

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Salmonella enterica SUBSPECIES *enterica* SEROVAR INFANTIS
SUŞLARINDA ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNİN GENETİK DOĞASI

Duygu ABBASOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2009

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Salmonella enterica SUBSPECIES *enterica* SEROVAR INFANTIS SUŞLARINDA ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNİN GENETİK DOĞASI

Duygu ABBASOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Dalgalı Alan Jel Elektroforezi (PFGE) yöntemi ile tanımlanan 18 adet *Salmonella* Infantis suşunun ilaç dirençlilikleri 16 farklı antibiyotik kullanılarak incelenmiş ve DMC 40 suşunun diğer suşlardan farklı bir direnç profiline sahip olduğu belirlenmiştir. Çoklu ilaç dirençlilik özelliğine sahip *S. Infantis* üyelerinin tamamının 206.5 kb büyüklükte ortak bir plazmid içerdiği saptanmıştır. Konjugasyon denemeleri 206.5 kb plazmidin konjugal aktarım yeteneği içerdiğine ve nalidiksik asit dirençlilik özelliğini kodladığına işaret etmiştir. *S. Infantis* suşlarındaki nalidiksik asit dirençliliğin moleküler mekanizmasının analizi için uygun primerler kullanılarak *gyrA* gen bölgesi çoğaltılmıştır. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ürünlerinin dizi analizi sonucunda bu gen bölgesinde Ser83→Tyr (TCC→TAC) nokta mutasyonu tespit edilmiştir. Bu nokta mutasyonunun 206.5 kb büyüklükteki konjugatif plazmid üzerindeki *gyrA* geni üzerinde tespit edilmesi, nalidiksik asit dirençliliğinin söz konusu plazmid tarafından kodlandığını doğrulamıştır. Tanımlayıcı PZR çalışmaları sonucunda 206.5 kb büyüklükteki plazmidin alıcı suştan farklı bir sınıf I integron içerdiği ve bu integronun *gyrA* geni ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

2009, 74 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Salmonella* Infantis, çoklu ilaç dirençlilik, genetik analiz

ABSTRACT

Master Thesis

GENETIC NATURE OF MULTI DRUG RESISTANCE IN *Salmonella enterica* SUBSPECIES *enterica* SEROVAR INFANTIS

Duygu ABBASOĞLU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Antibiotic resistance characteristics of 18 *Salmonella* Infantis strains that were identified by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) was investigated by using 16 different antibiotic and it was determined that DMC 40 has a different resistance profile than the other strains. All *S. Infantis* members features of multi drug resistance was found to contain 206.5 kb common plasmid. Conjugation assays were pointed out that the 206.5 kb plasmid has conjugally transfer ability and encoded nalidixic acid resistance property in host strains. To determine the molecular mechanism of nalidixic acid resistance in *S. Infantis* strains, *gyrA* gene cluster was amplified with specific primers. As a result of sequence analysis of PCR (Polymerase Chain Reaction) products, Ser83→Tyr (TCC→TAC) point mutation was detected. Detecting this point mutation at *gyrA* gene site of 206.5 kb size conjugative plasmid confirmed that nalidixic acid resistance characteristic was encoded on this plasmid. End of descriptive PCR (Polymerase Chain Reaction) it was detected that 206.5 kb plasmid had different class I integron from recipient strain and this integron had a relation with *gyrA* gene.

2009, 74 pages

Key Words: *Salmonella* Infantis, multi drug resistance, genetic analysis

TEŐEKKÖR

Çalıőmalarımı yönlendiren, araőtırmalarımın her aőamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek bana yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e, laboratuvar arkadaşlarıma, aileme, ablam Ayőe'ye, arkadaşlarım Evin ve Ezgi'ye teşekkür ederim.

Duygu ABBASOĞLU

Ankara, Temmuz 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 <i>Salmonella</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	3
2.2 <i>S. Infantis</i> 'in Salmonellozis'teki Önemi.....	4
2.3 <i>Salmonella</i> 'da Çoklu İlaç Dirençlilik Gelişimi.....	5
2.4 <i>Salmonella</i> 'da İlaç Dirençliliğinin Yayılmasında Plazmidlerin, Transpozonların ve İntegronların Rolü.....	7
2.4.1 Plazmidler.....	7
2.4.1.1 <i>Salmonella</i> cinsinde plazmidlerin fonksiyonları.....	8
2.4.2 Transpozonlar.....	12
2.4.3 İntegronlar.....	14
2.5 <i>Salmonella</i> 'da Yatay Gen Transferi.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1 Materyal.....	18
3.1.1 Bakteriler.....	18
3.1.2 Antibiyotikler.....	18
3.1.3 Besiyerleri.....	21
3.1.4 Çözeltiler.....	22
3.1.5 Primerler.....	25
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1 Plazmid izolasyonu.....	26

3.2.1.1 Kado-Liu yöntemi ile plazmid izolasyonu.....	26
3.2.1.2 Kit ile plazmid izolasyonu.....	26
3.2.2 Elektroforez.....	27
3.2.3 Plazmidlerin büyüklüklerinin saptanması.....	28
3.2.4 Dalgalı alan jel elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis).....	29
3.2.5 Antimikrobiyel direncin belirlenmesi.....	30
3.2.5.1 Disk difüzyon metodu.....	30
3.2.5.2 Mikrodilasyon yöntemi.....	31
3.2.6 Genomik DNA izolasyonu.....	31
3.2.7 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) amplifikasyonları.....	32
3.2.8 DNA dizi analizleri.....	33
3.2.9 Dirençlilik genleri ve integron analizleri.....	33
3.2.10 Konjugasyon.....	34
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1 <i>Salmonella</i> Serotiplerinde Farklı Suşların Tanısı.....	35
4.2 <i>S. Infantis</i> Suşlarında Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Tanımı.....	44
4.3 <i>S. Infantis</i> Suşlarının Plazmid İçerikleri.....	48
4.4 <i>S. Infantis</i> Suşlarında Nalidiksik Asit Dirençliliğin Moleküler Analizi.....	52
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	74

SİMGELER DİZİNİ

AMC	Amoksisilin/klavulanik asit
AMP	Ampisilin
bç	Baz çifti
CHL	Kloramfenikol
CHP	Siprofloksasin
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EFT	Seftiofur
FFC	Florfenikol
g	gram
GEN	Gentamisin
KAN	Kanamisin
Kb	Kilo baz
L	Litre
LB	Luria Bertani
M	Molar
Mb	Mega baz
µg	mikrogram
mg	miligram
MHB	Müller Hinton Broth
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
µl	mikrolitre
ml	mililitre
mM	milimolar
NAL	Nalidiksik asit
NEO	Neomisin
ORF	Açık okuma kalıbı
PFGE	Dalgalı Alan Jel Elektroforezi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Ser	Serin
SGI	<i>Salmonella</i> Genomik Adası
SPE	Spektinomisin
STR	Streptomisin
SUL	Sulfonamid
SXT	Trimetoprim/sulfametoksazol
TAE	Tris Asetat Etilen Diamin Tetraasetik Asit
TBE	Tris Borat Etilen Diamin Tetraasetik Asit
TE	Tris Etilen Diamin Tetraasetik Asit
TET	Tetrasiklin
TMP	Trimetoprim
Tyr	Tirozin
UV	Ultraviyole
°C	Santigrat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Sınıf I integronların genel moleküler organizasyonu.....	33
Şekil 4.1 Türkiye kökenli <i>Salmonella</i> suşlarına ait PFGE profilleri.....	37
Şekil 4.2 Türkiye kökenli <i>Salmonella</i> suşlarına ait PFGE profilleri.....	38
Şekil 4.3 Türkiye kökenli <i>Salmonella</i> suşlarına ait PFGE profilleri.....	39
Şekil 4.4 Türkiye kökenli <i>Salmonella</i> suşlarına ait PFGE profilleri.....	40
Şekil 4.5 Türkiye kökenli <i>Salmonella</i> suşlarına ait PFGE profilleri.....	41
Şekil 4.6 Türkiye kökenli <i>Salmonella</i> suşlarına ait PFGE profilleri.....	42
Şekil 4.7 <i>S. Infantis</i> suşlarının plazmid içeriği.....	50
Şekil 4.8 <i>S. Infantis</i> suşlarının plazmid içeriği.....	51
Şekil 4.9 Verici suş, alıcı suş ve nalidiksik asit dirençlilik aktarımı sağlanan konjugantta plazmid içerikleri.....	54
Şekil 4.10 Konjugasyon denemelerinde kullanılan suşlarda <i>gyrA</i> primerleri.....	55
Şekil 4.11 Konjugatif plazmid (a) ve alıcı suş (b) genomundan <i>gyrA</i> gen bölgesinin DNA dizi analizi.....	56
Şekil 4.12 <i>S. Infantis</i> suşlarında I. sınıf integronların analizi.....	59
Şekil 4.13 Verici suş, konjugatif plazmid ve alıcı suşta I. sınıf integronların analizi.....	60
Şekil 4.14 Verici suş genomik DNA'sı ve konjugatif plazmid (206.5 kb) üzerinde çoğaltılan <i>gyrA</i> gen bölgesinin DNA dizi analizi.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin disk konsantrasyonları.....	19
Çizelge 3.2 Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) kuyucuk test planı ve analizlerinde kullanılan antimikrobiyel madde oranları.....	20
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan primerler ve PZR koşulları.....	25
Çizelge 4.1 PFGE profillerine göre <i>Salmonella</i> serotiplerinde oluşturulan suş grupları.....	43
Çizelge 4.2 <i>S. Infantis</i> suşlarında disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılık özellikleri.....	45
Çizelge 4.3 <i>S. Infantis</i> suşlarında antibiyotik dirençlilik düzeyleri.....	46

1. GİRİŞ

Soğuk kanlı hayvanlardan insana kadar çok geniş bir konakçı dizgesine sahip olan *Salmonella* suşları, dünyada en yaygın gıda kaynaklı hastalık etmenleridir. Bazı serotipler konakçı spesifik özellik göstermekle birlikte büyük çoğunluğu çapraz enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı tüm sıcak kanlı hayvan orijinli *Salmonella* serotipleri insan için potansiyel patojen olarak tanımlanmaktadır. Ana *Salmonella* bulaş kaynakları başta tavuk eti olmak üzere, sığır, domuz etleri, yumurta ve süt ürünleri olarak tanımlanmıştır. Kontamine gıdalar tüketildiğinde, *Salmonella* üyeleri midenin asidik koşullarını tolere eder ve ince barsakta kolonize olur. İnce barsak epiteline tutunmayı lamina propria'ya giriş izler. Bu bölgede tifoit olmayan *Salmonella* serotipleri lokal enfeksiyonu başlatır. *S. Typhi* ise bu aşamadan sonra sistemik enfeksiyona yol açar.

Antimikrobiyel ajanların sadece hastalıkların tedavisinde değil gıda üretiminde koruyucu olarak yaygın bir şekilde kullanımı, patojenlerde dirençlilik gelişimi için ciddi bir seçici baskı oluşturmaktadır. 1950'li yıllardan beri bakterilerin gerek doğal ve gerekse klinik izolatlarında artan ilaç dirençlilik fenotipleri tanımlanmaktadır. *Salmonella* serotiplerinde özellikle çoklu ilaç dirençlilik gelişimine paralel olarak, salgınlarda % 0.2 olan ölüm oranı % 4'e kadar ulaşmıştır. Çoklu ilaç dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonlarda bir diğer önemli sorun, tedavide kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde olasılıkların kısıtlanmasıdır. *Salmonella* suşları içerisinde tanımlanan en yaygın çoklu ilaç dirençlilik fenotipi *S. Typhimurium* DT104'tür. İlk kez bu suşta tespit edilen beş farklı antimikrobiyel ajana karşı dirençlilik, günümüzde özellikle geri kalmış ya da gelişmekte olan ülkelerde yaygın tespit edilebilir bir özellik haline gelmiştir. Çoklu ilaç dirençlilik özelliği gösteren *Salmonella* serotiplerinin başında, *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Infantis*, *S. Uganda*, *S. Agona*, *S. Newport*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg* ve *S. Typhimurium* gelmektedir.

S. Infantis, *Salmonella* enfeksiyonlarının ana kaynaklarından birini teşkil eden kanatlı etleri ve ürünlerinde en sık rastlanılan serotipler arasında yer almaktadır. Sığırlarda ve insanda salmonellozise yol açan bu serotipin klinik vakalardaki etkinliğinin hızlı bir

şekilde artışı, çoklu ilaç dirençlilik fenotipinin gelişimi ile doğrudan ilişkilidir. Klinik olmayan habitatlarda yüksek oranda ilaç dirençliliğine sahip *S. Infantis* suşlarının tanımlanması, bu suşların ilaçların seçici baskı oluşturduğu koşullarda dominant hale gelmesini teşvik etmektedir. Diğer yandan, ilaç dirençlilik genlerinin yatay gen transferi yolu ile tür içi ve türler arası aktarımının sağlanabilmesi, çoklu ilaç dirençli suşların gelişimi ve yayılmasında temel hareket noktasını oluşturmaktadır. İlaç dirençlilik gen kasetlerinin yakalanması ve yatay gen transfer sistemlerini yöneten determinantlarla ilişkilendirilmesinde rol oynayan temel yapılar integron elementleridir. Bu nedenle integronlar, *Salmonella*'da ilaç dirençlilik çalışmalarının ana unsurlarından biri haline gelmiştir.

Bu çalışmada Türkiye kökenli *S. Infantis* suşlarının çoklu ilaç dirençlilik özelliklerinin tanısı, bu özelliklerin integronlar ve konjugatif sistemler ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesi üyesi olan *Salmonella* cinsi; Gram-negatif, fakültatif anaerob, katalaz enzim sistemine sahip, basil morfolojisinde (0.7-1.5 X 2-5 µm) ve genellikle peritrik flagella ile hareket edebilen bakterileri içermektedir. Ancak *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* gibi bazı serotipler hareketsizdir. Sitrat gibi kompleks karbonhidratların da dahil olduğu birçok karbon kaynağının fermentasyonu sonucunda asit ve gaz oluştururlar. *Salmonella* cinsi üyelerinin optimum üreme sıcaklığı 35 °C-37 °C arasındadır (Edwards *et al.* 2002, Fluit 2005).

Salmonella cinsi; *S. enterica*, *S. bongori* ve *S. subterranea* olmak üzere üç tür içermektedir. *S. enterica* türü ise; *S. enterica subsp. enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* ve *indica* olarak adlandırılan altı alt türe ayrılmıştır (Fluit 2005).

Serotipler (serovaryete) ile türlerin karıştırılmasını engellemek ve adlandırmayı sadeleştirmek için, serotip esas alındığında alt tür adının gözardı edilmesi (*S. enterica subsp. I serotype Typhimurium* yerine, *S. enterica serotype Typhimurium* gibi) ya da kısa form (*S. Typhimurium*) kullanımı önerilmiştir. *S. enterica subsp. enterica* insan ve diğer sıcak kanlı hayvanları enfekte ederek sistemik ya da sistemik olmayan enfeksiyonlara yol açan gıda kökenli patojendir. Bugüne kadar kapsüller (Vi), flagellar (H) ve somatik (O) antijenleri esas alınmak suretiyle 3000'e yakın serovaryetesi tanımlanmıştır (Grabber *et al.* 1995, Chen *et al.* 2004, Gay *et al.* 2006). *Salmonella* üyeleri esas olarak insan ve hayvanların bağırsak sisteminde bulunmaktadır. Ancak son tanımlanan tür olan *S. subterranea* uranyumca zengin sedimentlerden izole edilmiştir. Bazı *Salmonella* serotipleri konakçı spesifik olsa da (*S. Typhi*, *S. Pullorum*, *S. Gallinarum* gibi) büyük çoğunluğu geniş bir konakçı dizgesine sahiptir (Voetsch *et al.* 2004, Suar *et al.* 2006).

Salmonella serotipleri, uygun koşullar altında suda ya da toprakta haftalarca yaşayabilirler. Suların rutin klorlanması, pastörizasyon ya da birçok genel

dezenfeksiyon ajanı kullanılarak bu bakteriler öldürülebilir. Ancak sağlıklı çiftlik hayvanları ve evcil kanatlılarda da söz konusu serotipler kolonize olabilmekte ve bu yolla hayvandan insana geçiş gerçekleşmektedir. *Salmonella* tüm dünyada gıdalar aracılığı ile enfeksiyona yol açan en önemli etmendir. *Salmonella* enfeksiyonu açısından en tehlikeli gıdalar; kümes hayvanları eti, kıyma, sosis, yumurta ürünleri, su ürünleri, dondurma, süt tozu ve krema olarak tanımlanmıştır. Ayrıca çeşitli soslar ve salatalar, pudingler ve diğer süt ürünleri de *Salmonella* riski taşıyan gıdalar arasında yer almaktadır. Ham madde işleme teknolojisi, depolama ve pazarlama koşulları *Salmonella* riskinin büyümesine neden olmaktadır. *Salmonella*'nın yol açtığı gastroenterit'in şiddeti konakçının yaşına bağlıdır. Yenidoğanlarda, bebeklerde ve yaşlılarda salmonellozis daha şiddetli bir seyir gösterir (Helms *et al.* 2005, Raffatellu *et al.* 2005, Gibson *et al.* 2005).

2.2 S. Infantis'in Salmonellozis'teki Önemi

İnsanlarda salmonellozisin ana kaynaklarından biri kümes hayvanları ve onların ürünlerinin tüketimidir. Diğer et ürünleri ve gıdalar yanında, kanatlı üretiminde en yaygın rastlanılan serotiplerden biri *S. Infantis*'dir. İnsan ve sığır salmonellozisine neden olan bu serotip, Kauffman-White şemasında O antijenleri bakımından C₁, faj1 H antijenleri bakımından "r" ve faj2 H antijenleri bakımından "1.5" olarak tanımlanmıştır (Ando *et al.* 2003, Hamada *et al.* 2003). Halen *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* insanda salmonellozise yol açan en yaygın serotiplerdir. Ancak son yirmi yılda özellikle gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerde yürütülen çalışmalarda bu iki serotipin baskınlığının giderek azaldığı ve *S. Infantis* başta olmak üzere, başka serotiplerin sıklığının arttığı tespit edilmiştir (Zhao *et al.* 2003, Chen *et al.* 2004, Jacoby *et al.* 2006, Asai *et al.* 2007). İlk *S. Infantis* kökenli salgın 1971 yılında Finlandiya'da meydana gelmiş ve bu salgının kaynağının broiler üretimi olduğu saptanmıştır. Büyükbaş hayvan çiftliklerinde ise 1992 yılında aynı serotipin yol açtığı salgınlar belirlenmiştir. İlk tanımlanan yaygın *S. Infantis* kökenli insan salmonellozis salgını 1993 yılı ağustos ayında Danimarka'da meydana gelmiştir. Bu salgında 500 kişi salmonellozis tedavisi görmüştür. Bu salgın üzerinde yürütülen epidemiyolojik çalışmalarda, salgının domuz etlerinden kaynaklandığı saptanmıştır (Wegener and Baggesen 1996, Jacoby *et al.*

2006). Bu süreçten sonra *S. Infantis*'in neden olduğu büyük çaplı salmonellozis salgınları İngiltere, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri ve çok sayıda Afrika ülkesinde tanımlanmıştır (Chen *et al.* 2004, Gay *et al.* 2006). Kanatlılar ve büyükbaş hayvanlar yanında, insan salmonellozisinde de *S. Infantis* hızlı bir şekilde etkinliğini arttırmaktadır. Günümüzde *S. Infantis* insan salmonellozisinde en etkin üçüncü serotip olarak tanımlanmaktadır (Jacoby *et al.* 2006, Chessa *et al.* 2008a).

S. Infantis'in *Salmonella* enfeksiyonlarında etkinliğinin hızlı bir şekilde artması, tüm çiftlik hayvanlarında yaygın olarak bulunan bir serotip olması yanında, çoklu ilaç dirençlilik regülasyonunda içerdiği genetik elastisiteden kaynaklanmaktadır. Günümüzde tüm dünyada çoklu ilaç dirençlilik sistemlerinin tespit edildiği serotiplerin başında *S. Typhimurium* ve *S. Infantis* gelmektedir (Tükel *et al.* 2007, Chessa *et al.* 2008b).

2.3 *Salmonella*'da Çoklu İlaç Dirençlilik Gelişimi

Mikroorganizmalar antibiyotiklere ve diğer kimyasal terapötik ajanlara karşı dirençlilik kazanmada; hidroliz yolu ile inaktivasyon (β -laktamaz gibi), modifikasyon (aminoglikozid dirençlilik gibi), hedef değiştirme (florokinolon dirençlilikte mutant DNA girazın ya da metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'ta metisilin dirençli transpeptidazın üretimi gibi), hedef ile temasın engellenmesi ve hücre içine giren ajanın hücre dışına atılması başta olmak üzere değişik mekanizmalar kullanmaktadır (Nikaido 1998). Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde en etkin çoklu ilaç dirençlilik mekanizması, ilacın hücre dışına atılmasıdır. Bu mekanizmada ya basit taşıyıcı proteinler ya da kompleks membran füzyon proteinleri rol almaktadır (Cloeckaert and Schwarz 2001).

Antibiyotik ve diğer kimyasal terapötik ajanların kullanımının yaygınlık kazanmasının en önemli yan etkisi, insan ve hayvanlarda sadece patojenlerin değil, aynı zamanda normal flora üyelerinin de adaptif mutasyonlar aracılığı ile direnç kazanmasıdır. Bu kazanılan direnç sistemlerinin tür içi ya da yakın akraba türler arasında aktarımı yanında

uzak akraba türler arasında da aktarımının sağlanabilmesi özellikle patojenlerde çoklu ilaç dirençlilik gelişiminin esasını teşkil etmektedir (Chakravorty *et al.* 2002). *Salmonella*'da çoklu ilaç dirençlilik özelliğine sahip serotipler 1980'li yıllarda tanımlanmaya başlanmıştır. Bununla paralel olarak tüm dünyada çoklu ilaç dirençli suşların neden olduğu salgınlar ortaya çıkmıştır. Çoklu ilaç dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların kontrolü, günümüzde en ciddi sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir (Desvaux *et al.* 2004, Coombes *et al.* 2005). Türkiye'de *Salmonella* serotiplerinde antibiyotik ve diğer kimyasal ajanlara dirençlilik üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Klinik ve gıda kökenli izolatlar ile yürütülen çalışmalarda florokinon türevlerine, nalidiksik asite, streptomisine, kanamisine, ampisiline ve seftriaksona karşı yaygın direnç gelişimi saptanmıştır (Ang-Küçüker *et al.* 2000, Erdem *et al.* 2005, Yazıcıoğlu *et al.* 2005, Avşaroğlu *et al.* 2007). Dünyada da, Türkiye ile paralel bir şekilde, en fazla görülen çoklu ilaç dirençlilik fenotipleri; ampisilin, kloramfenikol/florfenikol, streptomisin/spektinomisin, sulfonamidler ve tetrasiklinlerin kombinasyonlarını içermektedir (Velge *et al.* 2005, Peirano *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2006, Wilson *et al.*, 2008).

Salmonella'da çoklu ilaç dirençlilik genleri kromozomal ya da plazmid DNA kökenli olabilmektedir. Konjugatif plazmidler aracılığı ile bu genlerin yakın ya da uzak akraba türlere aktarımı yanında, kromozomal DNA kökenli çoklu ilaç dirençlilik genlerinin integronlara bağlı konjugatif transpozonlarla aktarımı da gerçekleşebilmektedir. Bu genetik transfer mekanizmaları, ilaç dirençliliğinin doğal suşlar arasında hızla yayılmasının ana nedenidir (Fluit 2005, Rychlik *et al.* 2006, Langille *et al.* 2007, Chessa *et al.* 2008b).

2.4 *Salmonella*'da İlaç Dirençliliğinin Yayılmasında Plazmidlerin, Transpozonların ve İntegronların Rolü

2.4.1 Plazmidler

Plazmidler; mayalar, bakteriler ve arkelerde yaygın olarak bulunan replikasyon yeteneğindeki kromozom dışı DNA yapıları olarak tanımlanmaktadır. Genellikle

taşıdıkları genetik bilgi, bulundukları organizmaların atipik koşullara adaptasyonunu sağlar. Plazmidlerin sınıflandırılmasında kullanılan kriterlerden biri, gen fonksiyonlarıdır. Bu esasa göre plazmidler; dirençlilik plazmidleri (antibiyotik, ağır metal iyonları ve ultraviyole ışınlara direnç gibi), virülenslik plazmidleri, bakteriyosin üretimi ve dirençliliği kodlayan plazmidler, toksik organik bileşikler parçalayan plazmidler ve konjugatif plazmidler olmak üzere beş ana gruba ayrılmaktadır. Plazmidler aynı zamanda bakteriyofaj DNA'sı ile de stabil entegrasyon yapıları oluşturabilmektedir. Plazmidlerin taşıdığı genler, çoğunlukla transpozonlar ve insersiyon elementleri gibi hareketli genom bölgeleri ile ilişkilidir. Bu sayede söz konusu genlerin bölge spesifik rekombinasyon aracılığı ile yer değiştirmesi mümkün olmaktadır. Bazı durumlarda transpozisyonel yapılar, plazmidlerle kromozomlar, virüsler ya da başka plazmidler arasında da oluşabilmektedir. Bu durumun en tipik örneği ilaç dirençlilik genlerinde saptanmıştır (Helinski 2004).

Plazmidler; düzlemsel ya da çevrimsel yapıda, 1 kb (kilo baz) – 1 Mb (mega baz) arasında moleküler büyüklüğe sahip olabilen DNA yapılarıdır. Bakteriler aynı anda çok sayıda plazmid içerebilmektedir. Çevrimsel plazmidler genellikle kovalent olarak kendi üzerine kapanmış (ccc) formda bulunmaktadır. Düzlemsel plazmidlerde ise, uç bölgelerinde saç tokası yapıları ya da kovalent bağlanmış terminal protein kompleksleri tipiktir. Replikasyonlarında farklı stratejiler kullanan bu kromozom dışı DNA elementleri, kopya sayısı genlerinin regülasyonuna bağlı olarak, hücrelerde değişik sayılarda bulunabilmektedir. Plazmid kopya sayısı ile moleküler büyüklükleri arasında ters bir orantı saptanmıştır. Plazmid büyüklüğü arttıkça kopya sayısında düşme meydana gelmektedir (Stewart *et al.* 2004).

2.4.1.1 *Salmonella* cinsinde plazmidlerin fonksiyonları

Salmonella üyelerinde genellikle büyüklükleri 1-250 kb arasında değişen gösteren plazmidlerin varlığı saptanmıştır. Bazı suşlarda hiç plazmid bulunmazken, bazılarında içerdikleri farklı plazmidlerin sayısı 10'a kadar çıkabilmektedir. 20 kb'dan küçük *Salmonella* plazmidleri genellikle kriptik (fonksiyonu bilinmeyen) plazmidlerdir.

Salmonella plazmidlerinin sınıflandırılmasında kullanılan ana kriter uyumsuzluk gruplarıdır. Genel plazmid sınıflandırılmasında olduğu gibi *Salmonella* cinsinde de plazmid sınıflandırmasında kullanılan bir diğer kriter kodladıkları fenotipik özelliklerdir (Montenegro *et al.* 1991). Bu esas doğrultusunda *Salmonella* plazmidleri; virülenslik, dirençlilik (ilaç, UV, ağır metaller gibi), metabolik ve konjugatif plazmidler olmak üzere dört ana başlık altında incelenmektedir (Barrow and Lovell 1989, Montenegro *et al.* 1991).

S. Typhimurium, *Enteridis*, *Dublin*, *Cholerae-suis*, *Gallinarum*, *Pullorum* ve *Abortus-ovis* gibi belli başlı *Salmonella* serotipleri özgül virülenslik plazmidleri içermektedir. Söz konusu plazmidlerin konakçılarında stabil bir şekilde varlıklarını sürdürmesini sağlayan replikasyon ve stabilite bölgeleri, genetik analizler sonucu tanımlanmıştır. Korunmuş seriler içeren bu bölgelerden; *IncFIB*, *repAZ*, *IncFIIA* ve *repA* kromozomdan bağımsız replikasyonu, *parAB* ise hücre bölünmesi esnasında plazmidlerin yavru hücrelere dağılımını kontrol etmektedir. *IncFI* ve *IncFII* ile *IncI* ve *IncH* en iyi tanımlanan uyumsuzluk gruplarıdır (Ou 1993). Tüm *Salmonella* virülens plazmidlerinde *spvRABCD* genlerinin varlığı belirlenmiştir. Ayrıca serotiplere bağlı olarak *rck* (konakçı saldırısına direnç) ve *pef* (plazmid tarafından üretimi kontrol edilen fimbriya), *srgA* (disülfid oksidoredüktaz) ve *mig-5* (makrofaj teşvik geni – karbonik anhidraz) genleri de bulunabilmektedir (Wallis *et al.* 1995). Temel virülenslik genleri olan *spvABCD*'nin regülasyonu, *spvR* geni ürünü tarafından yapılmaktadır. *spvB* ve *spvC* genleri temel efektör proteinleri (*Salmonella*'nın konakçı epitelini ve makrofajları işgalini yöneten proteinler) kodlamaktadır (Lesnick *et al.* 2001). *Salmonella* genom dizi analizi ve plazmid biyolojisi çalışmaları; plazmid kodlu virülenslik genlerinin evriminin temel gücünü, *Salmonella*'da diğer patojenite adalarının evriminde de olduğu gibi, yatay gen transferinin (konjugasyon, transformasyon, transdüksiyon) oluşturduğuna işaret etmiştir (McClelland *et al.* 2001, Eriksson *et al.* 2003).

Salmonella'da yüksek moleküler büyüklüğe sahip plazmidlerin büyük bir çoğunluğu konjugatif özellikte olup, çoklu ilaç dirençlilik fenotipini kontrol etmektedir. Bu bakterilerde ilaç dirençlilik genleri genellikle transpozonlar ile ilişkili olduğundan plazmidlerden kromozoma ya da kromozom üzerinden plazmidlere kopya aktarımı

mümkün olmaktadır. Gerek konjugatif özellikleri ve gerekse transpozonların varlığı nedeni ile plazmidler *Salmonella* serotiplerinde sadece ilaç dirençliliğinin sağlanmasında değil, bu özelliğin tür içi ve türler arası aktarımı yolu ile yayılmasında da etkin bir rol oynamaktadır. Diğer yandan ilaç dirençlilik gen kasetlerinin ilişkili olduğu integronlar aracılığı ile söz konusu plazmidlerin kromozomal entegrasyonu (epizomal karakter) da gerçekleşebilmektedir. Bu durum ilaç dirençliliğinin stabilitesinde büyük önem taşımaktadır (Guerra *et al.* 2002, Schwarz *et al.* 2006).

Bugüne kadar değişik *Salmonella* serotiplerinde tespit edilen en yaygın plazmid kodlu-antibiyotik dirençlilik özelliği β -laktam grubuna karşı geliştirilen direnç sistemlerini kapsamaktadır. β -laktamlar, bakteri hücre duvarında penisilin bağlanma proteininin ilişkilendiği transpeptidasyon bölgelerini bloke etmek suretiyle bakteriyosidal etki gösterirler. β -laktam antibiyotikler; penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemler olmak üzere üç büyük grup altında toplanmaktadırlar. Özellikle penisilinlerin yaygın klinik kullanımlarından dolayı, bu grup antibiyotiklere karşı *Salmonella* suşlarında yüksek dirençlilik gelişimi meydana gelmiştir (Walsh 2003, Alcaine *et al.* 2007). *Salmonella*'da β -laktam dirençlilik, β -laktamaz enzimi tarafından sağlanmaktadır. Bu enzim β -laktam halka yapısını hidrolize etmek suretiyle, antimikrobiyel aktiviteye sahip olmayan β -aminoasitlerin oluşumuna yol açar. *Salmonella*'da β -laktamaz üretiminden sorumlu genler genellikle serotiplerde farklı büyüklüklerde olabilen plazmidler üzerinde kodlanmaktadır. Ancak bazı serotiplerde, nadir de olsa, kromozomal DNA üzerinde kodlanan β -laktamaz genleri de saptanmıştır. Plazmid kodlu *Salmonella* β -laktamazları, metallo- β -laktamazlar grubunda (Grup C β -laktamazlar) yer almaktadır. Grup A, B ve D β -laktamazlar ise *Salmonella* serotiplerinde daha nadir saptanan β -laktamazlardır (Li *et al.* 2007, Livermore *et al.* 2007).

Kinolon ve florokinolonlar, sentetik bakteriyosidal ilaçlardır. Medikal kullanım izni alan ilk kinolon, nalidiksik asittir. Bugüne kadar farklı kuşak kinolonlarının üretimi gerçekleştirilmiştir ve geliştirilmelerine devam edilmektedir. Kinolonların hedefi DNA giraz ve DNA topoizomera IV enzimleridir. *Salmonella* izolatlarında yaygın nalidiksik asit direncinin ve düşük düzeyde de olsa florokinolonlara karşı direnç gelişiminin belirlenmesi, bu grup antimikrobiyallerin de kullanımında sorunlar yaratmaya

başlamıştır. *Salmonella* serotiplerinde ilk belirlenen kinolon dirençlilik mutasyonları, plazmid ve kromozomal DNA kodlu *gyrA* ve *gyrB* genlerinde tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar sonucunda genellikle 83. pozisyonundaki serin (Ser-83) fenilalanin, tirozin ya da alanine veya 87. pozisyonundaki aspartik asit glisin, asparajin ya da tirozine dönüşmektedir. Diğer mutasyon tipi olan *parC*'de ise 57. pozisyonundaki treonin serine dönüşmektedir. Florokinolonlara direnç sağlamada da plazmid ve kromozomal DNA kökenli genlerde meydana gelen çok sayıda mutasyonun varlığı belirlenmiştir. Bu mutasyonlar özellikle hücre dışına madde akışını kontrol eden pompalar üzerine etki etmektedir. Plazmidler üzerinde en yaygın olarak kodlanan kinolon dirençlilik *qnr* geni tarafından sağlanmaktadır. Bu gen ürünü DNA giraz enzimine bağlanmak suretiyle hücreleri kinolon inhibisyonundan korumaktadır. *qnr* geni içeren plazmidlerin genellikle konjugatif özellikte saptanması, söz konusu dirençlilik özelliğinin hızlı bir şekilde yayılmasını açıklamaktadır (Alcaine *et al.* 2007, Kehrenberg *et al.* 2007).

Salmonella'da aminoglikozitlere karşı dirençlilik, aminoglikozitlerin enzimler aracılığı ile modifikasyona uğratılması sonucunda meydana gelmektedir. *Salmonella* genomik adalarında (SGI) kodlanan aminoglikozit asil transferazlar özellikle gentamisin, tobramisin ve kanamisine, aminoglikozit fosfotransferazlar ise streptomisine karşı dirençliliğin sağlanmasında önemli rol üstlenmektedir. Aminoglikozitlere karşı dirençlilik oluşumunda rol oynayan son grup enzimler olan nükleotidil transferazlar ise, genellikle integronlara bağlı gen kasetleri içerisinde yer aldığı için plazmid ve kromozomal DNA moleküllerinin her ikisi üzerinde de bulunabilmektedir (Villa and Carattoli 2005, Alcaine *et al.* 2007).

Kloramfenikol ve florfenikolleri içeren fenikol grubuna karşı dirençlilik *Salmonella* genomik adalarında yer alan ve yüksek düzeyde hareketlilik içeren *floR* geni tarafından kodlanmaktadır. Bugüne kadar fenikol dirençlilikten sorumlu herhangi bir plazmid tanımlanmamıştır (Schwarz *et al.* 2006, Suh and Odeh 2008).

Geniş konakçı etkinliği nedeniyle klinik kullanımında çok tercih edilen tetrasiklinler 30S ribozomal alt ünitenin A bölgesine bağlanmak suretiyle bakteriyel protein sentezini inhibe etmektedir. *Salmonella* serotiplerinde tetrasiklin dirençliliğinin ana mekanizması

akış pompaları ile ilacın hücre dışına atımıdır. Bakteri gruplarında yaygın olarak rastlanan bir diğer dirençlilik olan tetrasiklinin enzimatik inaktivasyonu *Salmonella*'da belirlenememiştir. *Salmonella*'da oksitetrasikline dirençlilikte rol oynayan 32 farklı gen saptanmıştır. Bu genler çoğunlukla *Salmonella* genomik adası I ve konjugatif transfer yeteneğinde olan değişik moleküler büyüklükteki plazmidler üzerinde yer almaktadır (Walsh 2003, Halawani and Shohayeb 2008).

Son antimikrobiyel grup olan sülfonamidler ve trimetoprim bakteriyostatik etkiye sahip bileşiklerden oluşmaktadır. Söz konusu bileşikler tetrahidrofolik asit sentezini inhibe etmek suretiyle etkilerini göstermektedir. Salmonellozisin tedavisinde trimetoprim ve sülfonamid kombinasyonlarının kullanımı uzun zamandır en uygun tedavi yöntemi olarak belirlenmiş olduğu için, bu bakterilerde söz konusu bileşiklere karşı geniş bir dirençlilik gelişimi meydana gelmiştir. Sulfanomid dirençliliğinin sağlanmasında *sul* geni rol oynamaktadır. *sul* geni ürünü dihidropteorat sintaz enzimidir. *Salmonella*'da tanımlanan temel *sul* genleri *sul1*, *sul2* ve *sul3*'tür. *Salmonella* serotiplerinde en yaygın olarak bulunan *sul1* geni konjugatif transfer yeteneğinde olan plazmidler üzerinde ve integronlara bağlı olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde nadir rastlanan *sul2* ve *sul3* genlerinin de konjugatif plazmidler tarafından taşındığı saptanmıştır. Söz konusu genlerin *Salmonella* genomik adalarında kopyalarının tespit edilmesi, integron davranışı ile açıklanmaktadır (Zhao *et al.* 2006, Hradecka *et al.* 2008, Saeed *et al.* 2009).

2.4.2 Transpozonlar

Transpozonlar, bulundukları organizmanın genomunda farklı pozisyonlara hareket etme yeteneğindeki DNA parçalarıdır. Transpozisyon olarak adlandırılan bu süreç mutasyonlara neden olmanın yanında, genomdaki DNA miktarının artmasında da rol oynamaktadır. Bu hareketli DNA parçaları aynı zamanda “sıçrayan genler” olarak da adlandırılmaktadır. Bölge spesifik ve bölge spesifik olmayan rekombinasyon yapma yeteneğindeki bu DNA parçaları, diğer bakterilerde olduğu gibi *Salmonella* cinsi üyelerinde de yaygın bir şekilde bulunmaktadır. *Salmonella* genomunda hem

kromozomal DNA hem de plazmidler üzerinde çok sayıda farklı transpozon kopyası belirlenmiştir (Waturangi *et al.* 2003).

Antibiyotik dirençlilik adaptif bir mekanizma olduğu için, dirençlilik ve virülenslik genleri evrimleşmeleri açısından büyük oranda ortak özellikler içermektedirler. Her iki özelliği kodlayan genler veya gen grupları kromozomal DNA ve plazmid DNA üzerinde bulunabilmektedir. Bu genlerin genomda farklı DNA molekülleri üzerinde bulunması, hareketli elementler ya da virüsler tarafından taşınması ile gerçekleşmektedir. Antibiyotik dirençlilik genlerini taşıyan çok sayıda transpozon ya da insersiyon elementi tanımlanmıştır (Pasquali *et al.* 2005). *Salmonella*'da tetrasiklinlere dirençliliği kodlayan genler genellikle transpozonlarla birleşik olarak bulunmaktadır. *tetA* (membran ilişkili pompa proteini) bu bakterilerde Tn1721 olarak adlandırılan 11.1 kb büyüklükte ve konjugatif özellik içermeyen bir transpozonun yapısında bulunmaktadır. Söz konusu transpozonun hareketliliği, konjugatif plazmidler tarafından sağlanmaktadır. Bazı *Salmonella* serotiplerinde Tn1721 transpozonu ile β -laktamlara dirençliliği kodlayan Tn3 transpozonunun konjugatif olmayan plazmidler ve kromozom üzerinde birleşik kopyaları saptanmıştır. Bu durumda birleşik element, iki farklı grup antimikrobiyel ajana karşı dirençlilik sağlamaktadır. Bu birleşik yapıların *Salmonella*'da çoklu ilaç dirençlilik genlerinin gelişimi ve genomik adaların evriminde önemli rol oynadığına inanılmaktadır (Su *et al.* 2006).

Gram-negatif bakterilerde streptomisin dirençliliği sağlayan *aph(6)-1a(strA)* ve *aph(6)-1d(strB)* genleri yaygın olarak bulunmaktadır. Bu *strA* ve *strB* genleri *Salmonella* serotiplerinde Tn5393 transpozonu üzerinde tanımlanmıştır. Diğer yandan, *Erwinia amylovora* (bitki patojeni)'da tanımlanan bir insersiyon serisi olan IS1133'ün, Tn5393 içeren *Salmonella* suşlarına aktarımı halinde streptomisin dirençliliğinin düzeyinin yüksek oranda arttığı belirlenmiştir. Bu durum *Salmonella*'da ilaç dirençliliğinin gelişiminde türler arası yatay gen transferinin de etkin bir mekanizma olduğuna işaret etmektedir (Galimand *et al.* 2005, Su *et al.* 2006).

Salmonella'da aminoglikozidlere dirençliliği sağlayan *armA* (aminoglikozid dirençli metilaz geni) *Tn1548* transpozonunda tanımlanmıştır. Bu transpozonu plazmidleri ya da kromozomal DNA'ları üzerinde taşıyan suşlar özellikle deoksistreptaminler ve formisitine karşı dirençli hale gelmektedir. Bu gen ilk kez *Klebsiella pneumoniae*'nin Inc/M grup plazmidi olan IP1204 üzerinde belirlenmiştir. Söz konusu plazmid üzerinde aynı zamanda CTX-M-3 β -laktamaz geni de tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* ve *Salmonella* klinik izolatlarının tümünde streptomisin/spektinomisin, sulfonamidler ve trimetoprim dirençlilik genlerinin de *Tn1548* transpozonun yapısında bulunduğu saptanmıştır. Bu genetik element iki ucunda bulunan IS6 serisi ve replikatif transpozisyon yolu ile genomda kopya sayısını çoğaltmaktadır (Miriagou *et al.* 2006).

Aminoglikozid modifiye eden enzimler genellikle I. ve II. sınıf integronlar üzerinde yer almaktadırlar. *Salmonella* ve diğer Gram-negatif bakterilerde yürütülen çalışmalarda I. sınıf integronların genellikle *Tn21*, *Tn1696* ve *Tn1412* transpozonları ile birleşik olduğu belirlenmiştir. *Tn21* transpozonu streptomisin/spektinomisin dirençlilik genini taşıyan *Inc2* integronu ile birleşik halde ve *IncFI* plazmidleri üzerinde tespit edilmiştir. II. sınıf integronlar ise genellikle *Tn7* transpozonu üzerinde lokalize olmaktadır. *Salmonella* suşlarında da yaygın olarak bulunan bu transpozonların yapısında yer alan *dfrA1-sat 1-aad1* gen kasetleri, çoklu ilaç dirençlilik fenotipinin ortaya çıkmasında görev almaktadır. Kromozomal DNA üzerinde yer alan bu gen kasetleri lateral ve vertikal gen aktarımı yolu ile çoklu ilaç dirençli *Salmonella* suşlarının evriminde önemli bir rol üstlenmektedir (Miko *et al.* 2003, Miriagou *et al.* 2006, Alcaine *et al.* 2007, Hradecka *et al.* 2008).

2.4.3 İntegronlar

İntegronlar, açık okuma kalıpları (ORF) ile birleşerek onları fonksiyonel genlere dönüştüren gen ifade sistemleridir. Bir integronda; integras geni (*IntI*), bağlanma bölgesi (*attI*) ve promotor temel yapılarıdır. *Salmonella*'da ilaç dirençlilik gen kasetleri

içeren ve diğer Gram-negatif bakterilerde de yaygın olarak bulunan dört sınıf integron tanımlanmıştır (Klemm *et al.* 2000).

I. sınıf integronlar 5' ve 3' uçlarında korunmuş seriler içerirler. 5' korunmuş serileri *IntI*, *attI* genleri ve promotor bölgelerinden, 3' korunmuş serileri ise sülfonamidlere dirençlilik genlerinden (*sul1*) oluşmaktadır. 3' korunmuş serilerinde aynı zamanda dezenfektan olarak kullanılan kuarterner amonyum bileşiklerine dirençliliği kontrol eden *qacEΔ1* geni yer almaktadır. Bu integronlarda antibiyotik dirençlilik gen kasetleri 5' ve 3' korunmuş seriler arasında tanımlanmıştır. InO olarak tanımlanan integron gibi bazı integronlarda hiç bir ilaç dirençlilik gen kaseti bulunmazken, bazı I. sınıf integronlarda yedi adete varan sayıda ilaç dirençlilik gen kaseti tespit edilmiştir. Bugüne kadar I. sınıf integronların yapısında yer alan 60'dan fazla ilaç dirençlilik gen kaseti tanımlanmıştır (Edwards *et al.* 2002, Fluit 2005, Villa and Carattoli 2005).

Sulfatiaksazol, tetrasiklin, trimetoprim, streptomisin/spektinomisin dirençlilik kodlayan genleri içeren II. sınıf integronlar genellikle Tn7 transpozonu ile ilişkili olarak bulunmaktadır. Bu gen kasetleri II. sınıf integronların 5' korunmuş serileri ile bitişiktir. II. sınıf integronların hiçbirinde sülfonamidlere dirençlilik oluşturan gen kasetleri tespit edilmemiştir. Söz konusu integronlar ayrıca TN7 transpozonunun hareketliliğini kontrol eden genler de içermektedir. Bu sayede hem bulundukları genomda kopya sayılarının artırılması ve hem de yatay gen transferi yolu ile yayılmaları mümkün olmaktadır (Carattoli 2001, Fluit and Schmitz 2004, Mammeri *et al.* 2005, van Essen-Zandbergen *et al.* 2007).

Bugüne kadar *Salmonella*'da tanımlanan tüm III. sınıf integronların; karbapenemi de içeren geniş etki spektrumuna sahip β-laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençlilik genlerini taşıdığı saptanmıştır. Diğer integronlardan oldukça farklı bir integras enzimine sahip olan bu elementler, atipik rekombinasyon bölgeleri ile ilişkilendirilmektedir (Magnus and Mazel 2002, Villa and Carattoli 2005, Lapierre *et al.* 2008).

Gram-negatif bakterilerde yaygın olarak bulunan ve konjugatif plazmidler ya da transpozonlar aracılığı ile yatay transferi gerçekleştirilen IV. sınıf integronların değişik türlerde yüzlerce gen kaseti taşıdığı belirlenmiştir. Bazı bakterilerde çok kopya halinde bulunan bu yapılar integron adalarını oluşturmaktadır. *Salmonella*'da çoklu ilaç dirençliliğinin gelişiminde önemli role sahip bu integronların antibiyotik dirençlilik adalarının evrimini yönlendirdiği öne sürülmektedir (Lapierre *et al.* 2008).

Salmonella'da ilaç dirençlilik genlerinin kazanımından sorumlu ana ajanların integronlar olduğu çok sayıda araştırma ile tanımlanmıştır. Başka kaynaklardan gen kasetlerini alabilen bu genetik elementler, bakteriler arasında kendi yatay transferlerini gerçekleştirme yeteneğinde değildir. Ancak virüsler, konjugatif plazmidler ve transpozonlar aracılığı ile bakteriler arasında yayılabilmekte ve özellikle çoklu ilaç dirençli fenotiplerin oluşumuna yol açabilmektedir (Hradecka *et al.* 2008, Lapierre *et al.* 2008).

2.5 *Salmonella*'da Yatay Gen Transferi

İlaç dirençlilik, başka kaynaklardan kazanma ya da içsel (insinrik) olmak üzere iki yolla oluşmaktadır. İçsel dirençliliğin moleküler kaynağı mutasyonlar, kazanılmış dirençliliğin kaynağı ise yatay gen transferi ve rekombinasyonlardır. Temel olarak; transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon sistemlerinden oluşan yatay gen transferi mekanizmaları bakteriyel genomların evriminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu sistemler içerisinde tür içi ve türler arası gen aktarımında en etkin olanı konjugasyondur. Konjugasyon özetle; bakteri hücrelerinin fiziksel teması sonucu genetik materyalin verici hücreden alıcı hücreye tek yönlü aktarımı olarak tanımlanmaktadır. Konjugasyonu gerçekleştiren genetik yapılar, transfer genleri içeren (konjugatif özellik) plazmidler ya da transpozonlardır (Pepper 2003). Diğer yatay gen transferi mekanizmalarında olduğu gibi; konjugasyonda da, kromozomdan bağımsız plazmid aktarımı hariç, rekombinasyon gen kazanımının ana kaynağını teşkil etmektedir (Hastings *et al.* 2004).

Daha önce de ifade edildiği gibi, *Salmonella*'nın da dahil olduğu çoklu ilaç dirençlilik özelliğine sahip patojen gruplarında söz konusu fenotipin genetik kaynağını integronlar teşkil etmektedir. İntegronlar *Salmonella* genomik adalarında transpozonlarla, kromozom dışında ise bağımsız replikonlar olan plazmidler ile ilişkilidir. İlaç dirençlilik gen kasetlerini yapılarına alan bu hareketli DNA elementlerinin konjugasyon sistemleri kullanılarak hem tür içi hem de türler arası aktarımı gerçekleştirilebilmektedir. Konjugatif hareketlilikte zorunlu genler plazmidler ya da transpozonlar içerisinde yer alırken, yeni hücreye (alıcı) aktarılan ilaç dirençlilik genlerinin kromozomal rekombinasyonu, integronların korunmuş serileri tarafından yönetilmektedir (Wright 2007).

Güçlü bir seçici baskı altında evrimleşen ilaç dirençlilik genlerinin aynı populasyon içinde dominant hale geçmesi doğal bir süreçtir. Ancak farklı habitatlardaki aynı tür üyeleri (klinik ve klinik olmayan habitatlardaki suşlar gibi) ve farklı türler arasında antibiyotik dirençlilik genlerinin yayılmasında yatay gen transferi mekanizmaları rol oynamaktadır. Seçici baskı altında direnç genlerinin yeni modifikasyonlarının oluşması ve integronların gen kasetleri halinde bu genleri (çoğunlukla birden fazla antibiyotik genini) yakalaması konjugatif hareketliliğin başlangıç noktasını oluşturmaktadır. Söz konusu integronların konjugatif transpozonlar ya da plazmidler ile ilişkilenebilmesi suretiyle de tür içi ve türler arası yayılımı gerçekleştirilmektedir. *Salmonella*'da konjugatif sistemler aracılığı ile yayılan dirençlilik özellikleri; başta β -laktam grubu antibiyotikler olmak üzere, sülfonamidler, kinolon ve florokinolonlar, tetrasiklinler ve aminoglikozid gruplarının değişik üyelerinde tanımlanmıştır (Paterson and Bonomo 2005, Su *et al.* 2006, Alcaine *et al.* 2007, Martinez *et al.* 2008).

Salmonella'da çoklu ilaç dirençliliğinin gelişiminin moleküler mekanizmalarının çalışılması yanında, genom evriminin anlaşılmasında da konjugasyon sistemleri model olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan en yaygın gen grupları β -laktam dirençliliği kodlayan genlerdir (Martinez *et al.* 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriler

Çalışmada kullanılan *Salmonella* suşları, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Kültür Koleksiyonundan sağlandı. *Salmonella* suşları LB broth ortamında 37 °C’de 18 saat süreyle geliştirildi ve % 60 gliserol içeren steril LB broth ile 1:1 (hacim/hacim) oranında karıştırılarak 2 mL’lik steril stok kültür tüplerinde -20°C’de saklandı.

3.1.2 Antibiyotikler

Araştırmada kullanılan antibiyotiklerin disk ve çözelti konsantrasyonları sırası ile Çizelge 3.1 ve 3.2 de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan antibiyotikler disk konsantrasyonları (Oxoid Ltd., UK).

Antimikrobiyel Madde (Sembol)	Grubu	Disk konsantrasyonu (µg)
Kanamisin (KAN)	Aminoglikozid	30
Neomisin (NEO)	Aminoglikozid	10
Nalidiksik asit (NAL)	Kinolon	30
Tetrasiklin (TET)	Tetrasiklin	30
Spektinomisin (SPE)	Aminoglikozid	10
Sülfonamit (SUL)	Sülfonamit	300
Trimetoprim (TMP)	Antifolat	5
Ampisilin (AMP)	β -laktam	10
Amoksisilin/klavulanik asit (AMC)	β -laktam	30
Seftiofur (EFT)	β-laktam	30
Kloramfenikol (CHL)	Fenikol	30
Florfenikol (FFC)	Fenikol	30
Gentamisin (GEN)	Aminoglikozid	10
Siprofloksasin (CIP)	Kinolon	5
Trimetoprim/sulfametoksazol (SXT)	Antifolat/Sülfonamit	25
Streptomisin (STR)	Aminoglikozid	10

Çizelge 3.2 Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) kuyucuk test planı ve analizlerinde kullanılan antimikrobiyel madde oranları

KAN 512 µg/ml	TET 512 µg/ml	NEO 512 µg/ml	SPE 512 µg/ml	STR 512 µg/ml	SUL 512 µg/ml	NAL 512 µg/ml	TMP 512 µg/ml
KAN 256 µg/ml	TET 256 µg/ml	NEO 256 µg/ml	SPE 256 µg/ml	STR 256 µg/ml	SUL 256 µg/ml	NAL 256 µg/ml	TMP 256 µg/ml
KAN 128 µg/ml	TET 128 µg/ml	NEO 128 µg/ml	SPE 128 µg/ml	STR 128 µg/ml	SUL 128 µg/ml	NAL 128 µg/ml	TMP 128 µg/ml
KAN 64 µg/ml	TET 64 µg/ml	NEO 64 µg/ml	SPE 64 µg/ml	STR 64 µg/ml	SUL 64 µg/ml	NAL 64 µg/ml	TMP 64 µg/ml
KAN 32 µg/ml	TET 32 µg/ml	NEO 32 µg/ml	SPE 32 µg/ml	STR 32 µg/ml	SUL 32 µg/ml	NAL 32 µg/ml	TMP 32 µg/ml
KAN 16 µg/ml	TET 16 µg/ml	NEO 16 µg/ml	SPE 16 µg/ml	STR 16 µg/ml	SUL 16 µg/ml	NAL 16 µg/ml	TMP 16 µg/ml
KAN 8 µg/ml	TET 8 µg/ml	NEO 8 µg/ml	SPE 8 µg/ml	STR 8 µg/ml	SUL 8 µg/ml	NAL 8 µg/ml	TMP 8 µg/ml
PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK

KAN: Kanamisin; TET: Tetrasiklin; NEO: Neomisin; SPE: Spektinomisin; STR: Streptomisin; SUL: Sulfonamid bileşimi; NAL: Nalidiksik Asit; TMP: Trimetoprim; PK: Pozitif kontrol.

3.1.3 Besiyerleri

Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (Merck KGaA., Germany)

Rutin analizlerde suşları geliştirmek amacıyla kullanıldı.

<u>İçerik</u>	<u>g/L</u>
Trypton	10
Maya ekstraktı	5
NaCl	10
Agar	13
pH 7.0 ± 0.2 (sterilizasyondan önce)	

Besiyeri içeriği 1000 mL saf suda çözüldü. Broth besiyeri cam tüplere dağıtıldıktan, katı besiyeri ise agar ilavesinden sonra, otoklavda (121 °C / 15 dakika) sterilize edildi. Katı besiyerleri 55 °C' ye kadar soğutulduktan sonra petrilere döküldü.

Müller-Hinton Broth (Oxoid Ltd., UK)

<u>İçerik</u>	<u>g/L</u>
Et ekstaktı	300
Kazein hidrolizat	17.5
Nişasta	1.5
pH 7.3 ± 0.1 (sterilizasyondan önce)	

38 gram toz besiyeri 1 litre saf su ile karıştırıldı ve 121 °C otoklavda 15 dakika süre ile sterilize edildi.

3.1.4 Çözeltiler

<u>SOC Ortamı</u>	<u>g/L</u>
Tripton	20 g
Maya Ekstraktı	5 g
5M NaCl	2 mL
1M KCl	2.5 mL
1M MgCl ₂	10 mL
1M MgSO ₄	10 mL
1M Glukoz	20 mL
dH ₂ O	1000 mL

Besiyeri içeriği homojen olarak karıştırıldıktan sonra 121 °C / 15 dakika süre ile sterilize edildi.

<u>Kado Tampon Çözeltisi</u>	<u>g/100mL</u>
(50 mM Tris / 1 mM EDTA, pH 8)	
Tris	0.6
EDTA	0.03

<u>Liziz Çözeltisi</u>	<u>mL</u>
Steril, dH ₂ O	11.5
15% SDS	4
250mM Tris	4
5N NaOH*	0.3

*Çözelti izolasyon sırasında taze olarak hazırlandı.

DNA Jel Yükleme Tampon Çözeltisi

Bromfenol mavisi	0.25 ml
Sakkaroz	40 g
Distile Su	100 ml

Fenol/Kloroform Çözeltisi* **mL**

Fenol 1 ml

Kloroform 1 ml

*Çözelti, izolasyon sırasında taze olarak hazırlandı.

1 M Tris-HCl, pH 8

Tris-Base 24.22 g

Steril dH₂O 200 mL

Çözeltinin pH'sı ayarlandıktan sonra 121 °C/15 dakika süre ile sterilize edildi.

0.5 M EDTA, pH 8

Na₂EDTA.2H₂O 37.22 g

Steril dH₂O 200 mL

Çözeltinin pH'sı ayarlandıktan sonra 121 °C/15 dakika süre ile sterilize edildi.

Tris-EDTA Çözeltisi (TE) **mL**

(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8)

1 M Tris-HCl, (pH 8) 10 mL

0.5 M EDTA, (pH 8) 2 mL

Steril dH₂O 988 mL

Çözelti hazırlandıktan sonra 121 °C/15 dakika süre ile sterilize edildi.

Hücre Süspansiyon Tampon Çözeltisi

(100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8)

1 M Tris-HCl, (pH 8) 10 mL

0.5 M EDTA, (pH 8) 20 mL

Steril dH₂O 97 mL

Çözelti hazırlandıktan sonra 121 °C/15 dakika süre ile sterilize edildi.

Seakem Agaroz (%1)-SDS

Seakem Agaroz (Biozym, USA)	0.25 g
Tris-EDTA çözeltisi (TE)	23.5 mL
% 20 SDS çözeltisi	1.25 mL

Seakem agaroz önce TE çözeltisi içerisinde eritildi. Daha sonra su banyosunda (GFL 1002, GFL GmbH., Germany) 50 °C'ye kadar soğutuldu ve sıcaklığı 50 °C'ye ayarlanan % 20 SDS çözeltisi belirtilen oranda eklendi.

0.5X Tris-Borat-EDTA (TBE) Çözeltisi

10X TBE Stok Çözeltisi	100 mL
Steril dH ₂ O	1900 mL

Hücre Liziz Tampon Çözeltisi

1 M Tris-HCl, (pH 8)	25 mL
0.5 M EDTA, (pH 8)	50 mL
Sarcosyl	5 g
Steril dH ₂ O	425 mL
Proteinaz K (20 mg/mL)	2.5 mL

Seakem Agaroz (%1)-TBE

Seakem Agaroz	1 g
0.5X TBE çözeltisi	100 mL

Seakem agaroz önce 0.5X TBE çözeltisinde eritilerek su banyosunda (GFL 1002, GFL GmbH., Germany) 50 °C'ye kadar soğutuldu.

3.1.5 Primerler

Çalışmada kullanılan primer dizileri ve PZR koşulları Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan primerler ve PZR koşulları.

Primer	Primer çifti (İleri/Geri)	T _a /t _e	PZR ürünü (bç)
Sınıf I integron	GGCATCCAAGCAGCAAGC/A AGCAGACTTGACCTGAT	55 °C/30 sn	değişken
<i>gyrA</i>	TGTCCGAGATGGCCTGAAGC/ TACCGTCATAGTTATCCACG	55 °C/30 sn	313

T_a = bağlanma sıcaklığı; t_e = uzama süresi.

3.2 Yöntem

3.2.1 Plazmid izolasyonu

Plazmid saflaştırılmasında modifiye Kado-Liu (1981) ve Kit ile izolasyon olmak üzere iki farklı yol izlendi.

3.2.1.1 Kado-Liu yöntemi ile plazmid izolasyonu

Plazmid izolasyonu için Kado ve Liu (1981) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı (Guerra *et al.* 2002). *Salmonella* suşları stok kültürden 2 mL LB broth besiyerine inoküle edildi ve çalkalamalı (200 rpm) inkübatörde 37 °C’de 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu kültürden mikrosantrifüj tüpüne 1 mL aktarılaraq oda sıcaklığında 14.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üst faz uzaklaştırıldı ve çökelti oda sıcaklığında kurutuldu. Çökelti 20 µL Kado tampon çözeltisi içerisinde çözöldü ve 100 µL hücre parçalama çözeltisi (liziz çözeltisi) eklenerek homojen bir karışım elde edinceye kadar yavaşça karıştırıldı. Örnekler 58 °C su banyosunda (GFL 1002, GFL GmbH., Germany) 27 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 100 µL fenol/kloroform karışımı uygulandı ve 2 dakika süresince yavaşça karıştırıldı. Oda sıcaklığında 14.000 rpm’de 30 dakika santrifüjün ardından 90 µl üst faz alınarak 10 µL yükleme tamponuyla karıştırıldı ve 10 dakika buz banyosunda bekletildi.

3.2.1.2 Kit ile plazmid izolasyonu

S. Infantis suşlarından plazmid izolasyonu ayrıca Qiagen Plasmid Midi Kit (Cat. No. 12145) kullanılarak gerçekleştirildi.

LB broth’ta % 1 oranında inoküle edilerek 37 °C’de 18 saat 200 rpm çalkalama hızında geliştirilen bakteri kültürlerinden 100 ml alındı ve 500 rpm’de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutularak hücreler çöktürüldü. Hücre çökeltisi 4 ml P1 tampon içerisinde çözöldü. Üzerine 4 ml P2 tamponu ilave edildi, elde 6 kez çevrilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Süre bitiminde karışım içerisine 4 ml P3 tamponu (3.0 M potasyum asetat, pH 5.5) ilave edildi ve aynı karıştırma işlemine tabi tutularak, buz

banyosunda 15 dakika bekletildi. Buz banyosundan alınan tüpler 4 °C’de 13000 rpm’de 30 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu (Sorwall RC5C Plus, Asheville, NC, USA). Üst sıvı tekrar 4 °C’de 13000 rpm’de santrifüj edildi. Burada oluşan üst faz, QBT tampon (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, % 15 etanol ve % 1.5 tritonX-100) ile dengelenmiş (kolonların dengelenmesi için, kolonlara 4 ml QBT tampon konularak tamamen akması beklendi) Qiagen-tip 100 kolonlara aktarıldı ve sıvının kolondan geçmesi beklendi. Bu aşamadan sonra kolon iki kez 10 ml QC yıkama tamponu (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, % 15 izopropanol) ile yıkandı. Yıkanan kolona 5 ml QF geri kazanım tamponu (1.25 M NaCl, 50 mM TrisHCl, pH 8.5, % 15 izopropanol) eklenerek DNA kolondan geri kazanıldı. Bu sıvıya 3.5 ml izopropanol ilave edildi ve 4 °C’de 11000 rpm’de 30 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Üst sıvı atıldıktan sonra çökelti % 70 etanol ile yıkandı. Bu ortam 4 °C’de 11000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. DNA örneğini içeren çökelti oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 100 µl steril distile su içerisinde çözüldü. DNA örnekleri kullanılana kadar -20 °C’de saklandı.

3.2.2 Elektroforez

Plazmid izolatları % 0.8 agaroz konsantrasyonu ile hazırlanan jel sistemlerinde, her kuyucuğa 20 µL olacak şekilde yüklendikten sonra 100 volt elektrik akımı uygulanarak (~1 saat) elektroforez işlemine tabi tutuldu. Plazmid büyüklüklerinin hesaplanabilmesi için her jel örneğinde bir kuyuya BAC-Tracker Supercoiled DNA Ladder (Epicentre Biotechnologies, USA) yüklendi.

PZR amplifikasyonu sonrasında ise, 10 µl PZR ürünü ve 2 µl 6xyükleme boyası karıştırılarak % 1 oranında agaroz içeren jelin kuyularına aktarıldı. Bant büyüklüklerinin belirlenebilmesi amacı ile kuyulardan birine 1kb DNA Marker (Fermentas, Finland) yüklendi. Tüm elektroforez işlemlerinde Tris asetat EDTA (TAE) tampon çözeltisi kullanıldı.

Elektroforez işlemi sonrasında agaroz jeller, 0.2 µg/ml etidyum bromit (Sigma Chem. Co., USA) çözeltisinde 20 dakika süre ile boyandı ve 366 nm dalga boyunda UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafları alındı (Kodak Gel Logic 200 Imaging System).

3.2.3 Plazmidlerin büyüklüklerinin saptanması

S. Infantis suşlarından izole edilen plazmidlerin büyüklüklerinin belirlenmesinde; moleküler büyüklükleri bilinen ccc DNA marker'larının elektroforetik hareketlilikleri ile, büyüklüklerinin logaritmaları arasında tanımlanan doğrusal ilişkiden yararlanıldı (Macrina *et al.* 1978, Southern 1979, Schaffer and Sederoff 1981). Marker ccc DNA molekülünün agaroz jel fotoğrafları üzerinde ölçülen göç aralıkları ile, bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak eğrileri çıkarıldı. İstatistik analizlerle her farklı jel için korelasyon katsayısı ve eğrinin eğimi belirlenerek, bakterilerden izole edilen plazmidlerin büyüklükleri saptandı (Campbell 1974, Elder and Southern 1983, Elder *et al.* 1983).

$$\text{Eğrinin Eğimi (I)} = \frac{E - (G.C)}{B - (G.A)}$$

$$\text{Korelasyon Katsayısı (J)} = \frac{E - (G.C)}{\sqrt{[D - (H.C)].[B - (G.A)]}}$$

$$\text{Moleküler Büyüklük (W)} = \text{Antilog}_{10} [I. (\alpha - G) + H]$$

$$X = \text{marker DNA moleküllerinin agaroz jel üzerindeki göç aralığı (mm)}$$

$$Y = \text{Marker DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz)}$$

$$A = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n$$

$$B = X_1^2 + X_2^2 + X_3^2 + \dots + X_n^2$$

$$C = \log_{10} Y_1 + \log_{10} Y_2 + \log_{10} Y_3 + \dots + \log_{10} Y_n$$

$$D = (\log_{10} Y_1)^2 + (\log_{10} Y_2)^2 + (\log_{10} Y_3)^2 + \dots + (\log_{10} Y_n)^2$$

$$E = X_1 (\log_{10} Y_1) + X_2 (\log_{10} Y_2) + X_3 (\log_{10} Y_3) + \dots + X_n (\log_{10} Y_n)$$

$$G = \text{Ortalama } X = \frac{A}{N}$$

$$H = \text{Ortalama } Y = \frac{C}{N}$$

α = Moleküler büyüklüğü bilinmeyen plazmidin jel üzerindeki göçü (mm)

3.2.4 Dalgalı alan jel elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)

Hücreler Luria-Bertani agar ortamında 37 °C’de 18 saat geliştirildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, steril öze ile alınan hücreler, 4 mL hücre süspansiyon tamponunda çözülerek optik yoğunluk spektrofotometrede (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Sweden) 610 nm dalga boyunda 1.35-1.4’e ayarlandı. Hazırlanan süspansiyonlar buz banyosunda muhafaza edildi. Agaroz tapalar hazırlanırken 300 µl hücre süspansiyonu, 15 µl Proteinaz K (20 mg/mL, son konsantrasyon 0.5 mg/mL) ve 300 µl Seakem Agaroz (% 1)-SDS, 1.5 mL’lik mikrosantrifüj tüpünde karıştırılarak BioRad-PFGE kalıplara (Plug Molds, BioRad, USA) aktarıldı. Tapalar hazırlanırken agarozun katılaşmamasına özen gösterildi ve bu amaçla karışım 50 °C su banyosunda (GFL 1002, GFL GmbH., Germany) hazırlandı. Daha sonra kalıplar +4 °C’de tapaların katılaşması için 30 dakika bekletildi. Agaroz tapalar katılaştıktan sonra 5 mL hücre liziz tampon çözeltisi aktarıldı ve 54 °C’ye ayarlanan çalkalamalı (175-200 rpm) su banyosunda (GFL 1083, GFL GmbH., Germany) 2 saat tutuldu. Yıkama işlemi 50 °C’de çalkalamalı (175-200 rpm) su banyosunda (GFL 1083, GFL GmbH., Germany) yapıldı. Yıkama işlemi her biri için 15’er dakika olacak şekilde önceden 50 °C’ye ayarlanan steril distile su (10-15 mL) ile iki kere ve sonra yine sıcaklığı 50 °C’ye ayarlanan TE tampon çözeltisi (10-15 mL) ile 4 kez tekrarlandı. Yıkama işlemleri tamamlandıktan sonra her bir tapa 2.5 mm şeritler halinde kesildi ve yeni bir TE tampon çözeltisine aktarılarak kullanılıncaya kadar +4 °C’de saklandı. Hazırlanan 2.5 mm’lik agaroz şeritler 120 µl SuRE tampon H çözeltisi (Roche Diagnostics GmbH, Germany) ile 15 dakika oda sıcaklığında tutularak dengelendi. Daha sonra tampon çözeltisi pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve yerine 100 µl, yine bu çözelti ile uygun konsantrasyonda hazırlanan *Xba*I (50U / hücre; Roche Diagnostics GmbH, Germany) restriksiyon enzimi eklendi. Restriksiyon kesimi, 37 °C’deki su banyosunda (GFL 1002, GFL GmbH., Germany) 2 saat inkübe edilerek yapıldı. Bu işlem sonunda enzim aktivitesinin durdurulması için enzim çözeltisi uzaklaştırılarak 500 µl 0,5X TBE çözeltisi eklendi. Restriksiyon kesimleri tamamlanan 2.5 mm’lik agaroz şeritler bir spatül yardımıyla elektroforez targağının her bir dişine

yatay şekilde koyuldu ve dişe bulaşan tampon çözeltisi bir pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Bu şekilde 5 dakika kurumaya bırakılan tarak daha sonra jel kalıbına yerleştirildi. Hazırlanan ve 50 °C'ye soğutulan Seakem Agaroz (% 1)-TBE kalıba yavaşça dökülerek 30 dakika polimerizasyona bırakıldı. Elektroforez çemberi (CHEF-DR III Variable Angle System, BioRad, USA) 2.5 litre 0.5X TBE (0,016 g thiurea eklenmiş) çözeltisi ile doldurularak 14 °C'ye soğutuldu. Hazırlanan agaroz jel çembere yerleştirildi ve 6V/cm (200V), 2-64 saniye, 120°A açıyla, 20 saat sabit sıcaklıkta koşturuldu. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra agaroz jel 20 dakika etidyum-bromit çözeltisinde (0.5 µg/mL) boyandı. Daha sonra, boyanın uzaklaşması için jel 30 dakika distile su ile yıkandı. Startagene Eagle-Eye II jel dokümantasyon sisteminde (Stratagene, USA) UV ışığı altında görüntülendi. Bant büyüklükleri bu sisteme ait bilgisayar programı kullanılarak hesaplandı (Stratagene, USA) (Angulo *et al.* 2000).

3.2.5 Antimikrobiyel direncin belirlenmesi

3.2.5.1 Disk difüzyon metodu

Kültürler steril öze ile % 1 oranında 4 ml LB broth ortamına inoküle edildi ve çalkalamalı (175-200 rpm) inkübatörde 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, steril saf su ile 1:100 (hacim:hacim) oranında dilue edildi ve 100 µl Müller Hinton (Oxoid, UK) agar plakları üzerine yayma ekim yapıldı. Antimikrobiyel ajanlar emdirilmiş 6 mm'lik kağıt diskler, agar yüzeyine yerleştirildi ve 37 °C'de 18 saat inkübe edildi. Disk difüzyonu çalışmasında, 16 farklı antimikrobiyel madde kullanıldı (Çizelge 3.1). İnkübasyon sonrası, disklerin etrafındaki zon çapları ölçüldü ve Klinik Laboratuar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nün belirlediği kırılma noktaları ile karşılaştırıldı. Buna göre sonuçlar duyarlı (S) ve dirençli (R) olarak belirlendi.

3.2.5.2 Mikrodilüsyon yöntemi

Duyarlılıkları saptanacak olan mikroorganizmaların, LB broth sıvı besiyerinde geliştirilen kültürlerinden steril serum fizyolojik içerisinde McFarland 0.5 (10^8 hücre/ml) yoğunluğunda örnekler hazırlandı ve 1:100 oranında dilüe edilerek 10^6 hücre/ml içeren mikroorganizma süspansiyonları elde edildi. Bakterilerin üretilmesi amacıyla Müller Hinton Broth (MHB) (Oxoid Ltd., UK) besiyerleri kullanıldı. Minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) tespit edilebilmesi için 96 kuyucuklu mikropiplaklarda mikrodilüsyon yöntemi, CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2008) M27-A protokolü esas alınarak gerçekleştirildi. 100 µl MHB besiyerini içeren kuyuların ilk sırasına her antibiyotik için son konsantrasyon 512 µg/ml olacak şekilde 1024 µg/ml stok solusyonundan eklendi (Çizelge 3.2). İlk kuyucuktan başlanarak bir sonrakine 100 µl aktarıldı ve son kuyucuktan 100 µl alınarak dilüsyon işlemi tamamlandı. Dilüsyon sonrasında tüm kuyucuklara 10 µl bakteri süspansiyonu (10^6 hücre/ml) eklenerek bakteriler 37 °C’de 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. Inkübasyon sonrası üremenin olduğu son kuyucuktan bir sonraki kuyucuktaki antibiyotik miktarı MİK değeri olarak tespit edildi.

3.2.6 Genomik DNA izolasyonu

Salmonella suşlarından genomik DNA izolasyonu, Sambrook *et al.* (1989) tarafından önerilen yöntemine göre yapıldı. 5 mL LB broth ortamında geliştirilen 18 saatlik kültürden 1.5 mL’lik steril mikrosantrifüj tüplerine alınan bakteri süspansiyonları, 14000 rpm’de 6 dakika santrifüj edildi (Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf GmbH., Germany). Tüplerdeki üst sıvı atıldı ve hücre çökeltisi oda sıcaklığında kurutuldu. Çökelti üzerine 300 µL TE tampon çözeltisi aktarıldı ve süspanse edildi. Bu süspansiyonlar 10 dk kaynar su banyosunda (GFL 1002, GFL GmbH., Germany) tutulduktan sonra, hızlı bir şekilde buz banyosuna alınarak soğutuldu. Bu ortamlar, tekrar 14000 rpm hızda 2 dakika santrifüj edildi (Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf GmbH., Germany) ve üst sıvı yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. İzolasyon örnekleri -20 °C’de muhafaza edildi ve PZR amplifikasyonlarında kullanıldı.

3.2.7 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) amplifikasyonları

PZR amplifikasyonları için Carattoli *et al.* (2005) tarafından önerilen yöntem optimize edilerek kullanıldı. PZR amplifikasyonlarının gerçekleştirilmesi için GeneAmp9700 Thermocycler (Applied BioSystems, USA) cihazından yararlanıldı. Amplifikasyonlar için kullanılan reaksiyon karışımı ve amplifikasyon koşulları aşağıda belirtilmiştir.

Reaksiyon karışımı:

Steril dH ₂ O	35,5 µl
10XPZR tampon çözeltisi	5 µl
dNTP	1 µl
İleri primer	1 µl
Geri primer	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
Taq DNA polimeraz	0,5 µl
DNA	2 µl

Amplifikasyon koşulları:

- 94 °C, 5 dakika
- 30 döngü; 94 °C, 30 saniye; T_a, 30 saniye; 72 °C, t_e
- 72 °C, 5 dakika
- 4 °C, ∞

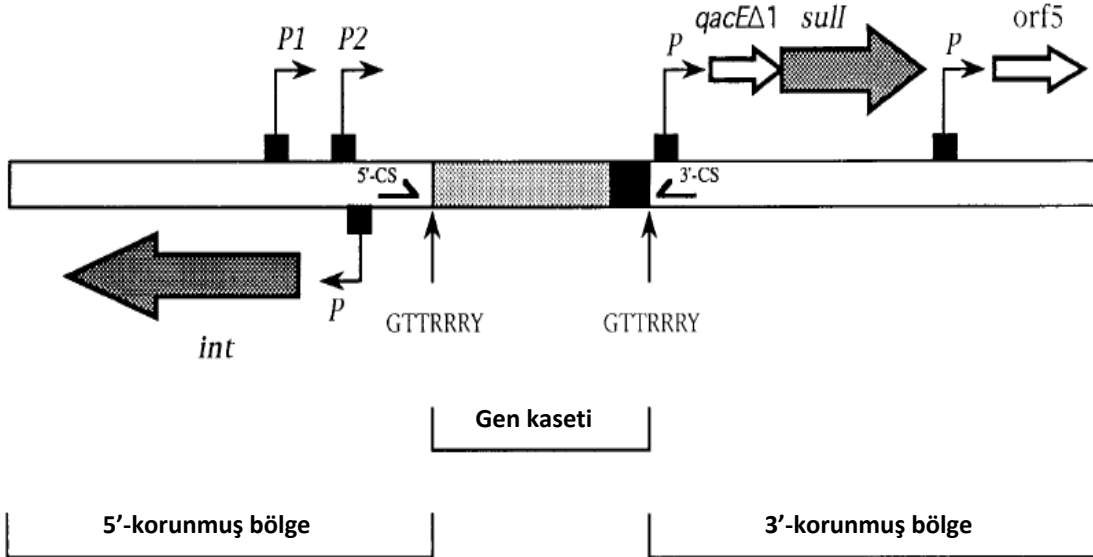
T_a (bağlanma sıcaklığı) her bir primer için ayrı ayrı $T_a(^{\circ}\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ formülünden hesaplanırken, t_e (uzama süresi) beklenen PZR ürününün baz çifti (bç) cinsinden uzunluğuna göre tayin edildi. Buna göre PZR ürünü 500 bç ve daha küçük ise 30 saniye, 500-700 bç arasında ise 40 saniye ve daha büyük PZR ürünleri, örneğin; 1000 bç için ise 1 dakika ya da daha fazla olarak belirlendi.

3.2.8 DNA dizi analizleri

Saflaştırılan DNA örneklerinin dizi analizi REFGEN (ODTÜ Teknokent, Ankara) firması tarafından yapıldı ve sonuçlar NCIB-BLAST programı kullanılarak değerlendirildi.

3.2.9 Dirençlilik genleri ve integron analizleri

Nalidiksik asit dirençlilikte etkin mutasyonların tanımlanması amacı ile *gyrA* genine özgü primerler kullanıldı.



Şekil 3.1 Sınıf I integronların genel moleküler organizasyonu (Le'vesque *et al.* 1995).

İntegron analizlerinin ilk aşaması olan integron varlığının belirlenmesi amacıyla; 1. sınıf integronların saptanmasında, 5' ve 3' korunmuş bölgelere göre dizayn edilen primer çiftinden yararlanıldı (Şekil 3.1). Kullanılan primerler Çizelge 3.3'de verilmiştir.

3.2.10 Konjugasyon

Konjugasyon denemelerinde kullanılan verici ve alıcı suş kültürleri LB broth ortamında 37 °C’de 18 saat süre ile geliştirildi. Konjugal eşleştirme için, geç eksponensiyel fazdaki kültürler (37 °C’de 6-8 saat süresince ve 200 rpm karıştırma uygulanarak üretildi) kullanıldı. Mikrosantrifüj tüplerine 1 ml’lik hacimler halinde alınan kültürler, 13000 rpm’de 30 sn santrifüj işlemi uygulanarak çöktürüldü. Çöktürülen hücreler, 1 ml 10 mM MgSO₄ içerisinde çözöldü. Alıcı ve verici suştan 0.5’er ml alınarak karıştırıldı ve daha sonra 0.4 µm por çapındaki membran filtreye emdirildi (Millipore Co. Bilkrica, MA, USA). Bu işlemi takiben filtreler LB agar ortamı üzerine kondu ve 37 °C 4 saat inkübe edildi. Eşleştirme işleminden sonra bakteri karışımını içeren membran filtreler 1 ml 10 mM MgSO₄ içerisinde çözöldü, PBS (fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi; % 0.8 NaCl, % 0.02 KCl, % 0.144 Na₂HPO₄, % 0.024 KH₂PO₄, pH 7.4) içerisinde seri dilüsyonları hazırlandı ve seçici antibiyotikleri içeren LB agar ortamlarına inoküle edildi. Yalnız verici ve alıcı suşların inoküle edildiği LB ortamları ise şahit olarak kullanıldı (Ausubel *et al.* 1994, Casadesus and Camacho 2002).

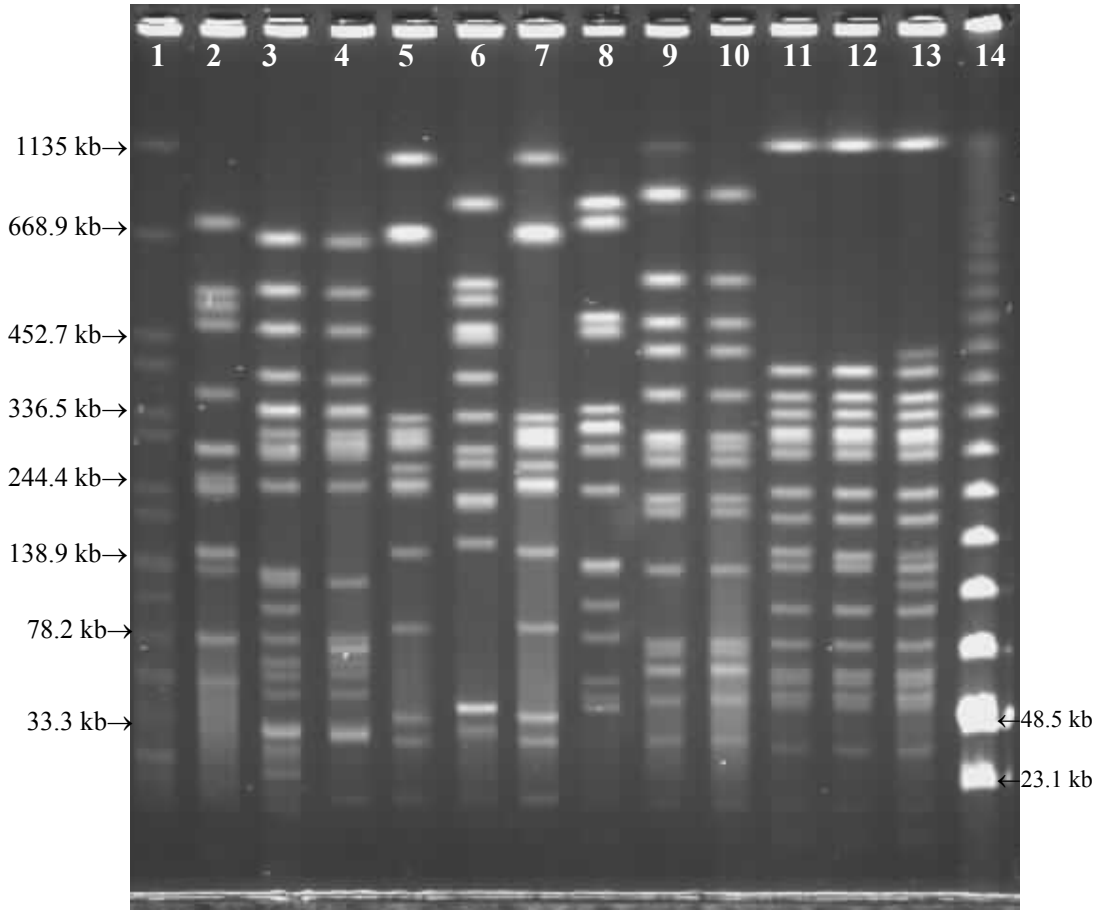
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 *Salmonella* Serotiplerinde Farklı Suşların Tanısı

Ankara’da satışa sunulan etler (tavuk ve sığır eti), yumurta ve tüketime hazır salatalardan Avşaroğlu *et al.* (2007) tarafından izole edildikten sonra; faj tiplendirmesi yanında, serolojik ve biyokimyasal testler kullanılarak tanımlanan *Salmonella* suşlarında klonal yayılma, dalgalı alan jel elektroforezi çalışmaları ile belirlenmiştir. Bu amaçla suşlardan kromozomal DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve *XbaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesime tabi tutulmuştur. Elde edilen her suşa ait *XbaI* fragment profili en az iki bant farklılığı esas alınarak aynı serotipin diğer suşlarından ayrılmıştır (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6). Bu esasa göre yapılan sınıflandırmada; *S. Agona*, *S. Enteridis*, *S. Thompson* ve *S. Wirchow* tek, *S. Kentucky* ve *S. subspecies I Rough* form iki, *S. Infantis* üç ve *S. Typhimurium* dokuz farklı grup altında toplanmıştır (Çizelge 4.1).

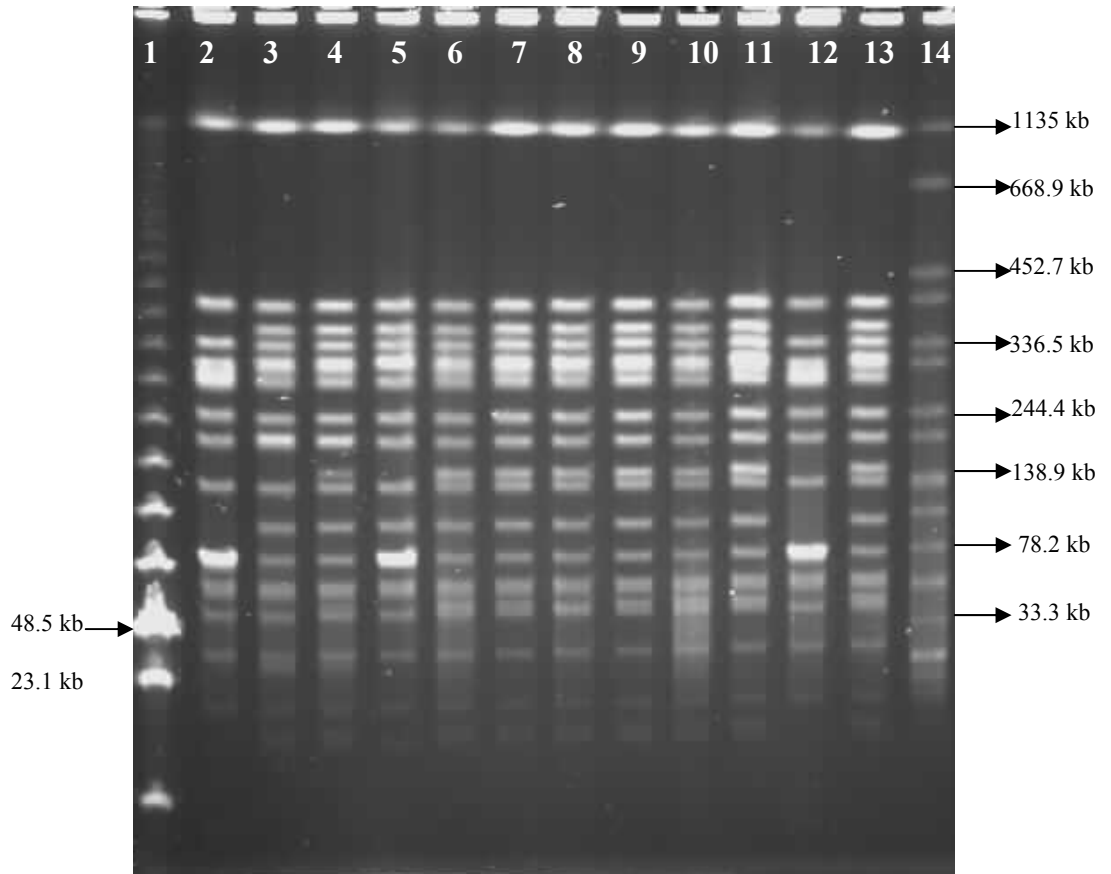
Genel Türkiye profilini yansıtmasa da Ankara’da toplanan örneklerde hakim serotip, halen dünyadaki örneklemelerde (Ang-Küçüker *et al.* 2000, Yan *et al.* 2003, Tenover and Pearson 2004, Hata *et al.* 2005, Macedo-Vinas *et al.* 2008) olduğu gibi *S. Typhimurium*’dur. Bu serotipi *S. Infantis* izlemektedir (Avşaroğlu *et al.* 2007). Bu serotiplerde klonal yayılma durumu dalgalı alan jel elektroforezi (PFGE) analizleri ile incelendiğinde, suş farklılaşmasının kontaminasyon oranları ile paralel bir şekilde arttığı görülmektedir. *Salmonella* kontaminasyonlarında dominant serotiplerin yüksek evrimleşme oranlarının ana nedeni tür içi ya da türler arası yatay gen transferleridir. Özellikle terapide ve hayvan yetiştiriciliğinde yaygın antibiyotik kullanımının yarattığı yüksek seçici baskı, mutantların dominansisini belirleyen ana unsurdur. Bu hakim serotiplerde meydana gelen suş farklılaşmaları, kontaminasyonların engellenmesi yanında salmonellozis’in tedavi yüzdelerini de önemli ölçüde düşürmektedir (Merkl 2004, Wang *et al.* 2004, Gay *et al.* 2006, Yang *et al.* 2009). Özellikle *S. Infantis* serotiplerinin gıdalarda bulunma sıklığının artışı ve sadece Ankara piyasasında satışa sunulan gıdalarda bile 3 farklı suş profilinin belirlenmesi, kanatlı yetiştiriciliğinde

kontROLSÜZ antibiyotik kullanımına ve açık satılan gıdalarda hijyenik koşullara uyulmadığına işaret etmektedir.



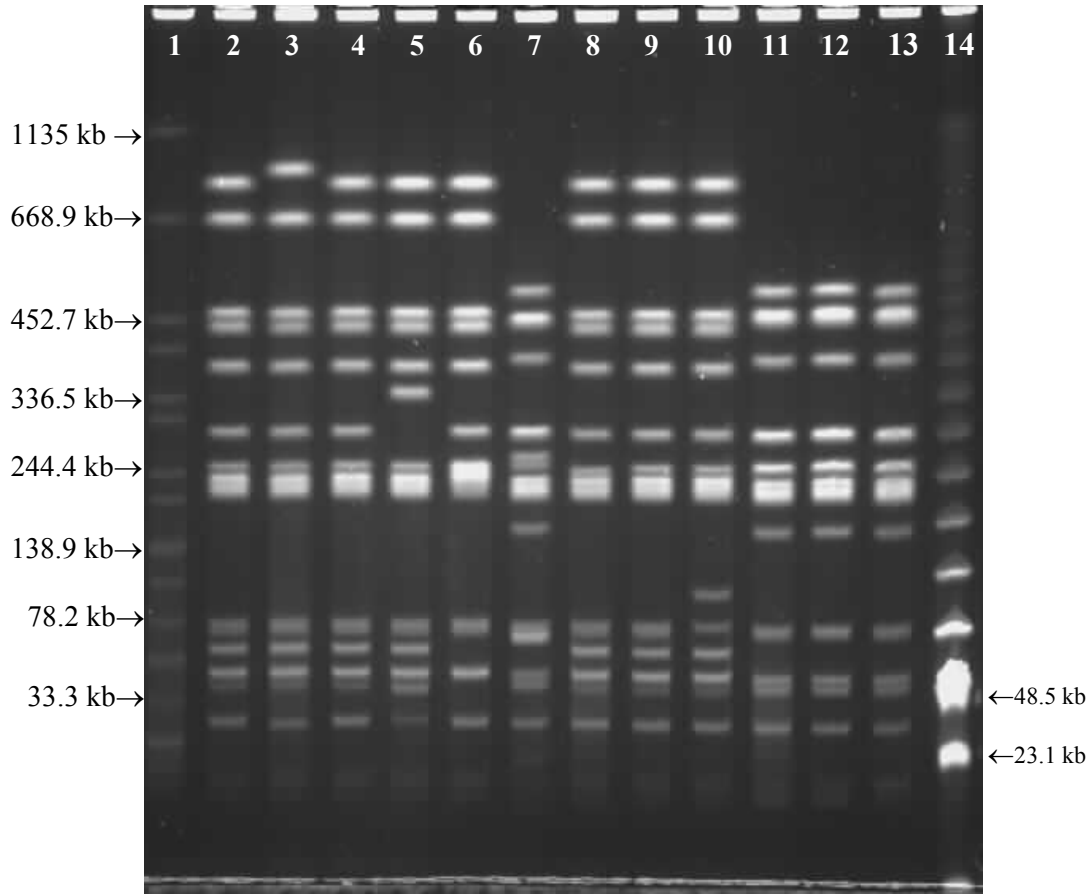
Şekil 4.1 Türkiye kökenli *Salmonella* suşlarına ait PFGE profilleri

Hat	Örnek	Serotip
1	(+) Kontrol	<i>S. Branderup</i>
2	DMA59	<i>S. Agona</i>
3	DMK34	<i>S. Kentucky</i>
4	DMK35	<i>S. Kentucky</i>
5	DMR52	<i>S. Subspec. I Rough form</i>
6	DMR54	<i>S. Subspec. I Rough form</i>
7	DME24	<i>S. Enteritidis</i>
8	DMTH39	<i>S. Thompson</i>
9	DMV9	<i>S. Virchow</i>
10	DMV10	<i>S. Virchow</i>
11	DMC1	<i>S. Infantis</i>
12	DMC7	<i>S. Infantis</i>
13	DMC12	<i>S. Infantis</i>
14	DNA Ladder	(Qiagen, USA)



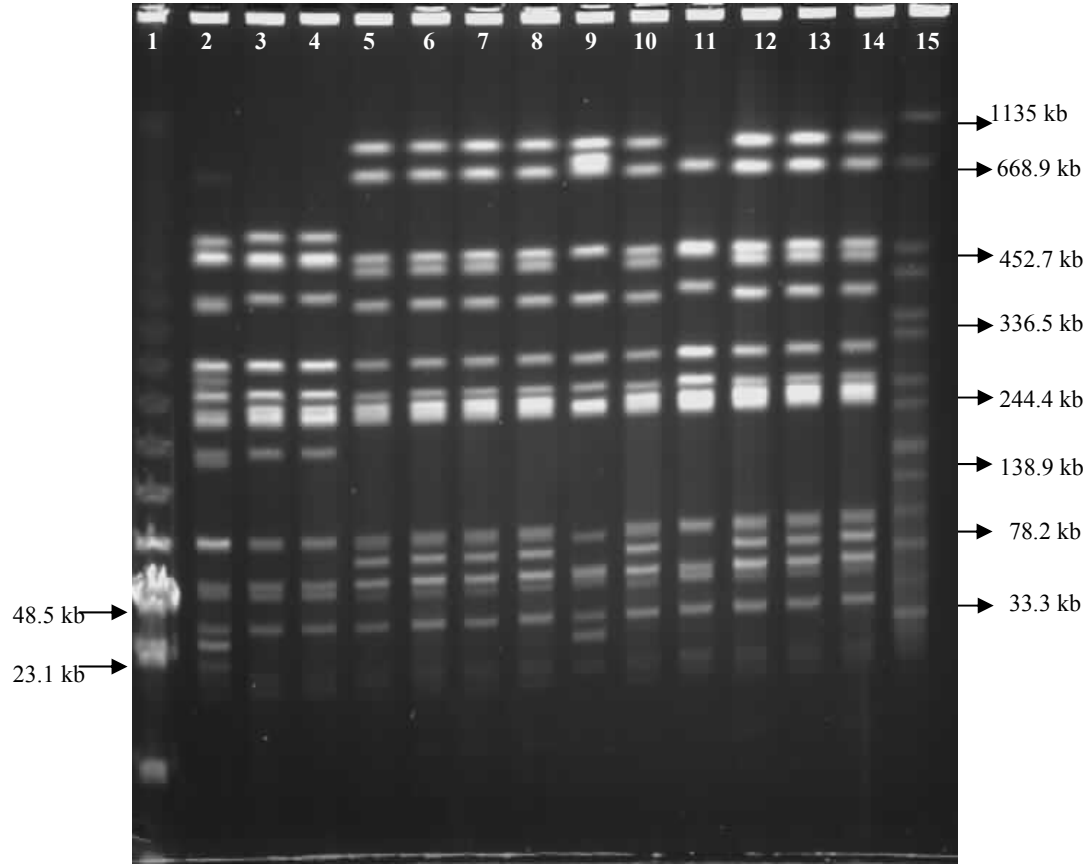
Şekil 4.2 Türkiye kökenli *Salmonella* suşlarına ait PFGE profilleri

Hat	Örnek	Serotip
1	DNA Ladder	(Qiagen, USA)
2	DMC20	<i>S. Infantis</i>
3	DMC23	<i>S. Infantis</i>
4	DMC40	<i>S. Infantis</i>
5	DMC41	<i>S. Infantis</i>
6	DMC43	<i>S. Infantis</i>
7	DMC45	<i>S. Infantis</i>
8	DMC46	<i>S. Infantis</i>
9	DMC47	<i>S. Infantis</i>
10	DMC48	<i>S. Infantis</i>
11	DMC53	<i>S. Infantis</i>
12	DMC55	<i>S. Infantis</i>
13	DMC56	<i>S. Infantis</i>
14	(+) Kontrol	<i>S. Branderup</i>



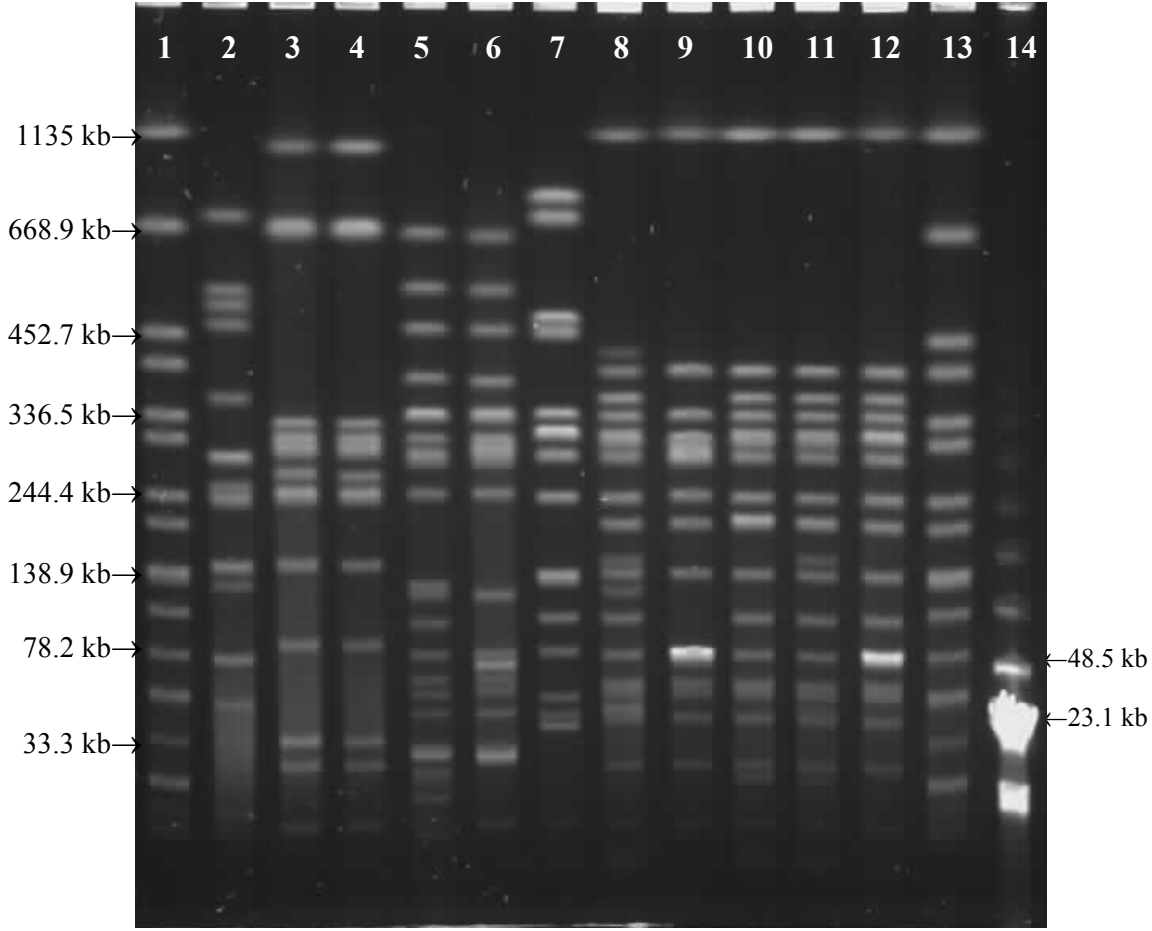
Şekil 4.3 Türkiye kökenli *Salmonella* suşlarına ait PFGE profilleri

Hat	Örnek	Serotip
1	(+) Kontrol	<i>S. Branderup</i>
2	DMT1	<i>S. Typhimurium</i>
3	DMT3	<i>S. Typhimurium</i>
4	DMT12	<i>S. Typhimurium</i>
5	DMT13	<i>S. Typhimurium</i>
6	DMT14	<i>S. Typhimurium</i>
7	DMT27	<i>S. Typhimurium</i>
8	DMT35	<i>S. Typhimurium</i>
9	DMT42	<i>S. Typhimurium</i>
10	DMT44	<i>S. Typhimurium</i>
11	DMT45	<i>S. Typhimurium</i>
12	DMT47	<i>S. Typhimurium</i>
13	DMT63	<i>S. Typhimurium</i>
14	DNA Ladder	(Qiagen, USA)



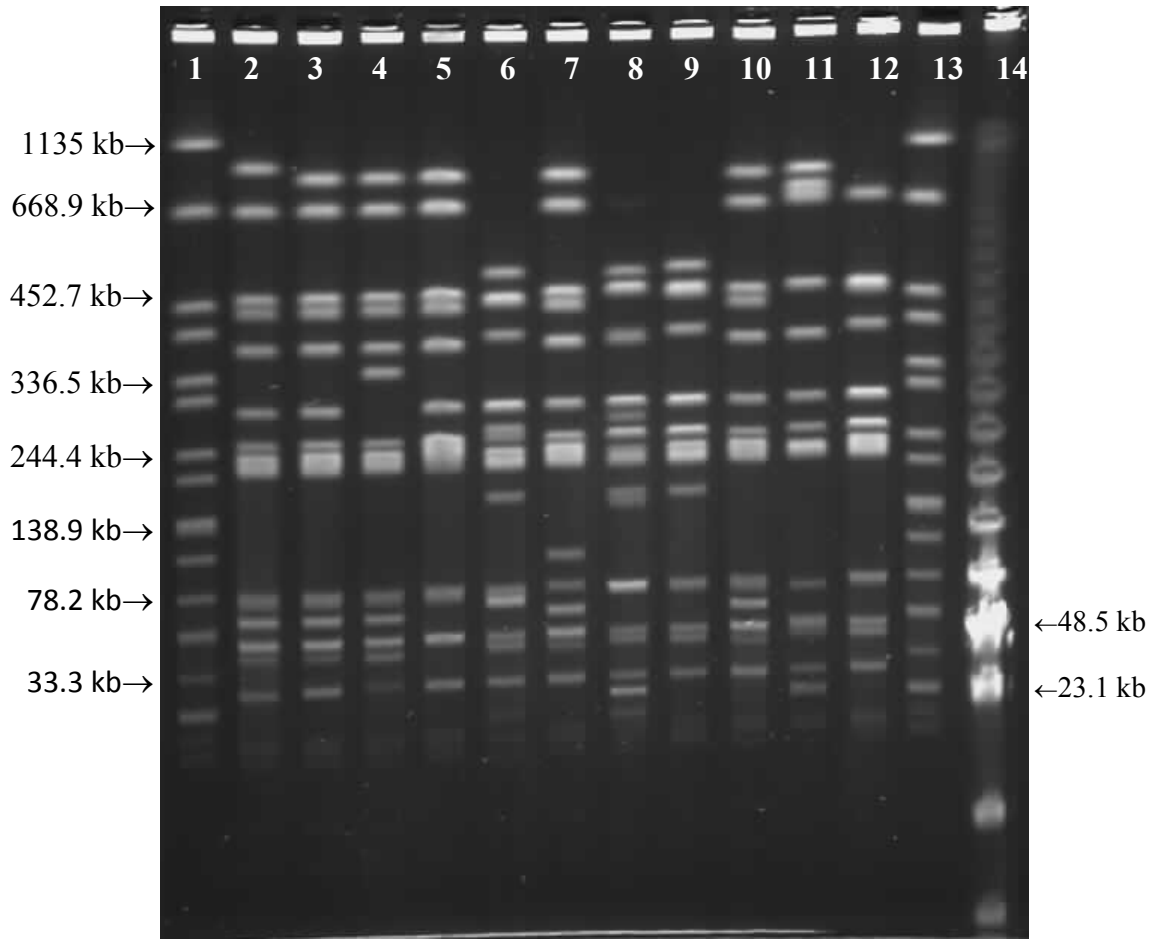
Şekil 4.4 Türkiye kökenli *Salmonella* suşlarına ait PFGE profilleri

Hat	Örnek	Serotip
1	DNA Ladder	(Qiagen, USA)
2	DMT64	<i>S. Typhimurium</i>
3	DMT65	<i>S. Typhimurium</i>
4	DMT66	<i>S. Typhimurium</i>
5	DMT68	<i>S. Typhimurium</i>
6	DMT69	<i>S. Typhimurium</i>
7	DMTN78	<i>S. Typhimurium</i>
8	DMTN79	<i>S. Typhimurium</i>
9	DMT80	<i>S. Typhimurium</i>
10	DMT81	<i>S. Typhimurium</i>
11	DMT84	<i>S. Typhimurium</i>
12	DMT88	<i>S. Typhimurium</i>
13	DMT93	<i>S. Typhimurium</i>
14	DMT96	<i>S. Typhimurium</i>
15	(+) Kontrol	<i>S. Branderup</i>



Şekil 4.5 Türkiye kökenli *Salmonella* suşlarına ait PFGE profilleri

Hat	Örnek	Serotip
1	(+) Kontrol	<i>S. Branderup</i>
2	DMA60	<i>S. Agona</i>
3	DME34	<i>S. Enteritidis</i>
4	DMR55	<i>S. Subspec. I Rough form</i>
5	DMK36	<i>S. Kentucky</i>
6	DMK37	<i>S. Kentucky</i>
7	DMTH40	<i>S. Thompson</i>
8	DMC57	<i>S. Infantis</i>
9	DMC58	<i>S. Infantis</i>
10	DMC70	<i>S. Infantis</i>
11	DMC71	<i>S. Infantis</i>
12	DMC75	<i>S. Infantis</i>
13	(+) Kontrol	<i>S. Branderup</i>
14	DNA Ladder	(Qiagen, USA)



Şekil 4.6 Türkiye kökenli *Salmonella* suşlarına ait PFGE profilleri

Hat	Örnek	Serotip
1	(+) Kontrol	<i>S. Branderup</i>
2	DMT100	<i>S. Typhimurium</i>
3	DMT101	<i>S. Typhimurium</i>
4	DMT102	<i>S. Typhimurium</i>
5	DMT103	<i>S. Typhimurium</i>
6	DMT106	<i>S. Typhimurium</i>
7	DMT107	<i>S. Typhimurium</i>
8	DMT109	<i>S. Typhimurium</i>
9	DMT120	<i>S. Typhimurium</i>
10	DMT121	<i>S. Typhimurium</i>
11	DMT124	<i>S. Typhimurium</i>
12	DMT126	<i>S. Typhimurium</i>
13	(+) Kontrol	<i>S. Branderup</i>
14	DNA Ladder	(Qiagen, USA)

Çizelge 4.1 PFGE profillerine göre *Salmonella* serotiplerinde oluşturulan suş grupları

Serotip	Kod No	Grup Adı
<i>S. Agona</i>	DMA59, DMA60	SAI
<i>S. Kentucky</i>	DMK34, DMK36	DKI
	DMK35, DMK37	DKII
<i>S. subspecies I Rough form</i>	DMR52, DMR55	DRI
	DMR54	DRII
<i>S. Enteridis</i>	DME24, DME34	DEI
<i>S. Thompson</i>	DMTH39, DMTH40	DTHI
<i>S. Virchow</i>	DMV9, DMV10	DWI
<i>S. Infantis</i>	DMC12, DMC57	DCI
	DMC20, DMC55, DMC58	DCII
	DMC1, DMC7, DMC23, DMC40, DMC41, DMC43, DMC45, DMC46, DMC47, DMC48, DMC56, DMC70, DMC71, DMC75	DCIII
<i>S. Typhimurium</i>	DMT124	DTI
	DMT13, DMT102	DTII
	DMT44, DMT107, DMT121	DTIII
	DMT64, DMT109	DTIV
	DMT80	DTV
	DMT84, DMT126	DTVI
	DMT1, DMT3, DMT12, DMT14, DMT35, DMT42, DMT68, DMT69, DMTN78, DMTN79, DMT81, DMT88, DMT93, DMT96, DMT100, DMT101, DMT103	DTVII
	DMT27, DMT45, DMT47, DMT63, DMT65, DMT66, DMT106	DTVIII
	DMT120	DTIX

4.2 S. Infantis Suşlarında Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Tanımı

Denemede kullanılan 18 adet *S. Infantis* suşunda antibiyotik duyarlılık profilleri öncelikle disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yapay ve doğal antibiyotik gruplarının tümünü temsil edecek şekilde seçilen 16 farklı antibiyotik diski ile yürütülen çalışmalar sonucunda DMC40 suşu dışındaki tüm *S. Infantis* suşlarının; kanamisin, tetrasiklin, neomisin, spektinomisin, streptomisin, sulfonamit bileşikleri, nalidiksik asit ve trimetoprim karşı dirençlilik gösterdiği, diğer antibiyotiklere karşı ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir. DMC40 suşu, kanamisine ve neomisine duyarlılık göstermesi dışında, diğer suşlar ile aynı antibiyotik duyarlılık profiline sahip bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Antibiyotik dirençlilik fenotipi tanımlanan suşlarda, duyarlılık düzeyleri, minimal inhibisyon konsantrasyonlarının kritik dilusyon yöntemi ile araştırılması sonucu belirlenmiştir. Tüm suşlarda en yüksek antibiyotik dirençlilik düzeyi sulfonamit bileşikleri için belirlenmiştir ($R > 512 \mu\text{g/ml}$). Bunu nalidiksik asit ve spektinomisin izlemiştir ($R > 128 \mu\text{g/ml}$). Kanamisin ve neomisine duyarlılık özelliği ile, diğer çoklu ilaç dirençli suşlardan farklılık gösteren DMC40 suşunda bu iki antibiyotiğe karşı $2 \mu\text{g/mL}$ 'den daha düşük bir duyarlılık saptanmıştır. Diğer suşlarda neomisin ve kanamisin dirençlilik düzeyleri, sırasıyla $R > 32 \mu\text{g/ml}$ ve $R > 64 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Son olarak, tüm suşlarda tetrasiklin, streptomisin ve trimetoprim için minimal inhibisyon konsantrasyonunun $32 \mu\text{g/mL}$ 'den büyük $64 \mu\text{g/mL}$ 'den ise düşük olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Türkiye kökenli *S. Infantis* suşlarında en yüksek antibiyotik dirençlilik düzeyinin sulfonamit bileşiklerine karşı tanımlanması, dünyada *Salmonella* izolatları ile yürütülen antibiyotik dirençlilik çalışmalarının sonuçlarına uyum göstermektedir. Yaklaşık kırk yıldır *Salmonella* serotiplerinde tanımlanan sulfonamit dirençlilik, tifoit ve tifoit olmayan salmonellozis'in tedavisinde yaygın bir kullanıma sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Özellikle 1960'lı yıllarda sulfonamitlerin trimetoprim ile sinerjik bir etki göstererek *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisinde daha etkin olduğunun belirlenmesi,

trimetoprim/sulfometaksazol

Çizelge 4.2 S. Infantis suşlarında disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılık özellikleri

Suş Kod No	Antibiyotikler															
	AMP	AMC	EFT	CHL	FFC	KAN	NEO	GEN	NAL	CHP	TET	STR	SPE	SUL	TMP	SXT
DMC1	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC7	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC12	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC20	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC23	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC40	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC43	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC45	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC46	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC47	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC48	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC55	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC56	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC57	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC58	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC70	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC71	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
DMC75	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S

AMP: Ampisilin; AMC: Amoksisilin/Klavulonik asit; EFT: Seftiofur; CHL: Kloramfenikol; FFC: Florfenikol; KAN: Kanamisin; NEO: Neomisin; GEN: Gentamisin; NAL: Nalidiksik asit; CHP: Siprofloksasin; TET: Tetrasiklin; STR: Streptomisin; SPE: Spektinomisin; SUL: Sülfonamit bileşikleri; TMP: Trimethoprim; SXT: Sulfatiazol/Trimetoprim; S: Duyarlı; R: Dirençli.

Çizelge 4.3 S. Infantis suşlarında antibiyotik dirençlilik düzeyleri (µg/ml)

Suş Kod No	Antibiyotik							
	KAN	TET	NEO	SPE	STR	SUL	NAL	TMP
DMC1	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC7	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC12	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC20	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC23	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC40	S(≤2)	R(>32)	S(≤2)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC43	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC45	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC46	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC47	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC48	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC55	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC56	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC57	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC58	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC70	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC71	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)
DMC75	R(>64)	R(>32)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>512)	R(>128)	R(>32)

KAN: Kanamisin; TET: Tetrasiklin; NEO: Neomisin; SPE: Spektinomisin; STR: Streptomisin; SUL: Sülfonamit bileşikleri; NAL: Nalidiksik asit; TMP: Trimethoprim; S:Duyarlı; R:Dirençli.

kombinasyonlarının kullanımını yaygınlaştırmıştır. (Smith *et al.* 2000, Park *et al.* 2006, Pai *et al.* 2007). Trimetoprim ve sulfometaksazol kombinasyonları, ince barsakta yüksek emilime sahiptir ve bakteriyel gelişim için zorunlu olan folik asit biyosentezini yüksek düzeyde engelleme yeteneğindedir (Guerra *et al.* 2003, Porwollik *et al.* 2004, Michael *et al.* 2008). Türkiye kökenli *S. Infantis* suşlarının tümünde sülfonamid dirençlilik ile birlikte trimetoprim dirençlilik özelliğinin de tanımlanması, bu dirençlilik fenotiplerinin yaygın ilaç kullanımından kaynaklanan seçici bir baskı ile meydana geldiğini kanıtlamaktadır. Diğer yandan tüm suşlarda saptanan ikinci en yüksek antibiyotik dirençlilik düzeyinin spektinomisin ve nalidiksik aside karşı tespit edilmesi de bu seçici baskının doğrudan bir sonucudur. Zira kinolon grubu antibiyotiklerin en yaygın kullanım alanı, özellikle kümes hayvanları yetiştiriciliğidir. Kinolonlar ayrıca bazı ülkelerde gıda koruyucusu olarak da kullanılmaktadır. Nalidiksik asit bu grubun en çok kullanılan üyesidir. *S. Infantis* suşlarının ana kökeninin kümes hayvanları oluşu, bu suşların çok yüksek nalidiksik asit direnci içermelerini açıklamaktadır. Özellikle 1990'lı yıllardan beri *Salmonella* suşlarında kinolon ve florokinolon dirençliliğinin hızlı artışı nedeni ile kinolonların kullanımının kısıtlanması önerilmektedir. Bu çalışmanın sonuçları, bu tespitin Türkiye için de önemli olduğuna işaret etmesi bakımından kritik bir değer taşımaktadır.

Nalidiksik asit örneğinde olduğu gibi, spektinomisin ve tetrasiklin grup antibiyotikler, özellikle kümes hayvanları olmak üzere, hayvan yetiştiriciliğinde geri kalmış ya da gelişmekte olan ülkelerde, enfeksiyonlardan korunmak amacı ile yaygın bir kullanım alanı bulunmaktadır. Zira bu antibiyotik grupları geniş bir antibakteriyel aktivite spektrumuna sahiptir. Kolay ulaşılabilir olmaları kullanımlarını yaygınlaştıran ana unsur olarak öne çıkmaktadır (Fabrega *et al.* 2008). Türkiye kökenli *S. Infantis* suşlarında ortak olan bu dirençlilik fenotiplerinin kökeni de büyük olasılıkla kümes hayvanları yetiştiriciliğine dayanmaktadır.

Türkiye kökenli *S. Infantis* suşlarında kanamisin, neomisin ve streptomisin gibi aminoglikozit grubu antibiyotiklere dirençlilik fenotipinin ortaya çıkması, özellikle bu antibiyotiklerin kanatlı yumurtalarından civciv çıkarılma sürecinde kullanımından kaynaklanmaktadır. Zira aminoglikozit antibiyotiklerin hayvansal gıda üretiminde kullanıldığı bir diğer alan domuz yetiştiriciliğidir (Michael *et al.* 2008). Ülkemizde

domuz yetiştiriciliğinin yok denecek kadar kısıtlı oluşu bu öngörümüzü desteklemektedir.

S. Infantis suşlarında ortak olan antibiyotik dirençlilik özelliklerinin tamamının kümes hayvanlarının üretimi ile ilişkili oluşu, bu alanda üretim birimlerinin denetlenmesinde ülkemizde ciddi bir sorun olduğuna işaret etmektedir. Bu sonuçlar, bu çalışmanın Türkiye çapında bir taramaya mutlak gereksinim olduğunu göstermektedir.

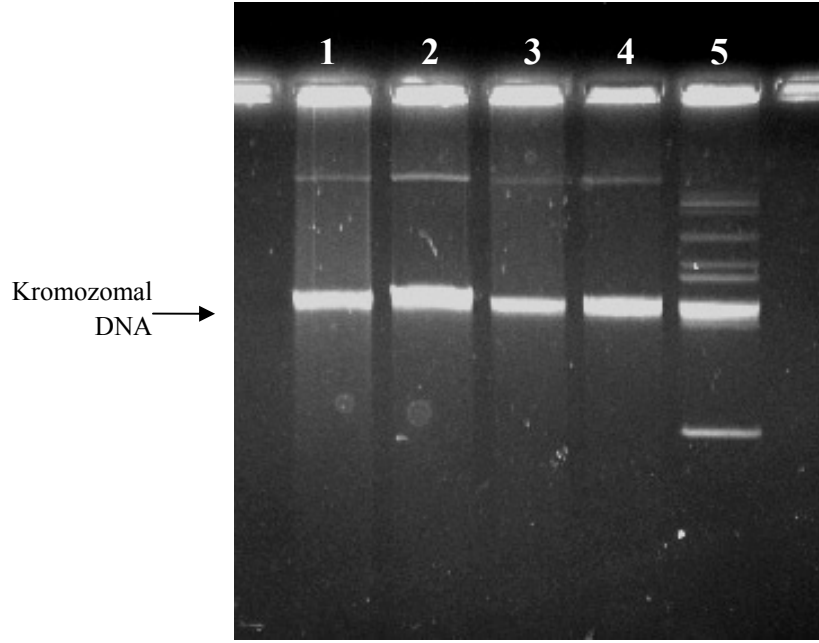
4.3 S. Infantis Suşlarının Plazmid İçerikleri

Çoklu ilaç dirençlilik özelliğine sahip olduğu belirlenen ve PFGE analizleri sonucu suş seviyesinde tanısı gerçekleştirilen *S. Infantis* üyelerinin plazmid profilleri, her suş grubu için birden fazla örnek seçilerek araştırılmıştır. Plazmid analizlerinde test kiti (Qiagen Plazmid Midi Kit, Cat. No. 12145) yanında, özellikle büyük plazmidlerin izolasyonunda yüksek düzeyde izolasyon verimliliğine sahip olan Kado and Liu (1981) yöntemi kullanılmıştır.

Kullanılan her iki yöntemde de *S. Infantis* suşlarının tamamının yalnız 206.5 kb (kilo baz) büyüklükte tek plazmid içerdiği saptanmıştır (Şekil 4.7 ve 4.8). *Salmonella* serotiplerinde plazmid varlığı oldukça yüksek düzeyde değişkenlik göstermektedir. Bazı serotiplerde virülens özellik ve çoklu ilaç dirençlilik yanında nadir metabolik plazmidlerin varlığı da tanımlanmıştır. Plazmid içeren serotiplerde plazmid sayısı genellikle 1-5 arasında değişmektedir. Özellikle virülenslik ile ilgili plazmidlerin homolojisi üzerinde yürütülen çalışmalarda, değişik serotiplerde tanımlanan bu plazmidlerin büyük oranda benzer olduğu saptanmıştır. Bu durum söz konusu plazmidlerin konjugatif hareketlilik yolu ile aktarım sonucu yayıldığına işaret etmektedir (Hall and Collis 1998, Magnus and Mazel 2002, Suh and Odeh 2008). Değişik *S. Infantis* izolatları ile yürütülen çalışmalarda *S. enterica* türünün diğer üyelerinde de yaygın bir şekilde görüldüğü gibi, plazmid varlığı belirlenememiştir. Ancak bazı çalışmalarda bu suşların bir ya da nadiren 4 plazmid içeriğine sahip oldukları saptanmıştır. Söz konusu suşlarda bu plazmidler 2-100 kb büyüklüğünde tanımlanmış olup, özellikle büyük plazmidlerin (92-97 kb) bazı antibiyotik dirençlilik

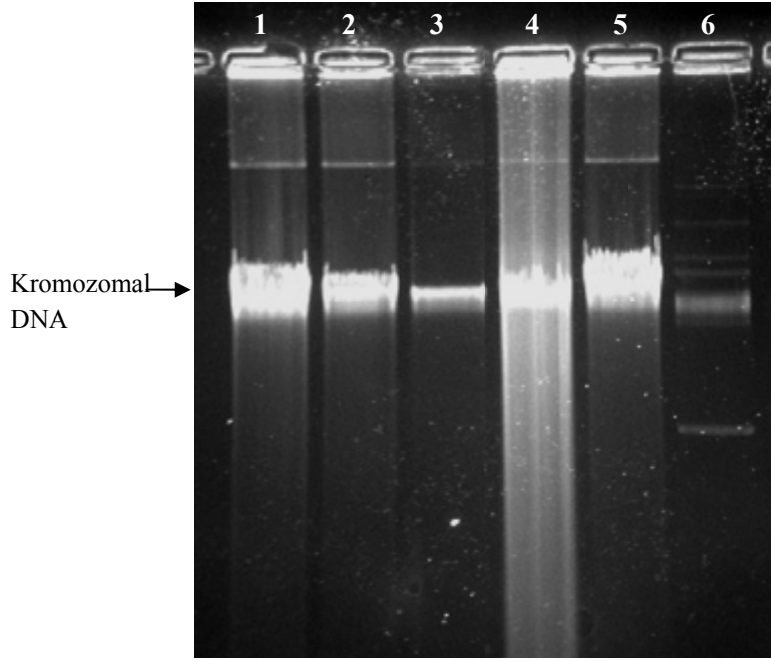
(β -laktamaz) fenotipleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. *S. Infantis* suşlarındaki 20 kb'dan düşük plazmidlerin ise kriptik plazmidler olduğu öne sürölmüştür (Lindqvist *et al.* 1999, Lindqvist and Pelkonen 2007, Kehrenberg *et al.* 2007, Suh and Odeh 2008).

Türkiye kökenli *S. Infantis* suşlarında tanımlanan megaplazmid (206.5 kb), şimdiye kadar bu serotipte tanımlanan en büyük plazmid olma özelliği ile dikkat çekmektedir. PFGE analizlerinde farklı gruplara ayrılan suşlarda bu plazmidin ortak oluşu, seçici baskının etkisi ile yayıldığına ve stabilite kazandığına işaret etmektedir. Bu öngörülerden hareketle tanımlanan megaplazmidin kontrol ettiği özellikler ve konjugal transferi üzerinde durulmuştur.



Şekil 4.7 *S. Infantis* suşlarının plazmid içeriği

Kuyu sırası	Suş No	Plazmid büyüklüğü
1	DMC12	206,5
2	DMC40	206,5
3	DMC58	206,5
4	DMC70	206,5
5	Marker	165, 120, 95, 55, 38, 28, non-marker DNA, 8 kb



Şekil 4.8 *S. Infantis* suşlarının plazmid içeriği

Kuyu sırası	Suş No	Plazmid büyüklüğü
1	DMC7	206,5
2	DMC20	206,5
3	DMC23	206,5
4	DMC57	206,5
5	DMC75	206,5
6	Marker	165, 120, 95, 55, 38, 28, non-marker DNA, 8 kb

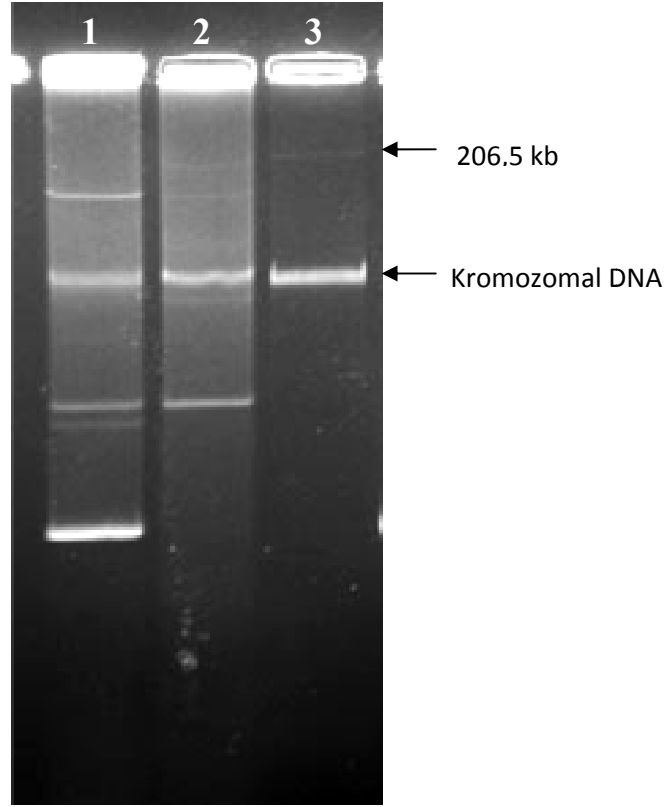
4.4 S. Infantis Suşlarında Nalidiksik Asit Dirençliliğinin Moleküler Analizi

Çoklu ilaç dirençlilik özelliğine sahip *S. Infantis* suşları verici olarak kullanılmak suretiyle, sadece karbenisilin dirençlilik içeren *S. Typhimurium* MA1 alıcı suşunda yürütülen katı agar eşleştirme yöntemi sonucunda, oluşan konjugantların yalnız 206.5 kb plazmidi kazandığı saptanmıştır. Tüm konjugantlarda kazanılan tek dirençliliğinin nalidiksik asite karşı saptanması, bu fenotipin 206.5 kb plazmid tarafından kodlandığını kanıtlamaktadır (Şekil 4.9). *Salmonella* suşlarında plazmid ya da kromozomal DNA kökenli genlerin konjugatif hareketliliği yaygın rastlanılan bir özelliktir. Yatay gen transferinin *Salmonella* patojenite adalarının evriminde oynadığı rol önemli ölçüde tanımlanmıştır. Günümüzde *Salmonella* genomik adaları içinde özellikle konjugal transfer sisteminin etkin olduğu yatay gen transfer mekanizmalarının antibiyotik dirençlilik bölgelerinin oluşumuna yol açtığı ileri sürülmektedir (Kehrenberg *et al.* 2007, Suh and Odeh 2008). Türkiye kökenli *S. Infantis* suşlarında nalidiksik asit (kinolon) dirençliliğinin konjugatif özellikte 206.5 kb plazmid tarafından kodlanması, bu özelliğin hızlı bir yayılım göstereceğine işaret etmektedir. Bu suşlarda diğer antibiyotiklere karşı dirençliliğinin 206.5 kb plazmid üzerinde kodlanmaması (kromozomal DNA kökenli oluşu) konjugatif hareketliliği engelleyen bir husus değildir. Zira antibiyotik dirençlilik gen kasetlerinin konjugatif transpozonlar yoluyla doğrudan aktarımı ya da konjugatif plazmidler üzerine taşındıktan sonra transferi de mümkündür. Deneysel çalışmamızda bu yolla aktarımın belirlenmemesi, söz konusu mekanizmaların çalışma koşullarında aktive olmamasından ya da düşük bir etkinliğe sahip olmasından kaynaklanabilir.

Konjugatif plazmidde kinolon dirençliliğinin varlığının moleküler analizi, bu ilaç dirençlilik genlerinin plazmid üzerindeki varlığının belirlenmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra aynı plazmid üzerinde I. sınıf integronların varlığı tanımlayıcı PZR primerleri kullanılarak belirlenmiştir.

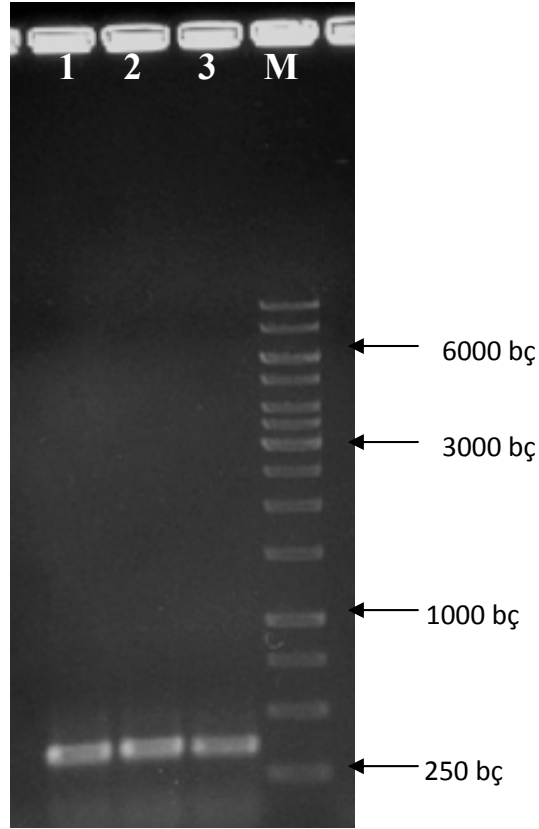
Kinolon dirençliliği kontrol eden *gyrA* gen bölgesine özgü primerler ile gerçekleştirilen çoğaltma çalışmalarında verici, alıcı ve konjugant suşlarda 313 baz çifti uzunlukta bir

bölge çoğaltılmıştır (Şekil 4.10). Bu denemede verici ve konjugant suşlarda PZR amplifikasyonu 206.5 kb plazmid kullanılarak, alıcı suşta ise genomik DNA üzerinde gerçekleştirilmiştir. Verici, alıcı ve konjugant suşlarda elde edilen PZR fragmentlerinin DNA dizi analizleri sonucu; verici ve konjugant suştaki *gyrA* bölgesinde, alıcı suştan farklı olarak, bir nokta mutasyonu sonucu 83. pozisyondaki serinin tirozine dönüştüğü saptanmıştır (Şekil 4.11). Bu durum, konjugatif plazmid tarafından kodlanan kinolon dirençliliğin (nalidiksik asit) söz konusu mutasyondan kaynaklandığını göstermektedir.



Şekil 4.9 Verici suş, alıcı suş ve nalidiksik asit dirençlilik aktarımı sağlanan konjugantın plazmid içerikleri

Kuyu sırası	Suş No
1	MA1 (alıcı suş)
2	DMC12+MA1 (konjugant)
3	DMC12 (verici suş)



Şekil 4.10 Konjugasyon denemelerinde kullanılan suşlarda *gyrA* primerleri

Kuyu sırası	Suş No	PZR Ürünü (bç)
1	DMC7 (verici)	313
2	Konjugant	313
3	MA1 (alıcı)	313
M	Marker (250-10000 bp; Generuler 1 kb DNA Ladder, #SM0311)	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250

a)

TGCCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCACGGCGATTTAC
GCAGTGTATGACACCATCGTTCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACA
TGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATTGACGGCGACTCCGCGGC
GGCAATGCGTTATACGGAGATCCGTCTGGCGAAAATCGCCCACGAACTGAT
GGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTGGA

b)

TGCCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCACGGCGATTTCC
GCAGTGTATGACACCATCGTTCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACA
TGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATTGACGGCGACTCCGCGGC
GGCAATGCGTTATACGGAGATCCGTCTGGCGAAAATCGCCCACGAACTGAT
GGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTGGA

Şekil 4.11 Konjugatif plazmid (a) ve alıcı suş (b) genomundan *gyrA* gen bölgesinin DNA dizi analizi

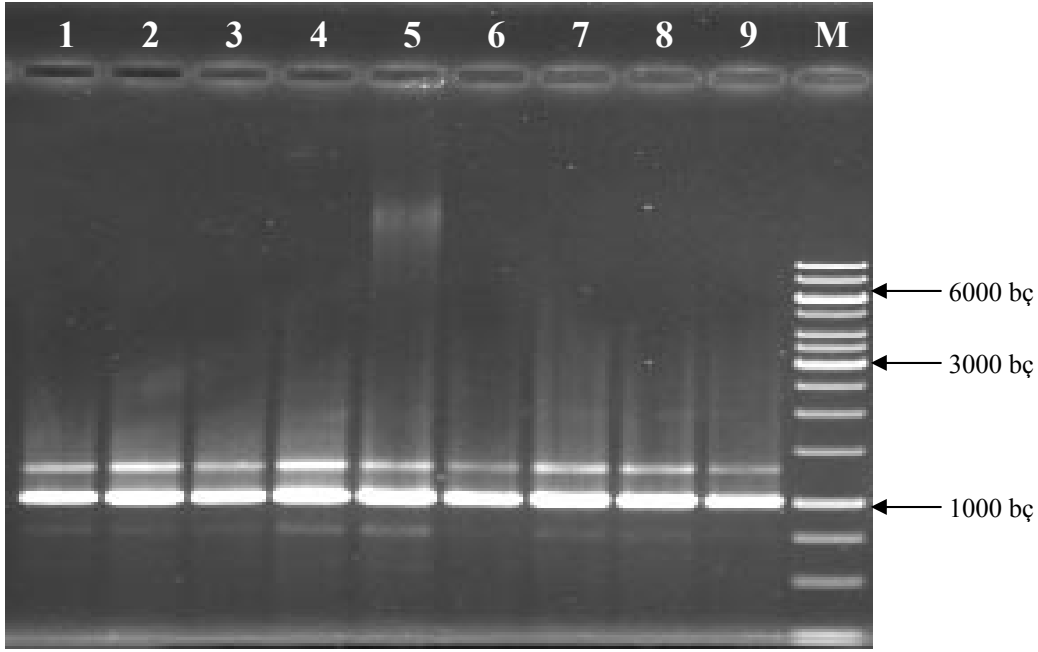
Kinolonlar sentetik antibakteriyel bileşikler olup, etkilerini DNA sentezini bozmak suretiyle gösterirler. Temel hedefleri Gram-negatif bakterilerde DNA topoizomeraz II (DNA giraz), Gram-pozitif bakterilerde ise DNA topoizomeraz IV'tür. Kinolonların primer hedefi topoizomerazlar olmasına rağmen, bu enzimlere doğrudan bağlanmazlar. Bunun yerine topoizomeraz-DNA komplekslerine bağlanmak suretiyle, topoizomeraz aktivitesini inhibe ederler. Bu aktivite sonucunda DNA üzerinde negatif superkangal dönüşlerin kaldırılması engellenir ve ayrıca eşlenen kromozom ayrışması gerçekleşmez. Nihai etki DNA kırıklarının teşvik edilmesi suretiyle sağlanır (Hall and Collis 1998, Tran and Jacoby 2002, Lukinmaa *et al.* 2004, Villa and Carattoli 2005, Gay *et al.* 2006).

Gram-negatif bakterilerde kinolon dirençlilikte üç temel mekanizma tanımlanmıştır. İlk dirençlilik mekanizması, DNA giraz enziminin *gyrA* ve *gyrB* alt ünitelerini kodlayan genlerde meydana gelen nokta mutasyonları sonucu, kinolon dirençli DNA giraz enzimlerinin oluşumudur. *Salmonella*'da kinolon dirençliliği kontrol eden bölgede (QRDR) yer alan *gyrA* geninde meydana gelen nokta mutasyonları sonucu 83. pozisyonundaki serinin (Ser-83) fenilalanin, tirozin ya da alanine veya 87. pozisyonundaki aspartik asidin glisin, asparajin ya da tirozine dönüşümü ile kinolon dirençliliğin sağlandığı saptanmıştır. Bu nokta mutasyonları, kinolon ve florokinolon grup antibakteriyel bileşikler içerisinde en yüksek dirençliliği nalidiksik aside karşı geliştirmektedir (Aarts *et al.* 2001, Cloeckaert and Schwarz 2001, Edwards *et al.* 2001, Fluit 2005, Borg *et al.* 2006, Fábrega *et al.* 2008). İkinci dirençlilik mekanizmasında, DNA topoizomeraz IV'ü kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu kinolon dirençlilik ortaya çıkmaktadır. Özellikle Gram-pozitif bakterilerde etkinlik gösteren bu mekanizma, bazı araştırmacılar tarafından *Salmonella* için de bildirilmiştir. Ancak bu araştırmalarda topoizomeraz IV alt ünitelerini kodlayan genlerde (özellikle *parC* ve *parE*) meydana gelen nokta mutasyonlarının kinolon dirençlilikte doğrudan etkisi yerine, DNA giraz genlerinde meydana gelen mutasyonların etkisini artırdığı ileri sürülmektedir (Lan *et al.* 2009, Xia *et al.* 2009). Bununla birlikte topoizomeraz IV genlerinde oluşan nokta mutasyonlarının *Salmonella*'da kinolon dirençlilik üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Amavisit *et al.* 2003, Herrero *et al.* 2008, Nishino *et al.* 2009). Kinolon dirençliliğin sağlanmasında etkinlik gösteren sistemlerden biri olan akış pompalarının regülasyonu, *Salmonella*'da

sıklıkla rastlanılan diğ er bir mekanizmadır. Son diren çlilik mekanizması ise plazmid kodlu genler tarafından yönetilen sistemlerdir. Bu mekanizmada, plazmid kodlu genler tarafından determine edilen diren ç proteinleri DNA giraz enzimi ile etkileşerek ilaç bağlanmasını engellemektedir (Luque *et al.* 2009, M rmann *et al.* 2009, Nishino *et al.* 2009).

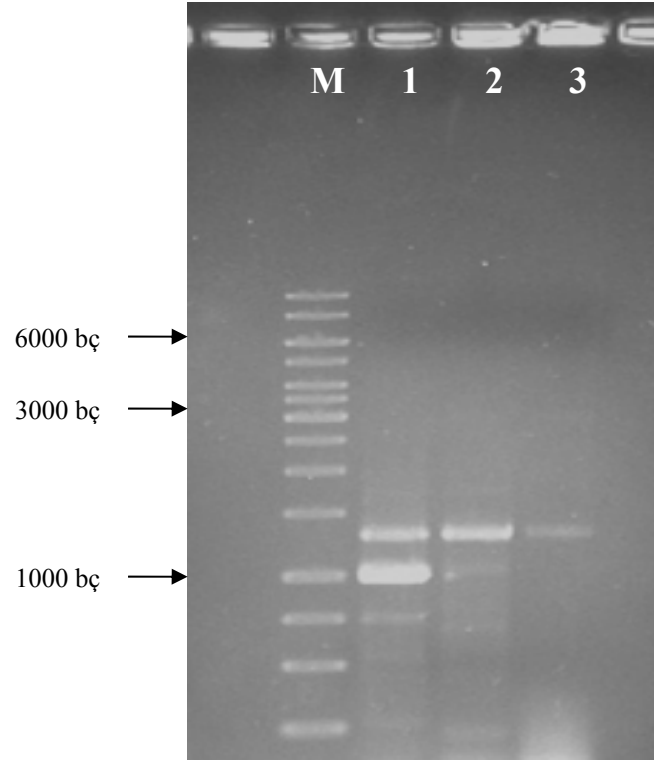
Çalışmamızda yürütülen moleküler analiz sonuçları *S. Infantis* su larında konjugatif bir plazmid (206,5 kb)  zerinde kodlanan *gyrA* geninde 83. pozisyondaki serinin (Ser-83, TCC) bir nokta mutasyonu ile tirozine (Tyr-83, TAC) dönüşümü sonucu nalidiksik asite yüksek düzeyde (>132  g/ml) diren çliliğin sağlandığını kanıtlamaktadır. Çok sayıda *Salmonella enterica* serotipinde bu mutasyonun yüksek düzeyde kinolon diren çlilik ile ilişkili olduğu ve konjugatif transpozonlar ya da plazmidler ile integronların entegrasyonu sonucu yatay gen transferinin gerçekleştiği belirlenmiştir (Su *et al.* 2006, Alcaine *et al.* 2007, Martinez *et al.* 2008, Nishino *et al.* 2009). Bununla birlikte bugüne kadar bu tür kinolon diren çliliğin *S. Infantis* su larında mega plazmidlerin üzerinde bulunduğu ve konjugasyonu yolu ile aktarıldığına dair bir veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda tanımlanan bu plazmidin kökeninin araştırılması, Türkiye kökenli *S. Infantis* su larında kinolon diren çliliğin evrimi ve geleceği konusunda önemli ipuçları verecektir.

Salmonella'da kinolonların da dahil olduğu birçok ilaç diren çlilik gen kaseti, *Salmonella* genomik adası I (SGI-I) içerisinde yer alan I. sınıf integronlar tarafından yakalanmaktadır (Baker *et al.* 2008, Halawani and Shohayeb 2008, Lapierre *et al.* 2008, Havlickova *et al.* 2009, Pan *et al.* 2009). Türkiye kökenli *S. Infantis* su larında nalidiksik asit diren çliliğin integronlar ile ilişkisinin tanımlanması amacı ile, I. sınıf integronlara özgü primerler kullanılarak ilgili genler aranmi tır. Polimeraz zincir reaksiyonları sonucu tüm *S. Infantis* su larında I. sınıf integronlara özgü 1000 bp ve 1200 baz çifti uzunlukta bölgeler çoğaltılmıştır ( ekil 4.12). Bu su lardaki konjugatif plazmidde I. sınıf integronların analizi sonuçları da genomik analizlerle paralel bulunmuştur ( ekil 4.13). Bu durum I. sınıf integronların konjugatif plazmid üzerinde bulunduğunu kanıtlamaktadır. Alıcı su ta I. sınıf integronların primerleri



Şekil 4.12 *S. Infantis* suşlarında I sınıf integronların analizi

Kuyu sırası	Suş No	PZR Ürünü (bp)
1	DMC7	1000; 1200
2	DMC12	1000; 1200
3	DMC20	1000; 1200
4	DMC23	1000; 1200
5	DMC40	1000; 1200
6	DMC57	1000; 1200
7	DMC58	1000; 1200
8	DMC70	1000; 1200
9	DMC75	1000; 1200
M(Marker)	(250-10000 bp; Generuler 1 kb DNA Ladder, #SM0311)	



Şekil 4.13 Verici suş, konjugatif plazmid ve alıcı suшта I. sınıf integronların analizi

Kuyu sırası	Suş No	PZR Ürünü (bç)
1	DMC7 (verici suş)	1000; 1200
2	Konjugant	1000; 1200
3	MA1 (alıcı suş)	1200
M(Marker)	(250-10000 bp; Generuler 1 kb DNA Ladder, #SM0311)	

ile yürütülen çoğaltma çalışmaları sonucunda ise; verici suş ve konjugatif plazmidten farklı olarak, yalnız 1200 baz çifti uzunlukta bölge çoğaltılmıştır (Şekil 4.13). Bu bulgu verici ve alıcı suşlarda I. sınıf integronların varyasyon gösterdiğine işaret etmektedir. Verici suşlarda ve konjugatif plazmid üzerinde çoğaltılan I. sınıf integron fragmentlerinden 1000 baz çiftlik parçanın jelden saflaştırıldıktan sonra *gyrA* primerleri ile çoğaltılan bölgesinin DNA dizi analizi sonuçları, tirozin mutasyonlu bölgenin varlığını göstermiştir (Şekil 4.14). Bu fragment alıcı suşta I. sınıf integron primerleri ile çoğaltılamamıştır. Tüm bu bulgular Türkiye kökenli *S. Infantis* suşlarında nalidiksik asit dirençliliğinin I. sınıf integronlar tarafından yakalandığını ve konjugatif bir plazmid üzerine taşınarak yatay gen transferinin sağlandığını kanıtlamaktadır. Nalidiksik asit dirençlilikte belirlenen nokta mutasyonunun etkinliğinin özellikle *par* geni (DNA topoizomera IV geni) mutasyonları ya da akış pompası regülasyonu ile desteklenip desteklenmediğinin araştırılması, kinolon dirençliliğinin mekanizmalarının detaylandırılması açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle yeni mutant bankalarının söz konusu nokta mutasyonları tarafından taranarak sinerjetik etkilerin belirlenmesi ileri düzey çalışmalar olarak planlanmaktadır.

TGCCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCACGGCGATTAC
GCAGTGTATGACACCATCGTTCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACA
TGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATTGACGGCGACTCCGCGGC
GGCAATGCGTTATACGGAGATCCGTCTGGCGAAAATCGCCCACGAACTGAT
GGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTGGA

Şekil 4.14 Verici suş genomik DNA'sı ve konjugatif plazmid (206.5 kb) üzerinde çoğaltılan *gyrA* gen bölgesinin DNA dizi analizi

KAYNAKLAR

- Aarts, H. J. M., Boumedine, K. S., Nesme, X. and Cloeckaert, A. 2001. Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. *Veterinary Research*, 32, 363-380.
- Asai, T., Ishihara, K., Harada, K., Kojima, A., Tamura, Y., Sato, S. and Takahashi, T. 2007. Long-Term Prevalence of Antimicrobial-Resistant *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Serovar Infantis in the Broiler Chicken Industry in Japan. *Microbiology and Immunology*, 51(1), 111-115.
- Avşaroğlu, M. D., Helmuth, R., Junker, E., Hertwig, S., Schroeter, A., Akcelik, M., Bozoglu, F. and Guerra, B. 2007. Plasmid-mediated quinolone resistance conferred by qnrS1 in *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated from Turkish food of avian origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 1146-1150.
- Angulo, F. J., Johnson, K. R., Tauxe, R. V. and Cohen, M. L. 2000. Origins and Consequences of Antimicrobial-Resistant Nontyphoidal *Salmonella*: Implications for the Use of Fluoroquinolones in Food Animals. *Microbial Drug Resistance*, 6(1), 77-83.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1994. *Current protocols in molecular biology*, 4. Baskı., New York.
- Alcaine, S. D., Warnick, L. D. and Wiedmann, M. 2007. Review Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, 70(3), 780-790.
- Ando, Y., Ono, K., Tsuji, R., Masutani, T., Fujiwara, Y., Kurazono, T. and Yanagawa, K. 2003. Investigation on contamination level of *Salmonella* spp. in chicken meat and analysis of *Salmonella* Infantis by PFGE method, *Jpn. J. Food Microbiol.*, 20, 123-127.
- Ang-Küçüker, M., Tolun, V., Helmuth, R., Rabsch, W., Boral, Ö., Akbulut, D., Susever, S. and Ang, Ö. 2000. Phage types, antibiotic susceptibilities and plasmid profiles of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains isolated in İstanbul, Turkey. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 6, 593-599.
- Amavisit, P., Lightfoot, D., Browning, G. F. and Markham, P. F. 2003. Variation between Pathogenic Serovars within *Salmonella* Pathogenicity Islands. *Journal of Bacteriology*, 185(12), 3624-3635.

- Baker, S., Pickard, D., Whitehead, S., Farrar, J. and Dougan, G. 2008. Mobilization of the *incQ* Plasmid R300B with a Chromosomal Conjugation System in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 4084-4087.
- Barrow, P. A. and Lovell, M. A. 1989. Functional Homology of Virulence Plasmids in *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, and *S. typhimurium*. *Infection and Immunity*, 57(10), 3136-3141.
- Borg, M. A., Scicluna, E., de Kraker, M., van de Sande-Bruinsma, N., Tiemersma, E., Gür, D., Redjeb, S. B., Rasslan, O., Elnassar, Z., Benbachir, M., Bagatzouni, D. P., Rahal, K., Daoud, Z., Grundmann, H. and Monen, J. 2006. Antibiotic Resistance in the Southeastern Mediterranean-Preliminary Results from the Armed Project. *Eurosurveillance*, 11, 164-167.
- Campbell, G. S. 1974. A Simple Method for Determining Unsaturated Conductivity From Moisture Retention Data. *Soil Science*, 177(6), 311-387.
- Carattoli, A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32, 243-259.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L. and Threlfall, E. J. 2005. Identification of plasmids by PZR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 219-228.
- Casadesus, J. and Camacho, E. M. 2002. Genetic Mapping in *Salmonella enterica*. In: *Prokaryotic genomics*. M. Blot (ed). Birkhäuser, pp. 10-20, Basel/Switzerland.
- Chakravorty, D., Wester, I. and Hensel, M. 2002. *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Mediates Protection of Intracellular *Salmonella* from Reactive Nitrogen Intermediates. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(9), 1155-1166.
- Chen, H., Joerger, R. D., Kingsley, D. H. and Hoover, D. G. 2004. Pressure Inactivation Kinetics of Phage λ cl 857. *Journal of Food Protection*, 67, 505-511.
- Chessa, D., Winter, M. G., Nuccio, S., Tükel, Ç. and Bäumler, A. J. 2008a. *RosE* represses *Std* fimbrial expression in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 68(3), 573-587.
- Chessa, D., Dorsey, C. W., Winter, M. and Bäumler, A. J. 2008b. Binding Specificity of *Salmonella* Plasmid-encoded Fimbriae Assessed by Glycomics. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8118-8124.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 18th informational supplement. CLSI, M100-S18 Clinical and Laboratory Standards Institute, 940, PA, USA.

- Cloeckaert, A. and Schwarz, S. 2001. Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Veterinary Research*, 32, 301-310.
- Coombes, B. K., Wickham, M. E., Lowden, M. J., Brown, N. F. and Finlay, B. B. 2005. Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 102(48), 17460-17465.
- Desvaux, M., Parham, N. J. and Henderson, I. R. 2004. The autotransporter secretion system. *Research in Microbiology*, 155(2), 53-60.
- Edwards, R. A., Matlock, B. C., Heffernan, B. J. and Maloy, S. R. 2001. Genomic analysis and growth-phase-dependent regulation of the SEF14 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Microbiology*, 147, 2705-2715.
- Edwards, R. A., Olsen, G. J. and Maloy S. R. 2002. Comparative genomics of closely related *Salmonellae*. *Trends in Microbiology*, 10(2), 94-99.
- Elder, J. K. and Southern E. M. 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis II: Comparison of methods for relating mobility to fragment length. *Analytical Biochemistry*, 128(1), 227-231.
- Elder, R. T., Loh, E. Y. and Davis, R. W. 1983. RNA from the yeast transposable element *TyI* has both ends in the direct repeats, a structure similar to retrovirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 80, 2432-2436.
- Erdem, B., Ercis, S., Hascelik, G., Gur, D., Gedikoglu, S., Aysev, A. D., Sumerkan, B., Otkun, M. ve Tuncer, I. 2005. Antimicrobial resistance patterns and serotype distribution among *Salmonella enterica* strains in Turkey, 2000-2002. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24, 220-225.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. and Hinton, J. C. D. 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 47(1), 103-118.
- Fábrega, A., Sánchez-Céspedes, J., Soto, S. and Vila, J. 2008. Quinolone resistance in the food chain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, 307-315.
- Fluit, A. C. and Schmitz, F. J. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 272-288.
- Fluit, A. C. 2005. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43, 1-11.

- Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P. and Lambert, T. 2005. Worldwide Disseminated *armA* Aminoglycoside Resistance Methylase Gene Is Borne by Composite Transposon Tn1548. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2949-2953.
- Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, H. C., Jacoby, G., Barrett, T. J., Medalla, F., Chiller, T. M. and Hooper, D. C. 2006. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Non-Typhi Serotypes of *Salmonella enterica*. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 297-304.
- Gibson, G. R., McCartney, A. L. and Rastall, R. A. 2005. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *British Journal of Nutrition*, 93(1), 31-34.
- Grabber, J. H., Hatfield, R. D., Ralph, J., Zou, J. and Amrhein, N. 1995. Ferulate cross-linking in cell walls isolated from maize cell suspensions. *Phytochemistry*, 40(4), 1077-1082.
- Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R. Mendoza, M. C. 2002. Characterisation of a Self-Transferable Plasmid from *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Clinical Isolates Carrying Two Integron-Borne Gene Cassettes Together with Virulence and Drug Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 2977-2981.
- Guerra, B., Malorny, B., Schroeter, A. and Helmuth, R. 2003. Multiple resistance mechanisms in fluoroquinolone resistant *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 2059.
- Halawani, E. and Shohayeb, M. 2008. Molecular Characterisation of Multiple Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Enteritidis Isolated in Saudi Arabia. *World Journal of Medical Sciences*, 3(1), 43-49.
- Hall, R. M. and Collis, C. M. 1998. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resistance Updates*, 1, 109-119.
- Hamada, K., Oshima, K. and Tsuji, H. 2003. Chromosomal Transferable Multidrug Resistance Genes of *Salmonella enterica* Serovar Infantis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 56, 216-218.
- Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. and Slack, A. 2004. Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 12(9), 401-404.
- Hata, M., Suzuki, M., Matsumoto, M., Takahashi, M., Sato, K., Ibe, S. and Sakae, K. 2005. Cloning of a Novel Gene for Quinolone Resistance from a Transferable Plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 801-803.

- Havlickova, H., Hradecka, H., Bernardyova, I. and Rychlik, I. 2009. Distribution of integrons and SGI1 among antibiotic-resistant *Salmonella enterica* isolates of animal origin. *Veterinary Microbiology*, 133, 193-198.
- Helinski, D. R. 2004. An Introduction to plasmids: A selective view of their history. In: *Plasmid Biology*. B. E. Funnell and G. Philips (eds). ASM Press, pp. 1-21, Washington, DC.
- Helms, M., Ethelberg, S., Molbak, K. and the DT104 Study Group 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 Infections, 1992-2001. *Emerging Infectious Diseases*, 11(6), 859-867.
- Herrero, A., Rodicio, M. R., Echeita, M. A. and Mendoza, M. C. 2008. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium carrying hybrid virulence-resistance plasmids (pUO-StVR): A new multidrug-resistant group endemic in Spain. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 253-261.
- Hradecka, H., Karasova, D. and Rychlik, I. 2008. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium conjugative plasmids transferring resistance to antibiotics and their interaction with the virulence plasmid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 932-941.
- Jacoby, G. A., Walsh, K. E., Mills, D. M., Walker, V. J., Oh, H., Robicsek, A. and Hooper, D. C. 2006. *qnrB*, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1178-1182.
- Kado, C. I. and Liu, S. T. 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *Journal of Bacteriology*, 145, 1365-1373.
- Kehrenberg, C., de Jong, A., Friederichs, S., Cloeckert, A. and Schwarz, S. 2007. Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian *Salmonella* serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 886-892.
- Klemm, M., Cheng, C., Cassell, G., Shuman, S. and Segall, A. M. 2000. Peptide Inhibitors of DNA Cleavage by Tyrosine Recombinases and Topoisomerases. *Journal of Molecular Biology*, 299, 1203-1216.
- Lan, J., Warner, T. F. and Heise, C. P. 2009. Attenuated *Salmonella* typhimurium-mediated interleukin-10 delivery is beneficial for dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *Diseases of the Colon and Rectum*, 43(3), 297-304.
- Langille, M. G. I., Zhao, F., Fedynak, A., Hsiao, W. W. L., Xu, Y. and Brinkman, F. S. L. 2007. Mobile Genetic Elements and Their Prediction. In: *Computational Methods for Understanding Bacterial and Archaeal Genomes*. Ying Xu and J. Peter Gogarten (eds). Imperial College Press, pp. 113-135, USA.

- Lapierre, L., Cornejo, J., Borie, C., Toro, C. and San Martin, B. 2008. Genetic Characterisation of Antibiotic Resistance Genes Linked to Class 1 and Class 2 Integrans in Commensal Strains of *Escherichia coli* isolated from Poultry and Swine. *Microbial Drug Resistance*, 14, 265-272.
- Lesnick, M. L., Reiner, N. E., Flerer, J. and Guiney, D. G. 2001. The *Salmonella* *spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Molecular Microbiology*, 39(6), 1464-1470.
- Lévesque, C., Piché, L., Larose, C. and Roy, P. H. 1995. PZR Mapping of Integrans Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1), 185-191.
- Li, X. Z., Mehrotra, M., Ghimire, S. and Adewoye, L. 2007. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology*, 121, 197-214.
- Lindqvist, N., Heinikainen, S., Toivonen, A.M., and Pelkonen, S. 1999. Discrimination between endemic and feedborne *Salmonella* Infantis infection in cattle by molecular typing. *Epidemiology and Infection*. 122, 497-504.
- Lindqvist, N. and Pelkonen, S. 2007. Genetic surveillance of endemic bovine *Salmonella* Infantis infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1), 15.
- Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini G. M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T. M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L. and Woodford, N. 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 165-174.
- Lukinmaa, S., Nakari, U. M., Eklund, M. and Siitonen, A. 2004. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *APMIS*, 112, 908-929.
- Luque, I., Echeita, A., León, J., Herrera-León, S., Tarradas, C. and González-Sanz, R. 2009. *Salmonella* Indiana as a cause of abortion in ewes: Genetic diversity and resistance patterns. *Veterinary Microbiology*, 134, 396-399.
- Macedo-Vinas, M., Cordeiro, N. F., Bado, I., Herrera-Leon, S., Vola, M., Robino, L., Gonzales-Sanz, R., Mateos, S., Schelotto, F., Algorta, G., Ayala, J. A., Echeita, A. and Vignoli, R. 2008. Surveillance of Antibiotic Resistance evolution and detection of class 1 and 2 integrons in human isolates of multi-resistant *Salmonella* Typhimurium obtained in Uruguay between 1976 and 2000. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(3), 342-348.
- Macrina, F. L., Kopecko, D. J., Jones, K. R., Ayers, D. J. and McCowen, S. M. 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid*, 1(3), 417-420.

- Magnus, D. A. and Mazel, D. 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology*, 292, 115-125.
- Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., Martinez, L. and Nordmann, P. 2005. Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 71-76.
- Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Solano, L. and Sánchez, M. B. 2008. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Review*, 33, 44-65.
- Merkl, R. 2004. SIGI: score-based identification of genomic islands. *BMC Bioinformatics*, 5, 1-14.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R. and Wilson, R. K. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413(6858), 852-856.
- Michael, G. B., Cardoso, M. and Schwarz, S. 2008. Molecular analysis of multiresistant porcine *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar Bredeney isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons and a group II intron. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 120-129.
- Miko, A., Pries, K., Schroeter, A. and Helmuth, R. 2003. Multiple-Drug Resistance in D-Tartrate-Positive *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi B Isolates from Poultry Is Mediated by Class 2 Integrons Inserted into the Bacterial Chromosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(11), 3640-3643.
- Miriagou, V., Carattoli, A. and Fanning, S. 2006. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes and Infection*, 8, 1923-1930.
- Montenegro, M. A., Morelli, G. and Helmuth, R. 1991. Heteroduplex analysis of *Salmonella* virulence plasmids and their prevalence in isolates of defined sources. *Microbial Pathogenesis*, 11(6), 391-397.
- Mürmann, L., dos Santos, M. C. and Cardoso, M. 2009. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. *Food Control*, 20, 191-195.
- Nikaido, H. 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology*, 1, 516-523.

- Nishino, K., Nikaido, F. and Yamaguchi, A. 2009. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794, 834-843.
- Ou, J. 1993. The 90 kilobase pair virulence plasmid of *Salmonella* serovar Typhimurium coexists in strains with a plasmid of the 23 incompatibility groups. *Microbial pathogenesis*, 15(3), 237-242.
- Pai, H., Seo, M. R. and Choi, T. Y. 2007. Association of QnrB Determinants and Production of Extended-Spectrum β -Lactamases or Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), 366-368.
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D. and Hooper, D. C. 2006. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3953-3955.
- Pan, Z., Wang, X., Zhang, X., Geng, S., Chen, X., Pan, W., Cong, Q., Liu, X., Jiao, X. and Liu, X. 2009. Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Pullorum isolates in China from 1962 to 2007. *Veterinary Microbiology*, 136(3-4), 387-392.
- Pasquali, F., Kehrenberg, C., Manfreda, G. and Schwarz, S. 2005. Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 562-565.
- Paterson, D. L. and Bonomo, R. A. 2005. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686.
- Peirano, G., Agersø, Y., Aarestrup, F. M., dos Reis, E. M. F. and Rodrigues, D. P. 2006. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 305-309.
- Pepper, J. W. 2003. The evolution of evolvability in genetic linkage patterns. *BioSystems*, 69, 115-126.
- Porwollik, S., Boyd, E. F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E. and McClelland, M. 2004. Characterisation of *Salmonella enterica* Subspecies I Genovars by Use of Microarrays. *Journal of Bacteriology*. 186 (17), 5883-5898.
- Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Dusold, R., Rubino, S. and Bäumler, A. J. 2005. The Vi Capsular Antigen of *Salmonella enterica* Serotype Typhi Reduces Toll-Like Receptor-Dependent Interleukin-8 Expression in the Intestinal Mucosa. *Infection and Immunity*. 73 (6), 3367-3374.
- Rychlik, I., Gregorova, D. and Hradecka, H. 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology*, 112, 1-10.

- Saeed, F., Khokhar, A., Zagardi, O. and Beerenwinkel, N. 2009. Multiple Sequence Alignment System for Pyrosequencing Reads, www.arvix.org. Eriřim Tarihi: 23.04.2009.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schaffer, H. E. and Sederoff, R. R. 1981. Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. Analytical Biochemistry, 115(1), 113-122.
- Schwarz, S., Cloeckart, A. and Roberts, M. C. 2006. Mechanisms and Spread of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. In: Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Frank M. Aarestrup (ed). ASM Press, pp.73-98, Washington, DC.
- Smith W. A, Mozet A. K. J., Hirsh D. C. 2000 *Salmonella* in California Wildlife Species: Prevalance in Rehabilitation Centers and Characterisation of Isolates. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 33 (3), 228-235.
- Southern, E. M. 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. Analytical Biochemistry, 100(2), 319-323.
- Stewart, P. E., Byram, R., Grimm, D., Tilly, K. and Rosa, A. P., 2004. The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. Plasmid, 53(1), 1-13.
- Su, L., Chen, H., Chia, J., Liu, S., Chu, C., Wu, T. and Chiu, C. 2006. Distribution of a transposon-like element carrying *bla*_{CMY-2} among *Salmonella* and other Enterobacteriaceae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57(3), 424-429.
- Suar, M., Jantsch, J., Hapfelmeier, S., Kremer, M., Stallmach, T., Barrow, P.A. and Hardt, W.D. 2006. Virulence of Broad- and Narrow- Host- Range *Salmonella enterica* Serovars in the Streptomycin-Pretreated Mouse Model. Infection and Immunity, 74 (1), 632-644.
- Suh, Y. C. and Odeh, E. N. 2008. Plasmids: A Vehicle for rapid transfer of antibiotic resistance markers of *Salmonella* species in animals. International Journal of Integrative Biology, 2(1), 55-61.
- Tenover, F. C. and Pearson, M. L. 2004. Methicillin-resistant staphylococcus aureus. Emerging infectious diseases, 10(11), 2052-2053.
- Tran, J. H. and Jacoby, G. A. 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. PNAS, 99(8), 5638-5642.

- Tükel, Ç., Akçelik, M., de Jong, M. F., Şimşek, Ö., Tsolis, R. M. and Bäumler, A. J. 2007. MarT Activates Expression of the MisL Autotransporter Protein of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189(10), 3922–3926.
- van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Veldman, K. and Mevius, D. 2007. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 746-750.
- Velge, P., Cloeckaert, A. and Barrow, P. 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotyp Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research*, 36, 267-288.
- Villa, L. and Carattoli, A. 2005. Integrons and Transposons on the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Virulence Plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), 1194-1197.
- Voetsch, A.C., Gildler, T. J. V., Angulo, F.J., Farley, M. M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P. R., Deneen, V.C. and Tauxe, R.V. 2004. FoodNet Estimate of the Burden of Illnes Caused by Nontyphoidal *Salmonella* Infections in the United States. *Estimate of Salmonella Incidence*, 38 (3), 127-134.
- Wallis, T. S., Paulin, S. M., Plested, J. S., Watson, P. R. and Jones, P. W. 1995. The *Salmonella dublin* Virulence Plasmid Mediates Systemic but Not Enteric Phases of Salmonellosis in Cattle. *Infection and Immunity*, 63(7), 2755-2761.
- Walsh, C. 2003. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. ASM Press, pp. 23-49, Washington, DC.
- Wang, M., Sahm, D. F., Jacoby, G. A. and Hooper, D. C. 2004. Emerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated with the *qnr* Gene in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1295-1299.
- Waturangi, D. E., Suwanto, A., Schwarz, S. and Erdelen, W. 2003. Identification of class 1 integrons-associated gene cassettes in *Escherichia coli* isolated from *Varanus* spp. in Indonesia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 175-177.
- Wegener, H. C. and Baggesen, D. L. 1996. Investigation of an outbreak of human salmonellosis caused by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Infantis by use of pulsed field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 32, 125-131.

- Wilson, D. N., Schlunzen, F., Harms, J. M., Starosta, A. L., Connell, S. R. and Fucini, P. 2008. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 105(36), 13339-13344.
- Wright, G. D. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews*, 5, 175-186.
- Xia, X., Zhao, S., Smith, A., McEvoy, J., Meng, J. and Bhagwat, A. A. 2009. Characterisation of *Salmonella* isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 93-98.
- Yan, S. S., Pendrak, M. L., Abela-Ridder, B., Punderson, J. W., Fedorko, D. P. and Foley, S. L. 2003. An overview of *Salmonella* typing Public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4, 189-204.
- Yang, B., Zheng, J., Brown, E. W., Zhao, S. and Meng, J. 2009. Characterisation of antimicrobial resistance-associated integrons and mismatch repair gene mutations in *Salmonella* serotypes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 120-124.
- Yazıcıoğlu, N., Kaya, K., Ayaz, K., Şen, S., Özkök, S., Aksoy, M., Yavuz, M. K., Kaplan, Y. Z., Tunca, Ş. T., Vural, Ş., Evgin, N., Karakoç, S. R., Miroğlu, M. ve Turut, N. 2005. Kanatlı kesimhanelerinin parçalama ünitelerinden alınan boyun ve kanat örneklerinden *Salmonella* izolasyonu, serotiplermesi ve antibiyotik dirençliliğinin araştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobioloji Dergisi*, 16, 23-36.
- Zhao, S., Qaiyumi, S., Friedman, S., Singh, R., Foley, S. L., White, D. G., McDermott, P. F., Donkar, T., Bolin, C., Munro, S., Baron, E. J. and Walker, R. D. 2003. Characterisation of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolated from Humans and Food Animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5366-5371.
- Zhao, S., McDermott, P. F., Friedman, F., Abbott, J., Ayers, S., Glenn, A., Robinson, E., Hubert, S. K., Harbottle, H., Walker, R. D., Chiller, T. M and White, D. G. 2006. Antimicrobial Resistance and Genetic Relatedness Among *Salmonella* from Retail Foods of Animal Origin: NARMS Retail Meat Surveillance. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 106-117.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu Abbasoğlu

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 22.10.1984

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise :Atatürk Anadolu Lisesi, 2002

Lisans :Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2007

Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim

Dalı, Şubat/2007-Haziran/2009