



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**HAYVANSAL ORİJİNLİ *SALMONELLA*
TYPHIMURIUM VE *SALMONELLA* KENTUCKY
SEROTİPLERİNDE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN
KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
SAPTANMASI**

Zeynep ŞİK

**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet AKAN**

ANKARA

2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAYVANSAL ORİJİNLİ *SALMONELLA*
TYPHIMURIUM VE *SALMONELLA* KENTUCKY
SEROTİPLERİNDE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN
KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
SAPTANMASI

Zeynep ŞİK

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet AKAN

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Hayvansal Orijinli *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Kentucky Serotiplerinde Antibiyotik Direncinin Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Saptanması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Zeynep ŞIK

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında

Zeynep ŞIK tarafından hazırlanan

“Hayvansal Orijinli *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Kentucky Serotiplerinde Antibiyotik Direncinin Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle

Saptanması” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY

ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	4
1.2. Etiyoloji	4
1.3. Patogenez	5
1.4. Antimikrobiyal Direnç	6
2. GEREÇ ve YÖNTEM	11
2.1. Gereç	11
2.1.1. Çalışmada Kullanılan <i>S. Typhimurium</i> ve <i>S. Kentucky</i> Suşları	11
2.1.2. <i>Salmonella</i> Serotiplendirme	12
2.1.3. Antibiyotik Diskleri	12
2.1.4. Moleküler Analizlerde Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	13
2.2. Yöntem	14
2.2.1. <i>Salmonella</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu	14
2.2.2. Disk Difüzyon Yöntemi	14
2.2.3. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Moleküler Analizi	15
2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu	15
2.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	16
2.2.3.3. Elektroforez ve Görüntüleme	17
3. BULGULAR	18
3.1. Serotiplendirme Bulguları	18
3.2. Disk Difüzyon Bulguları	18
3.3. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Moleküler Analiz Bulguları	30
4. TARTIŞMA	33
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	41
ÖZET	43
SUMMARY	45
KAYNAKLAR	47

ÖNSÖZ

Günümüzde 1415 patojen mikroorganizmanın insanlarda enfeksiyon oluşturduğu ortaya konmuştur. Bu patojenlerin 868 (%61) adedi zoonozdur. Tanımlanan 538 adet bakteri, geliştirilecek antimikrobiyallere karşı direnç oluşturmak ve bu direnç özelliğini aktarabilme potansiyeline sahiptir. Hayvancılık işletmelerinin kalabalık, kötü bakım beslenme ve hijyen şartlarının sahip olması ve aşırı miktarda ve bilinçsiz antimikrobiyal kullanımının sonucunda bakteriler antibiyotiklere karşı direnç geliştirmekte ve direnç özelliği bu ortamlarda daha kolay yayılabilmektedir. Dünyada antibiyotik kullanımının %73'ü gıda üreten hayvanlara uygulandığı tahmin edilirken, 2030 yılına kadar bu tüketim miktarının %67 oranında artması beklenmektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda tedavi amaçla kullanılan antibiyotik sınıfları çoğunlukla aynı olduğundan dolayı enfeksiyon etkenleri de dahil olmak üzere dirençli bakterilerin ortaya çıkma ve yayılma riskini artırmıştır. Antimikrobiyal direnç küresel bir halk sağlığı sorunudur. *Salmonella* serovarıları arasında antibiyotiklere en dirençli zoonotik serovardan biri olan, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Kentucky'dir. İnsanlarda gıda zehirlenmesine neden olan en önemli iki serovardan biri *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium'dur. Hayvansal orijinli ve çoklu ilaç direncine sahip bu iki serovar halk sağlığı için büyük risk oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasının amacı büyükbaş, küçükbaş ve kanatlı hayvanda dahil olmak üzere çeşitli konakçı türlerinden izole edilen *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* serovarlarında disk difüzyon ve moleküler yöntemlerle antimikrobiyal direnç profilini belirlemek amaçlandı. Antimikrobiyal direnç sorununun oluşmasını ve yayılmasını önlemek için bu tez çalışmasının sonuçlarının katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Doktora öğrenimim süresince her konuda destek olan başta danışman hocam Prof. Dr. Mehmet AKAN'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya ve Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU'na ve Doç. Dr. Kaan MÜŞTAK'a teşekkür ederim. Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı personelleri, mesai arkadaşlarım Uzm. Veteriner Hekim Selahattin ŞEN, Enes Gazi ATICI ve Yasin ELİTOK'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Son olarak bu

süreçte bana her zaman destek olan ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan annem Teslime ŞIK, babam Mevlüt ŞIK'a ve ablam Gülsüm ŞIK GÖKÇEN ve kardeşim İsmail ŞIK'a sonsuz teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

AB	Avrupa Birliği
AMP	Ampisilin
Bp	Baz çifti
C	Kloramfenikol
CAZ	Seftazidim
CIP	Siprofloksasin
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
CN	Gentamisin
CTX	Sefotaksim
ÇİD	Çoklu ilaç direnci
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FOX	Sefoksitin
ISO	International Organization for standardization
S3	Sulfonamid
S	Streptomisin
SXT	Trimetoprim/Sülfametaksazol
TE	Tetrasiklin
M	Moleküler belirteç (Gene ruler DNA ladder)
MEM	Meropenem
NA	Nalidiksik asit
NK	Negatif Kontrol
PK	Pozitif kontrol
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Tm	Erime Sıcaklığı

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. <i>S. Kentucky</i> suşlarının antimikrobiyal direnç yüzdeleri	19
Şekil 3.2. <i>S. Typhimurium</i> suşlarının antimikrobiyal direnç yüzdeleri	20
Şekil 3.3. <i>S. Kentucky</i> suşlarının taşıdığı <i>strA</i> genine ait PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü	32
Şekil 3.4. <i>S. Kentucky</i> suşlarının taşıdığı <i>tetA</i> genine ait PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü	32
Şekil 3.5. <i>S. Typhimurium</i> suşlarının taşıdığı <i>sul1</i> genine ait PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü	32

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan <i>S. Typhimurium</i> ve <i>S. Kentucky</i> serotiplerinin orijinleri	11
Çizelge 2.2. Disk difüzyon yöntemiyle <i>Salmonella</i> için antimikrobiyal duyarlılık testi zon çapı standartları (CLSI)	15
Çizelge 2.3. Antimikrobiyal direnç genlerinin primer dizileri	17
Çizelge 3.1. <i>S. Typhimurium</i> suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç kombinasyonları	20
Çizelge 3.2. <i>S. Kentucky</i> suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç kombinasyonları	21
Çizelge 3.3. <i>S. Kentucky</i> suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç profilleri	22
Çizelge 3.4. <i>S. Typhimurium</i> suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç profilleri	27
Çizelge 3.5. <i>S. Kentucky</i> ve <i>S. Typhimurium</i> suşlarının orijinlerine göre direnç genlerinin dağılımı	31
Çizelge 3.6. <i>S. Kentucky</i> serovarlarının hayvan türlerine göre direnç genlerinin dağılımı	31

1. GİRİŞ

Louis Pasteur, Robert Koch ve Paul Ehrlich'in 19. Yüzyılın sonlarında yürüttükleri çalışmalarıyla bilimsel bir temele oturtulan "mikroorganizmaların hastalık etkeni olarak tanımlanması ve hastalığı canlıdan canlıya yayabilmesi"nin ortaya konmasıyla birlikte patojen mikroorganizmalara karşı ilaç geliştirme çabaları hız kazanmıştır. Bu alanda en önemli gelişme İngiliz tıp doktoru Alexander Fleming'in 1928 yılında tesadüfen penisilini keşfetmesidir. Daha sonraki yıllarda antibiyotikler ya da antimikrobiyal ajanlar olarak tanımlanan birçok kimyasal madde bakteri ve mantar metabolitleri olarak üretilmiştir. İkinci Dünya Savaşı yıllarında antibiyotiklerin endüstriyel boyutlarda üretimi yapılmıştır. Antimikrobiyal ajanların insan sağlığında etkilerinden dolayı "tıp dünyasına damga vuran olay" olarak tanımlanmasının yanı sıra hayvan yetiştiriciliği alanında da çiftliklerde hijyen, bakım besleme ve alt yapı şartlarının geliştirilmesiyle birlikte çiftlik hayvanlarının yaşam ve verimini etkileyen birçok paraziter ve bakteriyel hastalıkların tedavisine ve kontrolüne olanak sağlamıştır. Veteriner hekimlik alanında antimikrobiyal ilaçların kullanımı birçok zoonotik bakteriyel ve paraziter hastalıkların tedavi ve kontrolü sağlanarak halk sağlığının olumlu yönde gelişimine önemli katkı sağlamıştır (İstanbulluoğlu, 2012).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, antimikrobiyal direnç 21. yüzyılın en önemli tehditlerinden biridir. Antimikrobiyal ilaçlar, Tıp ve Veteriner hekimlik alanlarında aşırı ve bilinçsiz kullanımı, patojen ve kommensal mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlı ortamlara uyum sağlamalarına olanak sağlamıştır. Bu period içinde genlerde meydana gelen reorganizasyonun sonucunda adaptasyon çok daha kolaylaşmış ve canlı kalma sürelerinin de artmasını sağlamış oldu (Arda, 2006). Dünya nüfusunun hızla artması ve bu nüfusun beslenmesi için gerekli hayvansal ürün ihtiyacını karşılamak amacıyla oluşturulan büyük çaplı entansif hayvancılık işletmeleri patojen mikroorganizmaların yerleşip çoğalabildikleri ve kendi aralarında horizontal gen aktarımını yapabildikleri yeni habitatların oluşmasına olanak sağlamıştır (İstanbulluoğlu, 2012). Bakterilerde çoklu ilaç direnci dahil olmak üzere

ortaya çıkan ve mevcut antimikrobiyal ilaç direnci insan ve hayvan sağlığı arasında önemli bir ilişki olduğu ortaya konmuştur. Antimikrobiyal ilaç direncini tanımlamak için erken tarama çözümü, hastalığın yayılmasını etkili bir şekilde yönetmek ve insanlarda ve hayvanlarda yeni vaka sayısını azaltmak için önemli bir adımdır (Rao ve ark., 2020). Antimikrobiyallere dirençli *Salmonella*'ların gıda zinciri aracılığıyla insanlara yayılma olasılığı halk sağlığı için tehlike oluşturmaktadır. Özellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerin gelişigüzel kullanımı, patojen popülasyonunda çoklu antibiyotik direnç profillerinin ortaya çıkması ve yayılması endişe verici bir durumdur (Mengistu ve ark., 2020).

Salmonella, gerek dünyada gerekse ülkemizde, hem hayvan hem de insan sağlığını tehdit eden, gıda orijinli enfeksiyonlarda, *Campylobacter*'den sonra ikinci sırada en çok izole edilen zoonoz karakterli, önemli bir mikroorganizmadır (EFSA, 2015). Dünya genelinde *Salmonella* spp.'nin neden olduğu yılda ortalama 93,8 milyon gastroenterit vakası ve 155.000 gıda kaynaklı ölüm bildirilmektedir (Majowicz ve ark., 2010). Nontifoidal *Salmonella* serovarlarının neden olduğu hastalıkların insidansı ülkeler arasında değişmektedir; bu oranın Avrupa'da 100.000 nüfus başına 690 vaka, İsrail'de ise yılda 100.000 nüfusta 100 vaka civarında olduğu rapor edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde salmonellosiz kaynaklı gıda zehirlenmelerinin yılda 1,4 milyon vakaya neden olduğu ve bu sayısının giderek arttığı tahmin edilmektedir (Heredia ve García, 2018). *Salmonella enterica*'nın tifoid olmayan serotipleri, dünya genelinde gıda kaynaklı enfeksiyonların en yaygın etkenleri arasında yer alır.

Salmonella enfeksiyonları genellikle tedavi olmaksızın düzelebilir ancak sistemik enfeksiyonlarda antimikrobiyal tedavi gereklidir (Mthembu ve ark., 2019). Ayrıca antibiyotikler yem katkı maddesi olarak veya hayvanların büyümesini desteklemek için daha önceki yıllarda bazı ülkelerde kullanılmıştır. Bu amaçla antibiyotiklerin kullanımı, ülkemizde ve AB ülkelerinde 2006 yılı itibarıyla yasaklanmıştır. Antibiyotiklerin bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı sonucunda bakterilerde direnç gelişmiştir. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar

Typhimurium (*S. Typhimurium*), insanlarda gıda kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biri olmasının yanı sıra buzağı morbiditesi ve mortalitesinin önemli bir etkenidir (Tsolis ve ark., 1999). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Kentucky (*S. Kentucky*) insanlarda önemli bir patojen olmamasına rağmen antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi ve bu direnç genlerini plazmidler üzerinde bulunması diğer bakterilere aktarma özelliği hem hayvan hem de insan sağlığı için risk oluşturmaktadır. Ayrıca antibiyotiklere dirençli *Salmonella* suşları, doğal çevreye, çiftlik çalışanlarına ve gıda işleme tesislerine yayılma ve burada kalma potansiyeline sahiptir. *Salmonella* gibi patojenik bakterileri kontrol ederken antimikrobiyal direnç profillerini belirleme yoluyla karakterize etmeye yönelik kapsamlı araştırma yapılmalı ve bunların oluşturduğu riskleri azaltmak için patojenlerin direnç genleri belirlenmelidir (Aminov 2010; Das ve ark., 2019; Tasmin ve ark., 2017 ve Zishiri ve ark., 2016).

S. Kentucky, Avrupa, Amerika, Afrika, Asya ve diğer bölgelerde yaygın olarak tespit edilmektedir. *S. Kentucky* izolatlarında, antibiyotiklere çoklu ilaç direnci saptanmıştır ve bu suşlar, geniş bir coğrafyada belirlenmiştir (EFSA, 2021 ve Xiong ve ark., 2020). *S. Kentucky* sağlıklı kümes hayvanları ve süt ineklerinden sıklıkla izole edildiği bildirilmektedir (Haley ve ark., 2016). *S. Kentucky* (8, 20: i: z₆) Dr. Philip Rarick Edwards tarafından 1937 yılında tanımlanmıştır. Mortalite oranına %50 olan koksidiyozlu civcivlerde normal olarak bulunan lezyonlara ek olarak, yaklaşık 5 cm'lik çapta ince bağırsak ve sekumda ülserli bölge tespit edilmiştir. Ülserli alanlardan alınan materyallerden yapılan ekimler sonucunda *Salmonella* spp. izole ve identifiye edilmiştir. Bu organizmanın isimlendirilmesi izole edildiği yerin adı verilerek *S. Kentucky* olarak identifiye edilmiştir (Edwards, 1938).

S. Typhimurium kümes hayvanları, domuz, koyun ve sığırlar dahil olmak üzere geniş bir konakçı aralığına sahip olduğundan dolayı gıda güvenliğini tehdit eden bir mikroorganizmadır. *S. Typhimurium* hayvansal kaynaklı gıdalardan izole edilen ilk beş serotip arasında yer almaktadır (Rao ve ark., 2020). *S. Typhimurium* diğer yaygın serotipler ile karşılaştırıldığında insan sağlığına etkisi en fazla olan serotiptir (Herrero-Fresno ve Olsen, 2018). Bu nedenle, gıda üreten hayvan popülasyonlarındaki

sürveyans ve kontrol önlemleri hem hayvan hem de insan sağlığı için önemlidir (Mellor ve ark., 2019).

1.1. Tarihçe

Salmonella ile ilgili çalışmalar 1880 yılında Eberth tarafından tifolu hastaların dalak ve mezenterik lenf bezlerinden izole etmesiyle başlamıştır. 1884 yılında Alman bilim insanı Gaffky tarafından tifo basili hem izole edilmiş hem de morfolojik olarak ilk tanımlanmasını yapmıştır. Daha sonra 1885 yılında Amerikalı bakteriyolog Salmon ve Smith, domuz kolerası etkeni olan ‘*Bacillus choleraesuis*’ domuz bağırsağından izole ve identifiye edilmiştir. 1900 yılında Lignieres tarafından ‘*Bacillus choleraesuis*’, Dr. Salmon’u onure etmek amacıyla *Salmonella choleraesuis* olarak değiştirilmiştir (Ryan ve ark., 2017).

1.2. Etiyoloji

Salmonella genusu; *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan oksidaz negatif, katalaz pozitif, sporsuz, fakültatif intraselüler, çomak morfolojisinde olan üyelerin çoğunluğu peritrik flagella ile hareketli Gram negatif gammaproteobakterilerdir. Kanatlı tifosu ve pullorum hastalığı etkeni olan *Salmonella Gallinarum* ve Pullorum flagellasız ve hareketsizdir. *Salmonella* genusunun optimal üreme sıcaklığı 35°C-37°C arasındadır. Üremesi için optimum pH değeri 6,5-7,5 arasında ancak pH 3,8-9,5 arasında da üreyebilir (Ryan ve ark., 2017).

Dünya Sağlık Örgütü’ne göre *Salmonella* genusu 16S rRNA dizi analizindeki farklılıklara göre *Salmonella bongori* ve *Salmonella enterica* olmak üzere iki türe ayrılmıştır. Birçok patojeni içeren *S. enterica* türü, *Salmonella enterica* subsp. I (enterica), II (*salamae*), IIIa (*arizonae*), IIIb (*diarizonae*), IV (*houtenae*) ve VI (*indica*) olarak altı alt gruba ayrılmaktadır. Bu isimlendirme *Salmonella* taksonomisini yansıtmaktadır (Jajere, 2019 ve Popoff ve ark., 2003). Birçok patojeni içeren *S. enterica*’nın coğrafi dağılımı, konak çeşitliliği ve insan enfeksiyonlarına neden olma yeteneği açısından büyük farklılık gösteren 2600’den fazla serotipi vardır (Cohen ve

ark., 2021) ve neredeyse tüm salmonelloz vakalarında sorumludur. *Salmonella* serovarları geleksel serotiplendirme yöntemi olarak bilinen Lam Agglütinasyon (White-Kauffmann-Le Minör Şeması) yöntemi ile tanımlanmaktadır. Bu yöntem ile *Salmonella* serovarlarını alt tiplerinin identifikasyonunda kullanılmaktadır. Yöntemin temeli somatik ‘‘O’’, flagellar ‘‘H’’ ve kapsüler ‘‘Vi’’ antijenini içeren yüzey antijenlerine göre *Salmonella* serovarlarının identifikasyonunu (Serotiplendirme) olanak sağlar (Brenner ve ark., 2000).

1.3. Patogenez

Salmonella'nın patogenezinin merkezinde gastrointestinal sistemin hücrelerini istila etme ve enfeksiyon oluşturma yeteneği vardır. İnsanlarda *Salmonella* enfeksiyonu, kanatlı hayvan ürünleri de dahil olmak üzere birçok farklı gıda bulaşmada önemli rol oynar (Dhanani ve ark., 2015). Yapılan araştırmalara göre büyüvenlik ve aşılama gibi kontrol stratejilerinin uygulanmasına rağmen *Salmonella* gibi gıda kaynaklı patojenlerin gıda üretim zincirinin tüm aşamalarında da hayatta kalma, yayılcı ve ısrarcı patojen olması nedeniyle kontrol edilmesi oldukça zordur (Cheng ve ark., 2019; Das ve ark., 2019 ve Dhanani ve ark., 2015). Bu nedenle bu etkenlerin risklerini azaltmak için *Salmonella*'nın hayvanlardaki serotiplerin hastalık oluşturmada ve yayılmasında rol oynayan faktörleri belirlemek gereklidir. *Salmonella* enfeksiyonlarının patogenezinde; konakçı hücre yüzeyine bağlanma ve yapışma, konakçı hücrelerinin istilasına izin veren ve konakçı savunma mekanizmasının üstesinden gelen faktörlerin üretimi ve konakçı hücrelerinde çoğalmaya neden olan virülans belirleyicileri önemli rol oynar. Bu virülans belirleyicileri bakteri kromozomu, plazmidler ve *Salmonella* Patojenite Adaları (SPI) dahil olmak üzere çok çeşitli genetik unsurlarda bulunan genler tarafından kodlanır (Das ve ark., 2019; Figueiredo ve ark., 2015 ve Ramos-Morales, 2012). *Salmonella* invazyon ve yayılması için Tip III (T3SS) sistemini kullanır (Hansen-Wester ve Hensel, 2001). *Salmonella*'nın epitel tabakasının invazyonu için; *sipA*, *sopA*, *sopB*, *sopD* ve *sopE2* dahil olmak üzere T3SS-1 efektörü gereklidir (Raffatelli ve ark., 2005). *SopB* proteini, salgı yollarının aktivasyonunda, nötrofillerin enfeksiyon bölgelerine toplanmasına ve hücrelerdeki iyon dengelerinin değişmesinde önemli bir

rol oynar. Hücrelerdeki iyon dengelerinin değişmesi, bağırsaklarda sıvı birikmesiyle birlikte ishale neden olmaktadır. Diğer ishale neden olan efektör proteinler ise; *sipA*, *sopA*, *sopD* ve *sopE2*'dir (Alghoribi ve ark., 2019; Kaur ve Jain, 2012 ve Zhang ve ark., 2002). *Salmonella* alternatif başka bir yol ile M hücresi, Dendritik hücreler veya makrofajlar gibi fagositik hücreler tarafından örnekleme yolu ile de hücre içine girebilir. Fagositik hücrelerin konakçı savunmasında önemli bir yeri vardır. *Salmonella*'nın patogenezi eşsiz kılan konakçı savunma mekanizmasından kurtulmasını sağlayan fagositik hücreler içinde hayatta kalma ve hatta çoğalma yeteneğidir (Lindgren ve ark., 1996 ve Tasmin ve ark., 2017). Bakterilerin konak hücrelerinde yaşamlarını sürdürebilmesi ve patogenezi için gerekli olan birden fazla metabolizma genleri taşırlar (Delgado-Suárez ve ark., 2018 ve Webber ve ark., 2019). Hücre içi boşlukta SPI-2 tarafından kodlanan virülans proteinleri (*sifA*) *Salmonella* vakuol (SCV) oluşumuna neden olur (Ibarra ve Steele-Mortimer, 2009). *SifA* içermeyen mutant suşlar, sistemik virülans ve hücre içi replikasyon özelliği oldukça azalmıştır (Rajashekar ve ark., 2014). *SifA*, *avrA*, *sopE*, *sopB* genleri *Salmonella* serotiplerinin konakçılara uyum sağlama yeteneğindeki değişiklikleri anlamamıza yardımcı olarak salgınların ortaya çıkmasıyla ilişkili olabilir (Webber ve ark., 2019). *Salmonella* virülans plazmidi (*spvB*) bakterilerin hücre içinde yaşamasını ve çoğalmasını sağlar (Delgado-Suárez ve ark., 2018 ve Webber ve ark., 2019). Bakteriler bağırsak mukozasını istila eder ve fagositler yoluyla lenfatik ve kan dolaşımına yayılarak dalak ve karaciğere ulaşarak enfeksiyona neden olur. *Salmonella* sistemik enfeksiyon oluşturma potansiyelini, konakçı fagositler içinde yaşama ve çoğalma özelliği belirler. Bu nedenle *Salmonella*'nın konakçı bağışıklık sisteminden nasıl kurtulduğu ve myeloid hücrelerde nasıl uzun süre yaşayabildiğini anlamamızı sağlayacaktır (Fàbrega ve Vila, 2013 ve Lou ve ark., 2019).

1.4. Antimikrobiyal Direnç (AMD)

Antimikrobiyal ajan, bakterilerin gelişmesini engelleyebilen veya bakterileri öldürebilen düşük moleküler ağırlıklı bir maddedir. Antimikrobiyaller arasında antibakteriyel ilaçlar, antiviral ajanlar, antifungal ajanlar ve anti-paraziter ilaçlar bulunur. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç İdaresi'ne göre

antimikrobiyaller, bakteri, virüs, mantar ve parazit gibi mikroorganizmalar arasında daha geniş bir etki spektrumuna sahip maddelerdir. Öte yandan, antibiyotiklerin sınırlı bir spektrumu vardır ve esas olarak bakterilere karşı etkilidir. Tüm antibiyotikler antimikrobiyaldir, ancak tüm antimikrobiyaller antibiyotik değildir (Velasquez Moreno, 2016). Antibiyotikler, genellikle, canlı mikroorganizmaların bazı özel türleri tarafından sentezlenen kemoterapötik maddelerdir. Antibiyotik deyimi, bu substansı sentezleyen etkenin dışındaki başka tür mikroorganizmaların üreme ve aktivitelerine engel olma özelliği gösteren maddeleri tanımlamak için kullanılmaktadır (Arda, 2006). Antibiyotiklerin keşfi enfeksiyonların neden olduğu hastalık ve ölüm sayısında azalma sağladığı için tıp dünyasına damga vuran olay olarak nitelendirilmektedir.

Antimikrobiyal direnç, bakteri hücrelerinin antimikrobiyal ilaçların bakteriyosidal veya bakteriyostatik etkisine dayanma yeteneğidir. AMD, hem insan hem de veteriner hekimliği ile ilgili önemli bir sorundur. Çoklu ilaç direnci, bakterilerin aynı anda birkaç antimikrobiyalin etkilerine dayanma yeteneğidir (Velasquez Moreno, 2016).

Aminoglikozit antibiyotikler, amino şekerlere glikozidik bağlar yoluyla bağlı bir aminosiklitol çekirdeğine (streptamin, 2-deoksistreptamin veya streptidin) sahip olmaları ile karakterize edilen karmaşık bir bileşik ailesidir. Aminoglikozitler öncelikle gram negatif aerobik basiller, stafilokoklar ve diğer gram pozitiflerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (Ramirez ve Tolmasky, 2010). Aminoglikozitler ilk olarak yirminci yüzyılın ortalarında hayvanlarda Gram negatif bakterilerin etkeni olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Frye ve Jackson, 2013). Aminoglikozitlere direnç, esas olarak aminoglikozit değiştirici enzimler tarafından enzimatik inaktivasyona dayanır. Ayrıca, aminoglikozitlerin alımında azalma ve streptomisine yüksek düzeyde direnç sağlayan kromozomal mutasyonlar da tarif edilmiştir. Aminoglikozitlerin enzimatik inaktivasyonu, N asetiltransferazlar, O-adeniltransferazlar veya O fosfotransferazlar tarafından sağlanır. Bu üç aminoglikozit modifiye edici enzim sınıfının her birinin, çoğu spesifik bir substrat spektrumu sergileyen çok sayıda üyesi vardır (Schwarz ve Chaslus-Dancla, 2001).

Aminoglikozitler, protein translasyonunu inhibe eden 30S ribozomal alt birimine bağlanarak işlev görür. Aminoglikozitlere karşı *Salmonella* direnci genellikle bileşiğin enzimatik bir modifikasyonudur; ancak diğer bakterilerde, bileşiğin aktif akışı veya aminoglikozidin ribozomal hedefine bağlanmasını önlemek için 16S rRNA alt biriminin enzimatik modifikasyonu dirence yol açabilir. *Salmonella* hayvan izolatlarındaki aminoglikozit direnç mekanizmaları, esas olarak aminoglikoziti değiştiren ve etkisizleştiren asetiltransferazlar, fosfotransferazlar ve nükleotidiltransferazlardan kaynaklanır. *aac*, *aad*, *aph* ve *str* genleri bildirilen yaygın aminoglikozitlerin direnç genleridir (Frye ve Jackson, 2013).

β -laktamlar hem insan hem de veterinerlik tıbbında klinik olarak en önemli antimikrobiyaller arasındadır. β -laktamlara karşı bakteri direnci, hayvan kökenli olanlar da dahil olmak üzere bakterilerde giderek daha fazla gözlenmiştir. β -laktam direncinin mekanizmaları, ilaçların hedeflerine ulaşamaması, hedef değişiklikleri ve/veya ilaçların β -laktamazlar tarafından etkisiz hale getirilmesini içerir. İkincisi, ağırlıklı olarak Gram-negatif bakterilerde β -laktam direncine katkıda bulunur. Gıda üreten ve evcil hayvanlardan türetilen bakterilerde çeşitli β -laktamazlar tanımlanmıştır ve ayrıca insanlarda β -laktamaz üreten bakteriler için bir rezervuar görevi görebilir (Li ve ark., 2007). Antibiyotiklerin β -laktamlar grubunda yer alan üyeleri, bakterilerin peptidoglikan tabakasının polisakkarid zincirinin kros bağlanmasını sağlayan transpeptidasyon enzimlerini inhibe ederek hücre duvarı sentezini engellerler (Arda, 2006). *Salmonella*'daki β -laktam direncinin çoğu, yatay olarak edinilen β -laktamazlar tarafından kodlanır. β -laktamaz direnç genleri şunlardır; *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{OXA} (Frye ve Jackson, 2013).

Kloramfenikol 1947 yılında *Streptomyces venezuelae*'den izole edilmiştir. İlk fenikol antimikrobiyal ajandır ve aynı zamanda nitro grubu içerdiği bulunan ilk doğal üründür. Kloramfenikol 1950'den beri sentetik olarak üretilmektedir. Veteriner hekimlikte, kloramfenikol evcil hayvanlarda ve gıda üretmeyen hayvanlarda hala kullanılmaktadır. AB'de gıda üreten hayvanlarda kullanımı 1994 yılında ve daha sonra diğer birçok ülkede yasaklanmıştır (Schwarz ve ark., 2016). Kloramfenikol ve florfenikol gibi bileşikler 50S ribosomal alt üniteyi inhibe ederler. Protein sentezinde

50S ribosomal alt ünite, peptidyl-tRNA'nın bağlanma bölgesini oluşturur. Bu bölgede protein sentezinin inhibe edilebilmesi için peptidyl-tRNA'nın 50S ile bağlanmasının engeller (Arda, 2006). Direnç mekanizmalarının çoğu, *floR* ve *cmlA* gibi akış pompalarının yanı sıra kloramfenikol asetiltransferaz, *cat1* gibi inaktive edici enzimlerdir. *Salmonella* ve hayvanlardan izole edilen diğer bakterilerde direnç genellikle bu mekanizmalarla görülür (Frye ve Jackson, 2013).

Anilin boyalarından köken alan sulfanamidler paramini-benzen sulfanilamid kimyasal yapısında, antimikrobiyal maddelerdir. Bakteriostatik etkiye sahiptirler ve bu etkiyi, aktif kısım olan amino benzen halkası sağlar. Bakteriler nükleik asitlerin sentezi için folik asite ihtiyaç duyarlar. Folik asit üretimini engelleyen durumlarda sulfonamide dirençli bakteriler bu maddeyi direkt olarak çevreden alabilirler. Ortama paraaminobenzoik asit (PABA) katıldığı zaman sulfanamidlerin etkisini gidereceği için inhibisyon etkisi vardır. Bu nedenle folik asit sentezleyen bakterilerin sulfanamidlere duyarlıdır (Arda, 2006).

Sülfonamidler hayvanlar ve insanlar için verimli ve ucuz antibakteriyel ajanlar olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bununla birlikte, her ikisine de direnç, kapsamlı ve hızlı bir şekilde yayılmıştır. Bunun başlıca nedeni, sırasıyla sülfonamid dihidropteroat sentaz hedef enzimlerinin ilaca duyarlı olmayan varyantlarını ifade eden direnç genlerinin yatay yayılmasıdır. Transpozonlar ve plazmitlerin aracılık ettiği ve sülfonamide karşı oldukça dirençli dihidropteroat sentazları ifade eden iki gen, *sul1* ve *sul2* bulunmuştur. Bu antimikrobiyallere direnç, bu bileşikleri bağlamayan enzimleri kodlayan genlerin edinilmesiyle oluşur. Bunlar, *Salmonella*'da bulunan *sul* genleri, *sul1*, *sul2* ve *sul3* (Frye ve Jackson, 2013).

Tetrasiklin grubunda yer alan antibiyotikler (klortetrasiklin, tetrasiklin, dimetilklortetrasiklin gibi) etki ve yapısal özellikleri bakımından birbirine benzer ve genellikle bakteriostatik etkiye sahiptirler. Tetrasiklinlerin, fiziksel ve farmakolojik olarak aralarında farklar olmasına rağmen birbirlerine karşı çapraz direnç verirler (Arda, 2006). Keşfedilen ilk antibiyotik sınıflarından biri olan tetrasiklinler, toprakta bulunan *Streptomyces* spp.'den izole edilmiştir. Tetrasiklinler, geniş spektrumlu

olduklarından dolayı Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere, klamidy, mikoplazmalar ve riketsiya gibi bakterilere ve Plasmodium spp gibi bazı protozoan parazitlere karşı inhibitör etkiye sahiptir. Gıda hayvanlarının üretiminde yaygın tetrasiklin kullanımı 1950'ler ve 1970'ler arasında çarpıcı bir şekilde arttı. Tetrasiklinler ABD hayvanlarda en yaygın olarak kullanılan ikinci antibiyotiktir (Roberts ve Schwarz, 2016). Tetrasiklinler (klortetrasiklin veya oksitetrasiklin) büyüme teşvik etmek ve sığır, domuz ve kümes hayvanlarında yem verimliliğini artırmak için de kullanılmıştır. Tetrasiklinlerin bakterileri, özellikle 30S ribosomal alt üniteyi etkiler ve mRNA ile birleşmesini engeller. *Salmonella*'da aktif akış sistemleri en yaygın olarak gözlenir ve *tet* (A), *tet* (B), *tet* (C), *tet* (D), *tet* (G) ve *tet* (H) direnç genlerini içerir (Frye ve Jackson, 2013).

Hayvancılıkta büyüme hızlandırıcı veya profilaktik amaçlı kullanılan antibiyotikler dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olur. Direnç özelliği kazanan bakterilerin antibiyotik direnç genlerinin moleküler yöntemler ile tespit edilmesi, hekimlerin bir ilacın belirli bir patojenlere karşı etkili olup olmayacağını belirlemelerini sağlar. Bu araştırmalar, antimikrobiyal direnç gelişmesine neden olabilecek bir antibiyotiklerin kullanılması yerine daha etkili antibiyotik kullanılmasının önünü açar (Mthembu ve ark., 2019).

Bu tez çalışmasının amacı; *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* serotiplerinin antibiyotik dirençliliğinin konvansiyonel ve moleküler yöntemler ile belirlenmesidir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu tez çalışmasının yapılması için Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü'nden, 03.05.2021 tarih ve E-71037622-605.99-1351439 sayılı yazısı ile gerekli tüm izinler alındı.

2.1.1. Çalışmada Kullanılan *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* Suşları

Çalışmada kullanılan *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* suşları farklı yetiştirme tipine sahip kümeslerin organ, altlık, toz ve çevresel kaynaklardan; inek, buzağı ve kuzuların organ ve dışkı örneklerinden izole edildi.

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarına gönderilen inek, buzağı ve kuzuların organ ve dışkı örnekleri ile farklı yetiştirme tipine sahip kümeslere ait organ, altlık, toz, çevresel kaynaklardan izole ve identifiye edilen 60 adet *S. Typhimurium* ve 90 adet *S. Kentucky* suşu kullanıldı (Çizelge 2.1). Suşlar *S. Typhimurium* 2008-2020, *S. Kentucky* ise 2011-2020 yılları arasında izole edilen suşlar kullanıldı.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* serotiplerinin orijinleri.

Serotip	Hayvan Türü	Suş Sayısı	Toplam
<i>S. Kentucky</i>	Tavuk	65	90
	Kaz	1	
	Buzağı	23	
	İnek	1	
<i>S. Typhimurium</i>	Tavuk	49	60
	Kaz	1	
	Hindi	2	
	Martı	1	
	Buzağı	5	
	Kuzu	2	
Toplam Suş Sayısı		150	

2.1.2. *Salmonella* Serotiplendirme

S. Typhimurium ve *S. Kentucky* suşlarının doğrulanmasında (serotiplendirme) Xylose Lysine Deoxycholate agar, MacConkey agar, Nutrient buyyon ve Nutrient agar kullanıldı.

Biyokimyasal test besiyeri ve araçlar: *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* suşlarının identifikasyonu/doğrulanmasında triple şeker iron agar (TSI), L-lizin dekarboksilaz besiyeri, üre agar, Beta galaktosidaz test besiyeri, nutrient buyyon, indol test besiyeri, kovaks, Voges Proskauer besiyeri, kreatin solüsyonu (n-amidinosarcosine), naftol etanol solüsyonu kullanıldı.

Serotiplendirmede kullanılan besiyerleri ve antiserumlar; *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* suşlarının serotiplendirilmesinde somatik ve flageller antijenlerinin yapısını ortaya çıkarmak için; nutrient agar besiyeri ve antiserumlar (Statens Serum Institute (Danimarka), Denka Seiken (Japonya)) kullanıldı.

2.1.3. Antibiyotik Diskleri

Antimikrobiyal duyarlılık testi, Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemiyle Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) yönergelerine uygun olarak en çok kullanılan 6 antibiyotik grubunu temsil eden antibiyotikler seçildi. Ampisilin (10 µg), Sefotaksim (30 µg), Seftazidim (30 µg), Kloramfenikol (30 µg), Tetrasiklin (30 µg), Gentamisin (10 µg), Nalidiksik asit (30 µg), Siprofloksasin (5 µg), Sülfonamid (300 µg), Trimetoprim/Sülfametoksazol (23,75 µg), streptomisin (10 µg), Cefoksitin (30 µg), Meropenem (10 µg), olmak üzere 13 adet antibiyotik diskleri kullanıldı. Referans suşu olarak disk difüzyon testi için *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

2.1.4. Moleküler Analizde Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

Kimyasal ve tampon solüsyonları: *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* suşlarının antibiyotik direnç genlerinin araştırılması için primerler ve master miks hazırlamak amacıyla 10XPCR buffer (Thermo Scientific, USA), 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, USA), dNTP mix (10 mM each) (Thermo Scientific, USA), Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific, USA) kullanıldı. Hazırlanan PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla; agoroz (Agarose, Biomax), tris borik asit EDTA (TBE) (Thermo Scientific, USA), boyama solüsyonu (G108, Safe View™ Classic, Applied Biological Materials Inc., Canada), 6xLoading Dye (SM032, Thermo Scientific, USA), GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder (SM0321, Thermo Scientific, USA) kullanıldı.

Cihazlar: *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* suşlarının direnç genlerinin araştırılmasında hassas terazi, steril kabin, santrifüj, vorteks, DNA thermal cycler (Thermo Scientific, USA), jel elektroforez ünitesi (Blu POWER 500) (Cihaz ve güç kaynağı), UV transillüminatörlü bilgisayarlı görüntüleme sistemi (Gene Genius, Syngene Bio Imaging System, USA) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. *Salmonella* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Bu çalışmada *Salmonella* suşlarının izolasyonu ve identifikasyonu yapıldıktan sonra *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* serotiplerinin doğrulanması, yüzey (LPS, O-antijenleri) ve flagella antijenlerinin (protein, H-antijenleri) tespiti için serotiplendirme yapıldı ve antijenik kombinasyonlar Kauffmann-White Şemasına göre değerlendirildi. Serotiplendirilmesi tamamlanan suşları daha sonrakullanılmak amacıyla %20 gliserinli tryptic soy broth'ta süspanse edilerek -40 °C'de saklandı.

2.2.2. Disk Difüzyon Yöntemi

Çalışmada kullanılan 150 adet *Salmonella* suşunun antimikrobiyal duyarlılık testi, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI-2019) yönergelerine uygun olarak yapıldı. Çalışmada 6 antibiyotik sınıftan (Beta laktamlar, aminoglikozitler, kinolon ve florokinolonlar, tetrasiklinler, fenikoller ve sülfonamidler) 13 antibiyotik kullanıldı. *Salmonella* izolatları 0,5 McFarland standardına uygun süspansiyonlar hazırlandıktan sonra Mueller Hilton katı besiyerlerine ekimler yapıldı. Besiyerleri kuruduktan sonra Ampisilin (10 µg), Sefotaksim (30 µg), Seftazidim (30 µg), Kloramfenikol (30 µg), Tetrasiklin (30 µg), Gentamisin (10 µg), Nalidiksik asit (30 µg), Siprofloksasin (5 µg), Sülfonamid (300 µg), Trimetoprim/Sülfametoksazol (23,75 µg), streptomisin (10 µg), Cefoksitin (30 µg), Meropenem (10 µg) antibiyotik diskleri konularak 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Referans suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. İnhibisyon bölgesi milimetre cinsinden, disk çevresinde bakteri üremesinin olmadığı alanın çapı ölçülerek belirlendi. Sonuçlar CLSI'ya uygun şekilde duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi (Çizelge 2.2). Suşlar üç veya üçten fazla farklı antimikrobiyal sınıfa direnç gösteriyorsa çoklu ilaç direnci (ÇİD veya MDR) olarak tanımlandı.

Çizelge 2.2. Disk difüzyon yöntemiyle *Salmonella* için antimikrobiyal duyarlılık testi zon çapı standartları (CLSI).

Antibiyotik ajan	Disk İçeriği	Zon Çapları (mm)		
		Duyarlı (S)	Orta Duyarlı (I)	Dirençli (R)
Ampisilin	10 µg	≥17	14-16	≤13
Sefotaksim	30 µg	≥26	23-25	≤22
Seftazidim	30 µg	≥21	18-20	≤17
Sefoksitin	30 µg	≥18	15-17	≤14
Kloramfenikol	30 µg	≥18	13-17	≤12
Tetrasiklin	30 µg	≥15	12-14	≤11
Gentamisin	10 µg	≥15	13-14	≤12
Meropenem	10 µg	≥23	20-22	≤19
Nalidiksik asit	30 µg	≥19	14-18	≤13
Siprofloksasin	5 µg	≥31	21-30	≤20
Sülfonamid	250 veya 300 µg	≥17	13-16	≤12
Streptomisin	10 µg	≥15	12-14	≤11
Trimetoprim/ Sülfametoksazol	1,25/ 23,75 µg	≥16	11-15	≤10

2.2.3. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Moleküler Analizi

2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Salmonella suşlarında DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemi ile yapıldı. Bu işlemin basamakları aşağıda sunulmuştur.

- Nutrient agarda saf kültürleri hazırlanan suşlardan bir öze ile tek koloni alındı ve 200 ul DNase free su içeren eppendorf tüplerde eklendi.
- 8000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek homojen hale getirildi.
- Üstteki sıvı atılarak üzerine 100 ul DNase free su eklendi.
- 8000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- Üstteki sıvı atılarak üzerine 50 ul DNase free su eklendi
- Bakteriyel süspansiyonlar ısıtma bloğu kullanılarak 100 °C’de 10 dakika kaynatıldı.

Bakteriyel ekstraktlar PCR’da kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

2.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Hayvansal orijinli *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* suşlarının antimikrobiyal direnç genlerinin araştırılması Çizelge 2.3'te yer alan primerler kullanılarak konvansiyonel PCR yöntemi ile gerçekleştirildi.

Çalışmada kullanılan direnç genleri primerleri seçilirken disk difzyon yöntemi sonucunda suşların en çok direnç gösterdiği antibiyotiklerin gen bölgeleri seçildi. Kullanılan primerlerin baz dizileri, ürün uzunlukları, bağlanma sıcaklıkları ve alındığı kaynaklar Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

PCR karışımı her bir örnek için 25 µl'lik hacimde olacak şekilde; 14,8 µl nuclease free water, 2,5 µl 10xPCR tampon çözeltisi, 3 µl MgCl₂ (25mM), 0,5 µl dNTP (10Mm) 1 µl reverse primer (10 pmol), 1 µl forward primer (10 pmol), 0,2 µl Taq DNA polymerase eklenerek hazırlandı. Hazırlanan mastermiks karışımından 0,2 mL'lik her bir tüpe 23 µl dağıtıldı ve her birine 2 µl örnek DNA eklendi. Pozitif kontrol suşu olarak *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* suşu kullanıldı. Negatif kontrol olarak 2 µl nuclease free water kullanıldı. Amplifikasyon için PCR protokol koşulları; ön denatürasyon 95 °C'de 5 dk takip eden 35 siklus, denatürasyon 95 °C'de 30 sn, primerlerin bağlanma sıcaklığı 56 °C'de (Çizelge 2.3) 30 sn, primerlerin uzaması 72 °C'de 45 sn ve 72 °C'de 5 dk son uzama aşaması olarak uygulandı.

Çizelge 2.3. Antimikrobiyal direnç genlerinin primer dizileri.

Hedef				
Gen	Primer Dizisi		Tm (°C)	Referans
<i>sul 1</i>	F: TCA CCG AGG ACT CCT TCT TC R: CAG TCC GCC TCA GCA ATA TC	Sülfanamid	57	Chen ve ark., 2004
<i>sul 2</i>	F: CCT GTT TCG TCC GAC ACA GA R: GAA GCG CAG CCG CAA TTC AT	Sülfanamid	57	Chen ve ark., 2004
<i>tetA</i>	F: GCG CCT TTC CTT TGG GTT CT R: CCA CCC GTT CCA CGT TGT TA	Tetrasiklin	60	Chen ve ark., 2004
<i>tetB</i>	F: CCC AGT GCT GTT GTT GTC AT R: CCA CCA CCA GCC AAT AAA AT	Tetrasiklin	59	Chen ve ark., 2004
<i>flo</i>	F: CTG AGG GTG TCG TCA TCT AC R: GCT CCG ACA ATG CTG ACT AT	Kloramfenikol	56	Chen ve ark., 2004
<i>aadA1</i>	F: TATCAGAGGTAGTTGGCGTCAT R: GTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATT	Streptomisin	56	Randall ve ark., 2004
<i>aadA2</i>	F: TGTTGGTTACTGTGGCCGTA R: GATCTCGCCTTTCACAAAGC	Streptomisin	58	Walker ve ark., 2001
<i>strA</i>	F: CTT GGT GAT AAC GGC AAT TC R: CCA ATC GCA GAT AGA AGG C	Streptomisin	51	Gebreyes ve Altier, 2002
<i>strB</i>	F: ATC GTC AAG GGA TTG AAA CC R: GGA TCG TAG AAC ATA TTG GC	Streptomisin	52	Gebreyes ve Altier, 2002

2.2.3.3. Elektroforez ve Görüntüleme

Amplifikasyon ürünlerinin her birinden 5 µl alınıp 2 µl 6xLoading Dye solüsyonu ile karıştırılarak, 20 cm'lik %1,5 agaroz içeren jele yüklendi. Jeldeki birinci göze marker konularak 180 voltta 60 dk elektroforez işlemine tabii tutuldu. Biyo-görüntüleme sistemi (Syngene) kullanılarak jeldeki örnekler görüntülendi.

3. BULGULAR

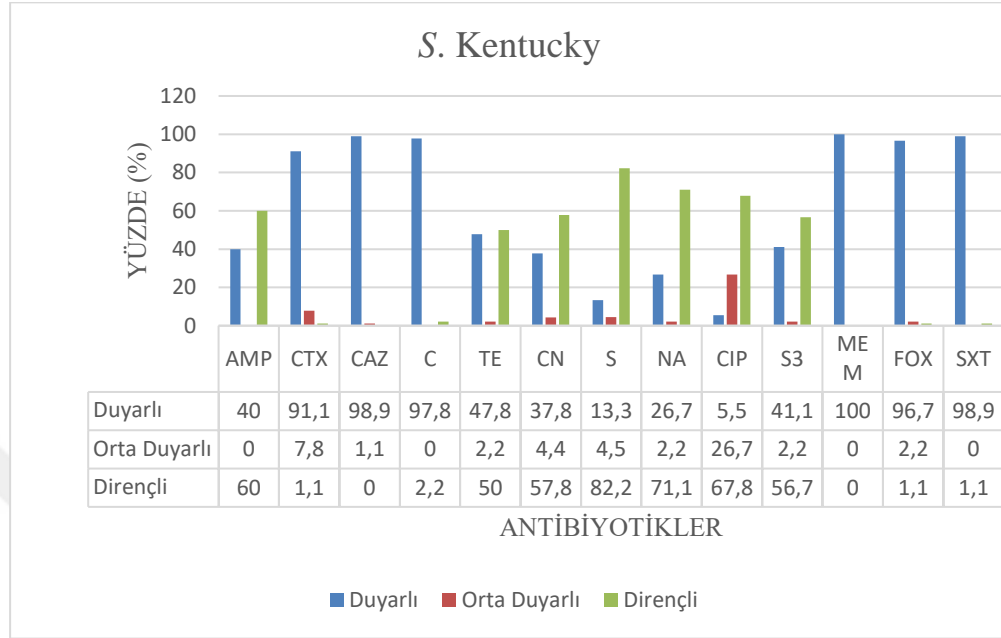
3.1. Serotiplendirme Bulguları

Tez çalışması kapsamında inek, buzağı ve kuzuların organ ve dışkı örnekleri ile farklı yetiştirme tipine sahip kümeslere ait organ, altlık, toz ve çevresel örneklerden izole edilen 60 adet *S. Typhimurium* ve 90 adet *S. Kentucky* suşunun doğrulanması amacıyla serotiplendirilmesi yapıldı. 150 adet izolatın antijenik formülünün incelenmesi sonucunda 60 adet izolat *S. Typhimurium* (1,4,[5],12: i: 1,2) ve 90 adet izolat *S. Kentucky* (8,20: i: z₆) olarak tanımlanarak tanımlandı.

3.2. Disk Difüzyon Bulguları

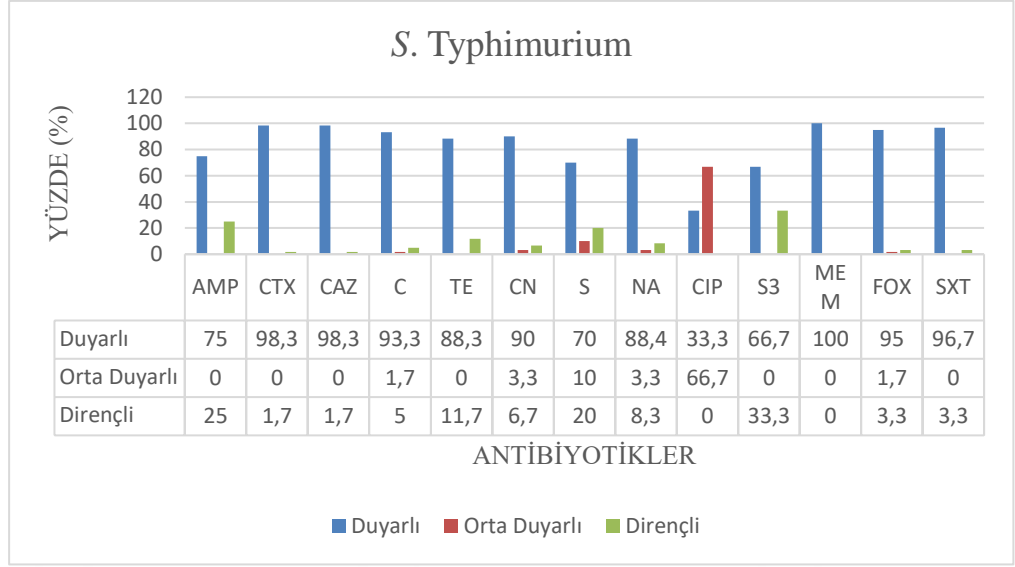
Antimikrobiyal duyarlılık testi, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI-2019) yönergelerine uygun olarak yapıldı. Çalışmada 90 adet *S. Kentucky* ve 60 adet *S. Typhimurium* suşunun 13 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılığı test edildi. *S. Kentucky* izolatlarının %91,1'i en az bir antibiyotiğe dirençli olduğu belirlendi. *S. Kentucky* suşlarına en yüksek direnci %82,2 ile streptomisin olduğu belirlendi. Bu direnç oranını %71,1 nalidiksik asit, %67,8 siprofloksasin, %60 ampisilin, %57,8 gentamisin, %56,7 sulfanamid, %50 tetrasiklin, %2,2 kloramfenikol, %1,1 sefotaksim, sefoksitin ve trimetoprim/sülfametoksazol izledi (Şekil 3.1). Tüm *S. Kentucky* suşları meropeneme duyarlı bulundu. Buzağı ve süt ineğinden izole edilen *S. Kentucky* suşlarının hepsi siproflaksine ve nalidiksik asite (%100; 24/24), streptomisin (%95,8; 23/24), sulfanamid (%95; 23/24), ampisilin, tetrasiklin ve gentamisine (%91,6; 22/24) olduğu tespit edildi. Kanatlı hayvanlarda streptomisin (%78,7; 52/66), nalidiksik asit (%60,6; 40/66), siprofloksasin (%56; 37/66), ampisilin (%48,8; 32/66), gentamisin (%45,4; 30/66), sulfanamid (%42,4; 28/66), tetrasiklin (%34,8; 23/66) olarak tespit edildi. *S. Kentucky* suşlarının %62,2'sinde çoklu antibiyotik direnci saptandı (Çizelge 3.3). Çoklu antimikrobiyal direnç profilini %24,4 buzağı ve süt ineği, %37,8 tavuk ve kazlarda tespit edildi. *S. Kentucky* suşları en fazla altı sınıf antibiyotiğe çoklu direnç gösterdiği tespit edildi.

Ayrıca 15 farklı ÇİD profili tespit edildi (Çizelge 3.2). Baskın antimikrobiyal direnç profili; CN-S-AMP-S3-NA-CIP-TE %36,7 olduğu belirlendi.



Şekil 3.1. S. Kentucky suşlarının antimikrobiyal direnç yüzdeleri.

S. Typhimurium suşlarının antibiyotiklere direnç oranları sırasıyla %33,3 sulfanamid, %25 ampisilin, %20 streptomisin, %11,7 tetrasiklin, %8,3 nalidiksik asit, %6,7 gentamisin, %5 kloramfenikole, %3,3 sefoksitin, %1,7 sefotaksim ve seftazidim direnç oranları tespit edildi (Şekil 3.1). Tüm S. Typhimurium suşları meropeneme duyarlı olduğu belirlendi. S. Typhimurium suşlarında %66,7 oranında siprofloksasine orta derecede duyarlı olduğu belirlendi. Suşların %56,6 en az bir antibiyotiğe dirençli olduğu belirlendi. Çoklu antimikrobiyal direnç profilleri %16,7 olarak tespit edildi (Çizelge 3.4). Ayrıca 6 farklı ÇİD profili tespit edildi (Çizelge 3.1). Baskın antimikrobiyal direnç profili; AMP-C-TE-S-S3 %5 olduğu belirlendi.



Şekil 3.2. S. Typhimurium suşlarının antimikrobiyal direnç yüzdeleri.

Çizelge 3.1. S. Typhimurium suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç kombinasyonları.

Serovar	Antimikrobiyal Direnç Profili	Tavuk	Kaz	Hindi	Martı	Buzağı	Kuzu
S. Typhimurium	AMP-NA-S3	1	-	-	-	-	-
	AMP-S3-S	1	-	-	-	-	-
	AMP-NA-CN	2	-	-	-	-	-
	AMP-TE-SXT	1	-	-	-	-	-
	AMP-TE-S-S3	-	-	-	-	-	2
	AMP-C-TE-S-S3	1	-	-	-	-	2

Çizelge 3.2. S. Kentucky suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç kombinasyonları.

Serovar	Antimikrobiyal Direnç Profili	Tavuk	Kaz	Buzağı	İnek
S. Kentucky	S-AMP-NA	1	-	-	-
	S-S3-NA	1	-	-	-
	CN-S-AMP-S3	1	-	-	-
	CN-S-S3-TE	1	-	-	-
	S-AMP-NA-CIP	1	-	-	-
	S-S3-NA-CIP	1	-	-	-
	CN-S-AMP-NA-CIP	2	-	-	-
	CN-S-S3-NA-CIP	5	-	-	-
	S-AMP-NA-CIP-TE	5	-	-	-
	CN-S-AMP-S3-NA-CIP	1	-	-	-
	CN-S-AMP-FOX-NA-CIP-TE	1	-	-	-
	CN-S-AMP-S3-NA-CIP-TE	10	1	21	1
	CN-S-AMP-SXT-NA-CIP-TE	1			
	CN-S-AMP-C-S3-NA-CIP-TE	1	-	-	-
	CN-S-AMP-CTX-S3-NA-CIP-TE	1	-	-	-

Çizelge 3.3. S. Kentucky suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç profilleri.

İsolat no	Serovar	İzolasyon tarihi	Orijin	Beta laktamlar																			MDR			
				Aminoglikozitler						Penisilinler	Sefalosporinler			Karbapenem	Fenikoller		Folat yolu inhibitörleri				Kinolonlar			Tetrasiklinler		
				CN	S	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA2</i>	AMP	FOX	CAZ	CTX	MEM	C	<i>flo</i>	S3	SXT	<i>sd1</i>	<i>sd2</i>	NA	CIP		TE	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>
SK-1	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-2	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-3	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-4	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	-	-	
SK-5	Kentucky	2013	Buzağı	S	I	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	S	+	-	
SK-6	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-7	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-8	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	+	-	-	R	S	S	I	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-9	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-10	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-11	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-12	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-13	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-14	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	I	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-15	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-16	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-17	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-18	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-19	Kentucky	2013	Süt ineği	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-20	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-21	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-22	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	-	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	

Çizelge 3.3. Devam. S. Kentucky suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç profilleri.

İsolat no	Serovar	İzolasyon tarihi	Orijin	Aminoglikozitler										Beta laktamlar				Fenikoller		Folat yolu inhibitörleri				Kinolonlar		Tetrasiklinler			MDR
				CN	S	strA		strB		aadA1	aadA2	AMP	Sefalosporinler			MEM	C	flo	S3	SXT	sul		NA	CIP	TE	tetA	tetB		
						FOX	CAZ	CTX	+				-	+	-						+	-							
SK-23	Kentucky	2013	Buzağı	R	R	-	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	R	-	-				
SK-25	Kentucky	2013	Tavuk	I	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	+	-	S	I	S	+	-				
SK-26	Kentucky	2013	Tavuk	I	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
SK-27	Kentucky	2013	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
SK-28	Kentucky	2013	Tavuk	I	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
SK-29	Kentucky	2013	Tavuk	R	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
SK-30	Kentucky	2014	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
SK-31	Kentucky	2014	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	I	S	S	S	-	R	S	+	-	R	I	S	+	-				
SK-32	Kentucky	2014	Tavuk	R	R	-	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	R	-	-				
SK-34	Kentucky	2014	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	I	S	-	-				
SK-35	Kentucky	2014	Tavuk	R	R	-	-	-	-	R	S	S	I	S	S	-	R	S	-	+	S	I	S	-	-				
SK-36	Kentucky	2014	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
SK-37	Kentucky	2014	Tavuk	R	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	R	S	-	+	R	R	I	-	-				
SK-38	Kentucky	2014	Tavuk	R	R	-	-	-	-	R	R	S	S	S	S	-	I	S	-	+	R	R	R	-	-				
SK-39	Kentucky	2014	Tavuk	R	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	S	R	-	-				
SK-40	Kentucky	2014	Tavuk	S	R	-	+	-	-	R	S	I	S	S	S	-	S	S	-	-	R	R	R	-	-				
SK-41	Kentucky	2014	Tavuk	R	R	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	S	-	-				
SK-42	Kentucky	2014	Tavuk	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	R	+	-				
SK-43	Kentucky	2014	Tavuk	R	R	-	-	-	-	S	I	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	S	-	-				
SK-44	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	R	S	-	-				
SK-45	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	+	R	R	R	+	-				
SK-46	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	+	R	R	R	+	-				

Çizelge 3.3. Devam. S. Kentucky suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç profilleri.

İsolat no	Serovar	İzolasyon tarihi	Orijin	Aminoglikozitler										Beta laktamlar				Fenikoller		Folat yolu inhibitörleri				Kinolonlar		Tetrasiklinler			MDR
				CN	S	strA	strB	aadA1	aadA2	Penisilinler	Sefalosporinler			Karbapenem	C	flo	S3	SXT	sul1	sul2	NA	CIP	TE	tetA	tetB				
										AMP	FOX	CAZ	CTX	MEM															
SK-47	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	+	R	R	R	+	-				
SK-48	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	+	R	R	R	+	-				
SK-49	Kentucky	2015	Tavuk	I	I	-	-	-	-	S	S	S	I	S	S	-	R	S	-	-	S	S	S	-	-				
SK-50	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	R	S	-	-				
SK-51	Kentucky	2015	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
SK-52	Kentucky	2015	Tavuk	S	R	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	R	S	-	-				
SK-53	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	R	+	-				
SK-54	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	R	+	-				
ZK-55	Kentucky	2015	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	S	-	-				
SK-56	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	-	-	-	-	R	I	S	I	S	S	-	S	S	-	-	R	R	S	-	-				
SK-57	Kentucky	2015	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
SK-59	Kentucky	2015	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	R	S	-	-				
SK-60	Kentucky	2015	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	R	S	-	-				
SK-61	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-				
SK-62	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-				
SK-63	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	R	+	R	S	+	-	R	R	R	+	-				
SK-64	Kentucky	2015	Tavuk	S	R	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	I	S	-	-				
SK-65	Kentucky	2015	Tavuk	S	R	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
SK-66	Kentucky	2015	Tavuk	S	I	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
SK-67	Kentucky	2015	Tavuk	S	I	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	I	I	S	-	-				
SK-70	Kentucky	2015	Tavuk	R	R	-	+	-	-	R	S	S	R	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-				
SK-71	Kentucky	2015	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				

Çizelge 3.3. Devam. S. Kentucky suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç profilleri.

İsolat no	Serovar	İzolasyon tarihi	Orijin	Beta laktamlar										Fenikoller		Folat yolu inhibitörleri				Kinolonlar		Tetrasiklinler			MDR	
				Aminoglikozitler						Penisilinler	Sefalosporinler			Karbapenem	C	flo	S3	SXT	sul1	sul2	NA	CIP	TE	tetA		tetB
				CN	S	strA	strB	aadA1	aadA2	AMP	FOX	CAZ	CTX	MEM												
SK-72	Kentucky	2015	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	+	-	S	I	S	-	-		
SK-74	Kentucky	2016	Tavuk	R	R	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	R	+	-	
SK-76	Kentucky	2016	Tavuk	R	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	S	-	-	
SK-77	Kentucky	2016	Tavuk	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	R	+	-	
SK-78	Kentucky	2016	Tavuk	R	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	R	+	-	
SK-79	Kentucky	2016	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
SK-80	Kentucky	2016	Tavuk	R	R	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	R	+	-	
SK-81	Kentucky	2016	Tavuk	S	R	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	R	R	-	-	
SK-82	Kentucky	2016	Tavuk	R	R	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	R	-	-	R	R	R	+	-	
SK-83	Kentucky	2016	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	I	I	S	-	-	
SK-88	Kentucky	2016	Buzağı	S	R	-	-	-	-	S	S	S	I	S	S	-	S	S	-	-	R	R	I	-	-	
SK-89	Kentucky	2016	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
SK-93	Kentucky	2017	Tavuk	R	R	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	R	R	+	-	
SK-95	Kentucky	2017	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	I	S	-	-	
SK-116	Kentucky	2019	Tavuk	S	S	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	R	S	-	-	
SK-125	Kentucky	2019	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	R	S	-	-	
SK-131	Kentucky	2020	Kaz	R	R	+	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	+	-	R	R	R	+	-	
SK-135	Kentucky	2020	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	I	S	-	-	R	R	S	-	-	
SK-137	Kentucky	2020	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	R	S	-	-	
SK-143	Kentucky	2011	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
SK-146	Kentucky	2011	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
SK-151	Kentucky	2011	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-	

Çizelge 3.3. Devam. *S.* Kentucky suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç profilleri.

İsolat no	Serovar	İzolasyon tarihi	Orijin	Beta laktamlar																						
				Aminoglikozitler						Penisilinler	Sefalosporinler			Karbapenem	Fenikoller		Folat yolu inhibitörleri				Kinolonlar		Tetrasiklinler			MDR
				CN	S	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA2</i>	AMP	FOX	CAZ	CTX	MEM	C	<i>flo</i>	S3	SXT	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	NA	CIP	TE	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	
SK-152	Kentucky	2011	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-		
SK-153	Kentucky	2011	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-		

MDR: Çoklu ilaç direnci (En az 3 antimikrobiyal sınıf olarak değerlendirildi)

Çizelge 3.4. *S. Typhimurium* suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç profilleri.

İsolat no	Serovar	İzolasyon tarihi	Orijin	Aminoglikozitler					Beta laktamlar				Fenikoller		Folat yolu inhibitörleri				Kinolonlar		Tetrasiklinler			MDR		
				CN	S	strA	strB	aadA1	aadA2	Penisilinler			MEM	C	flo	S3	SXT	sul1	sul2	NA	CIP	TE	tetA		tetB	
										AMP	FOX	CAZ														CTX
ST 33	Typhimurium	2017	Tavuk	R	I	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-		
ST 58	Typhimurium	2015	Tavuk	I	R	-	-	-	+	R	S	S	S	S	R	+	R	S	+	+	S	I	R	-	-	
ST 68	Typhimurium	2015	Tavuk	S	I	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	I	S	-	-		
ST 69	Typhimurium	2008	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-		
ST 73	Typhimurium	2016	Tavuk	S	I	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-		
ST 75	Typhimurium	2016	Kaz	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-		
ST 84	Typhimurium	2016	Buzağı	S	R	-	-	-	+	R	S	S	S	S	R	+	R	S	+	-	S	I	R	-	-	
ST 85	Typhimurium	2016	Buzağı	S	R	-	-	-	+	R	S	S	S	S	R	+	R	S	+	-	S	I	R	-	-	
ST 86	Typhimurium	2008	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	I	S	-	-		
ST 87	Typhimurium	2008	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-		
ST 90	Typhimurium	2017	Kuzu	S	R	-	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	I	R	-	+	
ST 91	Typhimurium	2017	Kuzu	S	R	+	+	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	I	R	-	+	
ST 92	Typhimurium	2017	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-		
ST 94	Typhimurium	2017	Martı	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-		
ST 96	Typhimurium	2008	Tavuk	S	S	-	-	-	-	R	S	S	S	S	I	-	R	S	-	+	R	I	S	-	-	
ST 97	Typhimurium	2017	Tavuk	S	S	-	-	-	-	R	R	R	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-		
ST 98	Typhimurium	2017	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-		
ST 99	Typhimurium	2017	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-		
ST 100	Typhimurium	2017	Hindi	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-		
ST 101	Typhimurium	2018	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	S	S	-	-		
ST 102	Typhimurium	2018	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	S	S	-	-		

Çizelge 3.4. Devam. *S. Typhimurium* suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç profilleri.

İsolat no	Serovar	İzolasyon tarihi	Orijin	Aminoglikozitler										Beta laktamlar				Fenikoller		Folat yolu inhibitörleri				Kinolonlar		Tetrasiklinler			MDR
				CN	S	strA	strB	aadA1	aadA2	Penisilinler		Sefalosporinler			Karbapenem		C	flo	S3	SXT	sul1	sul2	NA	CIP	TE	tetA	tetB		
										AMP	FOX	CAZ	CTX	MEM															
ST 104	Typhimurium	2018	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	R	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	S	S	-	-				
ST 105	Typhimurium	2018	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-				
ST 106	Typhimurium	2018	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-				
ST 107	Typhimurium	2018	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-				
ST 108	Typhimurium	2018	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
ST 109	Typhimurium	2018	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
ST 110	Typhimurium	2018	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-				
ST 111	Typhimurium	2018	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	I	S	I	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				
ST 112	Typhimurium	2018	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-				
ST 113	Typhimurium	2019	Buzağı	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-				
ST 114	Typhimurium	2019	Buzağı	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-				
ST 115	Typhimurium	2019	Buzağı	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-				
ST 117	Typhimurium	2019	Tavuk	S	S	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	I	S	-	-				
ST 118	Typhimurium	2019	Tavuk	S	R	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	+	S	I	S	-	-				
ST 119	Typhimurium	2019	Tavuk	S	S	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	+	S	I	S	-	-				
ST 120	Typhimurium	2019	Tavuk	S	I	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	I	S	-	-				
ST 121	Typhimurium	2019	Tavuk	R	S	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	I	S	-	-				
ST 122	Typhimurium	2019	Tavuk	R	S	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	R	I	S	-	-				
ST 123	Typhimurium	2019	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-				

Çizelge 3.4. Devam. *S. Typhimurium* suşlarının hayvan türlerine göre çoklu antimikrobiyal direnç profilleri.

İsolat no	Serovar	İzolasyon tarihi	Orijin	Beta laktamlar										Fenikoller		Folat yolu inhibitörleri				Kinolonlar		Tetrasiklinler			MDR	
				Aminoglikozitler					Penisilinler	Sefalosporinler			Karbapenem	C	flo	S3	SXT	sul1	sul2	NA	CIP	TE	tetA	tetB		
				CN	S	strA	strB	aadA1	aadA2	AMP	FOX	CAZ	CTX													MEM
ST 124	Typhimurium	2019	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	I	S	-	-	
ST 126	Typhimurium	2019	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	R	S	S	-	-	
ST 127	Typhimurium	2019	Tavuk	S	I	-	-	-	-	S	S	S	R	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
ST 128	Typhimurium	2019	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	I	S	-	-	
ST 129	Typhimurium	2019	Tavuk	S	S	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	R	-	-	I	I	R	-	-	
ST 130	Typhimurium	2020	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
ST 132	Typhimurium	2020	Tavuk	R	I	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	R	R	-	-	S	I	S	-	-	
ST 133	Typhimurium	2020	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
ST 134	Typhimurium	2020	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
ST 136	Typhimurium	2020	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	R	S	-	-	S	I	S	-	-	
ST 138	Typhimurium	2020	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
ST 139	Typhimurium	2020	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
ST 140	Typhimurium	2020	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
ST 144	Typhimurium	2011	Tavuk	I	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
ST 145	Typhimurium	2011	Tavuk	S	S	-	-	-	-	R	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	I	I	R	-	-	
ST 147	Typhimurium	2011	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-	
ST 148	Typhimurium	2011	Tavuk	S	R	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	I	S	-	-	
ST 149	Typhimurium	2008	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-	
ST 150	Typhimurium	2008	Tavuk	S	S	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	-	-	

3.3. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Moleküler Analiz Bulguları

Çalışma kapsamında yer alan 90 adet *S. Kentucky* ve 60 adet *S. Typhimurium* suşlarında streptomisin, tetrasiklin, sulfonamid, kloramfenikol antibiyotiklerine ait 9 adet direnç geni tüm suşlarda konvansiyonel PCR yöntemi ile araştırıldı. Görüntüleme işlemine ilişkin görüntüler Şekil 3.3-5'te yer almaktadır. Genlerin prevalansı %27,3 *tetA*, %25,3 *sul1*, %22 *strA*, %16,7 *strB*, %7,3 *sul2*, %2,7 *flo*, %2 *aadA2* ve %1,3 *tetB* geni tespit edildi (Çizelge 3.5).

Tetrasiklin direncinden sorumlu olan *tet* genlerinden *tetA* ve *tetB* direnç genleri; *S. Kentucky* suşlarında %45,6 *tetA* geni saptanırken *tetB* geni tespit edilmemiştir. *tetA* geni buzağılarda %87 tavuklarda ise %29,2 olduğu belirlendi. *S. Typhimurium* suşlarında *tetA* geni tespit edilmedi, *tetB* geni ise sadece kuzularda %3,3 olarak saptandı.

Sul1 ve *sul2* direnç genleri sulfonamid direncinde rol oynayan genlerin serovarlarına göre dağılımı şöyledir; *S. Kentucky* suşlarında %37,8 *sul1*, %7,8 *sul2* geni tespit edildi. *sul1* direnç geni en az bir tane tüm hayvan türünde tespit edildi (Çizelge 3.6). *sul2* direnç geni sadece %7,8 tavuklarda tespit edildi. *S. Typhimurium* suşlarında %5 *sul1*, %6,7 *sul2* direnç geni tespit edildi. *sul2* direnç geni sadece tavuklarda tespit edildi .

Kloramfenikol direncinde rol oynayan *flo* direnç geni, fenotipik dirençli iki adet *S. Kentucky* suşlarından sadece 1 suшта tespit edildi. Dirençli *S. Typhimurium* suşlarında hepsinde *flo* geni tespit edildi.

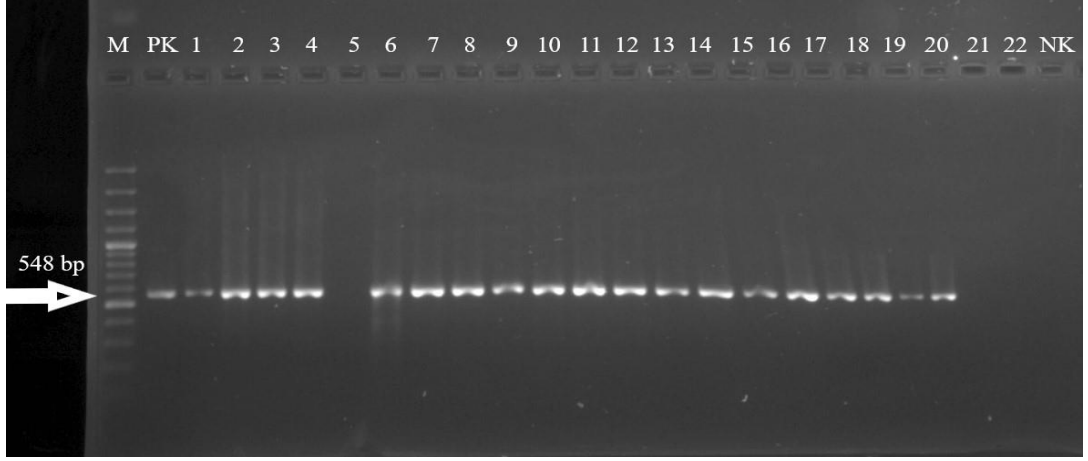
strA, *strB*, *aadA1*, *aadA2* streptomisin genleri; *S. Kentucky* suşlarında %35,2 *strA*, %20 *strB* tespit edilirken *aadA1* ve *aadA2* direnç genleri tespit edilmedi. *S. Typhimurium* suşlarında *strA* geni bir adet suшта, *strB* geni iki adet suшта *aadA2* geni üç adet suшта saptandı. *aadA1* direnç geni tespit edilmedi.

Çizelge 3.5. *S. Kentucky* ve *S. Typhimurium* suşlarının orijinlerine göre direnç genlerinin dağılımı.

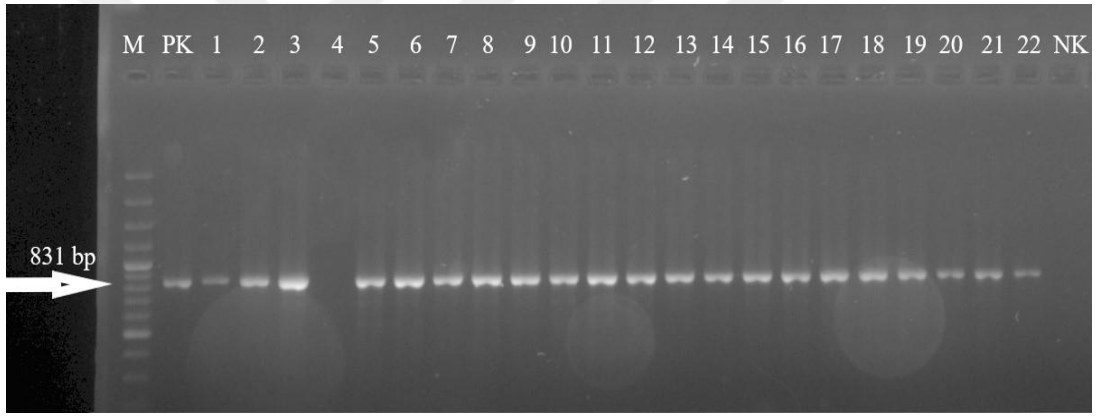
Direnç Geni	Tavuk n=112 (%)	Kaz n=2 (%)	Hindi n=2 (%)	Martı n=1 (%)	Buzağı n=28 (%)	Kuzu n=2 (%)	İnek n=1 (%)	Toplam n=150 (%)
<i>tetA</i>	19 (17)	1 (33,3)	-	-	20 (71,4)	-	1 (100)	41 (27,3)
<i>tetB</i>	-	-	-	-	-	2 (100)	-	2 (1,3)
<i>strA</i>	12 (10,7)	1 (33,3)	-	-	18 (64,3)	1 (50)	1 (100)	33 (22)
<i>strB</i>	15 (13,4)	-	-	-	7 (25)	2 (100)	1 (100)	25 (16,7)
<i>aadA1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aadA2</i>	1 (0,9)	-	-	-	2 (7,1)	-	-	3 (2)
<i>sul1</i>	14 (12,5)	1 (33,3)	-	-	22 (78,6)	-	1 (100)	38 (25,3)
<i>sul2</i>	11 (9,8)	-	-	-	-	-	-	11 (7,3)
<i>flo</i>	2 (1,8)	-	-	-	2 (7,1)	-	-	4 (2,7)

Çizelge 3.6. *S. Kentucky* serovarlarının hayvan türlerine göre direnç genlerinin dağılımı.

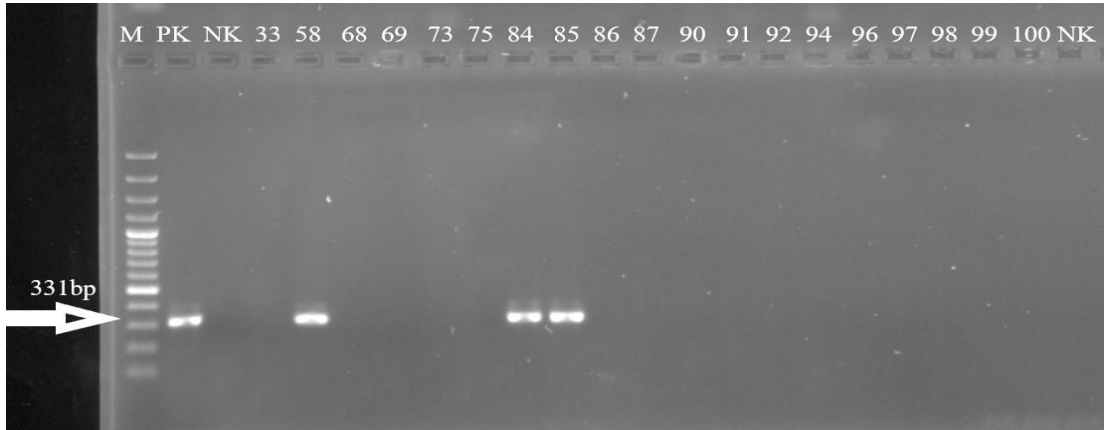
Direnç Genleri	Buzağı n=23 (%)	İnek n=1 (%)	Kaz n= 1 (%)	Tavuk n=65 (%)	Toplam n= 90 (%)
<i>sul 1</i>	20 (87)	1 (100)	1 (100)	12 (18,5)	34 (37,8)
<i>sul 2</i>	-	-	-	7 (10,8)	7 (7,8)
<i>tetA</i>	20 (87)	1 (100)	1 (100)	19 (29,2)	41 (45,6)
<i>tetB</i>	-	-	-	-	-
<i>flo</i>	-	-	-	1 (1,5)	1 (1,1)
<i>aadA1</i>	-	-	-	-	-
<i>aadA2</i>	-	-	-	-	-
<i>strA</i>	18 (78,3)	1 (100)	1 (100)	12 (18,5)	32 (35,6)
<i>strB</i>	5 (21,7)	1 (100)	-	12 (18,5)	18 (20)



Şekil 3.3. *S. Kentucky* şuşlarının taşıdığı *strA* genine ait PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 3.4. *S. Kentucky* şuşlarının taşıdığı *tetA* genine ait PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü



Şekil 3.5. *S. Typhimurium* şuşlarının taşıdığı *sull* genine ait PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü.

4. TARTIŞMA

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de antimikrobiyal direnç, üzerinde önemle durulan konular arasında yerini almaktadır. Antibakteriyel ilaçlara karşı direnç hem insan hem de çiftlik hayvanlarında ciddi bir sorun haline gelmiştir. İnsanlarda ve hayvanlarda tedavi amaçla kullanılan antibiyotik sınıfları çoğunlukla aynı olduğundan dolayı enfeksiyon etkenleri de dahil olmak üzere dirençli bakterilerin ortaya çıkma ve yayılma riskini artırmıştır (Anonim, 2017). Çiftlik hayvanları yani gıda üreten hayvanlar, antimikrobiyallere karşı direnç oluşturan ve bu direnç özelliğini insanlara bulaştırabilecek patojenlerin potansiyel bir kaynağıdır. Bakterilerde gelişen antimikrobiyal direnç, hayvansal gıdalar aracılığıyla, su, çevresel kontaminasyonlar ve hayvanlar ile temas yoluyla insanlara aktarılabilir. Dirençli bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonlar, tedavilerin uzun sürmesine ya da tedavinin başarısız olması enfeksiyonun diğer hastalara yayılmasına ve ölüm riskinin artmasına neden olabilir. Dirençli bakteriler direnç genlerini diğer bakterilere de aktarma özelliği olması antimikrobiyal direncin önemini artırmaktadır.

Turki ve ark. (2012), Tunus'da yaptıkları çalışmada; 57 *S. Kentucky* izolatlarının antibiyotiklere direnç profillerini araştırmışlar ve streptomisin (%80,7), sulfanamid (%42,1) ve tetrasiklin (%15,7) dirençli olduğunu bildirmiştir. Ayrıca kanatlı dışkılarından izole edilen 2 adet suşun Trimetoprim/Sülfametoksazol (%3,5) dirençli olduğu bildirmiştir. Caffrey ve ark. (2021), Kanada'da kanatlı orijinli 1596 adet *Salmonella* spp. suşunda yaptıkları çalışmada *S. Kentucky*'nin (%36) en sık tespit edilen serovar olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada *S. Kentucky* izolatlarında en yüksek antibiyotik direnç profilleri; streptomisine ve tetrasiklin (%89) eş zamanlı olarak, ampisilin (%27) direnç tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Liljebjelke ve ark. (2017), ABD'de broyler çiftliklerinden elde edilen antimikrobiyal direnç oranları streptomisin (%30,9), gentamisin (%12,6), sülfadimetoksin (%20,9), tetrasiklin (%13,9) ve trimetoprim-sülfametoksazol (%8,6) dahil olmak üzere çoklu antibiyotiklere dirençli *Salmonella* izolatları broyler çiftliklerinde tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada *Salmonella* serovarlarının %20'si üç veya daha fazla antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edilirken *S. Kentucky* suşlarının

% 53,8'i beş veya daha fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada 159 adet *S. Typhimurium* suşlarının %66,6 antibiyotiklere karşı pan duyarlı olduğunu saptamış ve %12,4 sülfadimetoksin, %9,4 gentamisin, %6,6 streptomisin, %6,4 tetrasikline direnç saptamışlardır. *S. Typhimurium* suşlarında üç veya daha fazla antibiyotiğe direnç saptadıklarını da bildirmişlerdir.

Ülkemizde *S. Kentucky* suşlarında yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde Ulusal Salmonella Kontrol Programına göre, tüm yetiştirme tiplerinde *S. Kentucky*'nin yüksek düzey direnç oranlarına sahip olduğu tespit edilmiştir. *S. Typhimurium*, broyler kümes örneklerinde, %88,3 sulfamethoksazol, %77,7 nalidiksik asit, %11,1 streptomisin ve ampisilin, %22,2 tetrasikline direnç tespit edilmiştir (Anonim, 2018). Hadimli ve ark. (2017), buzağı ve süt ineklerinin dışkılarından izole edilen *Salmonella* suşlarının çoklu antibiyotiğe dirençli olduğunu saptamışlardır. Çalışmada tüm *S. Kentucky* izolatlarının çoklu ilaç direncine sahip olduğu saptandı.

Bu tez çalışmasında farklı hayvansal orijinli *S. Kentucky* suşlarının antibiyotiklere karşı direnç oranları; *S. Kentucky* izolatlarının %91,1 en az bir antibiyotiğe direnç profili gösterdi. *S. Kentucky* suşlarına en yüksek direnci %82,2 ile streptomisin olduğu belirlendi. Bu direnç oranını %71,1 nalidiksik asit, %67,8 siprofloksasin, %60 ampisilin, %57,8 gentamisin, %56,7 sulfanamid, %50 tetrasiklin izledi. *S. Kentucky* suşlarındaki streptomisine karşı yüksek direnç tespit edilmesi, Caffrey ve ark. (2021), Liljebjelke ve ark. (2017) ve Turki ve ark. (2012)'nin bulgularıyla benzerlik göstermektedir. *Salmonella* enfeksiyonu tedavisinde streptomisinin hiçbir rolü olmamasına rağmen, streptomisine duyarlılık testi epidemiyolojik bir belirteç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Doran ve ark. 2006). Liljebjelke ve ark. (2017), kümes hayvanlarında streptomisin nadiren kullanıldığı ve yaptıkları çalışmada çiftliklerin streptomisin kullanmadıklarını beyan etmelerine rağmen kümes hayvanlarında *Salmonella* serovarlarında streptomisin direncinin en yüksek oranda olması dikkat çekici bulunmuştur. Araştırmacılar bu durumu, civcivleri peritonite karşı korumak amacıyla yapılan aşılarla yaygın olarak gentamisin kullanılması ile ilişkilendirmiş olup, gentamisin ile streptomisin direnci ile ilişkili direnç genlerinin fiziksel bağlantısı ve streptomisin direncinin kalıcılığı ile açıklamışlardır. Streptomisin direnç genlerinin, rekabet açısından avantajlı genlere

(bakteriosinler, sideroforlar gibi) sahip olması ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Aminoglikozidlere karşı kazanılan dirençte en önemli mekanizma, bu antibiyotiklerin amino ya da hidroksil gruplarının enzimatik olarak değiştirilmesidir. Değişikliğe uğrayan aminoglikozit molekülünün ribozomlara bağlanması engellenir ve bakteri aminoglikozid varlığında üremeye devam eder. Streptomisin direnci ve diğer aminoglikozidleri modifiye eden ve inaktive eden enzimler, asetiltransferazlar, fosfotransferazlar ve nükleotidiltransferazlardır. Bu enzimlerin birçoğu plazmid kontrolünde sentezlenmekte ve sentezlenmesinden sorumlu olan genler çoğu kez transpozonlarda taşınmaktadır. Transpozonlar aynı zamanda farklı grup antibiyotiklere karşı direnç oluşturduğundan dolayı aminoglikozit grubunun dışında kalan antibiyotiklerin (Ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, kanamisin, neomisin ve diğer ilgili antibiyotikler) kullanımı da streptomisin direncinin artışına neden olabilir (Alcaine ve ark., 2007 ve Mengistu ve ark., 2020). *Salmonella* serovarlarında streptomisin direncinin saptanması, antimikrobiyal direncin izlenmesi programlarında epidemiyolojik bir belirteç olarak kullanılmaktadır ve pentarezistansın varlığını ortaya koymaktadır (Doran ve ark., 2006 ve Quinn ve ark., 2006).

S. Typhimurium suşlarının antibiyotiklere direnç oranları sırasıyla %33,3 sulfanamid, %25 ampisilin, %20 streptomisin, %11,7 tetrasiklin, %8,3 nalidiksik asit, %6,7 gentamisin, %5 kloramfenikole direnç tespit edildi. Suşların %56,6 en az bir antibiyotiğe dirençli olduğu belirlendi. Çoklu antimikrobiyal direnç profilleri %11,6 olarak tespit edildi. *S. Typhimurium* suşlarında direnç oranları *S. Kentucky* suşlarına göre oldukça düşük olduğu belirlendi. *S. Typhimurium*'un diğer serovarlara göre daha az direnç oranlarının tespit edilmesi Liljebjelke ve ark. (2017) ve Mellor ve ark. (2019)'nın bulguları ile benzerdir. Bu farklılığın ortaya çıkmasının altında yatan neden halk sağlığı için risk oluşturan belirli serovarlara (*S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*) yönelik yapılan kontrol programları ve aşılama çalışmaları *S. Typhimurium*'daki varyasyonu etkilemiş olabilir ve AMR'li suşların saçılım riskinde azalmasına neden olmuş olabilir.

Kinolon grubu antibiyotikler yetişkinlerde invaziv Salmonellosis tedavisinde yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ajanlardır. Kinolonlara dirençli *Salmonella* suşlarının ortaya çıkması tedavilerin uzun sürmesine ya da tedavinin başarısız

olmasına neden olmaktadır. Bu tez çalışmasında *S. Kentucky* suşları %71,1 nalidiksik asit, %67,8 siprofloksasine dirençli olduğu tespit edildi. Nalidiksik asit ve siprofloksasin direnç oranları arasında uyum olduğunu belirlendi. Buzağı ve süt ineğinden izole edilen *S. Kentucky* suşlarının hepsi siprofloksasine ve nalidiksik asite (%100; 24/24), kanatlı hayvanlarda nalidiksik asit (%60,6; 40/66), siprofloksasin (%56; 37/66) direnç tespit edildi. Bu sonuçlar Andoh ve ark. (2016), Alvarez ve ark. (2020), Caffrey ve ark. (2021) ve EFSA (2021) bulguları ile benzerdir. *S. Typhimurium* suşlarında ise siprofloksasin %66,7 oranında orta derecede duyarlı olduğu belirlendi. Siprofloksasine karşı oluşan yüksek direnç oranları dirençli suşların insanlara bulaşması ve dirençli bakterilerin plazmidleri aracılığı ile direnç genlerini diğer bakterilere aktarma olasılığı, halk sağlığı için tehlike oluşturmaktadır. Ayrıca *Salmonella* enfeksiyonlarını tedavi etmek için alternatif bir ilaç olarak kabul edilen üçüncü nesil sefalosporinlere karşı dirençli olan çoklu ilaca dirençli bir adet *S. Kentucky* suşu tespit edildi. *S. Typhimurium* suşlarında sadece bir tanesi ampisilin ve üçüncü nesil sefalosporinlere dirençli olduğu tespit edildi. Sonuç olarak *S. Kentucky* ve *S. Typhimurium* suşlarında üçüncü nesil sefalosporinlere duyarlılık oranının yüksek olması önemli bir bulgudur. Çoklu ilaca dirençli *S. Kentucky* ve *S. Typhimurium* suşlarının kinolonlara ve üçüncü nesil sefalosporinler gibi klinik olarak önemli antibiyotiklere karşı dirençli suşların yayılması, klinik tedavinin zorlaşmasına neden olarak halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturacaktır. Karbapenemler kritik öneme sahip antimikrobiyal sınıfın içerisinde yer alır (WHO, 2019). Karbapenem sınıfında yer alan Meropenem *Salmonella* spp.'de antibiyotik direncinin izlenmesi ve raporlanması gereken bir antimikrobiyal ajandır (EFSA, 2021). Bu tez çalışmasında *S. Kentucky* ve *S. Typhimurium* suşlarının hepsi meropeneme duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Caffrey ve ark. (2021)'nin bulguları ile benzerdir. Meropenem sadece insanlarda enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır, hayvanların tedavisinde kullanılmaması gereken bir antimikrobiyal ajandır.

Ampisilin Dünya Sağlık Örgütü tarafından yüksek öncelikli yani kritik öneme sahip antimikrobiyal olarak sınıflandırılırken; sulfonamid ve tetrasiklinlerde son derece önemli antimikrobiyaller sınıfında yer almaktadır (WHO, 2019). Bu çalışmada *S. Kentucky* suşlarında, %60 ampisilin, %56,7 sulfonamid, %50 tetrasiklin direnç oranlarını tespit edildi. Bu sonuçlar EFSA (2021) ve Hadimli ve ark. (2017)'nin

bulguları ile benzerdir. *S. Kentucky* suşlarına göre *S. Typhimurium* suşlarının antibiyoetiklere karşı direnç oranlarında önemli farklar tespit edilirken hayvanları tedavi etmek için uzun yıllardır kullanılan antibiyotiklerin direnç oranlarının yüksek olduğu tespit edildi. *S. Typhimurium* suşlarının %33,3 sulfanamid, %25 ampisilin, %20 streptomisin, %11,7 tetrasiklin direnci belirlendi. Bu sonuçlar Anonim (2018), Hadimli ve ark. (2017) ve Liljebjelke ve ark. (2017)'nin bulguları ile benzerdir. Buzağı ve kuzudan izole edilen *S. Kentucky* ve *S. Typhimurium* suşlarının ampisilin, sulfanamid ve tetrasikline direnç oranları benzerdir. Bu antibiyotikler sığır, koyun ve keçi enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılması ile ilişkili olabilir.

Bu tez çalışmasında streptomisin direnç genleri *strA*, *strB*, *aadA1* ve *aadA2* genleri *S. Kentucky* suşlarında %35,6 *strA*, %20 *strB* tespit edilirken *aadA1* ve *aadA2* direnç genleri tespit edilmedi. Streptomisine fenotipik direnç gösteren suşların %50 oranında direnç geni tespit edilmedi. Streptomisine dirençli 12 adet *S. Typhimurium* suşlarında *strA* geni bir adet suшта, *strB* geni iki adet suшта, *aadA2* geni üç adet suшта olmak üzere beş adet suшта direnç geni tespit edildi. *S. Typhimurium* suşlarında *aadA1* direnç geni tespit edilmedi. *S. Kentucky* ve *S. Typhimurium* suşlarında streptomisine fenotipik direnç gösteren fakat incelen direnç genlerini bulundurmaması, bu direnç özelliğini farklı streptomisin direnç genleri tarafından kodlanıyor olabilir.

Tetrasiklin direncinden sorumlu *tetA* ve *tetB* genleri; *S. Kentucky* suşlarında %45,6 *tetA* geni saptanırken *tetB* geni tespit edilmemiştir. *S. Kentucky* suşlarında tetrasikline direnç gösteren yedi adet suшта (%15,6) direnç geni tespit edilmedi. Bu suşlarda fenotipik direnç muhtemelen farklı tetrasiklin direnç genleri tarafından kodlanmaktadır. *S. Typhimurium* suşlarında tetrasikline dirençli yedi suştan sadece ikisinde *tetB* geni tespit edilirken *tetA* geni tespit edilmedi. Beş suшта tetrasiklin direnci farklı gen bölgeleri tarafından kodlanıyor olabilir. Bu sonuçlar *Salmonella* serovarlarında en yaygın tetrasiklin direnç geninin *tetA* olduğunu bildiren diğer çalışmalar ile uyumludur (Chen ve ark., 2021 ve Pavelquesi ve ark., 2021).

Bu tez çalışmasında sulfonamid direncinden sorumlu *sul1* ve *sul2* geni, *S. Kentucky* suşlarında %37,8 *sul1*, %7,8 *sul2* geni tespit edildi. Sulfonamid direncine sahip %33,3 *S. Kentucky* suşlarında direnç geni tespit edilmedi. *S. Typhimurium*

suşlarında sulfonamide fenotipik direnç gösteren yirmi adet suştan altısında %5 *sul1*, %6,7 *sul2* direnç geni tespit edildi. Bu iki serovarda fenotipik direnci kodlayan sulfanamid direnç genlerinin tespit edilmemesi, dihidropteroat sentaz enziminin kromozomal geninde (*folP*) mutasyonların oluşması veya bilinmeyen genlerin edinilmesi sonucunda ortaya çıkan direnç mekanizmalarının oluşmasıyla ilişkili olabilir (Machado ve ark., 2013 ve Pavelquesi ve ark., 2021).

Kloromramfenikol direncinden sorumlu *flo* geni; dirençli iki *S. Kentucky* suşundan birinde tespit edildi. *S. Typhimurum* suşlarında ise dirençli üç suşun üçünde de *flo* geni tespit edildi.

Bu tez çalışmasında antibiyotik direnç genlerinde serovarlara spesifik bulgular elde edildi. *aadA2* ve *tetB* geni sadece *S. Typhimurium* suşlarında tespit edilirken *tetA* geni de sadece *S. Kentucky* serovarlarında tespit edildi. *sul2* sadece tavuklarda, *tetB* genide sadece kuzuda tespit edildi. Bu sonuçlar antimikrobiyal direnç genlerinin *Salmonella* serovar çeşidine göre değiştiğini bildiren Aslam ve ark. (2012)'nin bulgularına benzerdir. Direnç genlerinde serovarlara spesifik farklılıklar oluşmasında muhtemelen *Salmonella* serovarlarına özel genetik yapılar ile ilişkili olabilir (Aslam ve ark., 2012).

Tüm dünyada önemli bir halk sağlığı problemi olan *S. Typhimurium* DT104 [tanımlayıcı faj tipi 104] suşu; ilk olarak 1980'lerin sonlarında İngiltere'de sığır ve insanlardan izole edildi. DT104 suşu kümes hayvanları, koyun ve domuzlarda yaygın olarak bildirilmektedir. *S. Typhimurium* DT104, penta-resistance (ACSSuT) olarak tanımlanan beş yaygın kullanılan antimikrobiyal ilaca (ampisilin (A), kloramfenikol (C), streptomisin (S), sülfonamid (Su) ve tetrasiklin (T)) dirençli suşlar olarak tanımlanırlar (Dolapçı ve ark., 2015; Doran ve ark., 2006; Gebreyes ve Altier 2002; Quinn ve ark., 2006; Randall ve ark., 2004; Walker ve ark. 2001 ve Wang ve ark., 2019). DT104 suşlarında ACSSuT direnci, *Salmonella* genomik adası 1 (SG1) ayrılmaz bir parçası olduğu için ilgi çekicidir. Bu suşlar SG1'in distal ucunun yakınında antibiyotik direnç gen kümesi içeren iki adet sınıf 1 integron ve plazmid taşır. Bu integronlarda birincisi, streptomisin direnç geni *aadA2* ve kısmi sülfonamid direnç geni *sul1*'i bulundurur. *aadA2* geni ayrıca *Salmonella*'da streptomisin

direncinin önemli bir mekanizması olarak tanımlanmıştır ve geniş bir coğrafyaya yayılan çoklu ilaca dirençli *S. Typhimurium* DT104 klonal grubunda streptomisin direncinin temelidir (Doran ve ark., 2006 ve Quinn ve ark., 2006). Diğer sınıf 1 integronunda ise ampisilin direnç geni *bla_{PSE}* ve tam bir *sul1* genini bulundurur. Bu iki integronun arasında tetrasiklin direnç geni *tetG* ve kloramfenikol direnç geni olan *flo* yer alır (Quinn ve ark., 2006; Randall ve ark., 2004; Walker ve ark., 2001 ve Wang ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında *S. Typhimurium* suşlarında, 2 adet buzağı ve bir adet tavuktan izole edilen 3 adet suşta bu ilaç direnci modeli (ACSSuT) tespit edildi. Bu suşlarda, araştırılan direnç genlerinden *flo*, *sul1*, *aadA2* genleri tespit edildi. Bu sonuçlar bu üç suşun *S. Typhimurium* DT104 suşunun antibiyotik direnç modeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında Türkiye’de tavuk ve buzağılardan izole edilen üç adet *S. Typhimurium* DT104 suşunun antimikrobiyal direnç profiline sahip olduğu ortaya konuldu.

Bu tez çalışmasında *S. Kentucky* suşlarında %62,2’i çoklu antibiyotiğe dirençli olduğu belirlendi. Çoklu antibiyotik direnci, 3 ve daha fazla antimikrobiyal sınıfa karşı gelişen direnç olarak tanımlandı. Çoklu antimikrobiyal direnç profili %91,7 buzağı ve süt ineği, %51,5 tavuk ve kazlarda tespit edildi. *S. Kentucky* çoklu ilaca karşı dirençli olduğu bulgularımız, ABD (Liljebjelke ve ark., 2017), İspanya (Alvarez ve ark., 2020), Tunus (Turki ve ark., 2012), Kanada (Caffrey ve ark., 2021) ve EFSA (2021) ve ülkemizde yapılan çalışmaların (Anonim, 2018 ve Hadimli ve ark. 2017) bulguları ile benzerdir. Ayrıca *S. Kentucky* suşlarında ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfanamid ve tetrasikline dirençli tavuk ve buzağıdan izole edilen 2 adet suş tespit edildi. Çoklu ilaca dirençli *Salmonella* suşlarının ortaya çıkması ve yayılması sıklıkla bakterilerin kazandığı ekstra genetik elementler ile ilişkili olabilir (Carattoli, 2013 ve Elbediwi ve ark., 2019). Bu çalışmanın bulgusu olarak ortaya çıkan *S. Kentucky* suşlarında yüksek ilaç direnci profilleri kontrolsüz antibiyotik kullanımının zararlı etkisini göstermektedir. Hayvan refahından uzaklaşan entansif hayvan yetiştiriciliği sistemi, çoklu ilaca dirençli bakteri yayılmasını hızlandırmış olabilir (İstanbuluoğlu, 2012).

Ampisilin, streptomisin, tetrasiklin ve sulfonamid direncine siprofloksasin direncinin eklenmesi ile Salmonellosis vakalarının tedavilerin başarısız olma

ihtimalini artırmaktadır. *S. Kentucky* suşları %67,8 siprofloksasin direnci tespit edildi ve baskın antimikrobiyal direnç profili CN-S-AMP-S3-NA-CIP-TE %36,7 olduğu belirlendi. Bu antibiyotik direnç modeline sahip suşlarda çoklu direnç genlerine de sahip olduğu tespit edildi. *S. Kentucky* suşlarında buzağı ve süt ineğinde 1 çeşit, tavuklarda 15 çeşit çoklu ilaç direnç kombinasyonu profili tespit edildi. *S. Typhimurium* suşlarında %66,7 oranında siprofloksasine orta derecede duyarlı olduğu belirlendi. Siprofloksasine karşı orta düzeyde duyarlılık oranının yüksek düzeyde olması, gelecekte bakterilerin bu antibiyotiğe karşı direnç oranının artacağına göstergesi olması bakımından endişe vericidir. *S. Typhimurium* suşlarında çoklu antimikrobiyal direnç profilleri %16,7 olarak tespit edildi. Ayrıca 6 farklı ÇİD profili tespit edildi. Baskın antimikrobiyal direnç profili; AMP-C-TE-S-S3 %5 olduğu tespit edildi. *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* suşları çoklu ilaç direnç oranlarında önemli farklılık olduğu belirlendi. Bu farklılığın ortaya çıkmasında, siprofloksasin (*gyrA / parC* genlerinde mutasyonların oluşması) ve diğer antibiyotiklere (ampisilin, streptomisin, sülfonamid, tetrasiklin) yüksek direnç kazanan *S. Kentucky* ST198-X1 (Antunes ve ark., 2016; EFSA, 2021; Hawkey ve ark., 2019 ve Le Hello ve ark., 2011) olarak tanımlanan suşun direnç profilini gösteren suşlar ile ilişkili olabilir. *S. Kentucky* ST198, Fransa, Polonya, Amerika Birleşik Devletleri ve Vietnam'daki kümes hayvanlarında ve sığırlarda da bildirilmiştir (Chen ve ark. 2021). Türkiye'de *S. Kentucky* ST198 klonunun antibiyotik direnç modeline sahip suşların, tavuk ve buzağılardan izole edildiğine dair ilk bulgular bu tez çalışmasında ortaya kondu. Bu bulgular ST198 suşunun kanatlı hayvanlara, buzağı ve süt inekleri, diğer çiftlik hayvanları veya vahşi hayvanlara bulaşma potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir. Siprofloksasine dirençli ST198, gıda güvenliği ve halk sağlığı için önemli bir risk oluşturmakta olup bu suşun gıda üreten hayvanlarda izlenmesi gereklidir. *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* serovarlarında çoklu ilaç direnç fenotip çeşidinin en fazla kanatlı hayvanlarda olduğu belirlendi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Türkiye’de farklı hayvansal orijinli *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* serovarlarında disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal direnç profilleri ve konvansiyonel PCR yöntemi ile direnç genleri belirlendi.

S. Typhimurium ve *S. Kentucky* suşlarının antimikrobiyal direnç oranları karşılaştırıldığında serovarlar arasında hem fenotipik direnç oranları hem de genotipik direnç oranları arasında önemli farklılıkların olduğu belirlendi. *S. Kentucky* suşları %82,2 streptomisin, %71,1 nalidiksik asit, %67,8 siprofloksasin, %60 ampisilin, %57,8 gentamisin, %56,7 sulfanamid, %50 tetrasikline dirençli olduğu belirlenirken, *S. Typhimurium* suşlarının direnç oranları sırasıyla %33,3 sulfanamid, %25 ampisilin, %20 streptomisin, %11,7 tetrasiklin, %8,3 nalidiksik asit, %6,7 gentamisin, %5 kloramfenikole direnç oranları belirlendi. Kümes hayvanları ve büyükbaş hayvanların çoklu ilaca dirençli *Salmonella* serovarlarının kaynağı olduğu belirlendi. Bu sonuçlar gıda üreten hayvanlarda antibiyotik kullanımının daha dikkatli ve bilinçli olunması gerektiğini gösterdi. Direnç oranlarının yüksek olması insanlar için potansiyel bir risk olarak değerlendirildi.

Çalışmada araştırılan antimikrobiyal direnç genlerinin analizi sonucunda; *S. Kentucky* suşlarında %37,8 *sul1*, %7,8 *sul2*, %45,6 *tetA*, %35,6 *strA*, %20 *strB*, %1,1 *flo* geni tespit edildi ve *aadA1*, *aadA2* ve *tetB* geni tespit edilmedi. *S. Typhimurium* suşlarında %6,7 *sul2*, %5 *sul1*, %5 *flo*, %5 *aadA2*, %3,3 *tetB*, %3,3 *strB*, %1,7 *strA* geni tespit edilirken *aadA1* geni tespit edilmedi. *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* serovarlarında antimikrobiyal direnç fenotiplerinin genotipik direnç belirleyicilerine göre yüksek olduğu belirlendi. Bu çalışma farklı hayvansal orijinli *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* serovarlarının antimikrobiyal direnç profillerini araştıran en kapsamlı (farklı bölgeler, örnek sayısı ve farklı yıllar) çalışma özelliği taşımaktadır.

Çalışmamızın bulguları arasında çoklu ilaç direnç profilleri sergileyen *S. Kentucky* ST198-X1 klonu ile *S. Typhimurium* DT104 suşunun antimikrobiyal direnç modeline sahip suşlar kanatlı ve büyükbaş hayvanlarda tespit edildi. Bu bulgular ST198 ve DT104 suşunun kanatlı hayvanlara, buzağı ve süt inekleri, diğer çiftlik

hayvanları veya vahşi hayvanlara bulaşma potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir. ST198 ve DT104 suşları gıda güvenliği ve halk sağlığı için önemli bir risk oluşturmakta olup bu suşların gıda için üretilen hayvanlarda izlenmesi gereklidir.

Farklı hayvanlardan izole edilen *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* suşlarının antimikrobiyal direnç profillerinin fenotipik ve genotipik yöntemler ile ortaya konması; hekimlerin *Salmonella* tedavisi için uygulama yaklaşımlarını gözden geçirmesini sağlayarak ampirik antibiyotik kullanımının önüne geçerek daha etkili antibiyotik kullanımlarına sağlayacağı bakımından kritik öneme sahiptir. Bu çalışma halk sağlığı risklerini en aza indirmek için hayvanlarda antimikrobiyal kullanımının etkilerinin izlenmesinin önemini göstermektedir.

Serovarlar arasında antimikrobiyal ajanlara karşı direnç oranlarında önemli farklılıkların ortaya çıkması, halk sağlığı için risk oluşturan belirli serovarlara (*S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*) yönelik yapılan kontrol programları ve aşılama çalışmalarının etkisi ile ilişkili olduğu ve AMR'li suşların saçılım riskinde azalmasına neden olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar uygulanan kontrol önlemlerinin tüm *Salmonella* serovarlarına karşı eşit derecede etkili olmadığını göstermektedir. Bu nedenle, *Salmonella* kontrol programları, epidemiyolojik önemi olan diğer serovarları da kapsayacak şekilde güncellenmelidir.

S. Typhimurium ve *S. Kentucky* suşlarının resistome ve virülomunun genomik karakterizasyonu için tüm genom sekanslaması ile incelenmesi bu serovarlara risk faktörlerinin ve epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılmasını olanak sağlayacaktır.

Bu çalışma *Salmonella* gibi gıda kaynaklı patojenlerin izolasyonu, antimikrobiyal direnç ve ilaç kullanımının yanı sıra farklı rezervuarlar arasındaki ilişkileri, direnç genlerinin oluşma nedenleri ve yayılmasını ortaya çıkaran risk faktörlerinin devamlı olarak izlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Çoklu ilaç dirençli bakterilerin yayılmasını engellemek için antibiyotik kullanımına kısıtlamalar getirmek, çiftliklerde hayvan refahı, biyogüvenlik ve aşılama programlarının uygulanmasının antimikrobiyal kullanımının azalması açısından önem arz etmektedir.

ÖZET

Hayvansal Orijinli *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Kentucky Serotiplerinde Antibiyotik Direncinin Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Saptanması

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de antimikrobiyal direnç, üzerinde önemle durulan konular arasında yerini almaktadır. Antibakteriyel ilaçlara karşı direnç hem insan hem de çiftlik hayvanlarında ciddi bir sorun haline gelmiştir. Bu tez çalışmasının amacı; *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* serovarlarında antibiyotik dirençliliğinin konvansiyonel ve moleküler yöntemler ile belirlenmesi amaçlandı.

Bu tez çalışmasında Türkiye’de farklı hayvansal orijinli 60 adet *Salmonella* Typhimurium ve 90 adet *Salmonella* Kentucky serovarlarının sefotaksim, seftazidim, kloramfenikol, tetrasiklin, gentamisin, nalidiksik asit, siprofloksasin, sülfonamid, trimetoprim/sülfametoksazol, streptomisin, sefoksitin, meropenem karşı antimikrobiyal duyarlılık testi Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. *Salmonella* suşlarında *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetB*, *strA*, *strB*, *aadA1*, *aadA2* ve *flo* antimikrobiyal direnç genleri konvansiyonel PCR yöntemleri ile araştırıldı.

S. Kentucky suşları %82,2 streptomisin, %71,1 nalidiksik asit, %67,8 siprofloksasin, %60 ampisilin, %57,8 gentamisin, %56,7 sülfonamid, %50 tetrasikline dirençli olduğu tespit edildi. Buzağı ve süt ineğinden izole edilen *S. Kentucky* suşlarının hepsi %100 siproflaksine ve nalidiksik asite, %95,8 streptomisin, %95 sülfonamid, %91,6 ampisilin, tetrasiklin ve gentamisine dirençli olduğu tespit edildi. Kanatlı hayvanlarda %78,7 streptomisin, %60,6 nalidiksik asit, %56 siprofloksasin, %48,8 ampisilin, %45 gentamisin, %42 sülfonamid, %34 tetrasikline dirençli olduğu tespit edildi. *S. Kentucky* suşlarının %62,2’si çoklu antibiyotiğe dirençli olduğu belirlendi. Bu sonuçlar çoklu ilaç direnç profilleri sergileyen ve siprofloksasine dirençli *S. Kentucky* suşlarının, gıda güvenliği ve halk sağlığı için önemli bir risk oluşturan *S. Kentucky* ST198-X1 klonuna ait olabileceğini göstermiştir.

S. Typhimurium suşlarının antibiotiklere direnç oranları sırasıyla %33,3 sülfonamid, %25 ampisilin, %20 streptomisin, %11,7 tetrasiklin, %8,3 nalidiksik asit, %6,7 gentamisin, %5 kloramfenikole direnç oranları tespit edildi. *S. Typhimurium* suşlarında %66,7 oranında siprofloksasine orta derecede duyarlı olduğu belirlendi. Siprofloksasine karşı orta düzeyde duyarlılık oranının yüksek düzeyde olması, gelecekte bu antibiyotiğe karşı direnç oranının artacağına göstergesi olması bakımından endişe vericidir.

S. Kentucky suşlarında direnç genlerinin prevalansı %37,8 *sul1*, %7,8 *sul2*, %45,6 *tetA*, %35,6 *strA*, %20 *strB*, %1,1 *flo* geni tespit edildi ve *aadA1*, *aadA2* ve *tetB* geni tespit edilmedi. *S. Typhimurium* suşlarında %6,7 *sul2*, %5 *sul1*, %5 *flo*, %5 *aadA2*, %3,3 *tetB*, %3,3 *strB*, %1,7 *strA* geni tespit edilirken *aadA1* geni tespit edilmedi.

Bu çalışmanın sonuçları, halk sağlığı risklerini en aza indirmek için hayvanlarda antimikrobiyal kullanımının etkilerinin izlenmesinin önemini göstermektedir. Antibiyotik kullanımının gıda üreten hayvanlarda daha dikkatli ve bilinçli olunması gerektiği ortaya

konu. Bu çalışmanın bulguları, Türkiye’de *Salmonella* serovarlarının antimikrobiyal direnç profillerinin izlenmesinin önemini vurgulamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Antimikrobiyal Dirençlilik, PCR, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Typhimurium, Zoonoz.



SUMMARY

Determination of Antibiotic Resistance in *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Kentucky Serotypes of Animal Origin Using Conventional and Molecular Methods

Antimicrobial resistance is one of the most important issues in Turkey, similar to other parts of the world. Resistance to antibacterial drugs has become a serious problem in both humans and farm animals. The aim of this thesis study was to determine the antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Kentucky serovars using the conventional and molecular method.

In this thesis, 60 *S.* Typhimurium and 90 *S.* Kentucky serovars of different animal origin in Turkey were evaluated in terms of their antimicrobial susceptibility to cefotaxime, ceftazidime, chloramphenicol, tetracycline, gentamicin, nalidixic acid, ciprofloxacin, sulfonamide, trimethoprim/sulfamethoxazole, streptomycin, ceftiofur, and meropenem using the Kirby-Bauer disk diffusion method.

In the *Salmonella* strains, antimicrobial resistance genes *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetB*, *strA*, *strB*, *aadA1*, *aadA2*, and *flo* were investigated with conventional polymerase chain reaction methods. The *S.* Kentucky strains were found to be resistant to streptomycin at a rate of 85%, nalidixic acid at 73%, ciprofloxacin at 70.1%, ampicillin at 62%, gentamicin at 59.7%, sulfonamide at 58.6%, and tetracycline at 51.7%. All the *S.* Kentucky strains isolated from calves and dairy cows were resistant to ciprofloxacin and nalidixic acid, 95.8% were resistant to streptomycin, 95% to sulfonamide, and 91.6% to ampicillin, tetracycline, and gentamicin. In poultry animals, the rate of antimicrobial resistance was determined as 78.7% for streptomycin, 60.6% for nalidixic acid, 56% for ciprofloxacin, 48.8% for ampicillin, 45% for gentamicin, 42% for sulfonamide, and 34% for tetracycline. Of the *S.* Kentucky strains, 63.3% were resistant to multiple antibiotics. These strains exhibiting multi-drug resistance profiles and resistance to ciprofloxacin suggesting that they may belong to the *S.* Kentucky ST198-X1 clone, which poses a significant risk to food safety and public health.

The resistance rates of the *S.* Typhimurium strains to antibiotics were determined as follows: 33.3% for sulfonamide, 25% for ampicillin, 20% for streptomycin, 11.6% for tetracycline, 8.3% for nalidixic acid, 6.6% for gentamicin, and 5% for chloramphenicol. *S.* *S.* It was determined that 66.6% of the *S.* Typhimurium strains were moderately susceptible to ciprofloxacin. The high level of moderate susceptibility to ciprofloxacin is a concern since it suggests that the resistance rate against this antibiotic may increase in future.

The prevalence of the resistance genes in the *S.* Kentucky strains was as follows: 37.8% for *sul1*, 7.8% for *sul2*, 45.6% for *tetA*, 35.6% for *strA*, 20% for *strB*, and 1.1% for *flo*. The *aadA1*, *aadA2*, and *tetB* genes were not detected in these strains. Among the *S.* Typhimurium strains, the prevalence of the *sul2*, *sul1*, *flo*, *aadA2*, *tetB*, *strB*, and *strA* genes was determined as 6.7%, 5%, 5%, 5%, 3.3%, 3.3%, and 1.7%, respectively, while the *aadA1* gene was not detected.

The results of this study demonstrate the importance of determining the effects of antimicrobial use in animals to minimize public health risks. It was revealed that antibiotics should be used more carefully and consciously in food producing animals. The findings of this study also highlight the necessity of monitoring the antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serovars in Turkey.

Keywords: Antimicrobial Resistance, PCR, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Typhimurium, Zoonosis.



KAYNAKLAR

- ALGHORIBI MF, DOUMITH M, ALRODAYYAN M, AL ZAYER M, KOSTER WL, MUHANNA A, ALJOHANI SM, BALKHY HH, DESIN TS (2019). *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* harboring SPI-1 and SPI-2 are the predominant serotypes associated with human Salmonellosis in Saudi Arabia. *Front Cell Infect Microbiol*, **9**: 187.
- ALVAREZ J, LOPEZ G, MUELLNER P, DE FRUTOS C, AHLSTROM C, SERRANO T, MORENO MA, DURAN M, SAEZ JL, DOMINGUEZ L, UGARTE-RUIZ M (2020). Identifying emerging trends in antimicrobial resistance using *Salmonella* surveillance data in poultry in Spain. *Transbound Emerg Dis.*, **67**: 250–262.
- AMINOV RI (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*, **1**: 134.
- ANDOH LA, DALSGAARD A, OBIRI-DANSO K, NEWMAN MJ, BARCO L, OLSEN JE (2016). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from poultry in Ghana. *Epidemiol Infect*, **144**: 3288–3299.
- ANONİSKOLM (2017). Tüba-İnsan ve hayvan sağlığında akılcı antibiyotik kullanımı ve antibiyotik dirençlilik raporu. Erişim adresi: [TÜBA-İnsan ve Hayvan Sağlığında Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Antibiyotik Dirençlilik Raporu.pdf (tuba.gov.tr)] Erişim tarihi: 20/04/2021.
- ANONİM (2018). Ulusal *Salmonella* kontrol programı, Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü. Available.(https://tuyekad.org.tr/wpcontent/uploads/2018/09/ULUSAL_SALMONELLA_KONTROL_PROGRAMI_.pdf) Erişim tarihi: 20/05/2021.
- ANTUNES P, MOURÃO J, CAMPOS J, PEIXE L (2016). Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clin Microbiol Infect*, **22**: 110–121.
- ARDA M (2006). Temel Mikrobiyoloji. Medisan, Ankara
- ASLAM M, CHECKLEY S, AVERY B, CHALMERS G, BOHAYCHUK V, GENSLER G, REID-SMITH R, BOERLIN P (2012). Phenotypic and genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Food microbiology*, **32**: 110-117.
- BRENNER FW, VILLAR RG, ANGULO FJ, TAUXE R, SWAMINATHAN B (2000). *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol*, **38**: 2465–2467.
- CAFFREY N, AGUNOS A, GOW S, LILJEBJELKE K, MAINALI C, CHECKLEY SL (2021). *Salmonella* spp. prevalence and antimicrobial resistance in broiler chicken and turkey flocks in Canada from 2013 to 2018. *Zoonoses Public Health*, **68**: 719–736.
- CARATTOLI A (2013). Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*, **303**: 298–304.
- CHEN H, SONG J, ZENG X, CHEN D, CHEN R, QIU C, ZHOU K (2021). National prevalence of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 with high-level resistance to ciprofloxacin and extended-spectrum cephalosporins in China, 2013 to 2017. *mSystems*, **6**: e00935-20.

- CHENG RA, EADE CR, WIEDMANN M (2019). Embracing diversity: Differences in virulence mechanisms, disease severity, and host adaptations contribute to the success of nontyphoidal *Salmonella* as a foodborne pathogen. *Front Microbiol*, **10**: 1368.
- CHEN S, ZHAO S, WHITE DG, SCHROEDER CM, LU R, YANG H, MCDERMOTT PF, AYERS S, MENG J (2004). Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 1–7.
- COHEN E, AZRIEL S, AUSTER O, GAL A, ZITRONBLAT C, MIKHLIN S, SCHARTE F, HENSEL M, RAHAV G, GAL-MOR O (2021). Pathoadaptation of the passerine-associated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lineage to the avian host. *PLoS Pathog*, **17**: e1009451.
- DAS Q, LEPP D, YIN X, ROSS K, MCCALLUM JL, WARRINER K, MARCONE MF, DIARRA MS (2019). Transcriptional profiling of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposed to ethanolic extract of organic cranberry pomace. *PloS One*, **14**: e0219163.
- DELGADO-SUÁREZ EJ, SELEM-MOJICA N, ORTIZ-LÓPEZ R, GEBREYES WA, ALLARD MW, BARONA-GÓMEZ F, RUBIO-LOZANO MS (2018). Whole genome sequencing reveals widespread distribution of typhoidal toxin genes and VirB/D4 plasmids in bovine-associated nontyphoidal *Salmonella*. *Sci Rep*, **8**: 9864.
- DHANANI AS, BLOCK G, DEWAR K, FORGETTA V, TOPP E, BEIKO RG, DIARRA MS (2015). Genomic comparison of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky isolates from broiler chickens. *PloS One*, **10**: e0128773.
- DOLAPÇI I, TEKELI A, SAHIN F, ERDEM B (2015). Türkiye’de insanlardan izole edilen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium şuşlarının moleküler özellikleri. *Mikrobiyol Bul*, **49**: 502-512.
- DORAN G, NICHULAIN M, DELAPPE N, O'HARE C, CORBETT-FEENEY G, CORMICAN M (2006). Interpreting streptomycin susceptibility test results for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Int J Antimicrob Agents*, **27**: 538–540.
- EDWARDS P (1938). A new *Salmonella* type: *Salmonella* Kentucky. *J Hyg*, **38**: 306-308.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2015). The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, **13**: 3991
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (2021). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA journal. European Food Safety Authority*, **19**: e06490.
- ELBEDIWI M, LI Y, PAUDYAL N, PAN H, LI X, XIE S, RAJKOVIC A, FENG Y, FANG W, RANKIN SC, YUE M (2019). Global burden of colistin-resistant bacteria: Mobilized colistin resistance genes study (1980-2018). *Microorganisms*, **7**: 461.
- FÀBREGA A, VILA J (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev*, **26**: 308–341.

- FIGUEIREDO R, CARD R, NUNES C, ABUOUN M, BAGNALL MC, NUNEZ J, MENDONÇA N, ANJUM MF, DA SILVA GJ (2015). Virulence characterization of *Salmonella enterica* by a new microarray: detection and evaluation of the cytolethal distending toxin gene activity in the unusual host *S. Typhimurium*. *PloS One*, **10**: e0135010.
- FRYE JG, JACKSON CR (2013). Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. *Front Microbiol*, **4**: 135.
- GEBREYES WA, ALTIER C (2002). Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol*, **40**: 2813–2822.
- HADIMLI HH, PINARKARA Y, SAKMANOGLU A, SAYIN Z, ERGANIS O, USLU A, AL-SHATRAWI HJ (2017). Serotypes of *Salmonella* isolated from feces of cattle, buffalo, and camel and sensitivities to antibiotics in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, **41**: 193-198
- HALEY BJ, KIM SW, PETTENGILL J, LUO Y, KARNIS JS, VAN KESSEL JA (2016). Genomic and evolutionary analysis of two *Salmonella enterica* serovar Kentucky sequence types isolated from bovine and poultry sources in North America. *PloS One*, **11**: e0161225.
- HANSEN-WESTER I, HENSEL M (2001). *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect*. **3**: 549–559.
- HEREDIA N, GARCIA S (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)*. **4**: 250–255
- HERRERO-FRESNO A, OLSEN JE (2018). *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host - A mini-review. *Food Microbiol*, **71**: 98–110.
- IBARRA JA, STEELE-MORTIMER O (2009). *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol*, **11**: 1579–1586.
- ISTANBULLUOGLU E (2012). Antimikrobiyal direnç: Küresel gizli bir salgın. Bilinçli antibiyotik kullanımı ve antimikrobiyel direç sempozyumu. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı.
- JAJERE SM (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World*, **12**: 504–521.
- KAUR J, JAIN SK (2012). Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiol Res*, **167**: 199–210.
- LE HELLO S, HENDRIKSEN RS, DOUBLET B, FISHER I, NIELSEN EM, WHICHARD JM, BOUCHARIF B, FASHAE K, GRANIER SA, JOURDAN-DA SILVA N, CLOECKAERT A, THRELFALL EJ, ANGULO FJ, AARESTRUP FM, WAIN J, WEILL FX (2011). International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J Infect Dis*, **204**: 675–684.

- LI XZ, MEHROTRA M, GHIMIRE S, ADEWOYE L (2007). Beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol*, **121**: 197–214.
- LILJEBJELKE KA, HOFACRE CL, WHITE DG, AYERS S, LEE MD, MAURER JJ (2017). Diversity of antimicrobial resistance phenotypes in *Salmonella* isolated from commercial poultry farms. *Front. Vet. Sci*, **4**: 96.
- LINDGREN SW, STOJILJKOVIC I, HEFFRON F (1996). Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella* Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 4197–4201.
- LOU L, ZHANG P, PIAO R, WANG Y (2019). *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network. *Front Cell Infect Microbiol*. **9**: 270.
- MACHADO E, COQUE TM, CANTÓN R, SOUSA JC, PEIXE L (2013). Commensal Enterobacteriaceae as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and sul genes in Portugal. *Frontiers in microbiology*, **4**: 80.
- MAJOWICZ SE, MUSTO J, SCALLAN E, ANGULO FJ, KIRK M, O'BRIEN SJ, JONES TF, FAZIL A, HOEKSTRA RM (2010). International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*. **50**: 882-9
- MELLOR KC, PETROVSKA L, THOMSON NR, HARRIS K, REID S, MATHER AE (2019). Antimicrobial resistance diversity suggestive of distinct *Salmonella* Typhimurium sources or selective pressures in food-production animals. *Front. Microbiol*, **10**: 708.
- MENGISTU G, DEJENU G, TESEMA C, AREGA B, AWOKE T, ALEMU K, MOGES F (2020). Epidemiology of streptomycin resistant *Salmonella* from humans and animals in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, **15**: e0244057.
- MTHEMBU TP, ZISHIRI OT, EL ZOWALATY ME (2019). Molecular detection of multidrug-resistant *Salmonella* isolated from livestock production systems in South Africa. *Infect Drug Resist*. **12**: 3537-3548.
- PAVELQUESI S, DE OLIVEIRA FERREIRA A, RODRIGUES A, DE SOUZA SILVA CM, ORSI DC, DA SILVA I (2021). Presence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in *Salmonella* spp.: Literature review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, **10**: 1314.
- POPOFF MY, BOCKEMUHL J, GHEESLING LL (2003). Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*, **154**: 173–174.
- QUINN T, O'MAHONY R, BAIRD AW, DRUDY D, WHYTE P, FANNING S (2006). Multi-drug resistance in *Salmonella enterica*: Efflux mechanisms and their relationships with the development of chromosomal resistance gene clusters. *Curr Drug Targets*, **7**: 849–860.
- RAFFATELLU M, WILSON RP, CHESSA D, ANDREWS-POLYMENIS H, TRAN QT, LAWHON, S, KHARE S, ADAMS LG, BÄUMLER AJ (2005). SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium invasion of epithelial cells. *Infect Immun*, **73**: 146–154.

- RAJASHEKAR R, LIEBL D, CHIKKABALLI D, LISS V, HENSEL M (2014). Live cell imaging reveals novel functions of *Salmonella enterica* SPI2-T3SS effector proteins in remodeling of the host cell endosomal system. *PLoS One*, **9**: e115423.
- RAMIREZ MS, TOLMASKY ME (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. **13**: 151–171.
- RAMOS-MORALES F (2012). Impact of *Salmonella enterica* type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. *ISRN Cell Biology*, **1**: 36.
- RANDALL LP, COOLES SW, OSBORN MK, PIDDOCK LJ, WOODWARD MJ (2004). Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother*, **53**: 208–216.
- RAO S, LINKE L, DOSTER E, HYATT D, BURGESS BA, MAGNUSON R, PABILONIA KL, MORLEY PS (2020). Genomic diversity of class I integrons from antimicrobial resistant strains of *Salmonella* Typhimurium isolated from livestock, poultry and humans. *PLoS One*, **15**: e0243477.
- ROBERTS MC, SCHWARZ S (2016). Tetracycline and phenicol resistance genes and mechanisms: Importance for agriculture, the environment, and humans. *J Environ Qual*, **45**: 576–592.
- RYAN MP, O'DWYER J, ADLEY CC (2017). Evaluation of the complex nomenclature of the clinically and veterinary significant pathogen *Salmonella*. *Biomed Res Int*, **2017**: 3782182.
- SCHWARZ S, CHASLUS-DANCLA E (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res*, **32**: 201–225.
- SCHWARZ S, SHEN J, KADLEC K, WANG Y, BRENNER MICHAEL G, FEßLER AT, VESTER B (2016). Lincosamides, streptogramins, phenicols, and pleuromutilins: Mode of action and mechanisms of resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **6**: a027037.
- TASMIN R, HASAN NA, GRIM CJ, GRANT A, CHOI SY, ALAM MS, BELL R, CAVANAUGH C, BALAN KV, BABU US, PARVEEN S (2017). Genotypic and phenotypic characterization of multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Kentucky strains recovered from chicken carcasses. *PLoS One*, **12**: e0176938.
- TSOLIS RM, ADAMS LG, FICHT TA, BÄUMLER AJ (1999). Contribution of *Salmonella* Typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect Immun*, **67**: 4879–4885.
- TURKI Y, MEHRI I, CHERIF H, NAJJARI A, AISSA RB, HASSEN A, OUZARI H (2012). Epidemiology and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from Tunisia: The new emergent multi-drug resistant serotype. *Food Res Intern*, **45**: 925-930
- VELASQUEZ MORENO, CARMEN G (2016). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolated from poultry farms. Open Access Theses. 837.
- WALKER RA, LINDSAY E, WOODWARD MJ, WARD LR, THRELFALL EJ (2001). Variation in clonality and antibiotic-resistance genes among multiresistant *Salmonella*

enterica serotype Typhimurium phage-type U302 (MR U302) from humans, animals, and foods. *Microb Drug Resist*, **7**: 13–21.

WANG X, BISWAS S, PAUDYAL N, PAN H, LI X, FANG W, YUE M (2019). Antibiotic resistance in *Salmonella* Typhimurium isolates recovered from the food chain through national antimicrobial resistance monitoring system between 1996 and 2016. *Front Microbiol*, **10**: 985.

WEBBER B, BORGES KA, FURIAN TQ, RIZZO NN, TONDO EC, SANTOS L, RODRIGUES LB, NASCIMENTO V (2019). Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken carcasses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **61**: e36.

XIONG Z, WANG S, HUANG Y, GAO Y, SHEN H, CHEN Z, BAI J, ZHAN Z, WEN J, LIAO M, ZHANG J (2020). Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky ST198 in broiler chicken supply chain and patients, China, 2010-2016. *Microorganisms*, **8**: 140.

ZHANG S, SANTOS RL, TSOLIS RM, STENDER S, HARDT WD, BÄUMLER AJ, ADAMS LG (2002). The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun*, **70**: 3843–3855.

ZISHIRI OT, MKHIZE N, MUKARATIRWA S (2016). Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens and human clinical isolates from South Africa and Brazil. *Onderstepoort J Vet Res*, **83**: a1067.