leq 2$	$\geq 128$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 20$	$\leq 0.12$	2010
153	C	4	$\leq 2$	16	$\leq 1$	$\leq 1$	$\geq 320$	<b>4^{**}</b>	2009

\*: CLSI kriterlerine göre dirençli (R) kabul edilen kökenlerin MİK değerleri **kalm** yazılmıştır. \*\*: Orta düzey (I) direnç

### KLASİK VİRULANS FAKTÖRLERİNİN PZR İLE GÖSTERİLMESİ

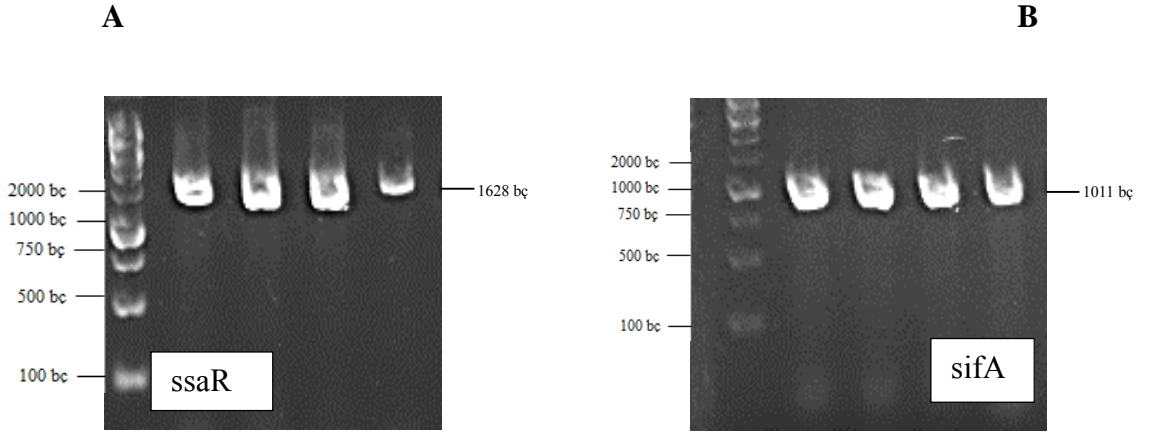
Tüm örneklerde SPA-1 üzerindeki invA, sipA, sipD, sopB, sopD, sopE2, SPA-2 üzerindeki ssaR, sifA ile plazmit üzerinde taşınan spvB, prot6E genleri araştırıldı ve tüm

örneklerde (%100) araştırılan tüm klasik virulans faktörlerinin bulunduğu saptandı. PZR sonrasında elde edilen jel görüntülerine ait örnekler Şekil 5,6,7’de gösterilmiştir.



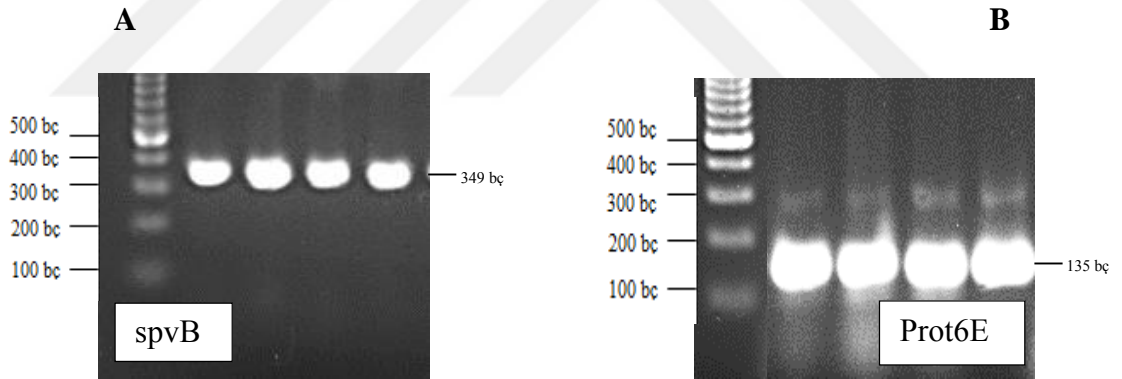
**Şekil 5.** PZR yöntemi ile SPA-1 genlerine ait elde edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntülerine ilişkin örnekler.

**A:** invA **Sütun 1:** Marker (100 bp gene ruler, Thermo Scientific), **B:** sipA, **C:** sipD, **D:** sopB, **E:** sopD, **F:** sopE2, **Sütun 1 (B-F):** M: Marker (1kb gene ruler, Thermo Scientific).



**Şekil 6.** PZR yöntemi ile SPA-2 genlerine ait elde edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntülerine ilişkin örnekler.

**A:** ssaR, **B:** sifA, **Sütun 1:** M: Marker (1 kb gene ruler, Thermo Scientific).



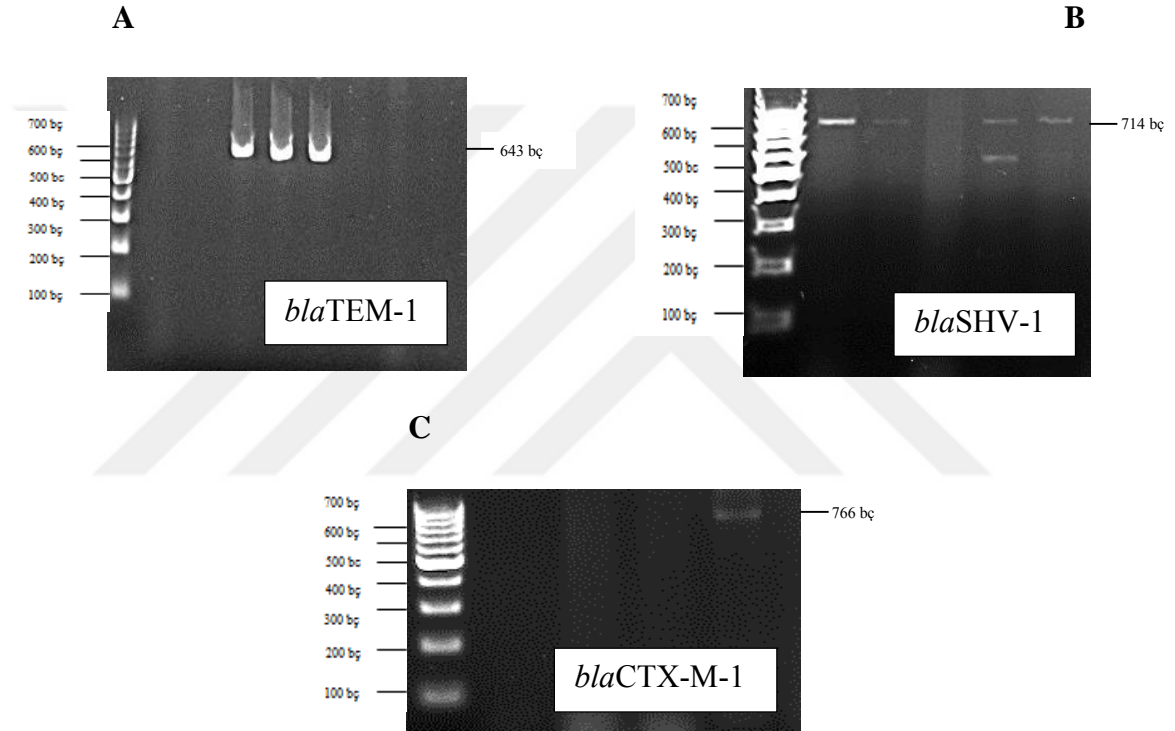
**Şekil 7.** PZR yöntemi ile plazmit üzerinde taşınan klasik virulans genlerine (spvB ve Prot6E) ait amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntülerine ilişkin örnekler.

**A:** spvB, **B:** Prot6E, **Sütun 1:** Marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific)

## ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN PZR YÖNTEMİ İLE GÖSTERİLMESİ

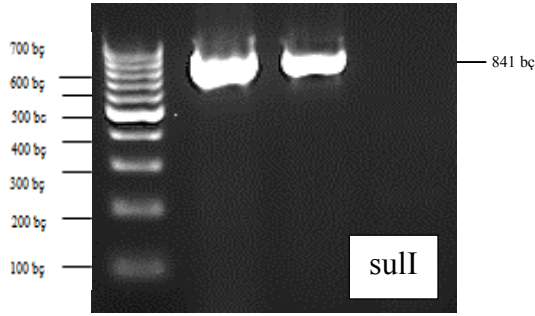
VITEK2 sonuçlarına göre ampisiline dirençli ya da orta düzeyde direnç gösteren yedi kökende TEM-1, SHV-1 ve CTX-M-1 türü genişlemiş spektrumlu beta laktamazların varlığı *bla*TEM-1, *bla*SHV-1 ve *bla*CTX-M-1 primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile araştırıldı.

Araştırılan yedi kökenden üçünün (%42.8) *bla*TEM-1, altısının (%85.7) *bla*SHV-1 ve birinin *bla*CTX-M-1 (%14.3) pozitif olduğu bulundu. PZR sonrası amplifikasyon ürünlerinin yapılan elektroforezleri sonucu elde edilen bantlara ait görüntüler Şekil 8’de verilmiştir.



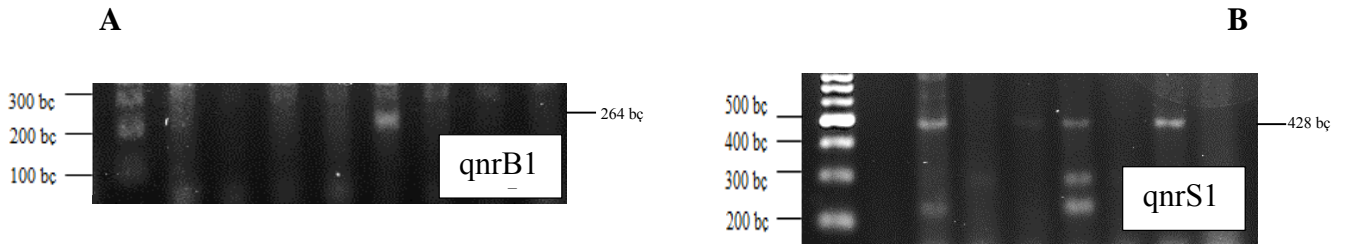
**Şekil 8.** PZR yöntemi ile GSBL direncinden sorumlu *bla*TEM-1, *bla*SHV-1 ve *bla*CTX-M-1 genlerine ait edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntüleri. **A:** *bla*TEM-1, **Sütun 1:** Marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), **Sütun 2- 8:** sırasıyla 6, 9, 34, 59, 87, 99, 153 numaralı kökenler, **B:** *bla*SHV-1, **Sütun 1:** Marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), **Sütun 2-6:** sırasıyla 6, 9, 34, 59, 87 numaralı kökenler, **C:** *bla*CTX-M-1, **Sütun 1:** M: Marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), **Sütun 2- 5:** sırasıyla 6, 9, 34, 59 numaralı kökenler

VITEK2 sonuçlarına göre trimetoprim-sulfometoksazol kombinasyonuna dirençli bulunan bir kökünde sulI ve sulII genlerinin varlığı PZR yöntemi ile araştırıldı. Kökünde sulI geni bulunurken sulII geni saptanmadı. sulI geninin PZR sonucu Şekil 9’da verilmiştir.



**Şekil 9.** PZR yöntemi ile sulfonamid direncinden sorumlu sulI genine ait edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntüleri. **Sütun 1:** Marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), **Sütun 2 ve 3:** 153 numaralı köken, **Sütun 4:** 71 numaralı köken (negatif kontrol)

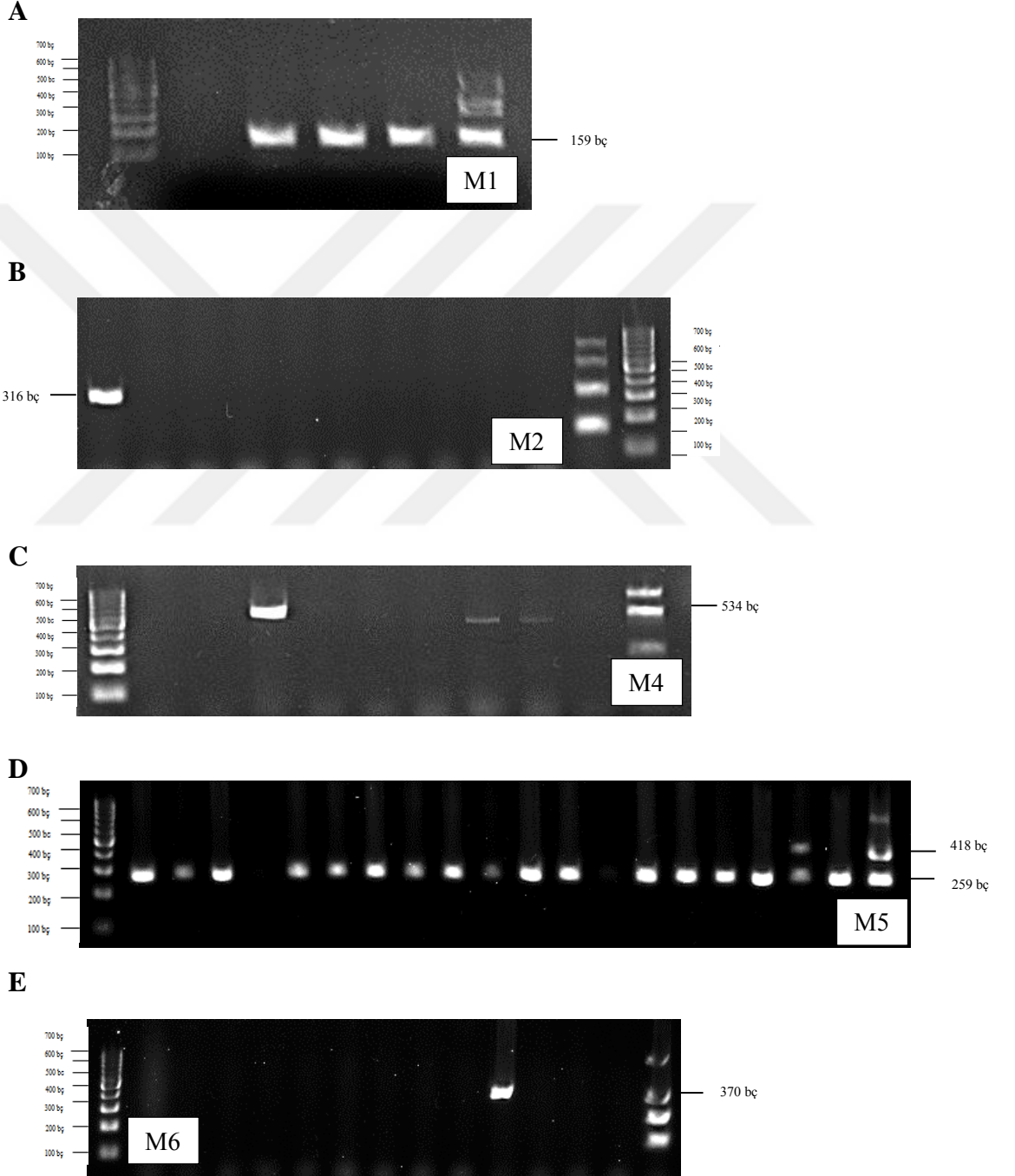
Ampisiline dirençli olan kökenler plazmitle aktarılan kinolon direncine karşı multipleks PZR ile araştırıldı. yedi kökenden birinde (%14) qnrB1, beşinde (%71) qnrS1 geni saptandı. Hiçbir kökünde qnrA1 genine rastlanmadı.



**Şekil 10.** PZR yöntemi ile plazmit aracılı kinolon direncinden sorumlu qnrB1 ve qnrS1 genlerine ait edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntüleri. **A:** qnrB1, **B:** qnrS1, **Sütun 1:** Marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), **Sütun 2-8:** sırasıyla 6, 9, 34, 59, 87, 99, 153 numaralı kökenler, **Sütun 9:** 71 numaralı köken (negatif kontrol)

## PBRT YÖNTEMİ SONUÇLARI

PBRT yöntemi ile sekiz ayrı multipleks PZR yapılarak 50 kökünde 25 replikonun araştırılması sonucunda, izolatların 13'ünde (%26) I1, birinde I2 (%2), dördünde (%8) P, 50'sinde (%100) FIIS, birinde (%2) A/C, dördünde (%8) X1 replikonu saptandı. Şekil 11'de PBRT sonuçlarına ait jel görüntüleri gösterilmektedir.



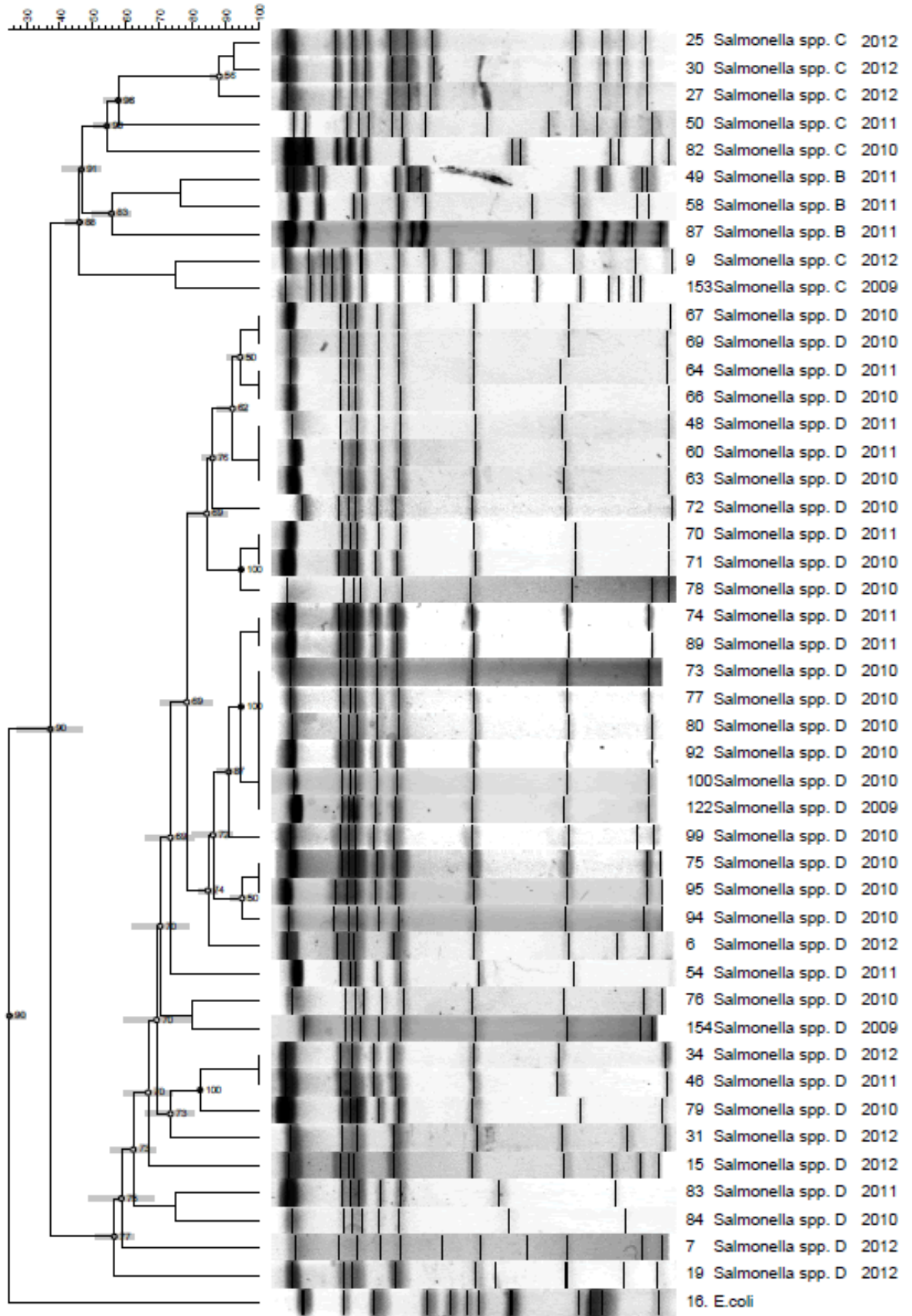
**Şekil 11.** PBRT yöntemi ile çeşitli replikonlara ait elde edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntüleri. **A:** M1 karışımı, **Sütun 1:** Marker (100 bp gene ruler, Thermo Scientific), **Sütun 2- 5:** sırasıyla 58, 59, 87, 97 numaralı kökenler, **Sütun 6:** HI1 (534 bç), HI2 (298-308 bç), I1 $\alpha$  (159 bç) replikonlarını içeren pozitif kontrol, **B:** M2 karışımı, **Sütun 1-10:** sırasıyla 59, 60, 63, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, **Sütun 11:** M (741 bç), N(514 bç), I2 (316 bç), BO (159 bç) replikonlarını içeren pozitif kontrol, **C:** M4 karışımı, **Sütun 1:** Marker (100 bp gene ruler, Thermo Scientific), **Sütun 2- 9:** sırasıyla 6, 7, 9, 15, 19, 25, 27, 30, 31 numaralı kökenler, Sütun 10: L (854 bç), P (534 bç), X3 (284 bç), I1 $\gamma$  (161 bç) replikonlarını içeren pozitif kontrol, **D:** M5 karışımı, **Sütun 1:** Marker (100 bp gene ruler, Thermo Scientific), **Sütun 2-20:** sırasıyla 78, 79, 80, 82, 83, 84, 86, 87, 89, 92, 94, 95, 97, 99, 100, 122, 122, 153, 154 numaralı kökenler, **Sütun 21:** T (750 bç), A/C (418 bç), FIIS(259-260 bç) replikonlarını içeren pozitif kontrol, **E:** M6 karışımı, **Sütun 1:** Marker (100 bp gene ruler, Thermo Scientific), **Sütun 2-13:** 6, 7, 9, 15, 19, 25, 27, 30, 31, 34, 46, 48 numaralı kökenler, **Sütun 14:** U (843 bç), X1 (370 bç), R (251 bç), FIIK (142-148 bç) replikonlarını içeren pozitif kontrol

## PFGE

50 adet *Salmonella* kökeninden 46'sı PFGE ile tiplendirildi, ancak dört örnek tiplendirilemedi. 46 örneğe ait PFGE paternlerinin dendogramında, %85 ve üzeri benzerlik ile 22 ana grup (1-22), 33 pulsotip, 8 küme (9.1, 9.3, 10.1, 11.1, 11.2, 11.4, 15.1 pulsotiplerine ait) ve 25 özgül profile ayrıldı. Kökenlerin pulsotipleri Tablo 7'de gösterilmiştir. Aynı serogrup içinde yer alan kökenler birbirleri ile daha yakın ilişkili görülürken diğer serogruplardan ayrımları sağlanmıştır. D serogrubuna ait kökenler B ve C gruplarına %35 yakınlık gösterirken, B ile C grupları kendi aralarında %45 ilişkili bulunmuştur.

VITEK2 sonuçlarına göre ampisilin ve levofloksasine dirençli bulunan ve blaSHV-1 geni taşıyan 9 ve 153 numaralı C serogrubuna ait kökenlerin C serogrubuna ait duyarlı kökenler ile B grubuna ait kökenlere yakınlığının aynı olduğu gözlenmiştir. Dirençli kökenlerin kendi aralarında daha yakın ilişkili olması dikkat çekicidir. Çalışmaya kontrol olarak eklenen *Escherichia coli* (*E.coli*) kökeni ile *Salmonella* kökenleri arasındaki yakınlık %30'un altında bulunmuştur.

PFGE yöntemi ile oluşturulan dendogram Şekil 12'de gösterilmiştir. Araştırılan antibiyotik direnç genleri ve bulunan replikon tipleri Tablo 7'de gösterilmiştir.



Şekil 12. *Salmonella* kökenlerinin PFGE profillerinin dendrogramı.



**Tablo 7. *Salmonella* kökenlerinde saptanan antibiyotik direnç genleri ve plazmitler**

<b>Köken no</b>	<b>Serogrup</b>	<b>GSBL</b>	<b>Kinolon</b>	<b>Sulfonamit</b>	<b>Plazmit</b>	<b>Pulsotip</b>
6	D	<i>blaSHV-1</i>	qnrS1		FHIS	11.6
7	D				FHIS	21.1
9	C	<i>blaSHV-1</i>	qnrS1		FHIS, P	7.1
15	D				FHIS, II	18.1
19	D				FHIS	22.1
25	C				FHIS	1.1
27	C				FHIS, P	1.3
30	C				FHIS, II, P	1.2
31	D				FHIS	17.1
34	D	<i>blaTEM-1</i>	qnrS1		FHIS, X1	15.1
46	D				FHIS	15.1
48	D				FHIS	4.1
49	B				FHIS	9.3
50	C				FHIS, II	2.1
54	D				FHIS	12.1
55	B				FHIS, II	-
58	B				FHIS	5.1
59	B	<i>blaTEM-1, blaSHV-1, blaCTX-M-1</i>	qnrS1		FHIS, II, I2,	-
60	D				FHIS	9.3
63	D				FHIS	9.3
64	D				FHIS	9.2
66	D				FHIS	9.2
67	D				FHIS	9.1
69	D				FHIS	9.1
70	D				FHIS	10.1
71	D				FHIS, X1	10.1
72	D				FHIS	9.4
73	D				FHIS	11.2
74	D				FHIS	11.1
75	D				FHIS, X1	11.4
76	D				FHIS	13.1
77	D				FHIS	11.2
78	D				FHIS, X1	10.2
79	D				FHIS	16.1
80	D				FHIS	11.2

Köken no	Serogrup	GSBL	Kinolon	Sulfonamit	Plazmit	Pulsotip
82	C				FIS	3.1
83	D				FIS	19.1
84	D				FIS	20.1
86	B				FIS	-
87	B	<i>bla</i> TEM-1, <i>bla</i> SHV-1	qnrB1		FIS, II	6.1
89	D				FIS	11.1
92	D				FIS, II	11.2
94	D				FIS, II	11.5
95	D				FIS	11.4
97	C				FIS, II	-
99	D	<i>bla</i> SHV-1			FIS	11.3
100	D				FIS, II	11.2
122	D				FIS, II	11.2
153	C	<i>bla</i> SHV-1		sulI	FIS, II, P, A/C	8.1
154	D				FIS, II	14.1

## TARTIŞMA

Salmonellozis yüksek morbiditeye ve ekonomik kayıplara sebep olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kontamine yiyecek ve sularla bulaşan *Salmonella*'ların dünyada her yıl 93.8 milyonun üzerinde enfeksiyon ve 155.000 ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir (5,54-56). Çok farklı konaklarda enfeksiyon oluşturabilmelerinin yanı sıra, kalıcı enfeksiyon yapabilme özellikleri ile yayılımlarını garanti altına alacak rezervuarlar oluşturabilmektedirler (54). Gıda, hayvancılık ve sağlık sektöründe kontrolsüz antibiyotik kullanımı antibiyotik dirençli kökenlerin ortaya çıkmasına neden olmuş, bu da Salmonellozların tedavisinde problemleri beraberinde getirmiştir. Tüm bu sorunlar toplumda sık karşılaşılan kökenlerin tipi, virulans özellikleri ile antimikrobiyal direnç durumlarını ortaya koyan, ayrıca kontaminasyon yollarının tahmini, kontrol programlarının geliştirilmesi ve monitorizasyonuna olanak veren epidemiyolojik çalışmaların önemini ortaya koymaktadır (5).

Çalışmamızın amacı “2009-2012 yılları arasında Edirne ve çevresinden klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* kökenlerinin enfeksiyon yapabilme özelliği genetik olarak araştırmak, *Salmonella* kökenlerinde farklı antibiyotiklere direnç neden olan gen tiplerini, plazmit tiplerini belirlemek ve kökenler arasındaki klonal ilişkiyi pulsed field jel elektroforezi ile saptamak” temeline kurulmuştu. Klinik örneklerden izole edilmiş *Salmonella* kökenlerinin tümünde patojeniteden sorumlu SPA-1, SPA-2 ve plazmit ilişkili klasik virulans faktörlerinin hepsi saptandı. Antibiyotiklere dirençli bulunan yedi kökenin en az bir direnç geni taşıdığı ve beş kökenin (%71) *Salmonella* virulans plazmitine ek olarak başka plazmitler de taşıdığı gösterildi. Kökenlerin klonal yakınlıkları PFGE yöntemi ile ortaya konuldu.

*Salmonella*'ların patojenitesinin kromozomal patojenite adalarında ve plazmit üzerinde bulunan virulans faktörleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (4,5,25-27,57). SPA-1 ilişkili genlerin intestinal epitelyumun invazyonu ve enterit oluşumundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Enterit tablosunun gelişebilmesi için ilk olarak bağırsak epitel hücrelerinin invazyonu gereklidir. SopA, SopB, SopD ve SopE gibi SPA-1 efektör proteinleri hem invazyonun gerçekleşmesinde hem de bağırsak ve bağırsak ilişkili lenfoid dokulara kolonizasyonda kritik rol oynar (4,57). Konak hücresiyle temastan sonra hücrelere giriş için gerekli olan *Salmonella* invazyon geni (*invA*) de SPA-1 bağımlı TTSS-1'in iç membran elemanıdır. SPA-2 ilişkili *ssaR* ve *sifA* genleri bakterinin hücre içi yaşamını devam ettirebilmesi ve sistemik yayılım gibi enfeksiyonun ileri aşamalarında görev alır (24-27,57). Çoğu virulans faktörü kromozomal patojenite adalarında taşınmasına rağmen karaciğer ve dalak gibi bağırsak dışı bölgelerdeki replikasyonda görevli olan bir bölümü de *Salmonella* virulans plazmitleri (*spv*) üzerinde yer alır. *S.enterica*'nın *spv* operonu taşıyan bazı kökenleri ciddi dissemine enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir (4,30,58). Biz de çalışmamızda öncelikle tüm kökenlerde SPA-1, SPA-2 ilişkili ve plazmit üzerinde taşınan klasik virulans faktörlerini araştırdık.

Çalışmamızda SPA-1 ilişkili *invA*, *sipA*, *sipD*, *sopD*, *sopB*, *sopE2* genleri, SPA-2 ilişkili *ssaR* ve *sifA* ile plazmit üzerindeki *spvB* ve *prot6E* genleri araştırıldı ve tüm kökenlerde araştırılan tüm genlerin (%100) bulunduğu tespit edildi. Bu bulgular ışığında klinik örneklerden izole edilen kökenlerimizin patojenik potansiyellerinin yüksek olduğu söylenebilir. Sonuçlarımız dünyada yapılan diğer çalışmalara uyumlu bulunmuştur (4,5,50).

Campioni ve ark. (5), 1986-2010 yılları arasında Brezilya'da insan ve besinlerden izole ettikleri 128 *S. Enteritidis* kökeni ile yaptıkları çalışmada virulansla ilişkili aynı genler çalışılmış ve %97.6 pozitiflik saptamışlardır, iki örnekte plazmidal virulans geni olan *spvB* pozitif olarak saptanırken *prot6E* geninin negatif bulunmasını mutasyonlara bağlamışlardır.

Hur ve ark. (4), Kore'de yaptıkları çalışmada domuzlardan izole edilen 42 *S. Typhimurium* kökeninin tümünde *invA* ve %90'ın üzerinde SPA-1 ve SPA-2 ilişkili genlerin bulunduğunu saptamışlardır. Bunun yanında virulans plazmiti ile taşınan *spvC* geninin sıklığını %14 olarak bulmuşlardır. İnsanlarda bağırsak dışı yayılımda görevli olan *spv* operonu oranının insanlardakine oranla bu kadar düşük bulunması ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiği kanısına varmışlardır.

Shah ve ark. (58) kanatlı hayvanlardan izole ettikleri 53 *Salmonella* kökeni ile yaptıkları çalışmada epitel hücre modeli üzerinde invazyon yapabilme yeteneğine göre kökenleri düşük, orta ve yüksek invazif olmak üzere üç farklı kategoriye ayırmışlardır. Düşük invazyon potansiyelli örneklerde sipA ve sipD ilişkili mRNA transkriptlerinin ekspresyonunun yüksek invazyon potansiyelli kökenlere göre 11-16 kat daha düşük olduğunu saptamışlardır. Ayrıca spvB genini %83 oranında pozitif olarak saptamışlar, negatif kökenlerin farklı derecelerde invazyon yeteneğine sahip gruplara dahil olduklarını, bu nedenle virulansla ilişkili plazmitle invaziflik derecesinde bir bağlantı bulamadıklarını açıklamışlardır.

*Salmonella*'larda gelişen antimikrobiyal direnci önemli bir halk sağlığı sorunudur. Hayvan yemlerine büyümeyi arttırıcı olarak eklenen veya tedavide kontrolsüz antibiyotik kullanımı bu sorunun temelini oluşturmaktadır. 1960 öncesine kadar çoğu antibiyotiğe duyarlı olan *Salmonella*'ların, günümüzde kazanmış oldukları genişlemiş spektrumlu beta laktamazlara bağlı direnç sayesinde üçüncü kuşak sefalosporinlerle tedavide sorunlar yaşanabilmektedir. Kökenler arasında plazmitler veya hareketli diğer elementlerle direnç aktarılabilen bu nedenle antibiyotik direncinin genetik temelini araştırılması önem kazanmaktadır (41-45).

*Salmonella* serotipleri arasında antimikrobiyal duyarlılık paternleri değişmektedir. Örneğin, *S. Enteritidis* en sık karşılaşılan serotiplerin başında gelmekte, diğer serotiplerle kıyaslandığında daha duyarlı olduğu gözlenmektedir, *S. Typhimurum* kökenlerinde ise direnç daha fazla görülmektedir. Çalışmamızda hem serotip tayinini yapmak hem de serotiplerdeki direnç durumunu gözlemek amacıyla, öncelikle polivalan ve grup spesifik antiserumlarla kökenlerin serogrupları araştırıldı (45).

50 kökenin serogruplandırılması sonucunda, kökenlerin beşinin B (%10), yedisinin C (%14), 38'inin D (%76) grubuna ait olduğu saptandı. Antimikrobiyal duyarlılık testleri VITEK2 otomatize sistemde yapılmış olan *Salmonella* kökenlerinden B serogrubuna dahil beş kökenden ikisi (%40), C serogrubuna dahil yedi kökenden ikisi (%28.5), D serogrubuna dahil 38 kökenden dördü (%10.5) en az bir antibiyotiğe dirençli bulundu.

Antimikrobiyal duyarlılık sonuçları ile fenotip-genotip ilişkisi kurmak üzere dirençli kökenlerde ilgili antimikrobiyallere ait direnç genleri PZR yöntemi ile araştırıldı. Ampisiline dirençli kökenlerde TEM-1, SHV-1 ve CTX-M-1 türü genişlemiş spektrumlu beta laktamazlarla ilişkili genlerin varlığı PZR yöntemi ile arandı ve sonuçlar fenotiple ilişkili bulundu. Tüm dirençli kökenlerde en az bir beta laktamaz geninin varlığı saptandı. Araştırılan yedi kökenden üçünün (%42.8) *bla*TEM-1, altısının (%85.7) *bla*SHV-1 ve birinin *bla*CTX-M-1 (%14.3) türü

beta laktam direncine sahip olduğu bulundu. Bir kökende (59) araştırılan her üç gen de olarak pozitif bulundu. Sulfonamid dirençli bir kökende (153) sulI geni saptandı, kökenin aynı zamanda SHV-1 türü genişlemiş beta laktamaza sahip olduğu bulundu. Beta laktam grubu antibiyotiklere (ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, piperasilin- tazobaktam) dirençli kökenlerde plazmit aracılı kinolon direncinden sorumlu qnrA1, qnrB1 ve qnrS1 genleri araştırıldı. Çalışılan yedi kökenden birinde (%14) qnrB1, beşinde (%71) qnrS1 geni saptandı. Hiçbir kökende qnrA1 genine rastlanmadı.

Tüm deneylere duyarlı iki köken negatif kontrol olarak eklendi ve PZR sonuçlarına göre de negatif bulundu. Antimikrobiyal duyarlılık üzerine dünyada yapılan benzer çalışmalarda da fenotip genotip uyumlu bulunmuştur (4,41,59).

Chen ve ark. (41) Amerika'da 1998-2000 yılları arasında etlerden izole ettikleri 133 *Salmonella* kökeni ile yaptıkları çalışmada 10 kökenin geniş spektrumlu beta laktamlara dirençli olduğunu dirençli tüm kökenlerde *bla*CMY-2 geninin ve bunların arasında beş kökenin aynı zamanda *bla*TEM-1 genini taşıdığını bildirmişlerdir. Ampisilin dirençli dokuz kökenin hepsinde *bla*TEM-1 geninin, sulfonamid dirençli kökenlerde ise hem sulI hem sulII geninin bulunduğunu saptamışlardır. *S. Typhimurium* DT104 faj tipindeki iki kökende ise *bla*PSY-2 türü beta laktam direnci bulmuşlardır.

Hur ve ark. (4) Kore'de yaptıkları çalışmada domuzlardan izole edilen *S. Typhimurium* kökenlerinde ACSSuT (ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sulfonamid, tetrasiklin) direnci ile ilişkili genlerin PZR sonuçlarını fenotipe uygun bulmuşlar. Ampisiline dirençli 17 kökenin 16'sında *bla*PSE ya da *bla*TEM; kloramfenikol direnci gösteren 12 kökenin 7'sinde en az bir fazla *cat1*, *cat2*, *floR*; streptomisine dirençli 38 kökenin 37'sinde en az bir *strA*, *strB*, *aadA*; sulfomekoksazole dirençli 37 kökenin 34'ünde sulI ya da sulII geni ve tetrasikline dirençli 40 kökenin 39'unda *tetA*, *tetG* ya da *tetC* genlerinden en az bir tanesinin bulunduğunu saptamışlardır.

Randall ve ark. (59) İngiltere'de 1998-2000 yılları arasında insan ve hayvanlardan izole edilen 35 serotipe ait 397 *Salmonella* kökeni ile yaptıkları çalışmada ampisiline dirençli tüm kökenlerin *bla*CARB-2 ve *bla*TEM genlerinden en az birine ve gentamisin dirençli iki kökenin *aadB* genine sahip olduğunu saptamışlardır. Bunun yanında kökenin dirençli olduğu halde ilgili direnç geninin bulunmadığı durumlarla da karşılaşmışlardır. Örneğin, 85 kloramfenikol dirençli kökenin 24'ünde *cat1*, *cat2* veya *floR* genleri, kanamisin dirençli 14 kökenin birinde *aphAI-IAB* geni, 81 spektinomisin dirençli kökenin 5'inde *aadA1* ya da *aadA2* genleri, 119

streptomisin dirençli kökenin 16'sında aadA1, aadA2 veya strA genleri, 127 sulfadiazin dirençli kökenin 7'sinde sulI veya sulII genleri, 108 tetrasiklin dirençli kökenin 21'inde tetA(A), tetA(B) veya tetA(G) genlerinin ve son olarak 45 trimetoprim dirençli kökenin 38'inde dhfrI geninin bulunmadığını saptamışlardır. Ancak genel olarak MİK değerleri ile antibiyotik direnç genlerinin bulunması arasında iyi bir korelasyon olduğu kanısına varmışlardır.

Horizontal gen transferinin antimikrobiyal direnç aktarımında en önemli mekanizmalardan biri olduğu bilinmektedir. Günümüze kadar *Enterobacteriaceae* ailesinde plazmitler tarafından kodlanan genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, karbapenemazlar ve kinolon direncine neden olan metilazlar tanımlanmıştır. Tüm plazmitlerin enterik bakterilerde aynı sıklıkta bulunmaması bazı gruptaki plazmitlerin belli enterik bakterilerde daha sık görülmesi nedeniyle plazmit tiplendirmesi bakterilerdeki klonal ilişkileri açıklamada anlamlı veriler sağlamaktadır (21-23).

Çalışmamızda *Salmonella* kökenlerindeki plazmitlerin varlığını araştırmak üzere Türkiye'de ve dünyada oldukça yeni bir teknik olan PBRT yöntemini kullandık. PBRT kiti ile *Enterobacteriaceae* türlerinde sık karşılaşılan ve direnç genleri üzerinde bulunan 25 ayrı replikonun varlığı 8 multipleks PZR ile araştırıldı. Hedeflenen 25 replikondan (HI1, HI2, I1, I2, X1, X2, L/M, N, FIA, FIB, FIC, FII, FIIS, FIIK, W, Y, P, A/C, T, K, U, R, B/O, HIB-M, FIB-M) altısı (FIIS, I1, I2, P, A/C, X1) kökenlerimizde saptandı.

FII replikonu IncFII türevi plazmitlere ait olmakla beraber *Klebsiella*, *Yersinia* ve *Salmonella* türlerinde (FIIK, FIIY ve FIIS) virulans plazmitleri olarak tanımlanmıştır. *Salmonella*'larla enfeksiyonun sistemik fazında rol alan spvA, spvB ve spvC genleri IncFII plazmiti üzerinde taşınmaktadır (60-65). *Salmonella enterica*'nın Enteritidis, Typhimurium, Dublin, Choleradis, Gallinarum, Pullorum, Abortusovis gibi bazı serotiplerinde bulunması nedeniyle serovar spesifik plazmitler olarak da anılan bu plazmitler serotiplere göre farklar göstermesine rağmen virulans için gerekli dizileri oldukça korunmuştur (19,25,51). Spv lokusunun ifadesi büyümenin baskılanması, ortamdaki besinlerin azalması ya da pH'ın düşmesi gibi faktörlerle uyarılmaktadır (66). SpvB ve spvC'nin spv operonunda en önemli efektörler oldukları, tek başına spvBC genlerinin *S. Typhimurium*'da eksik virulans plazmiti tamamlamaya yettiği gösterilmiştir (67).

Çalışmamızda 50 kökenin hepsinde *Salmonella* virulans plazmitinin homologu olan FIIS replikonu saptandı. Klasik virulans faktörlerinin PZR ile araştırılması sonucu spvB geninin

tüm türlerde bulunması ile PBRT tiplendirme sonuçları, tüm türlerde FIIS replikonunun saptanması sonuçların birbiri ile uyumlu olduğunu ortaya koymaktadır.

*Salmonella*'larda boyutları 50-100 kb arasında değişen serovar spesifik virulans plazmitinin dışında daha nadir olmakla birlikte yüksek veya düşük moleküler ağırlıklı başka plazmitler de bulunabilmektedir. Yüksek moleküler ağırlıklı plazmitler sıklıkla patojenite ve antimikrobilyallere direnç ile ilişkili iken boyutları 20 kb'ın altında olan düşük moleküler ağırlıklı plazmitlerin çoğunun görevi bilinmemektedir (51).

IncI, IncX ve IncF grupları başta olmak üzere bazı yüksek moleküler ağırlıklı plazmitlerin antibiyotik çağından önce izole edilen örneklerde de bulunması ancak görevlerinin tanımlanamaması antibiyotik direnç genlerinin sonradan kazanılan genetik elementlerle evrimleştiğini düşündürmektedir. Bu plazmitlerin buldukları bakteriye farklı antibiyotiklere direnç sağlamanın yanında laktoz kullanımı, faj enfeksiyonlarına karşı direnç sağlayan faj konversiyonu, ağır metallerle direnç gösterme gibi avantajlar sağladığı gösterilmiştir (61,66,67). Büyük çoğunluğu konjugatif ve kendini eşleyebilme özelliğinde olan yüksek moleküler ağırlıklı plazmitler birçok antibiyotiğe direnç sağlayan genleri üzerlerinde taşıyabilmektedir. Antibiyotik direnç genleri çoğunlukla plazmitler üzerindeki transpozonlarda yer almakta plazmit üzerinden bakteri kromozomuna entegre olabilmekte ya da kromozomda bulunan transpozon plazmite geçebilmektedir. Bu nedenle plazmitler hem antibiyotik direnç genlerinin depolanması ve korunmasına hem de yayılmasına hizmet etmektedir (51,70).

Çalışmamızda *Salmonella* virulans plazmitinden sonra kökenler arasında en sık bulunan plazmitin IncI1 olduğu saptandı. 50 kökenin 13'ünde bulunan IncI1 (%26) plazmitinin *Enterobacteriaceae* üyelerinde Shiga toksini üreten *E.coli* kökenlerinde adezyon ve invazyondan sorumlu tip IV pilinin kodlanmasında görevli genleri içerdiği bilinmektedir. Yakın zamanda ise genişlemiş spektrumlu beta laktam direnci ile ilişkili olduğu bulunmuştur (69,73). Geniş spektrumlu sefaloporinlere direnç sağlayan GSBL enzimleri *E.coli* ve *Salmonella*'larda başlıca *bla*CTX-M-2, *bla*CTX-M-9, *bla*CTX-M-15, and *bla*TEM-52 genleri tarafından kodlanmaktadır. Yakın zamanda Fransa'da *E.coli* kökenlerinde *bla*CTX-M-1 türevi GSBL'ler de bildirilmiştir (71-74). GSBL ve AmpC  $\beta$ -laktamaz genlerinin sıklıkla IncI1 ve IncHI2 plazmitlerinde taşındığı gösterilmiştir (72,75). Çalışmamızda *bla*CTX-M-1 taşıyan bir köken (59-serogrup B) tespit edilmiş ve bu kökende IncI1 plazmiti saptanmıştır. Bunun yanında *bla*SHV-1 taşıyan bir kökende (153-serogrup C) ve hem *bla*TEM-1 hem *bla*SHV-1 taşıyan başka bir kökende (87-serogrup B) ayrıca VITEK2 sonuçlarına göre herhangi bir antibiyotik direnci bulunmayan 10 ayrı kökende (15-serogrup D, 30-serogrup C, 50-serogrup C, 55-



serogrup B, 92-serogrup D, 94-serogrup D, 97-serogrup C, 100-serogrup D, 122-serogrup D, 154-serogrup D) daha IncI1 plazmitinin varlığı gösterilmiştir. Araştırılan beta laktamaz genlerinden en az birini taşıyan dört kökende (6-serogrup D, 9-serogrup C, 34-serogrup D, 99-serogrup D) ise IncI1 plazmiti bulunamamıştır.

Cloeckaert ve ark. (71) Fransa'da insan ve kanatlı hayvanlardan 2003-2008 yılları arasında izole edilen genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere direnç sağlayan blaCTX-M-1 üreten tüm *Salmonella* Llandoff, London, Newport, Typhimurium serovarlarının IncI1 plazmiti taşıdığını göstermişlerdir. Aynı zamanda plazmitin alt tiplendirilmesi sonucunda plazmitin Fransa'da sağlıklı kanatlı hayvan kökenli *E.coli* kökenlerindeki IncI1 plazmiti ile genetik olarak ilişkili olduğunu, dolayısıyla *E.coli* ve *Salmonella* kökenlerinde blaCTX-M-1 taşıyan plazmitin ortaya çıkmasında ortak bir kanatlı hayvan orijini olabileceğini ortaya koymuşlardır. İnsan ve hayvan kaynaklı bakteri popülasyonları arasında horizontal gen transferi yoluyla plazmitlerin aktarımının ilerde çoklu ilaç direnci gösteren kökenlerin artmasına neden olabileceği sonucuna varmışlardır.

Damborg ve ark. (76) Danimarka'da toplanan 209 köpek dışkısı örneğiyle yaptıkları çalışmada %1.9 oranında *E.coli* saptamışlardır. *E.coli* saptanan üç kökende CTX-M-1 türevi GSBL tespit etmişler ve genin IncI1 plazmiti üzerinde bulunduğunu, aynı zamanda iki kökende saptanan CTX-M-15 türevi GSBL'nin de IncF/Y plazmiti üzerinde bulunduğunu ortaya koymuşlardır.

Garcia-Fernandez ve ark. (72) yaptıkları çalışmada PBRT yöntemi ile farklı ülkelerden insan ve hayvan kaynaklı *E. coli* ve *Salmonella* kökenlerinden izole edilen plazmitlerin IncI1 grubuna ait 16 plazmiti, taşıdıkları  $\beta$ -laktamaz genleri yönünden araştırmışlardır. Araştırmalarının sonuçlarına göre plazmitlerin *bla*CMY-2, *bla*CTX-M-15, *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-14, *bla*TEM-52, *bla*SHV-12 veya *bla*TEM-1 genlerinden birini taşıdığı tespit edilmiştir.

IncI1 plazmitleri gibi IncI2 plazmitlerinin de iki tip pili sentezlediği gösterilmiştir. Kalın pilus tra operonu tarafından kodlanıp başlıca konjugasyondan sorumlu iken, ince pilus pil lokusu tarafından kodlanıp diğer tip IV salgı sistemlerine benzer enzim kodlanmasından ve sıvı ortamlarda konjugasyon oranının artırılmasından sorumludur. Ancak IncI1 plazmitlerinin aksine henüz bu plazmitlerle ilgili yapılmış çok fazla çalışma bulunmamaktadır (81-83). IncI2 plazmitleri üzerinde *bla*CTX-M-55 ve *bla*CMY-2 gibi beta laktam direncinden sorumlu

genlerin gösterildiği çalışmalar, IncI2'nin de antibiyotik direnç genleri yayılımında önemli olduğunu ortaya koymaktadır (77)

*E.coli* kökenlerinde sık karşılaşılan bir GSBL olan CTX-M-55 yakın zamanda Wong ve ark. (80) tarafından 2008'de Çin'de hasta dışkılarından izole edilen bir *Salmonella* kökeninde IncI2 türevi plazmitler üzerinde gösterilmiştir. Dizi analizi çalışmaları bu plazmitin *E.coli* kökenlerindeki ile aynı olduğunu bu nedenle IncI2 plazmitlerinin CTX-M türevi direncin türler arası yayılımında etkili olduğu ve *E.coli* kökenlerinin bu elementler için en önemli kaynak olduğunu ortaya koymuşlardır. Daha sonrasında prevalansı ortaya koymak adına 207 sefalosporin dirençli *Salmonella* kökeninde *bla*CTX-M ve IncI2 plazmiti bulunma sıklığını araştırmışlar ve araştırılan genotipte yedi köken tespit etmişlerdir. Bulgular IncI2 plazmitlerinin *E. coli* kökenlerinden *Salmonella* kökenlerine aktarıldığını ve yakın gelecekte benzer genotipte vaka sayısının artacağını göstermektedir.

Türkiye'de de ilk kez 2016 yılında NDM-1 ve CTX-M-15 ile RmtC genleri üreten ve IncI2, IncA/C ve IncY plazmidleri barındıran iki *Escherichia coli* izolatları ile gelişen idrar yolu infeksiyonları bildirilmiştir (81).

Çalışmamızda *bla*TEM-1, *bla*SHV-1, *bla*CTX-M-1 ve *qnr*S1 genlerini taşıyan bir kökende IncI2 plazmitinin gösterilmiş olması ülkemizde de plazmitin *Salmonella* kökenlerine aktarıldığını ve görülme sıklığının yakın zamanda artacağını düşündürmektedir.

IncP türevi plazmitler 50 kökenin dördünde (%8) saptanmış olup çalışma kapsamında ilgimizi çeken diğer bir plazmit grubu olmuştur. Çok farklı konaklarda replike olabilme özellikleri ile klinikten çevresel örneklerle birçok örnekte saptanmış olan bu plazmit grubu *Enterobacteriaceae* üyelerinde sık görülmektedir. İnsan sağlığı kadar çevresel biyoremediasyonda etkili birçok geni üzerinde bulundurmaktadır. Birçok antibiyotik ile dezenfektanların içinde bulunan ağır metaller ve amonyum bileşiklerine karşı direnç kazandıran genler tanımlanmıştır. Patojen ve fırsatçı bakterilerin yanında, toprak, gübre, atık su örneklerinden de IncP türevi plazmitlerin izole edilmiş olması, plazmitin bulunduğu bakterilerin adaptasyonunda büyük avantaj sağlayacağını ve enfeksiyon kontrolünde sorunların yaşanabileceğini ortaya koymaktadır (82,83). Plazmitin üzerinde aminoglikozit, tetrasiklin, beta laktam, sulfonamid direncine neden olan genlerin taşındığını gösteren birçok çalışma vardır (84-87).

Van Meerven ve ark. (87) atık su üretim tesisinden izole edilen IncP türevi amoksisilin, streptomisin, sulfonamid ve tetrasiklin direnç genlerini üzerinde bulduran

çevresel bir plazmitin gıda kaynaklı patojenlere aktarılmasını araştırdıkları çalışmalarında, *E.coli* O157:H7 ve *Salmonella* kökenlerine plazmitin konjugasyonla yüksek oranlarda aktarılabildiğini ve konjugasyon sonrasında genlerin çoğunun ifade edildiğini ortaya koymuşlardır.

Çalışmamızda IncP grubu plazmit taşıyan dört kökenden birinin (9-serogrup C) *blaSHV-1* ve *qnrS1* genleri, ayrı bir kökenin (153-serogrup C) bu genlerin yanında *sulI* geni taşıdığı, iki kökenin (27-serogrup C, 30-serogrup C) ise VITEK2 sonuçlarına göre herhangi bir antibiyotiğe dirençli olmadığı saptanmıştır. Ancak antibiyotik direnç genleri taşıyan kökenlerden birinin başka plazmitler de taşıması nedeniyle bu genlerin IncP plazmitiyle kesin ilişkili olduğunu söylemek hata olur.

Enterik bakterilerde sık karşılaşılan başka bir plazmit grubu olan IncA/C plazmitleri ilk olarak 1970'lerde kültür balıklarından izole edilen *Aeromonas hydrophila* ve *Vibrio spp.*'de saptanmış aynı dönemde balık çiftliklerinde antibiyotik kullanımının yaygınlaşmış olması plazmitin ortaya çıkışında antibiyotiklere maruz kalmanın etkisinin olabileceğini göstermektedir (88-90). 1990'larda *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde 2000'lerde ise *E.coli* ve *S.enterica* kökenlerinde *blaCMY-2* türevi  $\beta$ -laktamaz taşıyan bir element tanımlanmıştır. Dizi analizleri bu genlerin daha çok IncA/C plazmitleri üzerinde taşındığını aynı zamanda plazmit üzerinde başka birçok antibiyotik direnç geni ile birlikte bulunduğunu ortaya koymuştur. Günümüzde ise *E. coli*, *S. enterica*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*, *Yersinia ruckeri* ve *Klebsiella pneumonia* kökenlerinde izole edilen IncA/C plazmitleri bulunmaktadır (88,89). Bu kadar geniş konak seçkisi bulunan bu plazmitin Hindistan'da *K. pneumoniae* ve *E. coli* kökenlerinde Yeni Delhi metallo- $\beta$ -laktamaz kodlayan *blaNDM-1* genini taşıyan türevinin bulunmuş olması halk sağlığı açısından son derece dehşet vericidir (93,94).

Çalışmamızda *blaSHV-1*, *sulI* ve *qnrS1* genleri bulunduran bir kökende (153-serogrup C) IncA/C plazmiti (%2) tespit edildi. *sulI* tipi integron *Enterobacteriaceae* üyelerinde genellikle IncA/C plazmitleri ile aktarıldığından ilgili gen bu *Salmonella* kökeninde de IncA/C plazmiti üzerinde taşınıyor olabilir ancak kökende başka plazmitler de bulunması sebebiyle bu konuda kesin bir kanıya varmak mümkün değildir ve daha ayrıntılı ileri çalışmalar yapılması gereklidir (20).

50 kökenin dördünde (34-serogrup D, 71-serogrup D, 75-serogrup D, 78-serogrup D) IncX1 grubu plazmit (%8) saptandı. Geniş konak seçkisi olan bu plazmit antibiyotik

kullanımının yaygınlaşmasından önceki tarihlerde de *Enterobacteriaceae* üyelerinde saptanmıştır. Günümüzde ise IncX1 plazmitleri üzerinde bulunan *oqxAB* operonu hayvanlılıkta büyüme arttırıcı olarak kullanılan bir bileşik olan olakindoks'a ve kinoksalin, kinolon ve florokinolonlar gibi klinik antimikrobiyallere karşı direnç sağlayan efluks pompası genleri ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda plazmit üzerinde konjugasyon ve biyofilm formasyonu ile ilişkili ayrı bir gen kaseti daha saptanmıştır (95-97).

Hansen ve ark. (97) *E.coli* kökenlerinde bulunan IncX1 plazmitinin diğer enterik bakterilere aktarılabilirliğini test etmek amacıyla plazmiti *Salmonella* Typhimurium, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera* sp. ve *Enterobacter aerogenes* türlerine konjugasyon ile aktarmaya çalışmışlardır. Transkonjugantlarda kloramfenikol, siprofloksasin ve olakindoksa karşı azalmış duyarlılık görülmesi plazmitin *Enterobacteriaceae* üyelerine aktarılabilirliğini ortaya koymaktadır.

Johnson ve ark. (98) *Enterobacteriaceae* kökenleri ile yaptıkları çalışmada dört farklı IncX türevi (IncX1-4) tanımlamışlar ve dizi analizleri ile IncX1 üzerinde *bla*TEM-52, *bla*TEM-1, *oqxAB*, *blmS* antibiyotik direnç genlerinin bulunduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda da IncX1 plazmiti taşıyan bir kökende (34-serogrup D) hem *bla*TEM-1 hem *qnrS1* direnç genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Kökende kinolon direnci gözlenmezken plazmid kökenli direnç genlerinden birinin saptanmış olması, kökenin kinolon grubu antibiyotiklerle karşılaşması sonucu kolayca direnç geliştirebileceğini düşündürmektedir. Bunun yanında *qnr* genlerinin GSBL ilişkili genlerle yakın ilişkili olduğuna, sıklıkla kökenler arasında birlikte aktarıldığına ve kinolon direnci göstermeyen GSBL pozitif kökenlerde de bulunabildiğine dair benzer çalışmalar bulunmaktadır (47).

Çalışmamızda son olarak kökenler arasındaki klonal ilişkiyi ortaya koymak üzere tiplendirme metotları arasında altın standart olarak kabul edilen pulsed field jel elektroforezi (PFGE) tekniğini uyguladık. Kökenlerin DNA'larının XbaI ile kesilip darbeli akım ile ayrıştırılması sonucu 46 kökene ait PFGE paternlerinin dendogramında, 22 ana grup (1-22), 33 pulsotip, 8 küme (9.1, 9.3, 10.1, 11.1, 11.2, 11.4, 15.1 pulsotiplerine ait) ve 25 özgül profil olduğu gözlenmiştir.

Aynı serogrup içerisinde yer alan kökenlerin birbirleri ile daha yakın ilişkide olduğu ve aynı grup içinde yer aldıkları gösterilmiştir. D serogrubuna ait kökenler B ve C gruplarına %35

yakınlık gösterirken, B ile C grupları kendi aralarında %45 ilişkili bulunmuştur. C serogrubuna ait ampisilin ve levofloksasin direnci gösteren iki kökende (9 ve 153) *blaSHV-1* ve *qnrS1* direnç genleri saptanmış 153 numaralı örnekte farklı olarak *sulI* direnç geni de tespit edilmiş ve bu iki kökenin yakınlıkları %70'in üzerinde bulunmuştur. Aynı kökenlerin C serogrubuna ait duyarlı kökenler ile B grubuna ait kökenlere yakınlığının aynı olduğu görülmüştür. Dikkat çeken başka bir bulgu ise, B serogrubuna ait duyarlı iki kökenin (49 ve 58) birbirlerine yakınlıkları %70'in üzerinde iken, *blaTEM-1*, *blaSHV-1* ve *qnrB1* direnç genleri saptanan kökenin (87) duyarlı olan kökenlere yakınlığı %52 civarlarında bulunması olmuştur. Aynı serogrupta bulunan dirençli kökenin duyarlı kökenlere yakınlığının bu derece düşük olması, antimikrobiyal direnç genleri kazanılmasının kökenler arası klonal ilişkilerde etkili olduğunu düşündürmektedir.

Aktaş ve ark. (6) 2001-2004 yılları arasında Türkiye'de klinik *Salmonella* kökenleri ile yaptıkları çalışmada kökenlerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarını ve taşıdıkları antibiyotik direnç genlerini araştırmışlar ayrıca genetik ilişkileri ortaya koymak üzere kökenlere ait DNA örneklerini *XbaI* enzimi ile kesip PFGE uygulamışlardır. Serotipleme sonucunda kökenlerin *S. Enteritidis* (n=26) ve *S. Typhimurium* (n=15) serotiplerine ait olduğunu ve *S. Enteritidis* kökenlerinin tümü test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı iken *S. Typhimurium* kökenlerinden birinin ampisiline dördünün ise ACCSuT tipi dirence sahip olduklarını saptamışlardır. ACCSuT tipi direnç gösteren kökenlerin %90'ın üzerinde benzerlik gösterdiğini, aynı klonal gruba ait olduğunu ve 60 MDa'luk tek bir plazmit taşıdıklarını ortaya koymuşlardır.

Us ve ark. (1) Türkiye'nin 10 farklı ilinden klinik örneklerden izole edilen 112 *Salmonella* kökeni ile yaptıkları çalışmada, öncelikle kökenlerde plazmit taraması yapmışlar sonrasında klonal ilişkileri ortaya koymak amacı ile pulsed field jel elektroforezi yöntemini uygulamışlardır. Kökenlerin %90'ının en az bir plazmit taşıdığını saptamışlardır. PFGE yönteminde *SpeI* ve *XbaI* enzimleri ile 11'er farklı PFGE modeli elde edilmiş ve Türkiye'de karşılaşılan *S. Enteritidis* izolatlarının çoğunluğunun benzer PFGE paternleri gösteren kökenler olduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Yin ve ark. (99) Çin'de etlerden izole edilen 99 *Salmonella* kökeni ile yaptıkları çalışmada kökenleri *XbaI* enzimi ile restriksiyona uğrattıp PFGE ile klonal ilişki araştırması yapmışlar. Elektroforez sonucunda 82 ayrı patern oluştuğunu gözlemlemişler ve %90 benzerliği sınır olarak beş tipik küme gözlemlemişler ve her bir küme içerisindeki üyelerin yüksek DNA homojitesi gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca aynı serotipe ait bazı kökenlerin farklı

kaynaklardan ve farklı zamanlarda izole edilmesine rağmen yüksek benzerlik gösterebildiğini saptamışlardır.



## SONUÇLAR

Tüm kökenlerde gastroenterit tablosundan sorumlu SPA-1 ilişkili genler, derin dokulara invazyondan ve hücre içinde hayatta kalmadan sorumlu SPA-2 ilişkili genler ile enfeksiyonun sistemik fazında görev alan plazmit ilişkili tüm klasik virulans faktörlerinin bulunduğu bu nedenle kökenlerin patojenik potansiyellerinin yüksek olduğu sonucuna varıldı.

Ampisilin dirençli kökenlerde beta laktamaz sentezinden sorumlu *bla*TEM-1, *bla*SHV-1 ve *bla*CTX-M-1 genlerinden en az birinin bulunduğu tespit edildi. Trimetoprim-sulfometoksazol kombinasyonuna direnç gösteren bir kökenin sulfonamid direncinden sorumlu *sulI* genini taşıdığı gösterildi. Ampisilin dirençli yedi kökenden birinde plazmit aracılı kinolon direncinden sorumlu *qnrB1*, beşinde *qnrS1* geni saptandı. Bu bulgulara dayanarak, antibiyotik dirençli kökenlerin ilgili direnç genlerinden en az birini taşıdığı bu nedenle antibiyotik direnci açısından fenotip genotip ilişkisinin olduğu söylenebilir.

PBRT yöntemi ile kökenlerde bulunan replikonların araştırılması sonucu tüm kökenlerde *Salmonella* virulans plazmiti (IncFIIS) saptandı. *Salmonella*'larla enfeksiyonun sistemik fazında rol alan ve IncFII plazmiti üzerinde taşınan *spvB* geni kökenlerdeki klasik virulans faktörlerinin belirlenmesi kapsamında PZR yöntemi ile araştırıldı ve tüm kökenlerde bulunduğu ortaya kondu. Plazmid ile üzerinde bulunan genin iki farkı moleküler yöntemle de saptanmış olması, PBRT ve PZR sonuçlarının uyumlu olduğunu göstermektedir.

Bunun dışında 50 kökenin 13'ünde I1, birinde I2, dördünde P, birinde A/C ve dördünde X1 replikonu saptandı. Replikonların ilişkili oldukları plazmitlerin daha önceden yapılmış çalışmaların da ışığında çeşitli antibiyotiklere karşı dirençten sorumlu olduğu söylenebilir. Antibiyotik direnci göstermeyen bazı kökenlerde de ilgili plazmitlerin saptanması bu kökenlerin de zaman içinde direnç geliştirebileceğini göstermektedir.

Kökenlerin DNA'larının XbaI ile kesim ve elektroforez sonrasında PFGE profillerinin analizinde, 22 ana grup, 33 pulsotip, sekiz küme ve 25 özgül profil oluştuğu gözlemlendi. Aynı serogrup içerisinde yer alan kökenlerin birbirleri ile daha yakın ilişkide olduğu ve aynı grup içinde yer aldıkları gösterildi. Çeşitli antibiyotik direnç genleri taşıyan kökenlerin dendogramda birbirleriyle daha yakın ilişkili görüldüğü bu nedenle antimikrobiyal direnç genleri kazanılmasının kökenler arasındaki akrabalık ilişkilerine etki ettiği söylenebilir.





## ÖZET

Çalışmamızda *Salmonella*'ların virulansında etkili olan faktörlerin genetik boyutunu araştırmak, son yıllarda ortaya çıkan çoklu ilaç dirençli kökenlerin antibiyotik direncinde etkili olan genleri ve üzerlerinde taşındıkları plazmitleri saptamak son olarak da kökenler arası klonal ilişkileri belirlemek amaçlandı.

*Salmonella* Patojenite Adası-1'de bulunan *invA*, *sipA*, *sipD*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *Salmonella* Patojenite Adası-2'de bulunan *ssaR*, *sifA* ile plazmit üzerinde bulunan *spvB*, *prot6E* klasik virulans genleri polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırıldı.

Antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre ampisiline dirençli ya da orta düzey direnç gösteren yedi kökende beta laktam direncinden sorumlu TEM-1, SHV-1 ve CTX-M-1 genleri ve plazmit aracılı kinolon direncinden sorumlu *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrS1* genleri ile trimetoprim-sulfometoksazol kombinasyonuna direnç gösteren bir kökende sulfonamid direncinden sorumlu *sulI*, *sulII* genleri araştırıldı. Direnç gelişimi ve aktarımında önemli bir yer tutan plazmitlerin varlığı ve kökenler içindeki dağılımı polimeraz zincir reaksiyonu tabanlı replikon tiplendirmesi ile belirlendi.

Kökenler arasındaki klonal ilişki Pulsed Field Jel Elektroforezi yöntemi ile araştırıldı.

Araştırılan yedi kökenden üçünde *blaTEM-1*, altısında, *blaSHV-1*, birinde *blaCTX-M-1*, beşinde *qnrS1* ve birinde *qnrB1* geni saptandı. Trimetoprim-sulfometoksazol dirençli kökende *sulI* geni bulunurken, *sulII* geni bulunmadığı gözlemlendi. Kökenlerin birinde TEM-1 ve *qnrS1*, ikisinde SHV-1 ve *qnrS1*, birinde TEM-1, SHV-1, CTX-1 grubu ve *qnrS1*, birinde TEM-1, SHV-1 ve *qnrB1*, birinde SHV-1 ve *sulI* genleri birlikte saptandı.

50 kökende 25 replikonun araştırılması sonucunda, kökenlerin tümünde (%100) FIIS, 13'ünde (%26) I1, birinde I2 (%2), dördünde (%8) P, birinde (%2) A/C ve dördünde (%8) X1

replikonu saptandı. 50 adet *Salmonella* kökeninden 46'sı pulsed field jel elektroforezi ile tiplendirilebildi ve kökenlerin dendogramında sekiz küme, 25 özgül profil ve 33 pulstotip saptandı.

Tüm kökenlerin patojenite adalarındaki klasik virulans faktörlerinin tümüne sahip olduğu bu nedenle kökenlerimizin patojenik potansiyellerinin yüksek olduğu ve antibiyotik dirençli kökenlerin ilgili direnç genlerinden en az birini taşıması nedeni ile de antibiyotik direnci açısından fenotip genotip ilişkisinin olduğu söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Salmonella enterica*, gastroenterit, virulans genleri, pulsed field jel elektroforezi, polimeraz zincir reaksiyonu tabanlı replikon tiplendirmesi, antibiyotik duyarlılık



# **INVESTIGATION OF VIRULENCE FACTORS AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *SALMONELLA ENTERICA* STRAINS BY USING MOLECULAR TECHNIQUES AND IDENTIFICATION OF CLONAL RELATIONSHIPS AMONG THE STRAINS**

## **SUMMARY**

In this study we aimed to reveal the factors that effect virulence of *Salmonella*, to identify the antibiotic resistance genes and plasmids that confer to resistance to several antibiotics in multidrug resistant strains and to determine clonal relationship between the strains.

InvA, sipA, sipD, sopB, sopD, sopE2 virulence genes located in *Salmonella* Pathogenicity Island-1, ssaR, sifA genes located in *Salmonella* Pathogenicity Island-2 and spvB, prot6E genes that are carried on plasmids are investigated by using polymerase chain reaction.

According to antibiotic susceptibility results seven strains which are resistant or showing intermediate resistance to ampicillin were analyzed for the presence of TEM-1, SHV-1, CTX-M-1 beta lactam resistance genes and qnrA1, qnrB1, qnrS1 plasmid mediated quinolone resistance genes. Also one strain which is resistant to trimetoprim-sulfometoxazol combination was assayed for the presence of sulI and sulII sulfonamide resistance genes. Distribution and frequency of the plasmids among the strains that are responsible for the antibiotic resistance were investigated with plasmid based replicon typing. Moreover pulsed field gel electrophoresis was conducted in order to reveal the clonal relationship within the strains.

Among the seven strains, *bla*TEM-1 was found in three, *bla*SHV-1 was found in six, *bla*CTX-M-1 was found in one, *qnr*S1 was found in five and *qnr*B1 was found in one strain. Trimetoprim-sulfometoxazol resistant strain was found as positive to presence of *sul*I whereas negative to *sul*II. In addition, in one strain TEM-1 and *qnr*S1, in two strain SHV-1 and *qnr*S1, in one strain TEM-1, SHV-1, CTX-M-1 and *qnr*S1, in one strain TEM-1, SHV-1 and *qnr*B1 and in one strain SHV-1 and *sul*I genes were detected together.

Plasmid based replicon typing assay demonstrated that among the 50 strains all carried FIIS (100%) 13 (26%) carried II, one (2%) carried I2, four (8%) carried P, one (2%) carried A/C and four (8%) carried X1 replicon.

46 out of 50 strains were typed by using pulsed field gel electrophoresis. 46 strains were classified into eight major clusters, 33 pulsotypes and eight different clusters

Experiments revealed that all strains carrying all virulence genes located on both *Salmonella* Pathogenicity Island 1-2, and plasmids suggested high potential of pathogenicity. In addition, all antibiotic resistant strains carried at least one of the resistance genes of interest indicating phenotype-genotype association in antibiotic resistance.

**Key words:** *Salmonella enterica*, gastroenteritis, virulence genes, pulsed field gel electrophoresis, Plasmid based replicon typing, antibiotic susceptibility

## KAYNAKLAR

1. Us E, Erdem B, Tekeli A, Gerçeker D, Saran B, Bayramova M, Şahin F. *Salmonella* Serotip Enteritidis İzolatlarının Plazmid Profil Analizi ve “Pulsed Field” Jel Elektroforezi ile İncelenmesi. Mikrobiyol Bul 2011;45(2):210-27.
2. Erdem B, Tekeli A, Koyuncu E, Bayramova M. Türkiye’de insanlardan izole edilen *Salmonella* enterica subsp enterica serotip Enteritidis ve serotip Typhimurium suşlarının RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) yöntemi ile incelenmesi. TÜBİTAK ( Proje kodu: SBAG-AYD-440-103S181), Ankara, Aralık 2004.
3. Us E, Erdem B, Tekeli A, Dolapci I, Bayramova M, Saran B, Sahin F. Molecular investigation of *Salmonella* choleraesuis and *Salmonella* hadar strains isolated from humans in Turkey. Jpn J Infect Dis. 2009; 62(5):362-7.
4. Hur J, Choi YY, Park JH, Jeon BW, Lee HS, Kim AR et al. Antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea. Can J Vet Res. 2011;75(1):49-56.
5. Campioni F, Moratto Bergamini AM, Falcão JP. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. Food Microbiol 2012;32(2):254-64.
6. Aktas Z, Day M, Kayacan CB, Diren S, Threlfall EJ. Molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by plasmid analysis and pulsed-field gel electrophoresis. Int J Antimicrob Agents 2007;30(6):541-5.
7. Gülmez D. Morfoloji, Kültür ve Biyokimyasal Özellikler. Erdem B. (Editör) *Salmonella*’da. Ankara: TMC Yayınları; 2013, s.52-64.

8. Old DC, Threlfall EJ. *Salmonella*. In: Collier L, Balows A, Susman M (Eds.). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9<sup>th</sup> ed. London and New York: Arnold & Oxford University Press, 1998:969-97.
9. Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th ed. Paris: World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur; 2007
10. Su LH, Chiu CH. *Salmonella*: Clinical Importance and Evolution of Nomenclature, Chang Gung Med J 2007;30(3):210-9.
11. Imen BM, Ridha M, Mahjoub A. Laboratory Typing Methods for Diagnostic of *Salmonella* Strains, the "Old" Organism That Continued Challenges. In: Mahmoud BSM (Ed.). *Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen*. ISBN: 978-953-307-782-6. InTech; 2012. p.349-60.
12. Riley LW. Molecular epidemiology of infectious diseases: Principles and Practices. Washington DC: ASM Press; 2004.
13. Threlfall EJ, Frost JA. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. J Appl Bacteriol 1990;68, 5-16.
14. Threlfall EJ. Epidemic *Salmonella* typhimurium DT 104- A truly international multiresistant clone. J Antimicrob Chemother 2000;46, 7-10.
15. Ward LR, de Sa JD, Rowe B. A phage typing scheme for *Salmonella* enteritidis. Epidemiol Infect 1987;99(2):291-4.
16. Millemann Y, Lesage MC, Chaslus-Dancla E, Lafont JP. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella* typhimurium and *S. enteritidis*. J Clin Microbiol 1995; 33, 173-9.
17. Landeras E, Gonzalez-Hevia MA, Alzugaray R, Mendoza MC. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella* enteritidis by ribotyping. J Clin Microbiol 1996; 34, 2294-6.
18. Lim BK, Thong KL. Application of PCR-based serogrouping of selected *Salmonella* serotypes in Malaysia. J Infect Dev Ctries 2009;3(6):420-8
19. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods 2005;63(3):219-28.
20. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(6):2227-38.

21. Datta N, Hughes VM. Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature* 1983; 306, 616– 17.
22. García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(2):274-81.
23. Villa L, Aurora García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:2518-29.
24. Us E. *Salmonella* Virulans Faktörleri. Erdem B. (Editör) *Salmonella*'da. Ankara: TMC Yayınları; 2013. s.127-41.
25. Aydemir Ş. Patogenez. Erdem B. (Editör) *Salmonella*'da. Ankara: TMC Yayınları; 2013. s.161-71.
26. Foster JW Hal HK, Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* 1990;172;771-8.
27. Siriken B, *Salmonella* Patojenite Adaları, *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1): 181-188.
28. Watermen SR, Holden DW. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* 2003;5(8):501-11.
29. Forest CG, Ferraro E, Sabbagh SC, Daigle F. Intracellular survival of *Salmonella* enterica serovar Typhi in human macrophages is independent of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2. *Microbiology* 2010;156, 3689–98.
30. Hansen-Wester I, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* 2001;3(7):549-59.
31. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2000;2(2):145-56.
32. Gulig PA, Danbara H, Guiney DG, Lax AJ, Norel F, Rhen M. Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol* 1993;7(6):825-30.
33. McCormick BA, Miller SI, Carnes D, Madara JL. Transepithelial signaling to neutrophils by *Salmonellae*: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect Immun* 1995;63(6):2302-9.
34. Gómez-Aldapa CA, Torres-Vitela MR, Villarruel-López A, Castro-Rosas J. The Role of Foods in *Salmonella* Infections, In: Mahmoud BSM (Ed.). *Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen*. ISBN: 978-953-307-782-6. InTech; 2012. p.21-46.

35. Khan AA, Melvin CD, Dagdag EB. Identification and molecular characterization of *Salmonella* spp. from unpasteurized orange juices and identification of new serotype. *Food Microbiol* 2007 Aug;24(5):539-43.
36. Gilbert RJ, Humphery TJ. Food-borne bacterial Gastroenteritis. In: Collier L, Balows A, Sussman M (Eds.). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9<sup>th</sup> ed. London and New York: Arnold & Oxford University Press; 1998. p.539-65.
37. Voetsch A, Thomas C, Van Gilder J, Angulo F, Monica J, Farley M et al. FoodNet Estimate of the Burden of Illness Caused by Nontyphoidal *Salmonella* Infections in the United States. *Clin Infect Dis* 2004 Apr 15;38 Suppl 3:S127-34.
38. Forsyth JRL. Typhoid and Paratyphoid. In: Collier L, Balows A, Sussman M (Eds.). *Topley and Wilson's. Microbiology and Microbial Infections*. 9<sup>th</sup> ed. London: Arnold Press; 1998. p. 450–78.
39. Ayaz C. Tifo ve Diğer Salmonellozlar. In: Dolar E. (Editörler) İç Hastalıkları'nda. Bursa: Nobel Kitabevi, 2005:820-3.
40. Özbakkaloğlu B, Wilke Topçu A. Tifo Dışı Salmonellozlar. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi'nde*. 3. ed. İstanbul: Nobel Kitabevi, 2008:921-7.
41. Chen S, Zhao S, White DG, Schroeder CM, Lu R, Yang H et al. Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(1):1-7.
42. Velge P, Cloeckaert A, Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella* enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes, *Vet. Res* 2005 May-Jun;36(3):267-88.
43. Perçin D. Antimikrobiyal Direnci. Erdem B. (Editör) *Salmonella'da*. Ankara: TMC Yayınları; 2013, s.201-9.
44. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev*. 2002;26(2):141-8.
45. Su LH, Chiu CH, Chu C, Ou JT. Antimicrobial Resistance in Nontyphoid *Salmonella* Serotypes: A Global Challenge. *Clin Infect Dis*. 2004; 15;39(4):546-51.
46. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 20th Informational Supplement; CLSI Document M100-S20. Wayne, PA; CLSI, 2010.



47. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(2):394-7.
48. Su LH, Wu TL, Chiu CH. Development of carbapenem resistance during therapy for non-typhoid *Salmonella* infection. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(4):E91-4.
49. Özakın C. *Salmonella* Enfeksiyonlarında Tedavi, Korunma ve Kontrol. Erdem B. (Editör) *Salmonella*'da. Ankara: TMC Yayınları; 2013. s.216-21.
50. Shah DH, Zhou X, Addwebi T, Davis MA, Orfe L, Call DR et al. Cell invasion of poultry-associated *Salmonella* enterica serovar Enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. *Microbiology* 2011;157(Pt 5):1428-45.
51. Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella* enterica. *Vet Microbiol* 2006; 10;112(1):1-10.
52. Hadjinicolaou AV, Demetriou VL, Emmanuel MA, Kakoyiannis CK, Kostrikis LG. Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in environmental and clinical samples. *BMC Microbiol* 2009;19;9:97.
53. Unlu O, Tugrul M, Antimicrobial Resistance of Clinical *Salmonella* Strains in Edirne, Turkey: Four Year Trend. FEMS-6th Congress of European Microbiologists Abstract Book FEMS-2993, Maastricht, 2015.
54. Boyle EC, Bishop JL, Grassi GA, Finlay BB. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. *J Bacteriol* 2007; 189(5): 1489–95.
55. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 2010;15;50(6):882-9.
56. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlslose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC et al. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis* 2011;8(8):887-900.
57. Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrews-Polymenis H, Raffatellu M, Figueiredo J et al. Molecular pathogenesis of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun* 2003;71:1–12.

58. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. *Salmonella* challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J Anim Sci* 2008;86:E149–62.
59. Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJ, Woodward MJ. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004;53(2):208-16.
60. Guerra B, Soto S, Helmuth R, Mendoza MC. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integronborne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46, 2977–81.
61. Liu SL, Sanderson KE. I-CeuI reveals conservation of the genome of independent strains of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1995;177(11):3355-7.
62. Llanes C, Kirchgesner V, Plesiat P. Propagation of TEM- and PSE-type  $\beta$ -lactamases among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2430–6.
63. Martín MC, Gonzalez-Hevia MA, Alvarez-Riesgo JA, Mendoza MC. *Salmonella* serotype Virchow causing salmonellosis in a Spanish region. Characterization and survey of clones by DNA fingerprinting, phage typing and antimicrobial resistance. *Eur J Epidemiol* 2001;17:31–40.
64. Gulig PA. Virulence plasmids of *Salmonella typhimurium* and other *Salmonellae*. *Microb Pathog* 1990;8, 3–11.
65. Wallis TS, Paulin SM, Plested JS, Watson PR, Jones PW. The *Salmonella* dublin virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle. *Infect Immun* 1995;63, 2755–61.
66. Guiney DG, Libby S, Fang FC, Krause M, Fierer J. Growth-phase regulation of plasmid virulence genes in *Salmonella*. *Trends Microbiol* 1995;3(7):275-9.
67. Matsui H, Bacot CM, Garlington WA, Doyle TJ, Roberts S, Gulig PA. Virulence plasmid-borne spvB and spvC genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *J Bacteriol* 2001;183, 4652–8.
68. Timoney JF, Taylor DE, Shin S, McDonough P. pJT2: unusual HI plasmid in a highly virulent lactose-positive and chloramphenicol-resistant *Salmonella typhimurium* strain from calves. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;18, 480–2.

69. Ridley AM, Punia P, Ward LR, Rowe B, Threlfall EJ. Plasmid characterization and pulsed-field electrophoretic analysis demonstrate that ampicillin-resistant strains of *Salmonella enteritidis* phage type 6a are derived from *S. enteritidis* phage type 4. *J Appl Bacteriol* 1996;81, 613–8.
70. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 1995;15, 593–600.
71. Cloeckaert A, Praud K, Lefevre M, Doublet B, Pardos M, Granier SA et al. IncI1 Plasmid Carrying Extended-Spectrum  $\beta$  Lactamase Gene blaCTX-M-1 in *Salmonella enterica* Isolates from Poultry and Humans in France, 2003 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(10):4484-6.
72. Garcia-Fernandez A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A et al. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1229–33.
73. Girlich D, Poirel L, Carattoli A, Kempf I, Lartigue MF, Bertini A et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:4681–5.
74. Meunier D, Jouy E, Lazizzera C, Kobisch M, Madec JY. CTX-M-1 and CTX-M-15-type  $\beta$ -lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:402–7.
75. Cloeckaert A, Praud K, Doublet B, Bertini A, Carattoli A, Butaye P et al. Dissemination of an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase blaTEM-52 gene-carrying IncI1 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1872–5.
76. Damborg P, Morsing MK, Petersen T, Bortolaia V, Guardabassi L. CTX-M-1 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* in dog faeces from public gardens. *Acta Vet Scand* 2015; 25;57:83.
77. Lv L, Partridge SR, He L, Zeng Z, He D, Ye J et al. Genetic Characterization of IncI2 Plasmids Carrying blaCTX-M-55 Spreading in both Pets and Food Animals in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(6): 2824–7.
78. Kim SR, Komano T. The plasmid R64 thin pilus identified as a type IV pilus. *J Bacteriol* 1997;179:3594 –603.

79. Bradley DE. Characteristics and function of thick and thin conjugative pili determined by transfer-derepressed plasmids of incompatibility groups I1, I2, I5, B, K and Z. *J Gen Microbiol* 1984;130:1489–502.
80. Wong MH, Liu L, Yan M, Chan EW, Chen S. Dissemination of IncI2 Plasmids That Harbor the blaCTX-M Element among Clinical *Salmonella* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(8):5026-8.
81. Kapmaz M, Erdem F, Abulaila A, Yeniaras E, Öncül O, Aktaş Z. Türkiye’de ilk kez NDM-1 karbapenemaz üreten ve IncI2, IncA/C ile IncY plazmitlerini taşıyan *Escherichia coli* ST471 infeksiyonu. *Klimik* 2016, 30. Yıl Kurultayı Özet Kitabı s.16, Antalya, 2016.
82. Popowska M, Krawczyk-Balska A. Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential. *Front Microbiol* 2013;4:44.
83. Shintani M, Yamane H, Nojiri H. Behaviour of various hosts of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 in artificial microcosms. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010;74, 343–9
84. Szczepanowski R, Eikmeyera F, Harfmanna J, Blomb J, Rogersc LM, Top EM. et al. Sequencing and comparative analysis of IncP-1 antibiotic resistance plasmids reveal a highly conserved backbone and differences within accessory regions. *J Biotechnol* 2011;155, 95–103.
85. Tennstedt T, Szczepanowski R, Braun S, Pühler A, Schlüter A. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 2003;45, 239–52.
86. Tennstedt T, Szczepanowski R, Krahn I, Pühler A, Schlüter A. Sequence of the 68,869 bp IncP- 1 $\alpha$  plasmid pTB11 from a wastewater treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid* 2005;53, 218–38
87. Van Meervenne E, Van Coillie E, Kerckhof FM, Devlieghere F, Herman L, De Gelder LSP et al. Strain-specific transfer of antibiotic resistance from an environmental plasmid to foodborne pathogens. *J Biomed Biotechnol* 2012; 834598.
88. Johnson TJ, Lang KS. IncA/C plasmids: An emerging threat to human and animal health? *Mob Genet Elements* 2012; 2(1): 55–8.
89. Aoki T, Egusa S, Kimura T, Watanabe T. Detection of R factors in naturally occurring *Aeromonas salmonicida* strains. *Appl Microbiol* 1971; 22:716-7.

90. Wantanabe T, Aoki T, Ogata Y, Egusa S. Antibiotics and drug resistance in animals. R factors related to fish culturing. *Ann N Y Acad Sci* 1971;182:383–410.
91. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Giamarellou H. Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:221-4.
92. Allen KJ, Poppe C. Occurrence and characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins mediated by beta-lactamase CMY-2 in *Salmonella* isolated from food-producing animals in Canada. *Can J Vet Res* 2002;66:137-44.
93. Carattoli A, Villa L, Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Evolution of IncA/C blaCMY-2 carrying plasmids by acquisition of the blaNDM-1 carbapenemase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(2):783-6.
94. Chihara S, Okuzumi K, Yamamoto Y, Oikawa S, Hishinuma A. First case of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 producing *Escherichia coli* infection in Japan. *Clin Infect Dis* 2011; 52:153-4.
95. Norman A, Hansen LH, She Q, Sørensen SJ. Nucleotide sequence of pOLA52: A conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* 2008;60(1):59-74.
96. Hansen LH, Sørensen SJ, Jørgensen HS, Jensen LB. The Prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs. *Microbial Drug Resistance* 2005;11,378–82
97. Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(1):145-7.
98. Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D, Hansen LH, Hasman H, Debroy C et al. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Plasmid.* 2012;68(1):43-50.
99. Yin M, Yang B, Wu Y, Wang L, Wu H, Zhang T et al. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* serovar in retail meats in market place in Uighur, Xinjiang, China. *Food Cont* 2016;64:165-72.

## RESİMLEMELER LİSTESİ

ŞEKİLLER:	Sayfa
Şekil 1. <i>Salmonella</i> türlerinin sınıflandırılması .....	4
Şekil 2. <i>Salmonella</i> türlerinin identifikasyon şeması .....	5
Şekil 3. <i>Salmonella</i> patogeneğinde konak-patojen ilişkisini gösteren şema .....	14
Şekil 4. <i>Salmonella</i> patojenite adalarının şematik gösterimi .....	16
Şekil 5. PZR yöntemi ile SPA-1 genlerine ait elde edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntülerine ilişkin örnekler.....	34
Şekil 6. PZR yöntemi ile SPA-2 genlerine ait elde edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntülerine ilişkin örnekler .....	35
Şekil 7. PZR yöntemi ile plazmit üzerinde taşınan klasik virulans genlerine (spvB ve Prot6E) ait amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntülerine ilişkin örnekler.....	35
Şekil 8. PZR yöntemi ile GSBL direncinden sorumlu blaTEM-1, blaSHV-1 ve blaCTX-M-1 genlerine ait edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntüleri .....	36
Şekil 9. PZR yöntemi ile sulfonamid direncinden sorumlu sulI genine ait edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntüleri .....	37
Şekil 10. PZR yöntemi ile plazmit aracılı kinolon direncinden sorumlu qnrB1 ve qnrS1 genlerine ait edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntüleri .....	37

<b>Şekil 11.</b> PBRT yöntemi ile çeşitli replikonlara ait elde edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucu elde edilen bantlarının jeldeki görüntüleri .....	38
<b>Şekil 12.</b> <i>Salmonella</i> kökenlerinin PFGE profillerinin dendogramı .....	40

**TABLolar:**

**Sayfa**

<b>Tablo 1.</b> O-grupların eski ve yeni isimleri .....	4
<b>Tablo 2.</b> <i>Salmonella</i> serotiplerinde tanımlanmış replikonlar ve ilgili enzimler .....	11
<b>Tablo 3.</b> Araştırılan klasik virulans genlerine ait primer dizileri, çalışılan PZR profilleri, ampikon uzunlukları ve ilgili referanslar .....	25
<b>Tablo 4.</b> Araştırılan antimikrobiyal direnç genlerine ait primer dizileri, ampikon uzunlukları ve ilgili referanslar.....	28
<b>Tablo 5.</b> PBRT yöntemi ile araştırılan replikonların karışımlara göre dağılımı ve ampikon uzunlukları.....	31
<b>Tablo 6.</b> En az bir antibiyotiğe direnç gösteren kökenlerin listesi.....	33
<b>Tablo 7.</b> <i>Salmonella</i> kökenlerinde saptanan antibiyotik direnç genleri ve plazmitler.....	41

## ÖZGEÇMİŞ

1. Ad Soyad : Özge ÜNLÜ
2. Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul - 18.07.1988
3. Unvanı : Araştırma Görevlisi
4. Öğrenim Durumu : Doktora Öğrencisi

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Hacettepe Üniversitesi	2005-2010
Y. Lisans	-	-	-
Doktora	Tıbbi Mikrobiyoloji	Trakya Üniversitesi	2011-

### 5. Akademik Unvanlar:

**Araştırma Görevlisi :** 03.06.2013 / Üsküdar Üniversitesi –  
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi - Moleküler Biyoloji ve Genetik (İngilizce)

### 6. Yayınlar

#### 6.1. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Unlu O, Tugrul M, Molecular typing of *Salmonella* spp. by Multiplex Polymerase Chain Reaction, EMBO Conference on Microbiology after the genomics revolution: Genomes 2014 Abstract Book; p. 170, Haziran 2014, Institut Pasteur, Paris, Fransa

Unlu O, Tugrul M, Antimicrobial Resistance of Clinical *Salmonella* Strains in Edirne,



Turkey: Four Year Trend. FEMS-6th Congress of European Microbiologists Abstract Book; FEMS-2993, Mayıs 2015, Maastricht, Hollanda

### **6.2. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler**

Ünlü Ö, Filcan A, Şakru N, Tuğrul M, Bir Üniversite Hastanesinde Gastroenterit Etkenlerinin Dağılımı: Onüç Aylık Veriler. Türk Mikrobiyol Cem Derg 43(4):149-154, 2013

### **6.3. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

Ünlü Ö, Filcan A, Şakru N, Tuğrul M, Bir Üniversite Hastanesinde Gastroenterit Etkenlerinin Dağılımı: Onüç Aylık Veriler. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Bildiri Kitabı 2012; p. 140

## **7. Projeler**

### **7.1. Ulusal Projeler**

Tuğrul M, Ünlü Ö, Filcan A, Edirne ve çevresinden klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* suşlarının moleküler yöntemlere göre gruplandırılması ve antibakteriyel direnç durumlarının belirlenmesi, TÜBAP Desteği 2012

Ünlü Ö, Tuğrul M, *Salmonella* enterica kökenlerinin virulans faktörleri ile antibiyotik direncinin moleküler olarak incelenmesi ve kökenler arasındaki klonal ilişkilerin belirlenmesi, TÜBAP Desteği 2014 (Tez Projesi)

## **8. Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler**

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

## **9. İletişim Bilgileri**

**E-mail** : [ozge\\_unlu88@yahoo.com](mailto:ozge_unlu88@yahoo.com)

**GSM** : 0535 342 63 53

## **EKLER**



Ek 1

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-GOKAEK 2014/86		
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof. Dr. H. Murat TUĞRUL		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ			
	DESTEKLEYİCİ			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 10/05	Tarih: 14.05.2014		
	Fakültemiz Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. H. Murat TUĞRUL'un sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Doktora Öğrencisi Özge ÖNLÜ'nün tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevduat oy birliği ile karar verilmiştir.			
ETİK KURUL BİLGİLERİ				
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-GOKAEK Yönergesi			

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Başkan Yardımcısı	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Öye	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	izah!
Yrd. Doç. Dr. F. Nazrin TURAN Öye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	mağretli!
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Öye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Hasan ÜMİT Öye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	izah!
Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR Öye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Sedat ÜSTÜNDAĞ Öye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Burcu TOKUÇ Öye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Koray ELTER Öye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	mağretli!
Yrd. Doç. Dr. Rıdvan KÖSE ÇINAR Öye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Hast. A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Recep YAĞIZ Öye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Atakan SEZER Öye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Berkant DEMİRAL Öye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	mağretli!
Avukat Baki KURNAZ Öye		T.Ü. Rektörlüğü	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> H	

\*Araştırma ile ilgili  
\*\*Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Recep YAĞIZ  
Dekan a.  
Dekan Yardımcısı