

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ *Salmonella* SUŞLARININ
TANISI VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Neslihan TAŞKALE

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2010

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ *Salmonella* SUŞLARININ TANISI VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Neslihan TAŞKALE

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışmada, Türkiyenin değişik bölgelerinden alınan toplam 217 gıda örneğinde *Salmonella* sp. varlığı, uluslararası standartlar ofisinin önerdiği yöntem (ISO6972:2002) kullanılarak araştırılmıştır. API 20E testleri sonucunda toplam 41 izolat *Salmonella* sp. olarak tanımlanmıştır. *Salmonella* suşları, rastgele çoğaltılan polimorfik DNA bölgelerine göre 18 alt gruba ayrılmıştır. Plazmid analizleri sonucu 41 suştan yalnız 10 suşun sayıları 1-5, büyüklükleri 3.0-400 kb arasında değişen plazmidleri içerdiği saptanmıştır. *Salmonella* suşlarının antibiyotik dirençlilik profilleri disk difüzyon ve kritik dilüsyon testleri kullanılarak belirlenmiştir. Tüm suşlarda en yüksek dirençlilik düzeyleri kanamisin (R>512 µg/mL) ve nalidiksik asit (R>512 µg/mL) için tespit edilmiştir. Plazmid giderme çalışmaları, bu suşlarda antibiyotik dirençlilik ile plazmid içerikleri arasında bir ilişkinin bulunmadığına işaret etmiştir. Bu bulgular konjugasyon testleri ile de doğrulanmıştır. Diğer yandan 36 *Salmonella* suşunun sınıf I integronlara sahip olduğu saptanmıştır.

Ocak 2010, 85 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, çoklu ilaç dirençlilik, genetik karakterizasyon

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MULTI DRUG RESISTANT *Salmonella* STRAINS

Neslihan TAŞKALE

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

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, a total of 217 food samples obtained from different regions in Turkey were analysed for presence of *Salmonella* sp. according to the method proposed by international standards office (ISO6972:2002). Totally 41 isolates were identified as *Salmonella* sp. by API 20E tests. *Salmonella* strains were differentiated as 18 subgroups based on their random amplified polymorphic DNA patterns. Plasmid analyses showed that only 10 *Salmonella* strains of totally 41 were harboured 1-5 plasmids with molecular sizes 3.0-400 kb. Antibiotic resistance pattern of the *Salmonella* strains were revealed by disc diffusion and critical dilution tests. The highest resistance levels were determined against kanamycin ($R > 512 \mu\text{g/mL}$) and nalidixic acid ($R > 512 \mu\text{g/mL}$) for all strains. End of plasmid curing assays, it was determined that there is no relationship between plasmids and antibiotic resistance phenotypes in these strains. This findings were also confirmed with conjugation experiments. On the other hand 36 *Salmonella* strains were found to carry class I integrons.

January 2010, 85 pages

Key Words: *Salmonella*, multi drug resistance, genetic characterization

TEŞEKKÜR

Maddi ve manevi her türlü desteğini sunarak bana gerçek bilim dünyasının kapısını açtığı için; danışman hocam sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), çalışmamda yardımlarını esirgemedikleri için; Dr. Dilek AVŞAROğLU'na, Arş. Gör. Nefise AKKOÇ'a ve laboratuvar arkadaşlarıma,

Beni hayata tutundurdıkları ve tezimin her anında sabırla yanımda oldukları için; babaanneme ve abime, manevi desteğini bana her an hissettirdirdiği için; canım arkadaşım Dilek BETEŐ'e, tezim boyunca yardımını ve desteğini esirgemeyerek beni yalnız bırakmadığı için; biricik dert ortağım Osman KARATUğ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Neslihan TAŞKALE

Ankara, Ocak 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1 <i>Salmonella</i> Cinsinin Genel Özellikleri	3
2.2 <i>Salmonella</i> Patojenitesinin Moleküler Esasları	5
2.3 Bakteriyel Patojenlerde Antimikrobiyel Dirençlilik ve Bu Özelliğin Doğal Çevrelerdeki Fonksiyonu	8
2.4 <i>Salmonella</i> 'da Antimikrobiyel Direnç Gelişimi	10
2.5 <i>Salmonella</i> 'da Yatay Gen Transferi Elemanları ve Antimikrobiyel Direnç Gelişimi Üzerine Etkileri	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1 Materyal	17
3.1.1 Bakteri izolatları	17
3.1.2 Antibiyotikler	23
3.1.3 Besiyerleri	25
3.1.4 Çözeltiler	29
3.1.5 Primerler	32
3.2 Yöntem.....	33
3.2.1 Bakteri izolasyonu	33
3.2.2 Plazmid analizleri	38
3.2.2.1 Plazmid izolasyonu	38
3.2.2.2 Agoroz jel elektroforezi ve plazmid görüntülenmesi	38
3.2.2.3 Plazmid büyüklüklerinin saptanması	39
3.2.3 Antimikrobiyel duyarlılığın belirlenmesi	40

3.2.3.1 Disk difüzyon metodu	40
3.2.3.2 Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) metodu	40
3.2.4 Genomik DNA izolasyonu	41
3.2.5 İntegron analizleri	42
3.2.5.1 Primer dizaynı ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	42
3.2.5.2 İntegron bantlarının tanımlanması ve DNA dizi analizleri	44
3.2.6 Klasik mutasyon ve konjugasyon denemeleri	44
3.2.7 Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD- PZR) analizleri	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	47
4.1 Suşların İzolasyonu ve Biyokimyasal Karakterizasyonu	47
4.2 Suşların Plazmid Profilleri	50
4.3 Suşların Antibiyotik Duyarlılıkları	54
4.4 <i>Salmonella</i> Suşlarında Sınıf I İntegron Analizleri	61
4.5 Klasik Mutasyon Testleri ve Konjugasyon	66
4.6 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Analizleri	66
5. SONUÇ	73
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	85

SİMGELER DİZİNİ

AMC	Amoksisilin/klavulanik asit
AMP	Ampisilin
Bç	Baz çifti
BPW	Tamponlanmış Peptonlu Su
BSA	Bizmut Sülfid Agar
°C	Santigrat
CHL	Kloramfenikol
CIP	Siprofloksasin
CLSI	Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EFT	Seftiofur
FFC	Florfenikol
g	Gram
GEN	Gentamisin
KAN	Kanamisin
Kb	Kilo baz
L	Litre
LB	Luria Bertani
M	Molar
Md	Megadalton
µg	Mikrogram
mg	Miligram
MHB	Müller Hinton Broth
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mL	Mililitre

mM	milimolar
MKTTn	Müller-Kauffmann-Tetrasyonat/novobiosin
NAL	Nalidiksik asit
NEO	Neomisin
ORF	Açık okuma kalıbı
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RVS	Rappaport-Vassiliadis
S.	<i>Salmonella</i>
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SGI	<i>Salmonella</i> Genomik Adası
SPE	Spektinomisin
SPI	<i>Salmonella</i> Patojenite Adası
STR	Streptomisin
SUL	Sulfonamid
SXT	Trimetoprim/sulfametoksazol
TAE	Tris Asetat Etilen Diamin Tetraasetik Asit
TE	Tris Etilen Diamin Tetraasetik Asit
TET	Tetrasiklin
TMP	Trimetoprim
XLD	Ksiloz Lizin Deoksikolat
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 <i>Salmonella</i> izolasyonunun şematik sunumu	33
Şekil 3.2 API 20E test kitindeki tipik <i>Salmonella</i> reaksiyonları	35
Şekil 3.3 Sınıf I integronların moleküler organizasyonu	42
Şekil 4.1 <i>Salmonella</i> suşlarının plazmid içerikleri	51
Şekil 4.2 <i>Salmonella</i> suşlarının plazmid içerikleri	52
Şekil 4.3 <i>Salmonella</i> suşlarının plazmid içerikleri	53
Şekil 4.4 Disk difüzyon yöntemi	54
Şekil 4.5 <i>Salmonella</i> suşlarında Sınıf I integronların analizi	62
Şekil 4.6 <i>Salmonella</i> suşlarında Sınıf I integronların analizi	63
Şekil 4.7 <i>Salmonella</i> suşlarında Sınıf I integronların analizi	64
Şekil 4.8 <i>Salmonella</i> suşlarında Sınıf I integronların analizi	65
Şekil 4.9 Suşlarda P1254 primeri kullanılarak elde edilen RAPD- PZR bant profilleri	69
Şekil 4.10 Suşlarda P1283 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PZR bant profilleri	70
Şekil 4.11 RAPD-PZR amplifikasyon sonucu elde edilen verilere göre izolatlar arasındaki genetik benzerliği gösteren dendogram	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 <i>Salmonella</i> suşlarının izolasyonunda kullanılan izolasyon materyalleri	17
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları	23
Çizelge 3.3 Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) kuyucuk test planı ve analizlerinde kullanılan antibiyotik konsantrasyonları	24
Çizelge 3.4 İntegron ve RAPD analizlerinde kullanılan primerler ve sekansları	32
Çizelge 3.5 API 20E test kiti içeriğindeki biyokimyasal testler ve tipik <i>Salmonella</i> reaksiyonları	36
Çizelge 4.1 ISO 6579 : 2002 yöntemi ile izole edilen suşların biyokimyasal analiz sonuçları	48
Çizelge 4.2 <i>Salmonella</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıkları	57
Çizelge 4.3 <i>Salmonella</i> suşlarında antibiyotik dirençlilik düzeyleri	59
Çizelge 4.4 <i>Salmonella</i> suşlarında P1254 ve P1283 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RAPD-PZR amplifikasyonu sonrasında elde edilen RAPD-PZR profilleri	72

1. GİRİŞ

Patojenik *Salmonella* suşları insan ve diğer birçok memeli türünde hastalık etkenidir. *Salmonella* serotipleri gastroenteritden, tifo, bakteremi, fokal enfeksiyonlar ve yaşam boyu taşıyıcı duruma kadar geniş bir hastalık spektrumuna yol açabilmektedir. Tifoid olmayan *Salmonella* enfeksiyonları, ülkemizde ve dünya genelinde en önemli gıda enfeksiyonlarından biridir. Hastalık şiddetli karın ağrısı, ateş, diyare, bulantı ve bazen kusma ile kendini göstermekte, çocuklarda ve yaşlılarda aşırı su kaybına bağlı olarak hayati tehlike yaratmaktadır.

Bügüne kadar *Salmonella* cinsine ait 2500'ü aşkın serotip tanımlanmıştır. Bunlar arasında *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* geniş konakçı spektrumu nedeniyle hem insanlarda hem de hayvanlarda salmonelloza neden olan en yaygın serotipler olarak belirlenmiştir. Ancak başta beslenme ve hijyen koşulları olmak üzere bölgesel ve toplumsal refah düzeyi ile ilgili olarak değişen koşullar epidemik tiplerin giderek farklılaşmasına, bazılarının ise pandemiye kadar uzanan bir yaygınlık kazanmasına yol açmaktadır. Salmonellozun kontrolü ve tedavisinde bu dominant tiplerin moleküler düzeyde tanısı, uygun stratejilerin belirlenmesi açısından kritik bir önem taşımaktadır.

Salmonellozun kontrolü ve tedavisinde karşılaşılan en ciddi sorun giderek artan ilaç dirençlilik özelliği ve buna paralel olarak gelişen çoklu ilaç dirençli epidemik tiplerdir. Zira özellikle bakteriyel patojenlerde, tedavide yaygın antimikrobiyel ajan kullanımına bağlı olarak direnç gelişimi teşvik edilmekte ve bu durum salgınların kontrolünü zorlaştırmaktadır. Gerek mutasyonlar ve gerekse de yatay gen transferi ile antimikrobiyel ajanlara karşı direnç kazanan bakteriler, ortamda bulunan antibiyotikten etkilenmeksizin gelişmekte ve popülasyonda baskın hale gelmektedir. Özellikle plazmidler, transpozonlar ve integronlar aracılığı ile meydana gelen yatay gen transferi, kazanılan antibiyotik dirençliliğin hızla yayılmasına neden olmaktadır. Bu hareketli DNA elementleri arasında yer alan integronlar birden fazla antibiyotik

direnç gen kasetini yapısında bulundurabilmeleri sebebiyle son yıllarda antibiyotik dirençlilik çalışmalarının odak noktasını oluşturmuştur.

Çalışmamızda, Ankara başta olmak üzere, Türkiye'nin değişik bölgelerindeki çeşitli market ve üreticilerden alınan tavuk eti ve kırmızı et örneklerinde *Salmonella* varlığı araştırılmış, elde edilen suşlar biyokimyasal testlerle doğrulanmıştır. *Salmonella* tanısı konulan ve kültür koleksiyonuna alınan örneklerde antimikrobiyel ajanlara karşı duyarlılık düzeyleri belirlenmiştir. Fenotipik olarak gözlenen antibiyotik dirençlilik özelliğinin yatay gen transferi yolu ile aktarılıp aktarılamadığı konjugasyon deneyleri ile kontrol edilmiştir. Daha sonra suşlar integron varlığı açısından incelenmiş ve tespit edilen integronlar moleküler olarak karakterize edilmiştir. Son aşamada ise gıda örneklerinden izole edilen *Salmonella* suşlarının klonal yayılma karakteristikleri rastgele çoğaltılan fragment boy polimorfizmi (RAPD-PZR) tekniği ile incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri

Salmonella insanlarda gastroenterit ve tifo etkenidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından açıklanan son istatistiklerde, dünyada yaklaşık 18 milyon tifo (% 3.6 ölüm oranı) ve 1.5 milyar gastroenterit vakası (% 0.23 ölüm oranı) bildirilmiştir. Özellikle moleküler genetik ve ileri biyokimyasal teknikler kullanılarak elde edilen veriler ışığında *Salmonella* cinsi için; *S. enterica* ve *S. bongori* olarak adlandırılan iki tür önerilmiştir. *S. enterica* daha sonra; *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *houtaenae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *indica* ve *S. enterica* subsp. *arizonae* olarak adlandırılan altı alt türe ayrılmıştır. Serotipler (serovaryete) ile türlerin karıştırılmasını engellemek ve adlandırmayı sadeleştirmek için, serotip esas alındığında alt tür adının gözardı edilmesi (*S. enterica* subsp. I serotype Typhimurium yerine, *S. enterica* serotype Typhimurium gibi) ve kısa form (*S. Typhimurium* gibi) kullanımı önerilmiştir. *S. enterica* sıcak kanlı hayvanları enfekte ederek sistemik ya da sistemik olmayan hastalıklara yol açar. *S. bongori* serotipleri ise soğuk kanlı hayvanlara adapte olmuştur. Bugüne kadar yürütülen serotiplendirme çalışmaları sonucunda, *S. enterica*'ya ait 2500'ün üzerinde serotip saptanmıştır. Belirlenen serotiplerin büyük bir çoğunluğunda, patojenitenin moleküler mekanizması üzerine çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (Tindall vd. 2005, Gibson vd. 2006). Salmonellozun sıcak kanlı hayvanlarda oluşturduğu sistemik ya da sistemik olmayan enfeksiyonların moleküler düzeyde araştırılmasında *S. Typhimurium* model organizma olarak kullanılmaktadır.

Salmonella, *Enterobacteriaceae* familyasına ait Gram-negatif, spor oluşturmayan, fakültatif anaerob ve çomak formunda bakterileri içeren bir cinstir. Çomak şeklindeki hücreler yaklaşık 0.5-1.0 (en) x 1-5 (boy) µm boyutlarındadır. *Salmonella* üyelerinin büyük bir çoğunluğu flagella içerir ve hareketlidir. Laktozu fermente etme yeteneği yoktur. Gelişme sıcaklığı optimumları 37 °C'dir. *Salmonella* üyeleri düşük pH, düşük su aktivitesi ya da yüksek yağ içeriğine sahip gıdalarda sıcaklığa dirençlidir. Gıdaların dondurularak depolanmasında, özellikle donma sıcaklığı civarında canlılık düşer.

Optimum pH değeri 6.5-7.5 civarındadır. Ancak pH 4.5-9.0 arasında da gelişebilirler. *Salmonella* esas olarak insan ve hayvanların bağırsak sisteminde bulunan bir patojendir. Bazı *Salmonella* üyeleri konağa adapte olmuş ya da konak spesifiktir. Bunun en tipik örneği *S. Typhi*'dir. Konak spesifik diğer serovaryeteler: Paratyphi, Sendai (insan) , Pullorum/Gallinarum (kanatlılar), Dublin (sığırlar), Choleraesuis (domuzlar, ancak insanları da enfekte eder), Typhimurium ve Enteritidis (insan, sığır, kanatlılar, koyun, domuz, at ve yabani kemirgenlerde ana hastalık etmenleridir) sayılabilir (Singleton ve Sainsbury 1996, Wain vd. 2005).

Salmonella serotiplerinin büyük çoğunluğu geniş konak dizgesi içerir. Lağım ya da dışkı örneklerindeki *Salmonella*'lar, uygun koşullar altında suda ya da toprakta haftalarca yaşayabilirler. Suların rutin klorlanması, pastörizasyon ya da birçok genel dezenfeksiyon ajanı kullanılarak *Salmonella*'lar öldürülebilir (Fitzgerald vd. 2003, Wain vd. 2005). Ancak, sağlıklı çiftlik hayvanları ve evcil kanatlılarda da *S. Typhimurium* kolonize olmakta ve bu yolla hayvandan insana geçiş gerçekleşebilmektedir. *Salmonella* tüm dünyada gıdalar aracılığı ile enfeksiyona yol açan en önemli etmendir. Bu vakaların % 26'sının etmeni *S. Typhimurium* olarak belirlenmiştir. *Salmonella*'nın en çok bulunduğu gıda maddelerinin başında hayvansal ürünler gelmektedir. Bunlar arasında kümes hayvanları eti, kıyma, sosis, yumurta ürünleri, su ürünleri, dondurma, süt tozu ve krema en yüksek risk içeren gıdalardır. Ayrıca çeşitli soslar ve salatalar, pudingler ve diğer süt ürünleri de *Salmonella* riski taşıyan gıdalar arasında yer almaktadır. Hammadde işleme teknolojisi, depolama ve pazarlama koşulları *Salmonella* riskinin büyümesine neden olmaktadır. *Salmonella*'nın yol açtığı gastroenteritin şiddeti konağın yaşına bağlıdır. Yenidoğanlarda, bebeklerde ve yaşlılarda daha şiddetlidir (Voetsch vd. 2004, Suar vd. 2006).

S. Typhimurium kromozomu, yaklaşık 4×10^6 baz çifti uzunlukta olan tek bir çevrimsel DNA molekülüdür. Çoğu *Salmonella enterica* üyesi bir virülans plazmid ve lizogenik faj içerir. *S. enterica* serovar Typhimurium ve serovar Typhi'nin genom dizi analizleri tamamlanmıştır (McClelland vd. 2001, Srivatsan ve Wang 2008).

2.2 *Salmonella* Patojenitesinin Moleküler Esasları

Daha önce de ifade edildiği gibi, salmonellozun moleküler mekanizmasının anlaşılmasına yönelik çalışmalarda kullanılan model bakteri *S. Typhimurium*'dur. En yaygın kullanılan konak ise, fare model sistemleridir. Farelerde özellikle tifonun örneklenmesi, sistemi kullanışlı kılan ana unsurdur. Ancak değişik konaklarda serovaryeteler için *Salmonella* patojenitesinde farklı yanıtlar alınması, hastalığın moleküler mekanizması üzerinde yürütülen çalışmalarda ciddi sorunlar yaratmaktadır. Bugüne kadar yürütülen çalışmalardan elde edilen veriler ışığında sistemik ve sistemik olmayan *Salmonella* enfeksiyonunun genel moleküler mekanizmaları aydınlatılmıştır. *Salmonella* enfeksiyonu, primatlar ve insanlarda 10^5 ya da daha fazla bakterinin gıdalar yolu ile alımı sonucu başlar. *Salmonella*'lar ilk olarak ince bağırsağın bir bölümünü teşkil eden ve ileoçekal valveye yakın bölgede yer alan ileum'a, bakteriyel adhezinler aracılığı ile tutunur ve mukozal hücreler üzerinde kolonize olur. Bu tutunma ve kolonizasyonu ökaryotik hücrelerin işgali (invazyon) takip eder. Hücre işgalinde ilk aşama, Peyer's Patches (ince barsakta ve esas olarak da ileumda -incebağırsağın son kısmında- yer alan, lenfatik doku plakları) bölgesindeki mikrofold (M) hücrelerinin ve enterositlerin içerisine giriştir (Vazquez-Torres vd. 1999, Ohl ve Miller 2001).

Hastaların dışkı örneklerinde lökositlerin varlığı ya da yokluğuna bağlı olarak yangılı diyare ya da sıvı kaybına yol açan diyare tanımlanmaktadır. Dışkı örneklerinde laktoferrin ya da nötrofillerin bulunması yangılı diyareye, dışkıda lökositlerin bulunması halinde ise sıvı kaybına neden olan diyareye karar verilmektedir. Sıvı kaybına yol açan diyareye; *Vibrio cholerae*, enterotoksijenik *Escherichia coli*, enteropatojenik *E. coli* ve enterohemorrajik *E. coli* de neden olmaktadır. Bu bakteriler genellikle invazif değildir ve ince bağırsak mukozasında çok düşük düzeyde yangıya yol açarlar. Buna karşın yangılı diyareye neden olan patojenler (enteroinvazif *E. coli*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.* ve tifoid olmayan *Salmonella* serotipleri gibi) bağırsak epitelini işgal ederler ve bağırsakta yoğun nötrofil akışına neden olurlar (Bolton vd. 2000, Helms vd. 2005).

S. Typhimurium tarafından indüklenen gastroenteritin mekanizması üzerinde yürütülen son çalışmalarda, nötrofil sızması (akışı) ile karakterize edilen yangılı diyarenin bakteriyel işgal ve onu takip eden doğal bağışıklık yanıtından ileri geldiği belirlenmiştir. Enfeksiyon esnasında *S. Typhimurium*, *Salmonella* patojenite adası 1 (SPI1)'de kodlanan tip III salgı sistemi (T3SS-1) aracılığı ile efektör proteinlerini enjekte ederek, enterositlere ve M hücrelerine girer. Altı efektör, Rho ailesi GTPazlar için iki guanin nukleotit değişim faktörü (SopE ve SopE2), inozitol fosfat fosfataz (SopB, SigD olarak da anılmaktadır), aktin-bağlanma proteinleri (SipA ve SipC) ve aktiviteleri bilinmeyen efektörler (SopA ve SopD) beraber çalışmak suretiyle bakterinin bağırsak epitel hücrelerine girişini sağlamakta ve bağırsak mukozasında yangı oluşumunu tetiklemektedir (Unsworth vd. 2004, Raffatellu vd. 2005).

Salmonella'nın ince bağırsak epitel hücrelerine tutunması, lümeni kaplayan mukoz tabakadan geçme yeteneği sayesinde gerçekleşir. Hayvan model sistemleri ile yürütülen çalışmalarda, *Salmonella*'nın tutunma ve hücre işgali için öncelikli olarak bağırsak epitelinde bulunan M hücrelerini tercih ettiği saptanmıştır. Bu aşamada ayrıca fagositik olmayan enterosit hücrelerinin de kullanıldığı belirlenmiştir. M hücreleri pinositoz ile patojenleri ve antijenleri içlerine almakta ve Peyer's Patches epitelinin altında bulunan lenfoid hücrelere taşımaktadır. Bu aktivite mukozal bağışıklığın oluşturulması açısından önemlidir. *Salmonella*'nın ökaryotik hücre işgalinde fagositoz yolu da kullanılmaktadır. Bu yolla özellikle CD18 antijenini üreten fagositlerin içerisine girdikleri tespit edilmiştir (Baumler vd. 1996, Vazquez-Torres vd. 1999, Zhou vd. 2001, Voetsch vd. 2004, Suar vd. 2006).

Salmonella serotipleri epitellerin salgı yanıtı oluşturmasını tetiklemekte ve nötrofillerin toplanarak bağırsak lümenine (boşluğa) sızmasına yol açmaktadır. İn-vitro koşullarda yürütülen doku kültürü çalışmalarında nötrofil birikimi için, bakteri ve epitel hücrelerde çeşitli sitokinlerin üretimi ile ilişkili proteinlerin sentezlenmesinin zorunlu olduğu saptanmıştır. Özellikle epitel hücreleri tarafından üretilen kemokin interlökin-8 aracılığı ile mukozal boşlukta nötrofil birikiminin teşvik edildiği tespit edilmiştir (Lee vd. 2000, Ohl ve Miller 2001, Raffatellu vd. 2006). *Salmonella*

bağırsak epitelyum hücrelerini geçtikten sonra, bir diğer bağışıklık sistemi elemanı olan ve mukozal boşlukta yer alan makrofajlar içine girmektedir. Sistemik enfeksiyona yol açan *Salmonella* serotipleri makropinositoz yolu ile makrofaj içine girmekte ve fagositin antibakteriyel fonksiyonlarından kurtulmasını sağlayan virülans mekanizmaları aktive etmektedir. Enfekte olmuş fagositlerin retikuloendotelial sistemde bulunan diğer organlara göç etmesi bakterinin konak içinde yayılmasını kolaylaştırmaktadır (Ohl ve Miller 2001, Tükel vd. 2006).

S. Typhimurium ile insan hücreleri arasındaki interaksiyon, makrofaj benzeri hücreler (THP-1 veya U937 hücreleri), makrofajlardan türeyen monosit hücreleri veya birincil nötrofillerin, söz konusu bakteri ile enfekte edilmesi sonucu modellenmiştir (Bolton vd. 2000, Helms vd. 2005). Son zamanlarda ise insan vücudundan alınan doku örnekleri *S. Typhimurium* ile insan bağırsak mukozası arasındaki ilişkinin tanımlanması amacı ile kullanılmaktadır. İnsan epitel hücrelerinin kullanıldığı bu çalışmalarda; SopB tarafından üretilen fosfatidilinozitol fosfatazlar ile SopE-SopE2 tarafından üretilen RhoGTPaz'ların beraber çalışarak *S. Typhimurium* işgali için gerekli olan WASp/Scar proteinlerini aktive ettiği saptanmıştır (Unsworth vd. 2004). Aktive edilen WASp/Scar proteinleri Arp2/3 kompleksini etkileyerek aktin filamentlerinin yeni dallar oluşturmasını sağlamaktadır (Mullins vd. 1998). SipA proteini bu aşamada aktin polimerizasyonu için gerekli olan kritik dal konsantrasyon miktarını düşürerek, yeni dalların oluşumunu hızlandırmakta ve aynı zamanda ADF/kofilin tarafından yönetilen aktin çözülmelerini engellemektedir. Yeni aktin dallarının hızla büyümesi membranı dışarı doğru itmekte ve membran kabartılarının oluşmasına, makropinositoz ile bakterinin içeri alınmasına öncülük etmektedir (Helms vd. 2005).

Salmonella enfeksiyonunda gerçek doku hasarı, nötrofiller aracılığı ile; proteazların, miyeloperoksidazların ve NADPH oksidazların salgılanması sonucu gerçekleşmektedir. Epitelin bariyer fonksiyonunu kaybetmesinden sonra, kan damarlarından çok miktarda damar sıvısı kaybı meydana gelir ve böylece kandan bağırsak lümenine yüksek oranda sıvı akışı gerçekleşir. Nadir olmakla birlikte,

bakteriler koruyucu makrofaj yanıtı oluşmadan önce kan dolaşımına dahil olabilir ve bu durumda da septik şok ve ölüm görülür (Raffatellu vd. 2006, Tükel vd. 2006).

Bağırsak mukozasında canlı kalabilmek için *S. Typhimurium*'un tercih ettiği niş, makrofajların içerisidir. Makrofajların içerisinde canlı kalmak için ise, SPI2 tarafından kodlanan ikinci bir tipIII salgı sistemine (T3SS–2) gereksinim vardır. Bu bakterilerde T3SS-2'nin inaktivasyonu sonucu, buzağılarda ve streptomisin muamele edilmiş farelerde *S. Typhimurium*'un ağızdan enfeksiyonunu takip eden 24 saat içerisinde bağırsak mukozasında nötrofil sızmasının önemli ölçüde düştüğü belirlenmiştir. Yangı reaksiyonunun, hücre içi bir adaptör protein olan ve Toll-benzeri reseptörlerden (TLRs) alınan sinyalleri birleştiren MyD88'e bağımlı olması, lamina propria'da T3SS–2 ortamlı bakteriyel yaşamın, patojen tanıyan algılayıcılar tarafından sürekli izlendiğine işaret etmektedir (Raffatellu vd. 2005).

2.3 Bakteriyel Patojenlerde Antimikrobiyel Dirençlilik ve Bu Özelliğin Doğal Çevrelerdeki Fonksiyonu

Bakteriyel patojenlerde, daha önce duyarlı oldukları antimikrobiyel ajanlara karşı dirençlilik gelişimi hızla artmaktadır. Bu artan dirençlilik insan ve hayvan sağlığında, özellikle enfeksiyon hastalıkların kontrolü ve tedavisinde ciddi riskler doğurmaktadır (Levy 1998, Levy ve Marshall 2004). Antimikrobiyel direnç, evrimsel sürecin tanımlanmasında gerçek zamanlı olarak çalışılabilen birkaç sınırlı örnekten biri olması nedeniyle de biyolojik bilimlerden büyük önem taşımaktadır. Bu anlamda, antimikrobiyel dirençliliğin iki temel mekanizması olan mutasyonlar ve yatay gen transferleri, yoğun çalışmaların odağı haline gelmiştir. Antimikrobiyel dirençliliğin analizi, stres ortamlarına bakteriyel adaptasyonun tipik bir örneğini teşkil etmektedir (Hamilton-Miller 2004).

Doğal ekosistemlerde antimikrobiyel ajanlara karşı dirençlilik ilk kez, mikrobiyel antagonizm esas alınarak çalışılmaya başlanmıştır. Bu doğrultuda yürütülen çalışmalarda, patojenlerin doğal ekosistemlerde antibiyotik dirençlilik özelliğini kazanmasının büyük bir olasılıkla, yatay gen transferi yolu ile gerçekleştiği öne

sürülmüştür. Halen antibiyotik dirençliliğin gelişiminde en güçlü kanıtlardan biri, tür içi ya da türler arası yatay gen transferi mekanizmalarının tanımlanmasıdır (Haas ve Défago 2005). Özellikle antimikrobiyellerin yaygın olarak üretildiği ya da kullanımı sonucu biriktiği ekosistemlerde oluşan seçici baskı, dirençlilik gelişiminde mutasyon ve lateral gen transferi etkisini artırmaktadır. Ancak son çalışmalar, bu sürecin söz konusu mekanizmalar yanında, daha karmaşık hücrel olaylardan etkilendiğini de göstermiştir. Bu mekanizmalar daha çok hücrel stres yanıt sistemleri ile ilgili genetik ve metabolik düzenlemelerdir (Linares vd. 2006). Örneğin; bir metaboliti modifiye eden enzim, benzer yapıdaki bir antibiyotiği de modifiye ederek dirençlilik sağlayabilmektedir. Bu durum kromozomal 2'-N-asetiltransferaz enziminde tipiktir. *Providencia stuartii*'de söz konusu enzim hem bakteriyel peptidoglikan yapısını, hem de gentamisinini modifiye edebilmektedir. Yine beta laktamaz enzimlerinin primer substratı peptidoglikan öncüleridir ve bu sayede ana fonksiyonlarını (peptidoglikan sentezi) gerçekleştirmektedirler. Ancak söz konusu enzimlerin beta-laktam grubu antibiyotiklere bağlanarak onların inaktivasyonunu da gerçekleştirdiği bilinmektedir (Lubelski vd. 2007, Gerber vd. 2008). Özetle; mutasyonel ve yatay gen transferi yanında, antimikrobiyel ajanların değişik transkripsiyonel sinyalleri teşvik ederek özgül yanıtlar oluşturma yeteneği de dirençlilik gelişiminde rol alan önemli mekanizmalardan biridir. Bu süreç hücre sinyal trafiğini değiştirmesi özelliğinden dolayı çok karmaşıktır (Gerber vd. 2008).

Antimikrobiyel ajanlara dirençlilik, kazanılmış ya da içsel (intrinsik) olmak üzere temel iki tip içerisinde değerlendirilmektedir. Bakteriyel populasyonlar, düşük mutasyon oranları içermektedir. Ayrıca DNA hata tamir mekanizmaları doğal mutasyon oranını 1000 kez düşürme yeteneğindedir. Ancak bazı araştırmacılar bakteriyel alt populasyonlarda mutasyon oranının normalden çok yüksek olduğunu saptamıştır. Bu hipermutasyonların stres altındaki populasyonlarda gerçekleştiğinin tanımlanması, antimikrobiyel direnç gelişiminin moleküler esasının açıklanmasında temel hareket noktasını teşkil etmektedir. Söz konusu hipermutatörlerin en önemlilerinden biri enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ve hayvan beslemede yaygın bir şekilde kullanılan antibiyotiklerdir (Macia vd. 2005, Pigliucci 2008). Mutasyonların yönlendirilmesi ayrıca direnç gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır.

Mutasyonların yönlendirilmesinde en sık görülen mekanizmalar, gen amplifikasyonu ve mutasyona sıcak bölgelerin oluşumudur (Fajardo vd. 2008). Mutasyon sıklığını artıran bir diğer mekanizma ise SOS yanıt tipinde DNA tamir sistemleridir. Bakteriyel DNA polimeraz IV'ün yönlendirdiği bu hata eğilimli tamir sistemleri, adaptif mutasyonların temel kaynaklarından birini teşkil etmektedir. Global regülatörleri etkileyen çevresel sinyallerin (antibiyotik stresi gibi) bakteriyel DNA polimeraz IV'ün transkripsiyonunu tetikleyerek mutasyon oranını teşvik ettiği belirlenmiştir (Gerber vd. 2008).

Özellikle çevresel sinyallerin bakteriyel regülasyonu ve mutasyon oranlarını değiştirdiğinin tespiti, bakteriyel antimikrobiyel direncin gelişiminin açıklanmasına yeni boyutlar kazandırmıştır. Bugün kinolonlara ve beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin esasının SOS yanıt tipinde tamir mekanizmalarının tetiklenmesinden kaynaklandığı bilinmektedir (Martinez vd. 2009).

2.4 *Salmonella*'da Antimikrobiyel Direnç Gelişimi

Salmonella serotiplerinde antimikrobiyel ajanlara direnç; klonal yayılma ve yatay gen transferi olmak üzere iki temel mekanizma ile gerçekleşmektedir. Antimikrobiyel ajanların yarattığı seçici baskı altında bu mekanizmaların birlikte etkileri sonucu 1970'li yıllardan itibaren birden fazla ajana karşı dirençli (çoklu ilaç dirençli) *Salmonella* suşlarında tüm dünyada görülen hızlı artış, salmonellozun kontrolü ve tedavisinde ciddi sorunlar yaratmaya başlamıştır. *Salmonella*'da ilk dönemlerde tanımlanan kloramfenikol, kanamisin, streptomisin, sulfonamid ve tetrasiklin dirençlilik, kinolonlar ve 3. jenerasyon sefalosporinlere karşı da kazanılarak hızlı bir gelişme göstermiştir. İlk çoklu ilaç fenotipi *S. Typhi*'de kloramfenikol, ampisilin ve ko-trimoksazole (trimetoprim-sulfametoksazole) karşı tanımlanmıştır. Antibiyotik kullanımındaki değişikliğin yönlendirmesiyle, *S. Typhi*'de çoklu ilaç dirençliliği (MDR) fenotipi, her direnç tipi birbirinden bağımsız ve aşamalı olarak ortaya çıkmıştır. Kloramfenikol ve ampisilin kullanımı daha eski olmakla birlikte ko-trimoksazol tifo ateşinin tedavisi için ilk defa 1981 yılında önerilmiştir. *S. Typhi*'nin çoklu ilaç dirençliliğinin (MDR) en erken belgelenmiş salgınları 1984 yılında

Malezya'da ve 1988 yılında Hindistan'da ortaya çıkmıştır. İzolatların % 90'unda rapor edilen çoklu ilaç fenotipini kodlayan 98 Md büyüklükte plazmid daha sonra nerede ise tüm dünyada çoklu ilaç dirençli *S. Typhi* suşlarında belirlenmiştir (White vd. 2001, Carattoli vd. 2002).

S. Typhimurium DT104, 1980'li yıllardan beri tüm dünyada sorun yaratan ve üzerinde en fazla çalışma yapılmış olan çoklu ilaç dirençli klonal grubu teşkil etmektedir. Bu epidemik suş, ilk kez İngiltere'de kuşlarda tanımlanmıştır. Günümüzde ise; tavuk, domuz, inek ve insanlarda en yaygın gastroenterit ajanı olduğu bilinmektedir. Bu suşun klonları ampisilin, kloramfenikol, spektinomisin/streptomisin, sulfonamid, tetrasiklin ve kinolonlar gibi birçok antimikrobiyel bileşiğe karşı çoklu ilaç dirençlilik içermektedir (Lawson vd. 2002, Esaki vd. 2004). Diğer bir pandemik *Salmonella* klonal grubu ise *S. Newport* A203'tür. Bu suş ilk belirlemelerde; ampisilin, sefalotin, kloramfenikol, streptomisin, tetrasiklin ve sulfametoksazole karşı dirençli bulunmuştur. Günümüzde ise dokuz farklı antimikrobiyel ajana karşı direnç gösterebilen tipleri tanımlanabilmektedir (Rabatsky-Her vd. 2004, Varma vd. 2005, Fluit 2005).

Ülkemizde *Salmonella*'da enfeksiyon ajanlarının serotip düzeyinde tanısı daha çok tifoid (*S. Typhi*) izolatlarda gerçekleştirilmiş olup, tifoid olmayan tiplerin epidemisi üzerinde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, çoklu ilaç dirençlilik özelliğinin tifoid olmayan *Salmonella* izolatlarında da hızlı bir şekilde yayıldığına işaret etmektedir. Ancak bu yayılmanın üzerinde yatay gen transferinin ya da klonal yayılmanın etkilerinin araştırıldığı bir çalışma mevcut değildir (Erol 1999, Erdem vd. 2005, Yazıcıoğlu vd. 2005). Son çalışmalarda özellikle çoklu ilaç dirençli ve tifoid olmayan bazı Türkiye kökenli *Salmonella* izolatlarında, çoklu ilaç dirençlilik fenotipinin *Shigella*'dan kazanılmış plazmidler üzerinde kodlandığının belirlenmesi, yatay gen transferinin bölgesel olarak farklı epidemik türlerin kaynağına işaret etmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Aynı çalışmalarda, Türkiye kökenli tifoid olmayan *Salmonella* suşlarının sınırlı klonal grup belirlemesi de gerçekleştirilmiştir. Bu klonal grupların özellikle Avrupadaki temel tiplerle farklılık göstermesi, söz

konusu çalışmaların Türkiyenin tamamına yayılarak genişletilmesi zorunluluğuna işaret etmiştir (Avşaroğlu vd. 2007).

Salmonella'da çoklu ilaç dirençli suşların ortaya çıkması ve giderek artan bir yaygınlık kazanması, bu özelliğin genetik ve biyokimyasal esasının tanımlanmasına yönelik çalışmalara büyük bir ivme kazandırmıştır. Bu doğrultuda yürütülen genetik analizler sonucu; *S. enterica* serotip Typhimurium DT104, serotip Paratyphi B ve serotip Agona'nın çoklu ilaç dirençli suşlarının *Salmonella* genomik adası I (SGI-1) olarak adlandırılan genomik bir bölgeye sahip olduğu belirlenmiştir (Hohmann 2001, Yan vd. 2003, van Essen-Zandbergen vd. 2007).

SGI-1'de; transpozaz, entegraz ve eksizyonaz gibi DNA mobilitesiyle ilişkili genlerin bulunuşu ve % GC içeriklerinin *Salmonella* genomunun diğer bölgelerinden farklı oluşu, bu bölgelerin yatay gen transferi ile kazanıldıklarına işaret etmiştir. Ayrıca, SGI-1'in değişik varyantları birçok *S. enterica* serotipinde aynı kromozomal lokasyonda bulunmuştur. Bu bulgular da söz konusu bölgelerin yatay gen transferi ya da bölge spesifik rekombinasyon yolu ile evrimleştiğinin diğer güçlü kanıtlarını sunmaktadır. Yakın zamanda SGI-1'in yeni bir varyantı *S. enterica* serotip Albany'de tespit edilmiştir. Bu varyantta, SGI-1'deki streptomisin direnç geni içeren integron, trimetoprim direnç geni içeren bir integronla değiştirilmiştir. Bu gözlemler, kromozomal antibiyotik direnç lokuslarının yeni kazanımlar olduklarını, hızlı bir genetik değişim süreci içerdiklerini ve antibiyotik dirençliliğine adaptasyon mekanizması olarak evrimleştiklerini göstermektedir (Carattoli 2003, Alcaine vd. 2007). SGI-1 içinde en az beş antibiyotiğe direnç gösteren (çoklu ilaç dirençliliği fenotipi) genler iki integrondan oluşan bir bölgede kümelenmiştir. Ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sulfonamidler ve tetrasikline dirençliliğin, *S. enterica* serotip Typhimurium DT104'ün SGI-1 varyantında kodlandığı belirlenmiştir. Streptomisin direnç geni *S. enterica* serotip Albany'nin SGI-1'inde trimetoprim direnç geniyle rekombine durumda tespit edilmiştir (Miriagou vd. 2006, van Essen-Zandbergen vd. 2007, Suh ve Odeh 2008).

2.5 *Salmonella*'da Yatay Gen Transferi Elemanları ve Antimikrobiyel Direnç Gelişim Üzerine Etkileri

Antimikrobiyel dirençlilik, daha önce de ifade edildiği gibi, genlerin diğer bakterilerden kazanımı ya da içsel (intrinsik) olmak üzere başlıca iki yolla meydana gelmektedir. İçsel dirençliliğin moleküler kaynağı mutasyonlar, kazanılmış dirençliliğin kaynağı ise yatay gen transferi ve bu süreci tamamlayan rekombinasyonlardır. Bakteriyel yatay gen transferi mekanizmaları; transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon sistemleri ile karakterize edilmektedir. Bakteriyel genomların evriminde önemli bir görev oynayan bu sistemler içerisinde, tür içi ve türler arası gen aktarımında en etkin olanı konjugasyondur. Konjugasyon özetle; bakteri hücrelerinin fiziksel teması sonucu genetik materyalin verici hücreden alıcı hücreye tek yönlü aktarımı olarak tanımlanmaktadır. Konjugasyonu gerçekleştiren genetik yapılar, transfer genleri içeren (konjugatif özellik) plazmidler ya da transpozonlardır. Diğer yandan konjugatif transpozonlar ya da plazmidlerle birleşme yeteneğinde olan ve ilaç dirençlilik gen kasetlerini taşıyan integronlar, yatay gen transferinin dolaylı elemanları olarak önemli bir görev üstlenmektedir (Pepper 2003). Bütün yatay gen transferi sistemlerinde rekombinasyon, kromozomal esaslı gen kazanımının ana kaynağını teşkil etmektedir (Hastings vd. 2004). *Salmonella*'da çoklu ilaç dirençliliğinin gelişiminin moleküler mekanizmalarının çalışılması, mutasyon analizleri yanında, yatay gen transfer sistemlerinin etkinliğine bağlıdır. Halen bu bakterilerde genom evriminin detaylarının belirlenmesinde kullanılan en etkin moleküler elemanlardan biri konjugasyon sistemleridir (Schwarz vd. 2006).

Salmonella'da plazmid kodlu antibiyotik dirençlilik genleri yoğun bir şekilde araştırılmış ve evrimsel karakterizasyonları yapılmıştır. Transpozonlar ve integron elementleri ile kombine halde bulunan yüksek moleküler büyüklükteki çoklu ilaç dirençlilik plazmidleri, *Salmonella* serotiplerinde tipiktir. İntegron ve transpozonlar sayesinde ilaç dirençlilik genlerinin farklı genetik elementler arasında taşınımı ve rekombinasyonu gerçekleştirilmektedir (Guerra vd. 2002, Schwarz vd. 2006). *Salmonella* serotiplerinde yürütülen mutasyonel analizler sonucunda; β -laktam antibiyotiklerin temel grupları olan penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemlere dirençlilik özelliğinin kromozomal DNA yanında değişik plazmidler üzerinde de

kodlandığı tanımlanmıştır. β -laktam grubu antibiyotiklere dirençlilik sağlayan ve birincil işlevi peptidoglikan sentezi olan β -laktamaz enzimlerinin mutasyonel varyantları genellikle plazmid kodludur (Livermore vd. 2007). Bunun yanında, kinolon ve florokinolonlara, fenikoller ve kloramfenikole, tetrasiklinlere, aminoglikozitlere ve sulfonamidlere karşı plazmid kökenli antibiyotik dirençlilik genlerine de sıklıkla rastlanmaktadır (Alcaine vd. 2007, Kehrenberg vd. 2007). Bu plazmidlerin genellikle konjugatif özellik içermesi, çoklu antibiyotik direnç özelliğinin tür içi ve türler arası yayılımında büyük bir önem taşımaktadır. Bazı direnç plazmidlerinin aynı uyumsuzluk grubunda yer alması yatay gen transferinin etkinliğini düşüren temel husustur. Bu nedenle antibiyotik direnç özelliğini determine eden plazmidlerin uyumsuzluk gruplarının belirlenmesi, *Salmonella* epidemisi çalışmalarında temel hareket noktalarından birini teşkil etmektedir (Walsh 2003, Halawani ve Shohayeb 2008).

Kromozoma ya da plazmide entegrasyon özelliği içeren transpozonlar, DNA molekülleri üzerinde farklı lokalizasyonlara replikatif ya da konzervatif mekanizmaları kullanarak hareket etme yeteneği içeren DNA elementleridir. Özellikle ilave kopyalarının üzerinde doğal seçkinin etkisinin düşmesi nedeniyle mutasyon sıklığının artışı, bu elementleri genom elastisitesinin temel araçları haline getirmiştir. Belirli DNA bölgelerine girme eğilimleri yanında, rastgele rekombinasyon yapma yeteneğinde de olan bu DNA elementleri, diğer Gram-negatif bakterilerde olduğu gibi, *Salmonella* cinsi üyelerinde de yaygın bir şekilde bulunmaktadır. *Salmonella* genomunda hem kromozomal DNA hem de plazmidler üzerinde çok sayıda farklı transpozon kopyası belirlenmiştir. *Salmonella* serotiplerinde çoklu ilaç dirençlilik fenotipini kontrol eden genleri determine eden ve aynı zamanda konjugatif özellik içeren en yaygın transpozonlar; 11.1 kb moleküler büyüklüğe sahip *Tn1721* (tetrasiklin dirençlilikte etkin bir membran pompa proteinini kodlayan *tetA* genini taşımaktadır), Gram-negatif bakteri genomlarının tipik transpozon ailesi üyesi olan *Tn5373* (streptomisin direnç proteinlerini kodlayan *strA* ve *strB* genlerini taşımaktadır), *Tn1548* (*Salmonella*'da amiloglikozit grup antibiyotiklere dirençliliği sağlayan bir metilaz enzimini kodlayan *armA* geni yanında, penisilinlere direnç sağlayan CTX-M-3 tip β -laktamaz geni de bu transpozon tarafından taşınmaktadır)

olarak belirlenmiştir. Yüksek rekombinasyon yeteneği sayesinde önemli bir genetik elastisiteye sahip olan transpozonlar, özellikle integronlar ile birleşerek taşıdıkları antibiyotik dirençlilik genlerinin sayısını sürekli artırmakta ve modifiye etmektedir (Waturangi vd. 2003, Galimand vd. 2005, Su vd. 2006, Miriagou vd. 2006, Alcaine vd. 2007, Hradecka vd. 2008).

İntegronlar, genlerin farklı DNA moleküllerinde ifadesini sağlayan vektör sistemler olarak tanımlanmaktadır. Özellikle Gram-negatif bakterilerde antimikrobiyel direnç genlerinin kasetler halinde yakalanması ve konjugatif DNA elementleri ile birleşerek taşınmasından sorumlu olan direnç integronları ve diğer gen kasetlerini yapılarına alan süper integronlar olmak üzere iki ana tip içermektedirler. Direnç integronları bir çok bakteri türünde plazmid, transpozon ya da kromozomal DNA üzerinde lokalize olabilmekte, süper integronlar ise yalnız kromozomal DNA üzerinde yer almaktadır (Villa ve Carattoli 2005, van Essen-Zandbergen vd. 2007).

Direnç gen kasetlerinin integronlar tarafından yakalanması, çoklu antibiyotik direnç gen bölgelerinin evrimleşmesinde temel hareket noktasını oluşturmaktadır. Zira bu gen kasetlerinin integronların içerisinde rekombinasyonu ve konjugatif DNA elementleriyle tür içi ve türler arası aktarımının gerçekleşmesi, *Salmonella* başta olmak üzere birçok patojen bakteri genomunda antibiyotik dirençlilik adalarının oluşumu ve gelişimini tetiklemektedir. Bugüne kadar tek bir integron üzerinde yüzden fazla ilaç dirençlilik gen kasetinin belirlenebildiği düşünülür ise, söz konusu evrimleşme gücünün ne kadar yüksek olduğu daha açık bir şekilde anlaşılabilir. Direnç gen kasetleri integronların attC bölgesi içerisine genellikle promotörleri olmaksızın alınmaktadır. Söz konusu bölgenin 5' ucunda yer alan integron kökenli promotör, yakalanan direnç genlerinin transkripsiyonunda işlev görmektedir. İlaç dirençlilik integronları, içerdikleri integras enzim geni homolojisi esas alınarak beş ana grup altında toplanmıştır. Sınıf I integronlar tipik olarak dirençlilikten sorumlu *aad* (streptomisin/spektinomisin), *pseI* ve *oxa* (ampisilin) ve *dfrA* (trimetoprim) genlerini, Sınıf II integronlar sülfonamidlere dirençlilik sağlayan *sul* genlerini, Sınıf III integronlar karbapenemi de içeren geniş etki spektrumuna sahip β -laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençlilik genlerini içermektedir. Sınıf IV integronlar, tüm

integron sınıfları içerisinde en yaygın olan grubu teşkil etmektedir. Genomlarda dirençlilik adalarının oluşumunun temel elemanlarını içeren bu sınıfta yüzlerce gen kaseti yakalayabilen türler tanımlanmıştır. Sınıf V integronlar bazı aminoglikozit grup antibiyotiklere dirençlilik özelliği yanında, daha çok dezenfektan ajanlara ve ağır metal iyonlarına karşı dirençlilikten sorumlu gen kasetlerini içermektedir. Sınıf I, III ve IV integronlar *Salmonella* genomunda kromozomal, plazmid ve transpozon elementleri ile ilişkili bulunabilirken, Sınıf II ve V integronlarda özellikle *Tn7* transpozonları ile spesifik bağlanma ilişkisi tespit edilmiştir (Carattoli 2001, Fluit ve Schmitz 2004, Mammeri vd. 2005, van Essen-Zandbergen vd. 2007, Lapierre vd. 2008).

İntegronların gerek direnç gen kasetlerini yakalama ve gerekse yatay gen transferini gerçekleştiren ajanlar ile ilişkilenerken tür içi ve türler arası aktarımı gerçekleştirme yetenekleri, bu genetik yapıları antimikrobiyel dirençlilik çalışmalarının odağı haline getirmiştir. Özellikle dirençliliğin evrimi ve buna bağlı epidemilerin kontrolünde kullanılacak global çözümler, integron analizlerinden elde edilen veriler ışığında şekillenmektedir (Martinez vd. 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri izolatları

Çalışmada kullanılan *Salmonella* suşları, farklı bölgelerde bulunan kasap ve marketlerde satışa sunulan gıda örneklerinden izole edildi. Kullanılan bu hayvansal kaynaklı gıda örnekleri dana eti (99 örnek), koyun eti (13 örnek), tavuk eti (104 örnek) ve süttür (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 *Salmonella* suşlarının izolasyonunda kullanılan izolasyon materyalleri

	Materyal	Örneğin alındığı yer	Tarih	Sonuç	Suş adı
1	Dana Kıyma	Ankara-Tandoğan	24.09.2007	-	
2	Dana Kıyma	Ankara-Tandoğan	02.10.2007	+	IS-2
3	Dana Kıyma	Ankara-Aydınlıkevler	02.10.2007	-	
4	Dana Kıyma	Ankara-Çukurambar	02.10.2007	+	IS-4
5	Dana Kıyma	Ankara-Demetevler	16.10.2007	-	
6	Dana Kıyma	Ankara-Tandoğan	15.10.2007	+	IS-6
7	Dana Kıyma	Ankara-Çukurambar	16.10.2007	-	
8	Dana Kıyma	Ankara-Bahçelievler	16.10.2007	-	
9	Dana Kıyma	Ankara-Kızılay	15.10.2007	-	
10	Dana Kıyma	Ankara-Kızılay	16.10.2007	-	
11	Dana Kıyma	Ankara-Akköprü	22.10.2007	-	
12	Dana Kıyma	Ankara-Aydınlıkevler	22.10.2007	-	
13	Dana Kıyma	Ankara-Subayevleri	21.10.2007	-	
14	Dana Kıyma	Ankara-Subayevleri	21.10.2007	-	
15	Tavuk Göğüs	Ankara-Tandoğan	22.10.2007	-	
16	Dana Kıyma	Ankara-Batıkent	28.10.2007	-	
17	Dana Kıyma	Ankara-Batıkent	28.10.2007	-	
18	Dana Kıyma	Ankara-Mamak	29.10.2007	-	
19	Dana Kıyma	Ankara-Keçiören	28.10.2007	-	
20	Tavuk Kanat	Ankara-Mamak	29.10.2007	+	IS-20
21	Dana Kıyma	Ankara-Bahçelievler	29.10.2007	-	
22	Koyun Kıyma	Ankara-Emek	28.10.2007	-	
23	Dana Kıyma	Ankara-Emek	28.10.2007	+	IS-23
24	Dana Kıyma	Ankara-Aydınlıkevler	28.10.2007	-	
25	Dana Kıyma	Ankara-Bahçelievler	29.10.2007	-	
26	Dana Kıyma	Ankara-Bahçelievler	29.10.2007	-	
27	Dana Kıyma	Ankara-Eryaman	04.11.2007	-	
28	Dana Kıyma	Ankara-Çukurambar	04.11.2007	-	

Çizelge 3.1 *Salmonella* suşlarının izolasyonunda kullanılan izolasyon materyalleri
(devam)

	Materyal	Örneğin alındığı yer	Tarih	Sonuç	Suş adı
29	Çiğ Süt	Ankara-Batıkent	05.11.2007	-	
30	Dana Kıyma	Ankara-Batıkent	05.11.2007	-	
31	Dana Kıyma	Ankara-Aydınlıkevler	04.11.2007	-	
32	Dana Kıyma	Ankara-Maltepe	05.11.2007	-	
33	Dana Kıyma	Ankara-Maltepe	05.11.2007	-	
34	Dana Kıyma	Ankara-Aydınlıkevler	04.11.2007	-	
35	Dana Kıyma	Ankara-Abidinpaşa	05.11.2007	-	
36	Dana Kıyma	Ankara-Abidinpaşa	05.11.2007	-	
37	Dana Kıyma	Ankara-Demirtepe	12.11.2007	-	
38	Dana Kıyma	Ankara-Tandoğan	12.11.2007	-	
39	Dana Kıyma	Ankara-Dikimevi	12.11.2007	-	
40	Dana Kıyma	Ankara-Batıkent	11.11.2007	-	
41	Dana Kıyma	Ankara-Tandoğan	12.11.2007	-	
42	Dana Kıyma	Ankara-Yüzüncüyıl	19.11.2007	-	
43	Dana Kıyma	Ankara-Cebeci	19.11.2007	-	
44	Dana Kıyma	Ankara-Kızılay	18.11.2007	-	
45	Dana Kıyma	Ankara-Cebeci	19.11.2007	-	
46	Dana Kıyma	Ankara-Kızılay	19.11.2007	+	IS-46
47	Dana Kıyma	Ankara-Emek	26.11.2007	-	
48	Tavuk But	Ankara-Kolej	25.11.2007	-	
49	Tavuk Kanat	Ankara-Yüzüncüyıl	26.11.2007	-	
50	Dana Kıyma	Ankara-Emek	26.11.2007	-	
51	Dana Kıyma	Ankara-Emek	26.11.2007	-	
52	Tavuk But	Ankara-Kızılay	26.11.2007	+	IS-52
53	Tavuk Kanat	Ankara-Kızılay	02.12.2007	+	IS-53
54	Koyun İşkembe	Ankara-Hoşdere	02.12.2007	-	
55	Tavuk But	Ankara-Hoşdere	02.12.2007	-	
56	Dana Kıyma	Ankara-Dikimevi	03.12.2007	-	
57	Koyun Ciğer	Ankara-Kızılay	02.12.2007	-	
58	Tavuk But	Ankara-Yüzüncüyıl	02.12.2007	+	IS-58
59	Koyun Ciğer	Ankara-Çiğdem Mah.	02.12.2007	-	
60	Tavuk Baget	Ankara-Batıkent	03.12.2007	-	
61	Dana Kıyma	Ankara-Batıkent	03.12.2007	-	
62	Koyun Ciğer	Ankara-Demetevler	03.12.2007	-	
63	Tavuk Taşlık	Ankara-Demetevler	03.12.2007	+	IS-63
64	Tavuk But	Ankara-Demetevler	03.12.2007	+	IS-64
65	Koyun Böbrek	Ankara-Kızılay	05.12.2007	-	
66	Koyun Böbrek	Ankara-Kızılay	05.12.2007	-	
67	Tavuk Ciğer	Ankara-Kızılay	05.12.2007	-	
68	Tavuk But	Ankara-Demirtepe	04.12.2007	-	
69	Tavuk Ciğer	Ankara-Kızılay	04.12.2007	+	IS-69

Çizelge 3.1 *Salmonella* suşlarının izolasyonunda kullanılan izolasyon materyalleri
(devam)

	Materyal	Örneğin alındığı yer	Tarih	Sonuç	Suş adı
70	Tavuk Kanat	Ankara-Balgat	04.12.2007	-	
71	Tavuk Göğüs	Ankara-Kızılay	05.12.2007	-	
72	Tavuk Göğüs	Ankara-Kızılay	05.12.2007	+	IS-72
73	Tavuk But	Ankara-Kızılay	05.12.2007	+	IS-73
74	Tavuk Baget	Ankara-Sıhhiye	05.12.2007	-	
75	Tavuk Göğüs	Ankara-Sıhhiye	05.12.2007	-	
76	Tavuk Ciğer	Ankara-Sıhhiye	05.12.2007	-	
77	Koyun Böbrek	Ankara-Gazi Mahallesi	10.12.2007	-	
78	Tavuk Ciğer	Ankara-Gazi Mahallesi	10.12.2007	-	
79	Tavuk Kanat	Ankara-Gazi Mahallesi	10.12.2007	-	
80	Tavuk But	Ankara-Gazi Mahallesi	10.12.2007	+	IS-80
81	Tavuk Ciğer	Ankara-Gazi Mahallesi	10.12.2007	+	IS-81
82	Tavuk Göğüs	Ankara-Kızılay	09.12.2007	-	
83	Tavuk Göğüs	Ankara-Kızılay	09.12.2007	+	IS-83
84	Tavuk Göğüs	Ankara-Kızılay	09.12.2007	+	IS-84
85	Tavuk Pirzola	Tekirdağ-Çerkezköy	09.12.2007	-	
86	Dana Kuşbaşı	Tekirdağ-Çerkezköy	09.12.2007	-	
87	Tavuk Kanat	Tekirdağ-Çerkezköy	09.12.2007	-	
88	Tavuk Ciğer	Ankara-Ulus	12.12.2007	-	
89	Tavuk Kanat	Ankara-Ulus	12.12.2007	+	IS-89
90	Tavuk Taşlık	Ankara-Ulus	12.12.2007	-	
91	Tavuk But	Ankara-Ulus	12.12.2007	+	IS-91
92	Dana Kıyma	Ankara-Ulus	12.12.2007	-	
93	Koyun Ciğer	Ankara-Ulus	12.12.2007	-	
94	Tavuk Taşlık	Ankara-Ulus	12.12.2007	-	
95	Koyun Böbrek	Ankara-Ulus	12.12.2007	-	
96	Tavuk But	Ankara-Ulus	12.12.2007	+	IS-96
97	Tavuk Ciğer	Ankara-Ulus	12.12.2007	+	IS-97
98	Tavuk Sırt	Ankara-Ulus	12.12.2007	+	IS-98
99	Tavuk Kanat	Ankara-Ulus	12.12.2007	-	
100	Tavuk Kanat	Ankara-Ulus	12.12.2007	+	IS-100
101	Tavuk Taşlık	Ankara-Ulus	12.12.2007	+	IS-101
102	Dana Kıyma	Ankara-Ulus	12.12.2007	-	
103	Tavuk Göğüs	Ankara-Tandoğan	25.12.2007	-	
104	Tavuk Kanat	Ankara-Bahçelievler	25.12.2007	+	IS-104
105	Tavuk But	Ankara-Bahçelievler	25.12.2007	-	
106	Dana Kıyma	Ankara-Aydınlıkevler	24.12.2007	-	
107	Dana Ciğer	Ankara-Aydınlıkevler	24.12.2007	+	IS-107
108	Tavuk Ciğer	Ankara-Aydınlıkevler	24.12.2007	-	
109	Dana Bonfile	Ankara-Balgat	24.12.2007	-	
110	Tavuk But	Ankara-Abidinpaşa	25.12.2007	-	

Çizelge 3.1 *Salmonella* suşlarının izolasyonunda kullanılan izolasyon materyalleri
(devam)

	Materyal	Örneğin alındığı yer	Tarih	Sonuç	Suş adı
111	Tavuk Kanat	Ankara-Abidinpaşa	25.12.2007	-	
112	Tavuk But	Ankara-Abidinpaşa	25.12.2007	+	IS-112
113	Tavuk But	Ankara-Abidinpaşa	25.12.2007	-	
114	Tavuk Göğüs	Ankara-Beşevler	14.01.2008	-	
115	Tavuk Göğüs	Ankara-Tandoğan	14.01.2008	-	
116	Tavuk Göğüs	Ankara-Tandoğan	14.01.2008	-	
117	Tavuk Kanat	Ankara-Tandoğan	14.01.2008	+	IS-117
118	Dana Kıyma	Ankara-Tandoğan	14.01.2008	-	
119	Tavuk Göğüs	Ankara-Tandoğan	14.01.2008	-	
120	Tavuk Göğüs	Ankara-Tandoğan	14.01.2008	-	
121	Dana Kıyma	Ankara-Tandoğan	14.01.2008	-	
122	Tavuk Kanat	Ankara-Tandoğan	14.01.2008	-	
123	Tavuk Ciğer	Ankara-Tandoğan	14.01.2008	-	
124	Tavuk Göğüs	Ankara-Tandoğan	14.01.2008	+	IS-124
125	Tavuk Kanat	Ankara-Yüzüncüyıl	14.01.2008	-	
126	Tavuk But	Ankara-Yüzüncüyıl	14.01.2008	-	
127	Tavuk Kanat	Ankara-Yüzüncüyıl	14.01.2008	-	
128	Tavuk But	Ankara-Yüzüncüyıl	14.01.2008	+	IS-128
129	Tavuk Pirzola	Ankara-Gazi Mahallesi	22.01.2008	-	
130	Tavuk Kanat	Ankara-Gazi Mahallesi	22.01.2008	-	
131	Tavuk Kanat	Ankara-Gazi Mahallesi	22.01.2008	-	
132	Tavuk But	Ankara-Gazi Mahallesi	22.01.2008	-	
133	Tavuk Kanat	Ankara-Gazi Mahallesi	22.01.2008	-	
134	Tavuk Kanat	Ankara-Gazi Mahallesi	22.01.2008	+	IS-134
135	Tavuk Göğüs	Ankara-Çukurambar	22.01.2008	+	IS-135
136	Tavuk Göğüs	Ankara-Gazi Mahallesi	22.01.2008	-	
137	Tavuk Pirzola	Ankara-Çukurambar	22.01.2008	+	IS-137
138	Tavuk But	Ankara-Batıkent	22.01.2008	-	
139	Tavuk Baget	Ankara-Batıkent	22.01.2008	-	
140	Tavuk Göğüs	Ankara-Ayrancı	22.01.2008	+	IS-140
141	Tavuk Kanat	Ankara-Yenimahalle	22.01.2008	+	IS-141
142	Tavuk Kanat	Ankara-Yenimahalle	22.01.2008	-	
143	Tavuk Kanat	Ankara-Yenimahalle	22.01.2008	-	
144	Tavuk But	Ankara-Ayrancı	22.01.2008	-	
145	Tavuk Göğüs	Ankara-Ayrancı	22.01.2008	-	
146	Tavuk Göğüs	Ankara-Ayrancı	22.01.2008	-	
147	Tavuk Göğüs	Ankara-Ayrancı	22.01.2008	-	
148	Tavuk Baget	Ankara-Balgat	03.02.2008	+	IS-148
149	Tavuk Ciğer	Ankara-Balgat	03.02.2008	-	
150	Tavuk But	Ankara-Aydınlıkevler	28.01.2008	-	
151	Koyun Ciğer	Ankara-Aydınlıkevler	28.01.2008	-	

Çizelge 3.1 *Salmonella* suşlarının izolasyonunda kullanılan izolasyon materyalleri
(devam)

	Materyal	Örneğin alındığı yer	Tarih	Sonuç	Suş adı
152	Dana Kıyma	Ankara-Aydınlıkevler	28.01.2008	-	
153	Dana Kıyma	Ankara-Aydınlıkevler	28.01.2008	-	
154	Tavuk But	Ankara-İskitler	11.02.2008	-	
155	Tavuk Ciğer	Ankara-İskitler	11.02.2008	-	
156	Dana Kuşbaşı	Ankara-İskitler	11.02.2008	-	
157	Dana Kıyma	Ankara-İskitler	11.02.2008	-	
158	Tavuk Kanat	Ankara-Ulus	11.02.2008	-	
159	Dana Kuşbaşı	Ankara-Asfalt	18.02.2008	-	
160	Koyun Kuşbaşı	Ankara-Asfalt	18.02.2008	-	
161	Tavuk But	Ankara-Asfalt	18.02.2008	-	
162	Dana Ciğer	Ankara-Asfalt	18.02.2008	+	IS-162
163	Tavuk Ciğer	Ankara-Asfalt	18.02.2008	+	IS-163
164	Dana Kuşbaşı	Ankara-Asfalt	18.02.2008	-	
165	Koyun Kuşbaşı	Ankara-Asfalt	18.02.2008	-	
166	Dana Kuşbaşı	Ankara-Aktepe	25.02.2008	-	
167	Dana Kuşbaşı	Ankara-Aktepe	25.02.2008	-	
168	Dana Kuşbaşı	Ankara-Aktepe	25.02.2008	-	
169	Tavuk Baget	Ankara-Aktepe	25.02.2008	-	
170	Dana Kuşbaşı	Ankara-Aktepe	25.02.2008	-	
171	Tavuk Baget	Ankara-Etlik	03.03.2008	-	
172	Tavuk But	Ankara-Etlik	03.03.2008	-	
173	Dana Kıyma	Ankara-Etlik	03.03.2008	-	
174	Dana Ciğer	Ankara-Etlik	03.03.2008	+	IS-174
175	Dana Kıyma	Ankara-Etlik	03.03.2008	-	
176	Dana Kıyma	Ankara-Etlik	03.03.2008	-	
177	Dana Ciğer	Ankara-Etlik	03.03.2008	+	IS-177
178	Tavuk Kanat	Ankara-Etlik	03.03.2008	-	
179	Dana Kıyma	Ankara-Etlik	03.03.2008	-	
180	Dana Kıyma	Ankara-Etlik	03.03.2008	-	
181	Dana Kıyma	Ankara-Etlik	03.03.2008	-	
182	Tavuk Kanat	Ankara-Etlik	03.03.2008	-	
183	Dana Ciğer	Ankara-Etlik	03.03.2008	-	
184	Dana Kuşbaşı	Ankara-Ufuktepe	11.03.2008	-	
185	Dana Kuşbaşı	Ankara-Ufuktepe	11.03.2008	-	
186	Tavuk Kanat	Ankara-Ufuktepe	11.03.2008	-	
187	Dana Kuşbaşı	Ankara-Ufuktepe	11.03.2008	-	
188	Dana Kuşbaşı	Ankara-Ufuktepe	11.03.2008	-	
189	Dana Kıyma	Ankara-Dikmen	21.03.2008	-	
190	Dana Ciğer	Ankara-Dikmen	21.03.2008	-	
191	Dana Kıyma	Ankara-Dikmen	21.03.2008	-	
192	Dana Kıyma	Ankara-Dikmen	21.03.2008	-	

Çizelge 3.1 *Salmonella* suşlarının izolasyonunda kullanılan izolasyon materyalleri
(devam)

	Materyal	Örneğin alındığı yer	Tarih	Sonuç	Suş adı
193	Dana Kıyma	Ankara-Dikmen	21.03.2008	-	
194	Dana Kıyma	Ankara-Dikmen	21.03.2008	-	
195	Dana Kuşbaşı	Ankara-Dikmen	21.03.2008	-	
196	Dana Kuşbaşı	Ankara-Dikmen	21.03.2008	-	
197	Dana Kuşbaşı	Ankara-Dikmen	21.03.2008	-	
198	Dana Kıyma	Ankara-Aydınlıkevler	31.03.2008	-	
199	Tavuk But	Ankara-Aydınlıkevler	31.03.2008	-	
200	Dana Kıyma	Ankara-Aydınlıkevler	31.03.2008	-	
201	Tavuk Göğüs	Isparta-Gülkent	31.03.2008	-	
202	Dana Ciğer	Isparta-Gülkent	31.03.2008	-	
203	Dana Ciğer	Isparta-Gülkent	31.03.2008	-	
204	Dana Ciğer	Isparta-Gülkent	31.03.2008	-	
205	Tavuk Kanat	Isparta-Gülkent	31.03.2008	-	
206	Tavuk But	Isparta-Gülkent	31.03.2008	-	
207	Dana Kuşbaşı	Isparta-Gülkent	31.03.2008	-	
208	Tavuk Göğüs	Isparta-Gülkent	31.03.2008	-	
209	Dana Kuşbaşı	Isparta-Gülkent	31.03.2008	-	
210	Dana Kıyma	Ankara-Haymana	14.04.2008	-	
211	Dana Ciğer	Ankara-Haymana	14.04.2008	-	
212	Tavuk Baget	Ankara-Haymana	14.04.2008	-	
213	Dana Ciğer	Ankara-Haymana	14.04.2008	-	
214	Tavuk But	Ankara-Haymana	14.04.2008	-	
215	Tavuk Kanat	Ankara-Haymana	14.04.2008	-	
216	Dana Ciğer	Ankara-Haymana	14.04.2008	-	
217	Tavuk Kanat	Ankara-Haymana	14.04.2008	-	

+ : *Salmonella* sp.

- : Diğer

3.1.2 Antibiyotikler

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları

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

Çizelge 3.3 Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) kuyucuk test planı ve analizlerinde kullanılan antibiyotik konsantrasyonları

CHL 512 µg/mL	GEN 512 µg/mL	KAN 512 µg/mL	NAL 512 µg/mL	NEO 512 µg/mL	SPE 512 µg/mL	SUL 512 µg/mL	TMP 512 µg/mL
CHL 256 µg/mL	GEN 256 µg/mL	KAN 256 µg/mL	NAL 256 µg/mL	NEO 256 µg/mL	SPE 256 µg/mL	SUL 256 µg/mL	TMP 256 µg/mL
CHL 128 µg/mL	GEN 128 µg/mL	KAN 128 µg/mL	NAL 128 µg/mL	NEO 128 µg/mL	SPE 128 µg/mL	SUL 128 µg/mL	TMP 128 µg/mL
CHL 64 µg/mL	GEN 64 µg/mL	KAN 64 µg/mL	NAL 64 µg/mL	NEO 64 µg/mL	SPE 64 µg/mL	SUL 64 µg/mL	TMP 64 µg/mL
CHL 32 µg/mL	GEN 32 µg/mL	KAN 32 µg/mL	NAL 32 µg/mL	NEO 32 µg/mL	SPE 32 µg/mL	SUL 32 µg/mL	TMP 32 µg/mL
CHL 16 µg/mL	GEN 16 µg/mL	KAN 16 µg/mL	NAL 16 µg/mL	NEO 16 µg/mL	SPE 16 µg/mL	SUL 16 µg/mL	TMP 16 µg/mL
CHL 8 µg/mL	GEN 8 µg/mL	KAN 8 µg/mL	NAL 8 µg/mL	NEO 8 µg/mL	SPE 8 µg/mL	SUL 8 µg/mL	TMP 8 µg/mL
PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK

CHL: Kloramfenikol; GEN: Gentamisin; KAN: Kanamisin; NAL: Nalidiksik Asit; NEO: Neomisin; SPE: Spektinomisin; SUL: Sulfonamid; TMP: Trimetoprim; PK: Pozitif kontrol.

3.1.3 Besiyerleri

Bizmut Sülfat Agar (BSA) (Merck, Germany)

<u>İçerik</u>	<u>g/L</u>
Et ekstraktı	5
Pepton	10
D(+) glukoz	5
Di-sodyum hidrojen fosfat	4
Demir (III) sülfat	0,3
Bizmut sülfat indikator	8
Brilliant yeşili	0,025
Agar	15
pH 7,6 ± 0,2 (sterilizasyondan önce)	

Tamponlanmış Peptonlu Su (BPW) (Oxoid, England)

<u>İçerik</u>	<u>g/L</u>
Pepton	10
Sodyum klorid	5
Disodyum hidrojen fosfat	3,5
Potasyum dihidrojen fosfat	1,5
pH 7,2 ± 0,2 (sterilizasyondan önce)	
Sterilizasyon : 121 °C' de 15 dk.	

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

<u>İçerik</u>	<u>g/L</u>
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
Sodyum klorid	10
Agar	15
pH 7.0 ± 0.2 (sterilizasyondan önce)	
Sterilizasyon : 121 °C' de 15 dk.	

Müller-Hinton Broth ve Agar (Oxoid, England)

<u>İçerik</u>	<u>g/L</u>
Et ekstraktı	300
Kazein hidrolizat	17.5
Nişasta	1.5
Agar	17
pH 7.3 ± 0.2 (sterilizasyondan önce)	
Sterilizasyon : 121 °C' de 15 dk.	

Müller-Kauffmann Tetrasyonat/novobiosin Broth (MKTTn) (Oxoid, England)

<u>İçerik</u>	<u>g/L</u>
Et ekstraktı	4,3
Pepton	8,6
Sodyum klorid	2,6
Kalsiyum karbonat	38,7
Sodyum tiyosülfat	30,5
Ox-bile	4,78
Brilliant yeşili	0,0096
Novobiosin solüsyonu (0,8%)	5 ml
İyot-İyodür solüsyonu	20 ml
pH 8,0 ± 0,2 (sterilizasyondan önce)	

Rappaport Vassiliadis Broth (RVB) (Merck, Germany)

<u>İçerik</u>	<u>g/L</u>
Pepton	4,5
Magnezyum klorid heksahidrat	29
Sodyum klorid	8
Di-potasyum hidrojen fosfat	0,4
Potasyum di-hidrojen fosfat	0,6
Malaşit yeşili	0,036
pH 5,2 ± 0,2 (sterilizasyondan önce)	
Sterilizasyon : 115 °C' de 15 dk.	

Ksiloz Lizin Deoksikolat (XLD) Agar (Oxoid, England)

<u>İçerik</u>	<u>g/L</u>
Maya ekstraktı	3
L-Lizin HCl	5
Ksiloz	3,75
Laktoz	7,5
Sükroz	7,5
Sodyum deoksikolat	1
Sodyum klorid	5
Sodyum tiyosülfat	6,8
Ferik amonyum sitrat	0,8
Fenol kırmızısı	0,08
Agar	12,5
pH 7,4 ± 0,2 (sterilizasyondan önce)	

3.1.4 Çözeltiler

0,5 M EDTA

İçerik

Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.22 g
Steril distile su	200 mL
pH 8.0	
Sterilizasyon : 121 °C' de 15 dk.	

5 N NaOH Çözeltilisi

İçerik

NaOH	10 g
Steril distile su	50 mL

1 M Tris-HCl Çözeltilisi

İçerik

Trizma-base	24,22 g
Steril distile su	200 mL
pH 8.0	
Sterilizasyon : 121 °C' de 15 dk.	

% 15 SDS Çözeltisi

İçerik

SDS	7.5 g
Steril distile su	50 mL

DNA Jel Yükleme Tampon Çözeltisi

İçerik

Bromfenol mavisi	0.25 mL
Sakkaroz	40 g
Steril distile su	100 mL

Fenol/Kloroform Çözeltisi

İçerik

Fenol	1 mL
Kloroform	1 mL

İyot-İyodür Çözeltisi

İçerik

Potasyum İyodür	25
İyot	20
Steril distile su	100 mL

Kado Tampon Çözeltisi

İçerik

Tris	0.6 g
EDTA	0.03 g
Steril distile su	100 mL
pH 8.0	
Sterilizasyon : 121 °C' de 15 dk.	

Liziz Çözeltisi

İçerik mL

Steril distile su	11.5
15% SDS	4
250mM Tris	4
5N NaOH	0.3

Tris-EDTA (TE) Tampon Çözeltisi

İçerik mL

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

1 M Tris-HCl, pH 8	10
0.5 M EDTA, pH 8	2
Steril distile su	988
Sterilizasyon : 121 °C' de 15 dk.	

3.1.5 Primerler

Çalışmada kullanılan primerlerin dizilimleri ve PZR koşulları Çizelge 3.4’de verilmiştir.

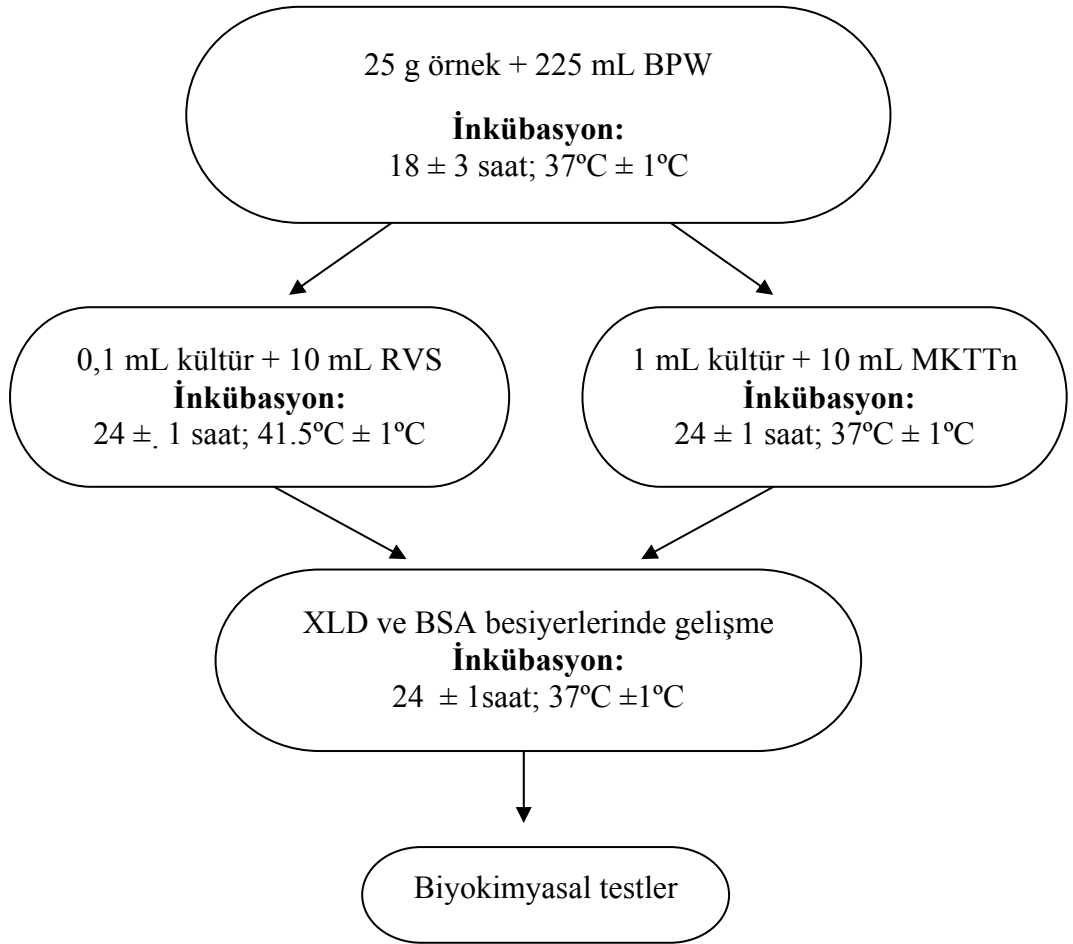
Çizelge 3.4 İntegron ve RAPD analizlerinde kullanılan primerler ve sekansları

Primer	Primer sekansı (İleri/Geri)	T_a/t_e	PZR ürünü (bç)
Sınıf I integron	GGCATCCAAGCAGCAAGC/ AAGCAGACTTGACCTGAT	55 °C/30 sn	değişken
P1254 (RAPD)	5’-CCG CAG CCA A-3’	35 °C/60 sn	değişken
P1283 (RAPD)	5’-GCG ATC CCC A-3’	35 °C/60 sn	değişken

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri izolasyonu

Çalışmada kullanılan gıda materyallerinden *Salmonella* sp.'in izolasyonu Şekil 3.1'de verilen yöntem kullanılmak suretiyle 4 basamakta gerçekleştirildi (ISO 6579 : 2002).



Şekil 3.1 *Salmonella* izolasyonunun şematik sunumu

1. Seçici olmayan besiyerinde önzenginleştirme:

25 gr tartılan gıda örneği 225 mL tamponlanmış peptonlu suya (BPW) inoküle edilip (1/10, w/v), statik inkübatörde (Binder, USA) $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de 18 ± 1 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. *Salmonella* için seçici olmayan bu uygulama; gıdaların prosesleri sırasında uygulanan işlemler, gıda katkıları, gıda koruma yöntemleri ya da çevresel faktörler nedeniyle zarar görmüş bakterilerin aktifleştirilmesi için gereken bir aşamadır.

2. Seçici besiyerinde zenginleştirme:

Önzenginleştirme ortamından elde edilen kültürlerden Rappaport-Vassiliadis (RVS) ve Müller-Kauffmann-Tetrasyonat/novobiosin (MKTTn) broth ortamlarına paralel ekimler yapılmıştır. 0,1 mL kültür 10 mL RVS brotha inoküle edilip, $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ± 3 saat inkübe edilirken, buna paralel olarak; 1 mL kültür 10 mL MKTTn brotha inoküle edilip $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ± 3 saat inkübe edilmiştir.

3. Seçici katı besiyerinde gelişme ve koloni seçimi:

Zenginleştirme ortamında gelişen kültürler Ksiloz Lizin Deoksikolat (XLD) agar ve Bizmut Sülfid Agar (BSA) olmak üzere 2 seçici besiyerine inoküle edilmiş ve $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de 24 ± 3 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra XLD agar üzerinde siyah merkezli etrafı saydam kırmızımsı zonlu, BSA agar üzerinde ise metalik parlaklığa sahip siyah renkli tipik *Salmonella* kolonileri seçilmiştir.

4. Kolonilerin doğrulanması:

Salmonella olduğu tahmin edilerek seçilen saf koloniler Luria Bertani (LB) broth ortamında çalkalamalı inkübatörde (Thermo, USA) 37°C 'de 200 rpm hızda 18 saat süre ile geliştirilmiştir. Kolonilerin *Salmonella* sp.' ne ait olup olmadığı gram boyama, oksidaz testi ve diğer biyokimyasal testler ile kontrol edilmiştir. Gram boyama sonucu gram (-), oksidaz testi sonucu oksidaz negatif olan suşlara diğer

biyokimyasal testler API 20E test kiti (bioMérieux, Inc., France) ile uygulanarak doğrulama testleri tamamlanmıştır. Kültürlerin salin süspansiyonları üretici firmanın yönlendirmelerine göre plastik stripteki 20 mini test tüpüne inoküle edilmiştir. Birkaç tüp (CIT, VP ve GEL) tamamen doldurulurken, bazı tüplerin (ADH, LDC, ODC, H₂S, URE) üstü aneorobik reaksiyonların gerçekleşmesi için mineral yağ ile doldurulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 API 20E test kitindeki tipik *Salmonella* reaksiyonları

37°C’de 18-24 saat inkübasyondan sonra kitte görülen reaksiyonlar renk değişimlerine göre okunmuştur. Bu bilgiler üretici firmanın veri tabanı ile analize tabi tutulmuş ve \geq % 89 olasılıklı pozitif sonuçlar *Salmonella* olarak kabul edilmiştir. Doğrulan *Salmonella* kültürleri % 60 gliserol içeren LB broth ortamında -80°C stoğuna alınmıştır. API 20E test kiti biyokimyasal testlerin listesi ve *Salmonella* sp.’nin oluşturduğu tipik reaksiyonlar Çizelge 3.5’ de verilmiştir.

Çizelge 3.5 API 20E test kiti içeriğindeki biyokimyasal testler ve tipik *Salmonella* reaksiyonları

Test	Substrat	Reaksiyon	(-) Sonuç	(+) Sonuç	<i>Salmonella</i> spp.
ONPG	ONPG	Beta-galaktozidaz	Renksiz	Sarı	-
ADH	Arjinin	Arjinin dihidrolaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu	-
LDC	Lizin	Lizin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu	+
ODC	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu	+
CIT	Sitrat	Sitrat kullanımı	Soluk yeşil/Sarı	Mavi-yeşil/Mavi	-
H ₂ S	Sodyum tiyosülfat	H ₂ S oluşumu	Renksiz/Gri	Siyah birikinti	+
URE	Üre	Üre hidrolizi	Sarı	Kırmızı/ Turuncu	-
TDA	Triptofan	Deaminaz	Sarı	Kahverengi - Kırmızı	-
IND	Triptofan	İndol oluşumu	Sarı	Kırmızı (2 dakikada)	-
VP	Sodyum pirüvat	Asetoin oluşumu	Renksiz	Kırmızı/ pembe (10 dakikada)	-

Çizelge 3.5 API 20E test kiti içeriğindeki biyokimyasal testler ve tipik *Salmonella* reaksiyonları (devam)

Test	Substrat	Reaksiyon	(-) Sonuç	(+) Sonuç	<i>Salmonella</i> spp.
GEL	Carboal jelatin	Jelatinaz	Difüzyon yok	Siyah difüzyon	-
GLU	Glukoz	Fermantasyon/ Oksidasyon	Mavi/ Mavi-yeşil	Sarı	+
MAN	Mannitol	Fermantasyon/ Oksidasyon	Mavi/ Mavi-yeşil	Sarı	+
INO	İnositol	Fermantasyon/ Oksidasyon	Mavi/ Mavi-yeşil	Sarı	-
SOR	Sorbitol	Fermantasyon/ Oksidasyon	Mavi/ Mavi-yeşil	Sarı	+
RHA	Ramnoz	Fermantasyon/ Oksidasyon	Mavi/ Mavi-yeşil	Sarı	+
SAC	Sükroz	Fermantasyon/ Oksidasyon	Mavi/ Mavi-yeşil	Sarı	-
MEL	Melibioz	Fermantasyon/ Oksidasyon	Mavi/ Mavi-yeşil	Sarı	+
AMY	Amigdalın	Fermantasyon/ Oksidasyon	Mavi/ Mavi-yeşil	Sarı	-
ARA	Arabinoz	Fermantasyon/ Oksidasyon	Mavi/ Mavi-yeşil	Sarı	+

3.2.2 Plazmid analizleri

3.2.2.1 Plazmid izolasyonu

Plazmid izolasyonu için Kado ve Liu (1981) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı (Kado ve Liu 1981, Helmuth vd. 1985, Guerra vd. 2002). *Salmonella* suşları stok kültürden steril plastik özelerle 2 mL LB broth besiyerine inoküle edildi ve çalkalamalı (175-200 rpm) inkübatörde 37°C’de 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu kültürden mikrosantrifüj tüpüne 1,5 mL aktarılarak oda sıcaklığında 14.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi (Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf GmbH., Germany). Santrifüjden sonra üst faz atıldı ve çökelti oda sıcaklığında kurutuldu. Bakteriyel çökelti kuruduktan sonra 20 µL Kado tampon çözeltisinde kuvvetli karıştırma uygulanarak çözüldü. Bu süspansiyona 100 µL hücre parçalama çözeltisi (liziz çözeltisi) eklenerek homojen bir karışım elde edinceye kadar yavaşça karıştırıldı. Örnekler 58°C su banyosunda (GFL 1002, GFL GmbH., Germany) 27 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra taze hazırlanan 100 µL fenol:kloroform (1:1) karışımı eklendi ve elde çevirilerek beyaz renge gelinceye kadar karıştırıldı. Bu aşamadan sonra oda sıcaklığında 14.000 rpm’de 30 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj sonrası 90 µL üst faz alınarak 10 µL DNA yükleme tamponuyla karıştırıldı ve 10 dakika buz banyosunda bekletildi.

3.2.2.2 Agoroz jel elektroforezi ve plazmid görüntülenmesi

Plazmid izolatları 1X Tris Asetat EDTA (TAE) tampon çözeltisinde % 0.8 agaroz konsantrasyonu ile hazırlanan jelde 100 volt elektrik akımı uygulanarak 1.5 saat koşturuldu (Elektroforez güç kaynağı: Pharmacia EPS 500/400, İsveç). Plazmid büyüklüklerinin hesaplanması için moleküler marker olarak BAC-Tracker Supercoiled DNA Ladder (Epicentre Biotechnologies, USA) kullanıldı.

Elektroforez işlemi sonrasında agaroz jeller, 0.2 µg/mL etidyum bromit (Sigma Chem. Co., USA) çözeltisinde 20 dakika süre ile boyandı ve jelde kalan boyanın

uzaklaştırılması için 15 dakika saf su ile yıkandıktan sonra 366 nm dalga boyunda UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafları çekildi (Kodak Gel Logic 200 Imaging System).

3.2.2.3 Plazmid büyüklüklerinin saptanması

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

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

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

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

X = Marker DNA moleküllerinin agaroz jel üzerindeki göç aralığı (mm)

Y = Marker DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz)

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2.3 Antimikrobiyel duyarlılığın belirlenmesi

3.2.3.1 Disk difüzyon metodu

Kültürler steril öze aracılığı ile 4 mL LB broth ortamına inoküle edildi ve çalkalamalı (200 rpm) inkübatörde 37°C’de 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, steril saf su ile 1:100 (hacim:hacim) oranında dilüe edilen örneklerden 100 µL Müller Hinton (Oxoid, UK) agar plakları üzerine yayma ekim yapıldı. Antimikrobiyel ajanlar (Oxoid, UK) emdirilmiş 6 mm’lik steril kağıt diskler, agar yüzeyine yerleştirildi ve 37°C’de 18 saat inkübe edildi. Disk difüzyon yöntemi için, 16 farklı antimikrobiyel madde kullanıldı. Kullanılan antimikrobiyel diskler ve içerikleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. İnkübasyon sonrası, disklerin etrafındaki zon çapları ölçüldü ve Klinik Laboratuar Standartları Enstitüsü (CLSI)’nün belirlediği kırılma noktaları ile karşılaştırılarak suşlar duyarlı (S), orta dirençli (I) ve dirençli (R) olarak belirlendi (Anonymous, 2008).

3.2.3.2 Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) metodu

Duyarlılıkları saptanacak olan mikroorganizmaların, LB broth sıvı besiyerinde üretilmiş kültürlerinden steril serum fizyolojik solüsyonu içerisinde McFarland 0.5 (10^8 hücre/mL) yoğunluğunda örnekler hazırlandı ve 1:100 oranında dilüe edilmek suretiyle 10^6 hücre/mL içeren mikroorganizma süspansiyonları elde edildi. Bakterilerin üretilmesi amacıyla Müller Hinton Broth (MHB) (Oxoid, UK) besiyerleri kullanıldı. Minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) tespit edilebilmesi için 96 kuyucuklu mikropklarda mikrodilüsyon yöntemi, CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2008) M27-A protokolüne göre çalışıldı. 100 µL MHB besiyerini içeren kuyuların ilk sırasına her antibiyotik için son konsantrasyon 512 µg/mL olacak şekilde 1024 µg/mL stok çözeltilerden eklendi (Çizelge 3.3). İlk kuyucuktan başlanarak bir sonraki kuyuya 100 µL aktarıldı ve son kuyucuktan 100 µL alınarak dilüsyon işlemi tamamlandı. Dilüsyon sonrasında tüm kuyucuklara 10 µL bakteri süspansiyonu (10^6 hücre/mL) eklenerek 37°C’de 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. Mikroorganizma üremesinin gözlemlenmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak belirlendi.

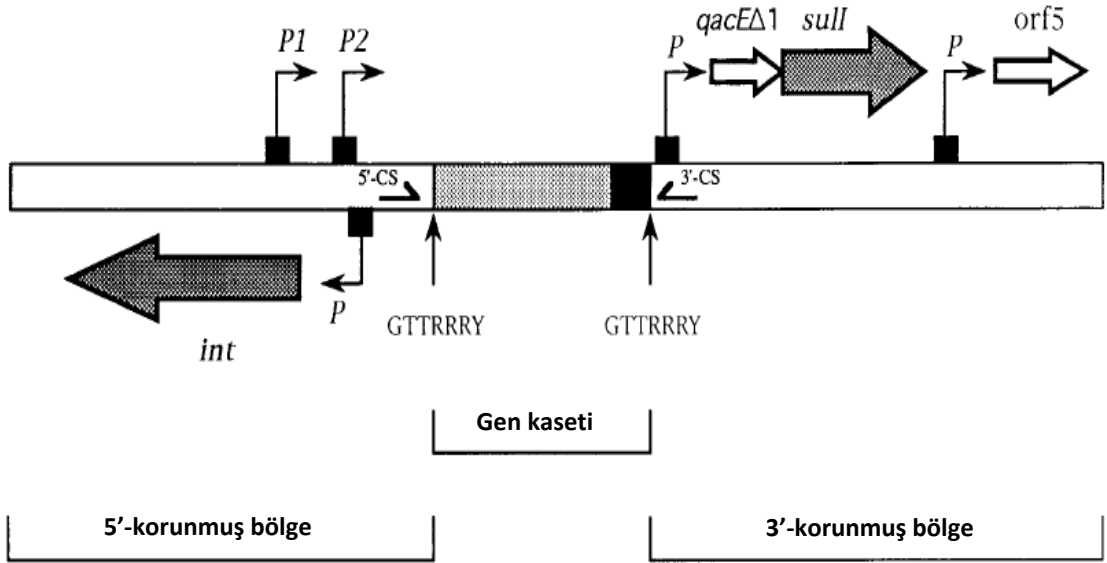
3.2.4 Genomik DNA izolasyonu

Salmonella suşlarından genomik DNA izolasyonu ticari olarak temin edilen Genomik DNA saflaştırma kiti (Fermentas, Finland) kullanılarak gerçekleştirildi. LB broth ortamında 18 saat süre ile geliştirilen kültürden 1.5 mL steril mikrosantrifüj tüplerine alınarak 7500 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi (Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf GmbH., Germany). Tüplerdeki üst sıvı atıldı ve hücre çökeltisi 200 µL Tris EDTA Tampon eklenerek çözüldü. Elde edilen bu 200 µL örnek 400 µL lizis çözültisi ile karıştırıldı ve 65°C'de kaynar su banyosunda (GFL 1002, GFL GmbH., Germany) 5 dakika süresince inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 600 µL kloroform ilave edilen tüpler 3-5 kez elde çevrilerek karıştırıldıktan sonra, 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Üst faz yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerine 800 µL çöktürme çözültisi ilave edildi. Örnekler 1-2 dakika elde karıştırıldıktan sonra 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu işlemden sonra üst sıvı döküldü ve DNA çökeltisi 100 µL 1.2 M NaCl solüsyonunda çözüldü. Çökeltinin tamamen çözüldüğüne emin olduktan sonra 300 µL soğuk etanol ilave edilerek, 10 dakika -20°C'de DNA'nın çökmesi için bekletildi. İnkübasyon süresi bitiminde 10000 rpm'de 4 dakika santrifüj işlemi uygulandı ve oluşan üst faz dökülmek suretiyle etanol uzaklaştırıldı. İzolatların tamamen kuruması beklendi. Kuruyan DNA örnekleri 100 µL steril dH₂O'da çözüldükten sonra PZR amplifikasyonlarında kullanılabilecek şekilde -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.5 İntegron analizleri

3.2.5.1 Primer dizaynı ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR amplifikasyonu için Carattoli vd. (2005) tarafından önerilen yöntem optimize edilerek uygulandı. Bu amaçla GeneAmp9700 Thermocycler (Applied BioSystems, USA) kullanıldı.



Şekil 3.3 Sınıf I integronların moleküler organizasyonu (Le'vesque vd. 1995)

İntegron analizlerinin ilk aşaması olan integron varlığının araştırılması amacıyla; Sınıf I integronların var olup olmadığının incelenmesi için 5' ve 3' korunmuş bölgelere göre dizayn edilen primer çiftinden (5'-3' CS, Şekil 3.3) yararlanıldı. Kullanılan primer dizileri Çizelge 3.4'de belirtilmiştir.

Amplifikasyon için kullanılan reaksiyon karışımı ve amplifikasyon koşulları aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmış ve uygulanmıştır.

PZR reaksiyon karışımı (tek reaksiyon için) :

- Steril distile su dH₂O.....35,5 µL
- 10X PZR tampon -MgCl₂ (Fermentas)5 µL
- dNTP (2mM Fermentas)1 µL
- İleri primer (Bioneer)1 µL
- Geri primer (Bioneer)1 µL
- MgCl₂ (25 mM Fermentas)4 µL
- Taq DNA polimeraz (5u/ml Fermentas)0,5 µL
- DNA2 µL

PZR amplifikasyon koşulları:

- 94 °C 5 dakika
 - 94 °C 30 saniye
 - 55 °C 30 saniye
 - 72 °C2 ,5 dakika
 - 72 °C5 dakika
 - 4 °C ∞
- } 30 döngü

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

3.2.5.2 İntegron bantlarının tanımlanması ve DNA dizi analizleri

İntegron analizi için PZR amplifikasyonu sonrasında, elde edilen üründen 10 µL alınarak 2 µL 6x yükleme boyası karıştırıldıktan sonra % 1 oranında agaroz içeren jelde 100 volt elektrik akımı altında 1.5 saat koşturuldu. Bant büyüklüklerinin belirlenebilmesi amacı ile 1kb DNA Marker'dan (Fermentas, Finland) yararlanıldı.

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

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

3.2.6 Klasik mutasyon ve konjugasyon denemeleri

Salmonella suşlarının içerdiği plazmidlerin giderilmesi amacı ile gelişme ortamlarında (LB Broth) konsantrasyonu 1-100 µg/mL arasında değişen oranlarda akriflavin (Sigma Chem. Co., USA) ilave edildi.

Konjugasyon denemeleri kullanılacak verici ve alıcı suş kültürleri LB broth ortamında uygun süre ve sıcaklıkta geliştirildikten sonra gerçekleştirildi. Konjugal eşleştirme için, geç eksponensiyel fazdaki kültürler (37°C'de 6-8 saat süresince ve 200 rpm karıştırma uygulanarak üretildi) kullanıldı. Mikrosantrifüj tüplerine 1'er mL alınan kültürler, 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj işlemi uygulanarak çöktürüldü. Çöktürülen hücreler, 1 mL 10 mM MgSO₄ içerisinde çözüldü. Alıcı ve verici suştan 0.5'er mL alınarak karıştırıldıktan sonra 0.4 µm por çapındaki membran filtreye emdirildi (Millipore Co. Bilkrica, MA, USA). Bu işlemi takiben, filtreler LB agar ortamı üzerine yerleştirilerek 37 °C 4 saat inkübasyona tabi tutuldu. Eşleştirme işleminden sonra bakteri karışımı 1 mL 10 mM MgSO₄ içerisinde çözüldü, PBS (fosfat ile

tamponlanmış tuz çözeltisi; % 0.8 NaCl, % 0.02 KCl, % 0.144 Na₂HPO₄, % 0.024 KH₂PO₄, pH 7.4) içerisinde seri dilüsyonları hazırlandı ve konjugantların belirlenebilmesi için seçici antibiyotikleri içeren LB agar ortamlarına inoküle edildi. Yalnız verici ve alıcı suşların tek başlarına inoküle edildiği LB ortamları ise şahit olarak kullanıldı (Ausubel vd. 1994, Casadesus ve Camacho 2002).

3.2.7 Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PZR) analizleri

RAPD-PZR analizleri için Lin vd. (1996) tarafından önerilen yöntem optimize edilerek kullanıldı. Çalışmada rastgele dizayn edilmiş 10 bazlık P1254 ve P1283 primerlerinden yararlanıldı (Çizelge 3.4). RAPD-PZR işlemi GeneAmp9700 Thermocycler cihazı (Applied BioSystems, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

PZR reaksiyon karışımı (tek reaksiyon için) :

- Steril dH₂O23,6 µL
- 10X PZR tampon -MgCl₂ +KCl (Fermentas)5 µL
- primer (Prizma)10 µL
- dNTP (10mM Fermentas)2 µL
- MgCl₂ (25 mM Fermentas) 7 µL
- Taq DNA polimeraz (5u/ml Fermentas)0,4 µL
- DNA 2 µL

PZR amplifikasyon koşulları:

- 94 °C4 dakika
 - 35 °C4 dakika
 - 72 °C4 dakika
 - 94 °C30 saniye
 - 35 °C60 saniye
 - 72 °C 2 dakika
 - 72 °C5 dakika
 - 4 °C ∞
- } 4 döngü
- } 30 döngü

Bu işlem sonrasında; 10 µL PZR ürünü, 2 µL 6x yükleme boyası karıştırıldı ve % 2 oranında agaroz içeren jel sistemlerinde 100 volt elektrik akımı uygulanarak 1.5 saat koşturuldu.

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

RAPD veri analizinde izolatlar arasında genetik benzerliği tahmin edebilmek için primerlerin amplifikasyon ürünlerinden elde edilen veriler kullanılmıştır. Agoroz jelde görüntülenen bantların varlığına '1', yokluğuna '0' verilerek bir veri matrisi oluşturulmuş ve Populasyon Genetik Analiz Programında (POPGENE v1.32) dendograma dönüştürülmüştür (Yeh vd.1997).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Suşların İzolasyonu ve Biyokimyasal Karakterizasyonu

Türkiye’de farklı bölgelerde satışa sunulan 217 adet hayvansal kaynaklı gıda kullanılarak yürütülen çalışmalar sonucunda 41 farklı örnekte *Salmonella* izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1). Bu 41 izolatın % 25’ inin kaynağı dana eti, % 75’ inin kaynağı ise tavuk etidir. Biyokimyasal test sonuçları izolatların % 89,4-% 99,9 olasılıkla *Salmonella* cinsine ait suşlar olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.1).

Piyasada açıkta satışa sunulan et örneklerinde *Salmonella* bulunma sıklığı, tavuk etlerinde diğer örneklerle oranlara çok yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar hem Türkiye’de ve hem de dünyada yürütülen izolasyon çalışmaları ile paralellik göstermektedir (Erol 1999, Schroeter vd. 2004, Erdem vd. 2005, Helms vd. 2005, Yazıcıoğlu vd. 2005). Kümes hayvancılığı ürünlerinin *Salmonella* kontaminasyonlarının başlıca kaynaklarından biri olması nedeniyle, özellikle tavuk etlerinin açık satışa sunumu, bu çalışmada da tespit edildiği üzere ciddi bir tüketici sağlığı riski taşımaktadır. Diğer yandan açıkta satılan büyük baş hayvan etlerinde de tanımlanan oranın (% 25), daha önce yürütülen araştırmalar dikkate alındığında (Serdaroğlu vd. 1996, Küplülü 1999, Anđ-Küçüker vd. 2000, Erdem vd. 2005) yüksek olduğu ortaya çıkmaktadır. Tüm bu bulgular, açıkta satılan etlerin sınırlandırılması ve hijyen kontrollerinin daha sık yapılması zorunluluğuna işaret etmektedir.

Çizelge 4.1 ISO 6579 : 2002 yöntemi ile izole edilen suşların biyokimyasal analiz sonuçları

SUŞ	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	BİLGİSAYAR ANALİZİ
IS2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4
IS4	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS6	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4
IS20	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS23	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4
IS46	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4
IS52	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS53	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS58	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS63	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4
IS64	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4
IS69	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS72	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4
IS73	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4
IS80	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS81	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS83	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS84	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS89	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS91	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4

ONPG: β-galaktozidaz; ADH: Arjinin dihidrolaz; LDC: Lizin dekarboksilaz; ODC: Ornithin dekarboksilaz; CIT: Sitrat kullanımı; H₂S: H₂S üretimi; URE: Ure hidrolizi; TDA: Deaminaz; IND: İndol üretimi; VP: Asetoin üretimi; GEL: Jelatinaz; GLU: Glukoz-; MAN: Mannitol-; INO: Inozitol-; SOR: Sorbitol-; RHA: Ramnoz-; SAC: sukroz-; MEL: Melibioz-; AMY: Amigdalın-; ARA: Arabinoz-fermentasyon/oksidasyon.

Çizelge 4.1 ISO 6579 : 2002 yöntemi ile izole edilen suşların biyokimyasal analiz sonuçları (devam)

SUŞ	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	BİLGİSAYAR ANALİZİ
IS96	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS97	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS98	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS100	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS101	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS104	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS107	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4
IS112	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS117	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS124	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS128	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS134	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS135	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS137	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS140	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4
IS141	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS148	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4
IS162	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS163	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.9
IS174	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 89.4
IS177	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp.% 99.4

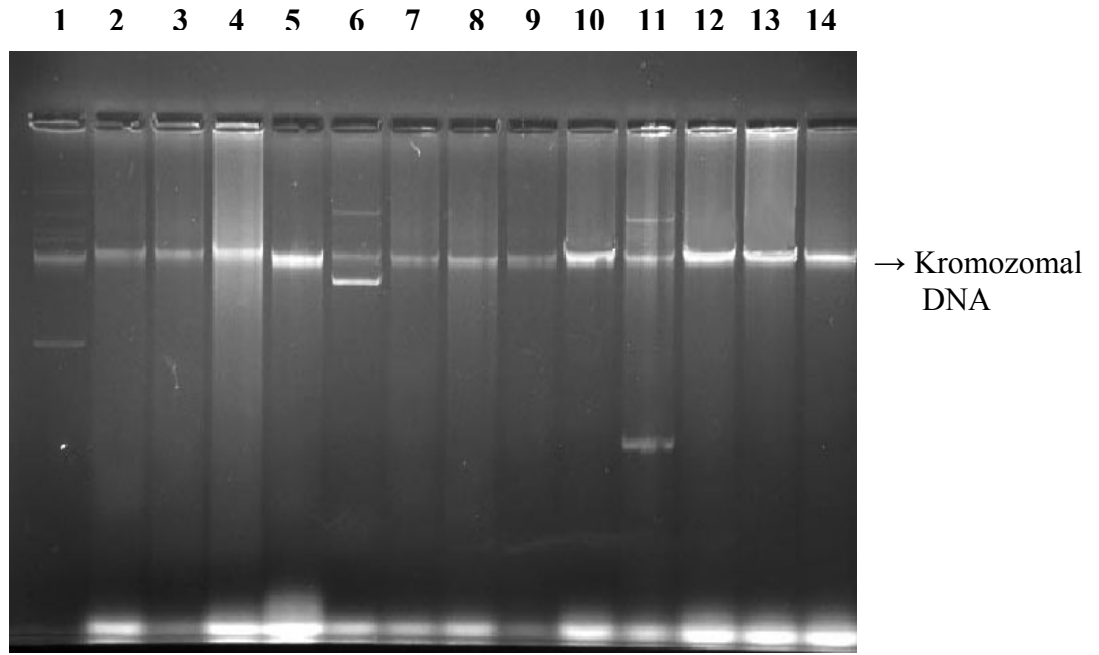
ONPG: β-galaktozidaz; ADH: Arjinin dihidrolaz; LDC: Lizin dekarboksilaz; ODC: Ornithin dekarboksilaz; CIT: Sitrat kullanımı; H₂S: H₂S üretimi; URE: Ure hidrolizi; TDA: Deaminaz; IND: İndol üretimi; VP: Asetoin üretimi; GEL: Jelatinaz; GLU: Glukoz-; MAN: Mannitol-; INO: Inozitol-; SOR: Sorbitol-; RHA: Ramnoz-; SAC: sukroz-; MEL: Melibioz-; AMY: Amigdalın-; ARA: Arabinoz fermentasyon/oksidasyon.

4.2 Suşların Plazmid Profilleri

Kado-Liu (1981) yöntemi kullanılarak *Salmonella* suşlarında tanımlanan plazmid içerikleri Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3’ de verilmiştir. IS89, IS100, IS112, IS124’de 1 adet; IS23, IS63, IS91, IS162, IS177’de 2 adet ve IS148’de 5 adet plazmid içeriği tanımlanmıştır. Plazmid büyüklükleri, 3.0 kb ve 400 kb arasında değişim göstermektedir. En büyük plazmidi (400 kb) IS124 suşu içerirken, IS89, IS91 ve IS100’ün 300 kb büyüklüğünde; IS148 ve IS177’nin 100,5 kb büyüklüğünde; IS91 ve IS162’nin 32 kb büyüklüğünde ortak plazmide sahip olduğu belirlenmiştir. IS2, IS4, IS6, IS20, IS46, IS52, IS53, IS58, IS64, IS69, IS72, IS73, IS80, IS81, IS83, IS84, IS96, IS97, IS98, IS101, IS104, IS107, IS117, IS128, IS134, IS135, IS137, IS140, IS141, IS163 ve IS174 suşları ise plazmid içermeyen doğal varyantlar olarak belirlenmiştir.

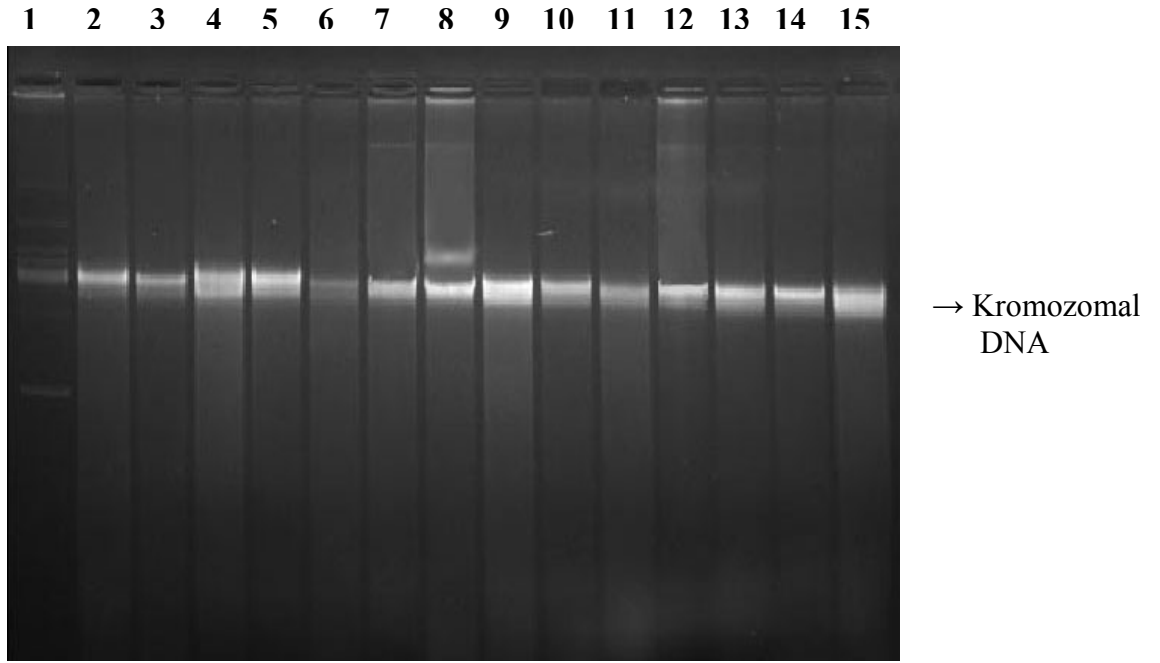
Salmonella serotipleri plazmid içerikleri bakımından önemli ölçüde farklılık içermektedir (Guerra vd. 2002, Rychlik vd. 2006). Plazmid içeren suşlarda plazmid sayısı genellikle 1-5 adet, büyüklüğü ise 2.0-500 kb arasında değişmektedir (Carrattoli vd. 2006). *Salmonella* suşlarında plazmidler; virülens özellik, antibiyotik dirençlilik, bakteriyosin ve toksin üretimi ve konjugal gen transferi gibi özellikleri kodlayabilmektedir. Bu bakteri cinsinde yukarıda ifade edildiği gibi, plazmid içeriklerinin yüksek düzeyde değişkenlik göstermesi (Gibson vd. 2006, Morgan vd. 2007), suş ayrımı ve serovaryete tanımında söz konusu moleküllerin kullanımını engellemektedir. Ancak, özellikle virülens faktörlerin lateral gen transferi yolu ile evriminde plazmidler kritik önem taşımaktadır. Diğer yandan, bu çalışmada tanımlanan ve moleküler büyüklükleri 400 kb’a kadar ulaşan megaplazmidlerin moleküler düzeyde analizi, *Salmonella* evriminde önemli ipuçları sunacaktır. Zira bu nadir plazmidler, bakteriyel evrim sürecinde farklı prokaryot gruplarında kodladıkları metabolik özellikler ve mutasyonel dengeleri bakımından genetik elastisitesinin ana kaynağını teşkil etmektedir (Srivastan ve Wang 2008, Chessa vd. 2008a).

Daha ileri çalışmalarımızda izole edilen ve koleksiyonumuzda stoğa alınan *Salmonella* plazmidlerinin fonksiyonel genetik analizlerinin yapılması planlanmaktadır.



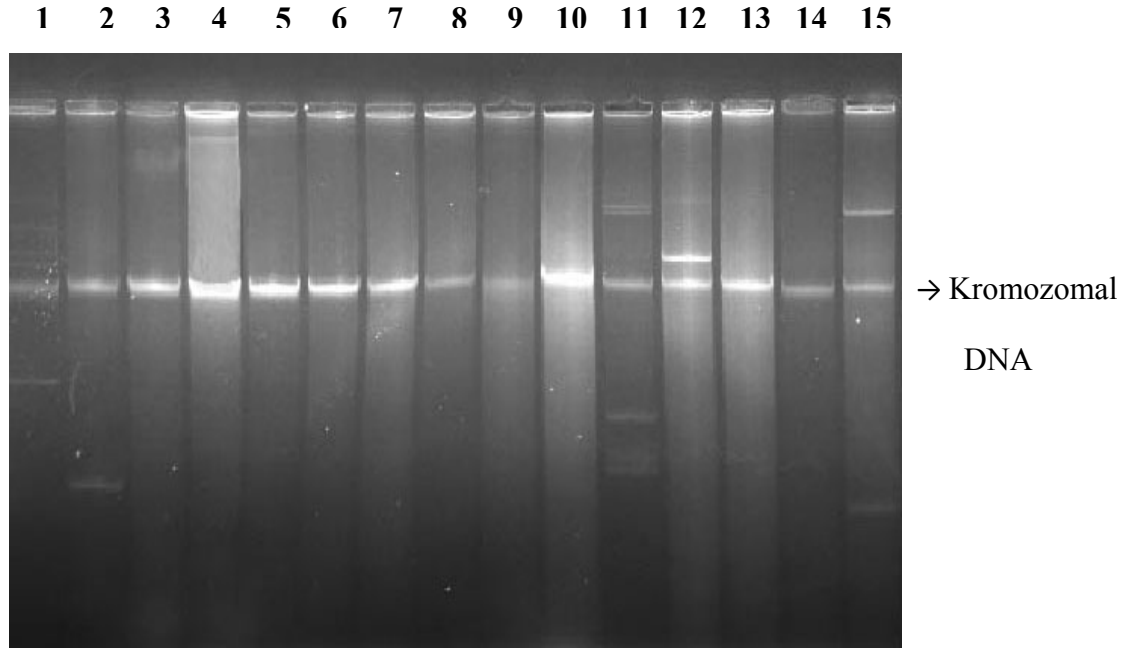
Şekil 4.1 *Salmonella* suşlarının plazmid içerikleri

Kuyu sırası	Suş	Plazmid büyüklüğü (kb)
1	Marker	165; 120; 95; 55; 38; 28; non-marker DNA; 8
2	IS2	-
3	IS4	-
4	IS6	-
5	IS20	-
6	IS23	66; 20
7	IS46	-
8	IS52	-
9	IS53	-
10	IS58	-
11	IS63	51; 5.0
12	IS64	-
13	IS69	-
14	IS72	-



Şekil 4.2 *Salmonella* suşlarının plazmid içerikleri

Kuyu sırası	Suş	Plazmid büyüklüğü (kb)
1	Marker	165; 120; 95; 55; 38; 28; non-marker DNA; 8
2	IS73	-
3	IS80	-
4	IS81	-
5	IS83	-
6	IS84	-
7	IS89	300
8	IS91	300; 32
9	IS96	-
10	IS97	-
11	IS98	-
12	IS100	300
13	IS101	-
14	IS103	-
15	IS104	-

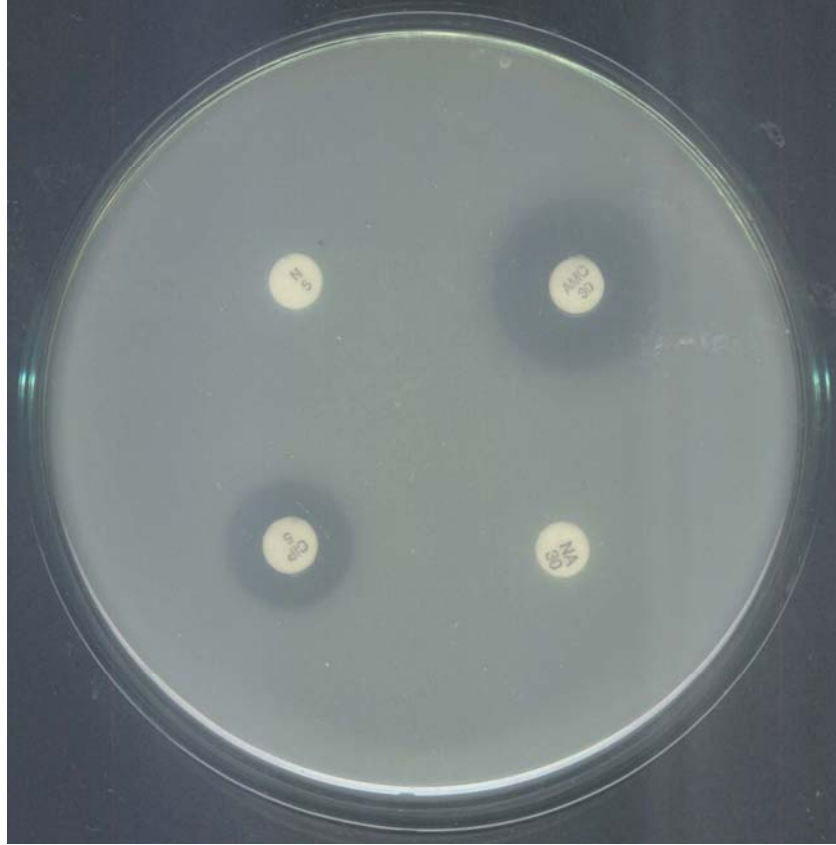


Şekil 4.3 *Salmonella* suşlarının plazmid içerikleri

Kuyu sırası	Suş	Plazmid büyüklüğü (kb)
1	Marker	165; 120; 95; 55; 38; 28; non-marker DNA; 8
2	IS112	3,5
3	IS117	-
4	IS124	400
5	IS128	-
6	IS134	-
7	IS135	-
8	IS137	-
9	IS140	-
10	IS141	-
11	IS148	120; 100,5; 6; 4,4; 4.0
12	IS162	138; 32
13	IS163	-
14	IS174	-
15	IS177	100,5; 3.0

4.3 Suşların Antibiyotik Duyarlılıkları

Çalışmada kullanılan 41 adet *Salmonella* suşunun antibiyotik duyarlılık profilleri öncelikle yapay ve doğal antibiyotik gruplarının tümünü temsil edecek şekilde seçilen 16 farklı antibiyotik diski kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Disk difüzyon yöntemi

Bu denemede antibiyotik dirençlilik fenotipi gösteren suşların duyarlılık düzeyleri ise, minimal inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) kritik dilüsyon yöntemi ile araştırılması sonucu saptanmıştır. Suşların antibiyotik duyarlılık sonuçları disk difüzyon için Çizelge 4.2 ve MİK değerleri için Çizelge 4.3 gösterilmiştir.

Suşların % 59'unun 5 yada daha fazla antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. İzolatların tümü ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, florfenikol, gentamisin (4 izolat dışında), kloramfenikol (2 izolat dışında), seftiofur antibiyotiklerine karşı duyarlı; % 49'u siprofloksasin, % 39'u kanamisin, % 59'u nalidiksik asit, % 98'i neomisin, % 54'ü spektinomisin, % 51'i streptomisin, % 100'ü sulfonamid, % 66'sı tetrasiklin, % 49'u trimetoprim, % 51'i trimetoprim/ sulfametoksazol antibiyotiklerine karşı dirençli bulunmuştur. En yüksek dirençlilik düzeyi kanamisin (R>512 µg/mL) ve nalidiksik asit (R>512 µg/mL) antibiyotiklerine karşı tanımlanırken, bunu spektinomisin (R>256 µg/mL) ve sulfonamid (R>128 µg/mL) izlemiştir.

Günümüzde enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde en önemli sorun çoklu etken bakterilerde antibiyotik dirençlilik gelişimidir (Schwarz ve Chaslus-Dancla 2001, Sturenburg ve Mack 2003, Batchelor vd. 2005). Bu nedenle özellikle hayvancılıkta, besleme ve koruma amacı ile antibiyotiklerin kontrolsüz kullanımına yönelik önlemler tüm dünyada alınmış ve güçlü takip yöntemleri geliştirilmiştir (Randall vd. 2004, Poirel vd. 2006, Chen vd. 2006, Kehrenberg vd. 2006, Chessa vd. 2008b). Türkiyede piyasaya sunulan et örneklerinden izole edilen 41 *Salmonella* suşunun tamamının çoklu ilaç dirençlilik özelliği göstermesi, bu sorunun ülkemiz için ne derece önemli olduğuna işaret etmektedir. Özellikle hayvan beslemede antibiyotik kullanımının kontrolsüz oluşu, bu sorunun ana kaynağını teşkil etmektedir. Zira kontrolsüz antibiyotik kullanımının dirençliliğin gelişiminde seçici baskı oluşturduğu moleküler genetik ve biyokimyasal araştırmalar sonucu tespit edilmiştir (Ngwai vd. 2006, Avşaroğlu vd. 2007, Lapierre vd. 2008). Özellikle gelişmiş ülkelerdeki bulgularla karşılaştırıldığında (Liebana vd. 2002, Malorny vd. 2003, Marimón vd. 2004, şenses vd. 2007, Nógrády vd. 2008, Shahada vd. 2009), Türkiye'den izole edilen suşlarda çok daha yüksek oranda çoklu ilaç dirençlilik fenotipine sahip *Salmonella* suşlarının tanımlanması, bu kontrolsüz antibiyotik kullanımına bağlı seçici baskının rolünü açıkça ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar; gıda üretiminde antibiyotikler başta olmak üzere, gıda koruyucularının kullanımının kontrolünde yeni stratejilerin gerekliliğini ön plana çıkarmaktadır.

Ülkemiz için bir diğer kritik nokta ise; *Salmonella* suşlarının serovaryete düzeyinde tanısının rutin yapıldığı herhangi bir laboratuvarın bulunmayışıdır. Gıda örneklerinde *Salmonella* analizleri sadece “var”, “yok” testleri ile gerçekleştirilmektedir. Ancak serovaryete düzeyinde tanı, gerek antibiyotik direnç gelişiminin kökeni ve gerekse klonal yayılmanın düzeyini göstermesi açısından vazgeçilmez bir öneme sahiptir. Ancak bu bilgiler ışığında *Salmonella* enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisinde etkin çözümler geliştirilebilir. Bu nedenle serotiplendirmelerin rutin olarak yapılacağı ve kontrollerin bu doğrultuda yönlendirileceği laboratuvarların kurulması ve geliştirilmesi zorunludur. Bu konuda öncülük Tarım ve Orman Bakanlığı ile Sağlık Bakanlığı tarafından gerçekleştirilmelidir.

Çizelge 4.2 *Salmonella* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları

Suş	Antibiyotikler (µg/mL)															
	AMP	AMC	CHL	CIP	EFT	FFC	GEN	KAN	NAL	NEO	SPE	STR	SUL	TET	TMP	SXT
IS2	S	S	S	I	I	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
IS4	S	S	S	I	I	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
IS6	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
IS20	S	S	S	R	I	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
IS23	S	S	S	I	I	I	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S
IS46	S	S	S	I	I	I	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
IS52	S	S	S	I	I	I	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S
IS53	S	S	I	R	I	I	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R
IS58	S	S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R
IS63	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
IS64	S	S	S	I	I	S	S	I	S	R	S	S	R	S	S	S
IS69	S	S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS72	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
IS73	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
IS80	S	S	I	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
IS81	S	S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS83	S	S	R	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
IS84	S	S	S	R	I	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R
IS89	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S
IS91	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S
IS96	S	I	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
IS97	I	S	S	I	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R

AMP: Ampisilin; AMC: Amoksisilin/klavulanik asit; CHL: Kloramfenikol; CIP: Siprofloksasin; EFT: Seftiofur; FFC: Florfenikol; GEN: Gentamisin; KAN: Kanamisin; NAL: Nalidiksik asit; NEO:Neomisin; SPE: Spektinomisin; STR: Streptomisin; SUL: Sulfonamid bileşikleri; TET: Tetrasiklin; TMP: Trimetoprim; SXT: Sulfametoksazol/Trimetoprim; S: Duyarlı; I: Orta dirençli; R: Dirençli.

Çizelge 4.2 *Salmonella* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları (devam)

Suş	Antibiyotikler (µg/mL)															
	AMP	AMC	CHL	CIP	EFT	FFC	GEN	KAN	NAL	NEO	SPE	STR	SUL	TET	TMP	SXT
IS98	I	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R
IS100	S	S	S	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS101	I	S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS104	S	S	I	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS107	I	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
IS112	I	S	S	R	I	S	S	S	R	R	S	S	R	I	S	S
IS117	I	S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS124	I	S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS128	S	S	I	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS134	S	S	I	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS135	S	I	S	R	I	S	I	I	S	R	S	R	R	R	S	S
IS137	S	I	I	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS140	S	S	S	I	I	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
IS141	S	S	I	R	I	S	S	S	R	R	I	R	R	R	S	I
IS148	S	I	R	I	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS162	S	S	S	I	I	S	S	S	R	R	I	S	R	I	S	S
IS163	S	S	I	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS174	S	S	S	I	I	S	I	I	S	R	S	S	R	S	S	S
IS177	S	S	S	I	I	S	S	S	R	R	S	S	R	I	S	S

AMP: Ampisilin; AMC: Amoksisilin/klavulanik asit; CHL: Kloramfenikol; CIP: Siprofloksasin; EFT: Seftiofur; FFC: Florfenikol; GEN: Gentamisin; KAN: Kanamisin; NAL: Nalidiksik asit; NEO:Neomisin; SPE: Spektinomisin; STR: Streptomisin; SUL: Sulfonamid bileşikleri; TET: Tetrasiklin; TMP: Trimetoprim; SXT: Sulfametoksazol/Trimetoprim; S: Duyarlı; I: Orta dirençli; R: Dirençli.

Çizelge 4.3 *Salmonella* suşlarında antibiyotik dirençlilik düzeyleri

Suş	Antibiyotikler (µg/mL)														
	AMP	AMC	CHL	CIP	EFT	FFC	GEN	KAN	NAL	NEO	SPE	STR	SUL	TET	TMP
IS2	S(<8)	S(<8)	S(<8)	I(>2)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<16)	S(<16)	R(>16)	S(<16)	S(<8)	R(>64)	S(<4)	S(<8)
IS4	S(<8)	S(<8)	S(<8)	I(>2)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<16)	S(<16)	R(>16)	S(<16)	S(<8)	R(>128)	S(<4)	S(<8)
IS6	S(<8)	S(<8)	S(<8)	S(<1)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<16)	S(<8)	R(>16)	S(<8)	S(<8)	R(>128)	S(<4)	S(<8)
IS20	S(<8)	S(<8)	S(<8)	R(>4)	I(>4)	I(>8)	S(<4)	S(<16)	R(>512)	R(>16)	R(>256)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	R(>64)
IS23	S(<8)	S(<8)	S(<8)	I(>2)	I(>4)	I(>8)	S(<4)	S(<16)	S(<16)	R(>16)	S(<32)	S(<8)	R(>128)	R(>32)	S(<8)
IS46	S(<8)	S(<8)	S(<8)	I(>2)	I(>4)	I(>8)	S(<4)	S(<16)	S(<16)	R(>16)	S(<16)	S(<8)	R(>128)	S(<4)	S(<8)
IS52	S(<8)	S(<8)	S(<8)	I(>2)	I(>4)	I(>8)	S(<4)	S(<16)	R(>512)	R(>16)	R(>128)	S(<8)	R(>128)	R(>32)	S(<8)
IS53	S(<8)	S(<8)	I(>16)	R(>4)	I(>4)	I(>8)	S(<4)	R(>512)	R(>512)	R(>32)	R(>128)	S(<8)	R(>128)	R(>32)	S(<8)
IS58	S(<8)	S(<8)	S(<8)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	R(>512)	R(>512)	R(>32)	R(>256)	S(<8)	R(>64)	R(>32)	R(>32)
IS63	S(<8)	S(<8)	S(<8)	S(<1)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<16)	S(<16)	R(>16)	S(<32)	S(<8)	R(>128)	S(<4)	S(<8)
IS64	S(<8)	S(<8)	S(<8)	I(>2)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	I(>32)	S(<16)	R(>16)	S(<8)	S(<8)	R(>128)	S(<4)	S(<8)
IS69	S(<8)	S(<8)	S(<8)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	R(>512)	R(>512)	R(>32)	R(>256)	R(>16)	R(>128)	R(>32)	R(>32)
IS72	S(<8)	S(<8)	S(<8)	S(<1)	S(<2)	S(<4)	S(<4)	S(<16)	S(<16)	R(>16)	S(<16)	S(<8)	R(>128)	S(<4)	S(<8)
IS73	S(<8)	S(<8)	S(<8)	S(<1)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<16)	S(<8)	R(>16)	S(<16)	S(<8)	R(>128)	S(<4)	S(<8)
IS80	S(<8)	S(<8)	I(>16)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<8)	R(>512)	R(>16)	R(>256)	R(>16)	R(>128)	R(>64)	R(>64)
IS81	S(<8)	S(<8)	S(<8)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	R(>512)	R(>512)	R(>32)	R(>256)	R(>16)	R(>128)	R(>32)	R(>64)
IS83	S(<8)	S(<8)	R(>32)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<8)	R(>512)	R(>16)	R(>256)	R(>16)	R(>128)	R(>64)	R(>64)
IS84	S(<8)	S(<8)	S(<8)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<8)	R(>512)	R(>16)	R(>256)	S(<8)	R(>128)	R(>32)	R(>64)
IS89	S(<8)	I(>16)	S(<8)	S(<1)	S(<2)	S(<4)	S(<4)	S(<8)	S(<16)	R(>16)	S(<16)	R(>32)	R(>128)	R(>32)	S(<8)
IS91	S(<8)	I(>16)	S(<8)	S(<1)	S(<2)	S(<4)	S(<4)	S(<8)	S(<16)	R(>16)	S(<16)	S(<8)	R(>128)	R(>16)	S(<8)
IS96	S(<8)	I(>16)	S(<8)	S(<1)	S(<2)	S(<4)	S(<4)	R(>512)	S(<16)	R(>16)	R(>128)	R(>16)	R(>64)	R(>16)	R(>16)
IS97	I(>16)	S(<8)	S(<8)	I(>2)	S(<2)	S(<4)	S(<4)	R(>64)	R(>256)	R(>16)	R(>128)	R(>16)	R(>64)	R(>16)	R(>16)

AMP: Ampisilin; AMC: Amoksisilin/klavulanik asit; CHL: Kloramfenikol; CIP: Siprofloksasin; EFT: Seftiofur; FFC: Florfenikol; GEN: Gentamisin; KAN: Kanamisin; NAL: Nalidiksik asit; NEO: Neomisin; SPE: Spektinomisin; STR: Streptomisin; SUL: Sulfonamid bileşikleri; TET: Tetrasiklin; TMP: Trimetoprim; S: Duyarlı; I: Orta dirençli; R: Dirençli.

Çizelge 4.3 *Salmonella* suşlarında antibiyotik dirençlilik düzeyleri (devam)

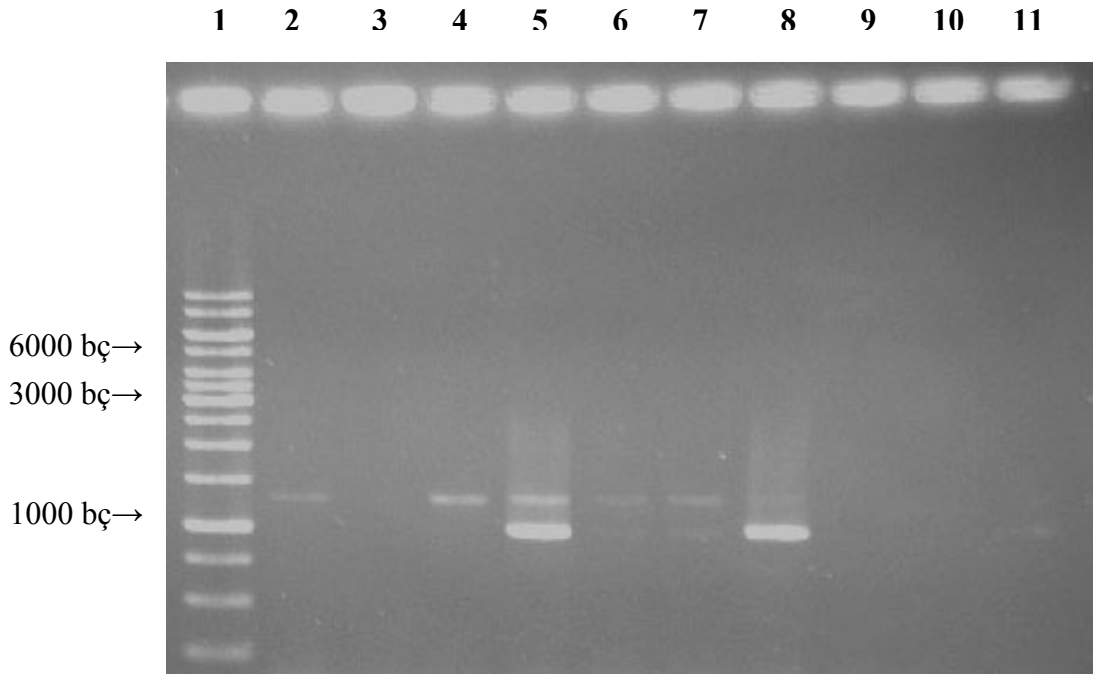
Suş	AMP	AMC	CHL	CIP	EFT	FFC	GEN	KAN	NAL	NEO	SPE	STR	SUL	TET	TMP
IS98	I(>16)	S(<8)	S(<8)	R(>4)	S(<2)	S(<4)	S(<4)	R(>256)	S(<16)	S(<8)	R(>128)	R(>16)	R(>64)	R(>32)	R(>16)
IS100	S(<8)	S(<8)	S(<8)	I(>2)	S(<2)	S(<4)	S(<4)	R(>512)	R(>128)	R(>16)	R(>128)	R(>16)	R(>128)	R(>64)	R(>64)
IS101	I(>16)	S(<8)	S(<8)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	R(>128)	R(>256)	R(>32)	R(>128)	R(>16)	R(>128)	R(>64)	R(>64)
IS104	S(<8)	S(<8)	I(>16)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	R(>128)	R(>256)	R(>32)	R(>256)	R(>64)	R(>128)	R(>64)	R(>128)
IS107	I(>16)	S(<8)	S(<8)	S(<1)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<16)	S(<16)	R(>32)	S(<32)	S(<8)	R(>128)	S(<4)	S(<8)
IS112	I(>16)	S(<8)	S(<8)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<16)	R(>256)	R(>16)	S(<16)	S(<8)	R(>128)	I(>8)	S(<8)
IS117	I(>16)	S(<8)	S(<8)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	R(>128)	R(>128)	R(>128)	R(>128)	R(>16)	R(>128)	R(>64)	R(>32)
IS124	I(>16)	S(<8)	S(<8)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	R(>128)	R(>256)	R(>32)	R(>128)	R(>16)	R(>64)	R(>64)	R(>64)
IS128	S(<8)	S(<8)	I(>16)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	R(>16)	R(>512)	R(>256)	R(>32)	R(>128)	R(>16)	R(>64)	R(>16)	R(>32)
IS134	S(<8)	S(<8)	I(>16)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	R(>16)	R(>512)	R(>256)	R(>32)	R(>128)	R(>16)	R(>128)	R(>64)	R(>64)
IS135	S(<8)	I(>16)	S(<8)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	I(>8)	I(>32)	S(<8)	R(>16)	S(<8)	R(>16)	R(>128)	R(>32)	S(<8)
IS137	S(<8)	I(>16)	I(>16)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	R(>16)	R(>64)	R(>256)	R(>32)	R(>256)	R(>16)	R(>128)	R(>64)	R(>64)
IS140	S(<8)	S(<8)	S(<8)	I(>2)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<16)	S(<8)	R(>16)	S(<16)	S(<8)	R(>128)	S(<4)	S(<8)
IS141	S(<8)	S(<8)	I(>16)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<16)	R(>256)	R(>16)	I(>64)	R(>16)	R(>128)	R(>32)	S(<8)
IS148	S(<8)	I(>16)	S(<8)	I(>2)	I(>4)	S(<4)	R(>16)	R(>64)	R(>256)	R(>64)	R(>128)	R(>16)	R(>128)	R(>32)	R(>64)
IS162	S(<8)	S(<8)	S(<8)	I(>2)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<16)	R(>256)	R(>16)	I(>64)	S(<8)	R(>128)	I(>8)	S(<8)
IS163	S(<8)	S(<8)	I(>16)	R(>4)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	R(>64)	R(>256)	R(>32)	R(>128)	R(>16)	R(>128)	R(>64)	R(>64)
IS174	S(<8)	S(<8)	S(<8)	I(>2)	I(>4)	S(<4)	I(>8)	I(>32)	S(<16)	R(>16)	S(<32)	S(<8)	R(>128)	S(<4)	S(<8)
IS177	S(<8)	S(<8)	S(<8)	I(>2)	I(>4)	S(<4)	S(<4)	S(<16)	R(>256)	R(>16)	S(<32)	S(<8)	R(>128)	I(>8)	S(<8)

AMP: Ampisilin; AMC: Amoksisilin/klavulanik asit; CHL: Kloramfenikol; CIP: Siprofloksasin; EFT: Seftiofur; FFC: Florfenikol; GEN: Gentamisin; KAN: Kanamisin; NAL: Nalidiksik asit; NEO: Neomisin; SPE: Spektinomisin; STR: Streptomisin; SUL: Sulfonamid bileşikleri; TET: Tetrasiklin; TMP: Trimetoprim; S: Duyarlı; I: Orta dirençli; R: Dirençli.

4.4 *Salmonella* Suşlarında Sınıf I İntegron Analizleri

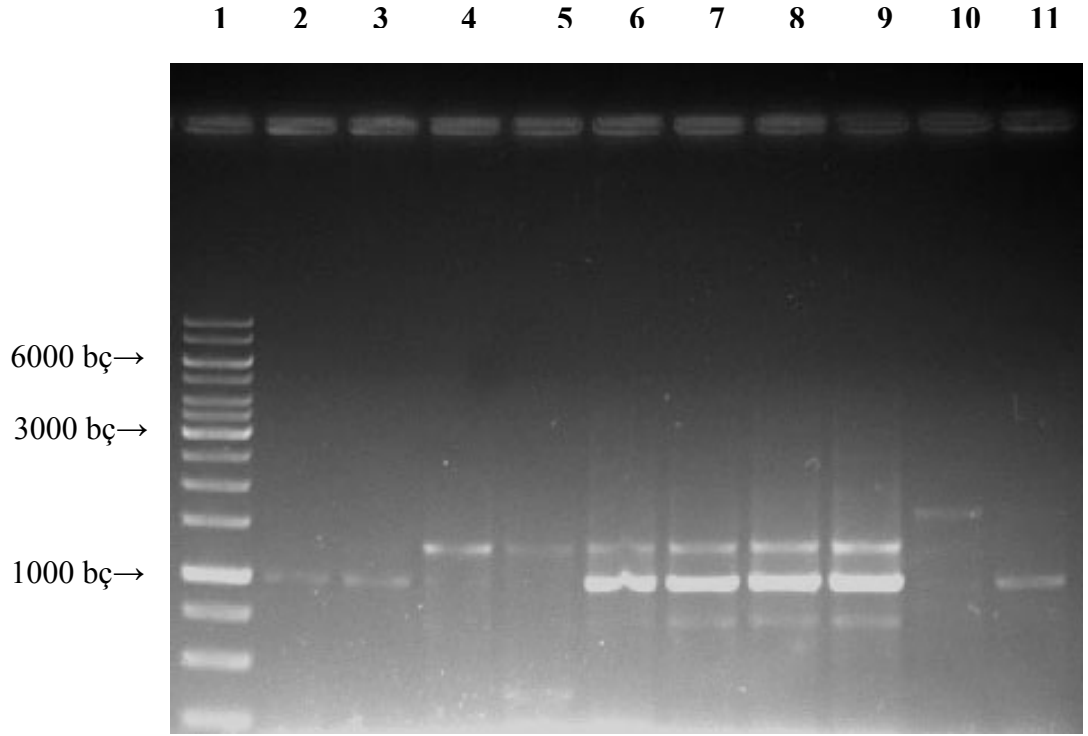
Sınıf I integronlara özgü primerler kullanılarak, *Salmonella* suşlarında 32 izolat için 1000 bç; 17 izolat için 1200 bç; 2 izolat için 1600 bç ve 4 izolat için ise 700 bç büyüklüğünde integronların varlığı belirlenmiş, 5 izolatta ise Sınıf I integron belirlenmemiştir (Şekil 4.5-4.8).

İntegronlar, başka kaynaklardan gen kasetlerini yapılarına alabilen ve heterolog konakçılarda ifadelerini sağlayabilen genetik elementler olarak tanımlanmaktadır (Duijkeren vd. 2002, Gay vd. 2006). Bu genetik elementler genetik transfer yeteneği içermemekle birlikte, konjugatif plazmidler ya da transpozonlara entegre olmaları halinde, tür içi ya da türler arası yatay gen transferleri gerçekleştirebilmektedir (Guerra vd. 2004, Asai vd. 2007, Nógrády vd. 2008, Martinez vd. 2009). Bu gen transferi sayesinde yakaladıkları gen kasetlerinin evriminde kritik bir öneme sahiptirler. Özellikle *Salmonella* antibiyotik dirençlilik adalarının evriminde Sınıf I integronların kritik bir role sahip olduğu belirlenmiştir (Clewell vd. 1985, Gebreyes ve Altier 2002, Nógrády vd. 2007, Nógrády vd. 2008, Peron vd. 2008). Çalışmamızda tanımlanan, 1000 ve 1200 bç büyüklükte Sınıf I integronlar *Salmonella*'da antibiyotik dirençlilik gen kasetleri ile ilişkili bulunmuştur. Ancak yine bu araştırmada Sınıf I integron primerleri kullanılarak çoğaltılan 1600 bç ve 700 bç büyüklükteki fragmentler yeni kayıtlardır. Sınıf I integronların Türkiye kökenli suşlara özgü varyasyonlarını tanımlayan bu bulgular, antibiyotik dirençlilik gelişimi açısından incelenmeye değer özellik taşımaktadır.



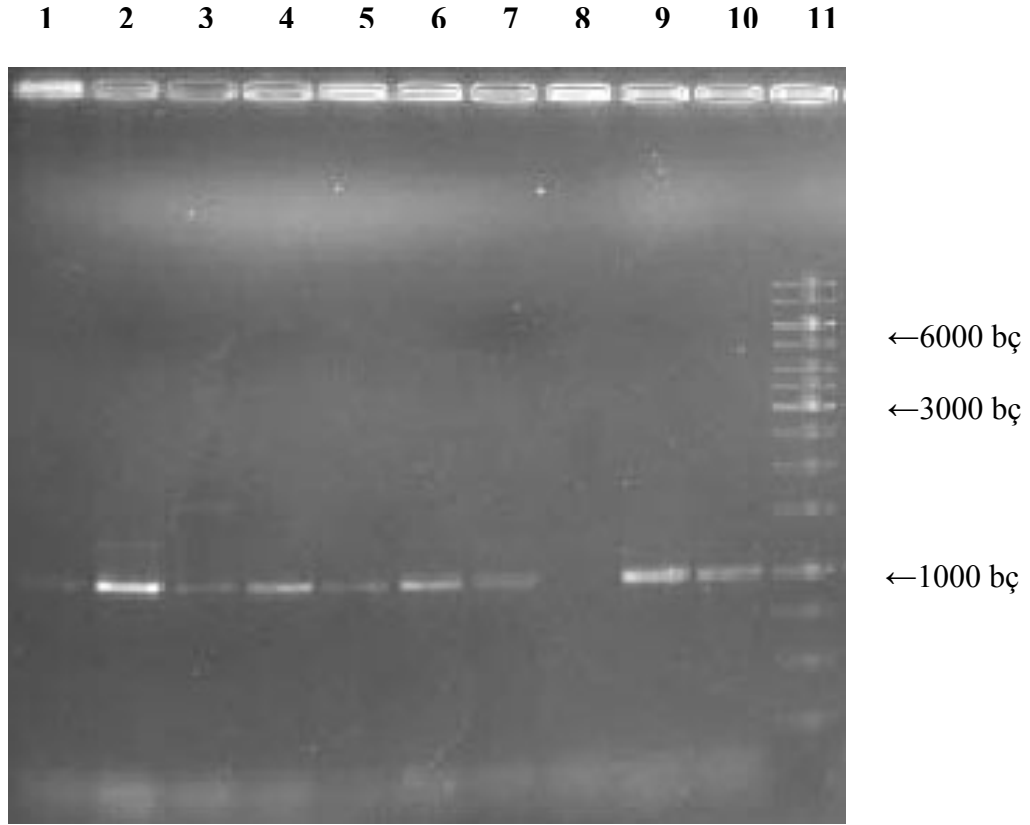
Şekil 4.5 *Salmonella* suşlarında Sınıf I integronların analizi

Kuyu sırası	Suş	PZR ürünü (bç)
1	Marker	250-10000
2	IS2	1200
3	IS4	-
4	IS6	1200
5	IS20	1200; 1000
6	IS23	1200; 1000
7	IS46	1200; 1000
8	IS52	1200; 1000
9	IS53	-
10	IS58	-
11	IS63	1000



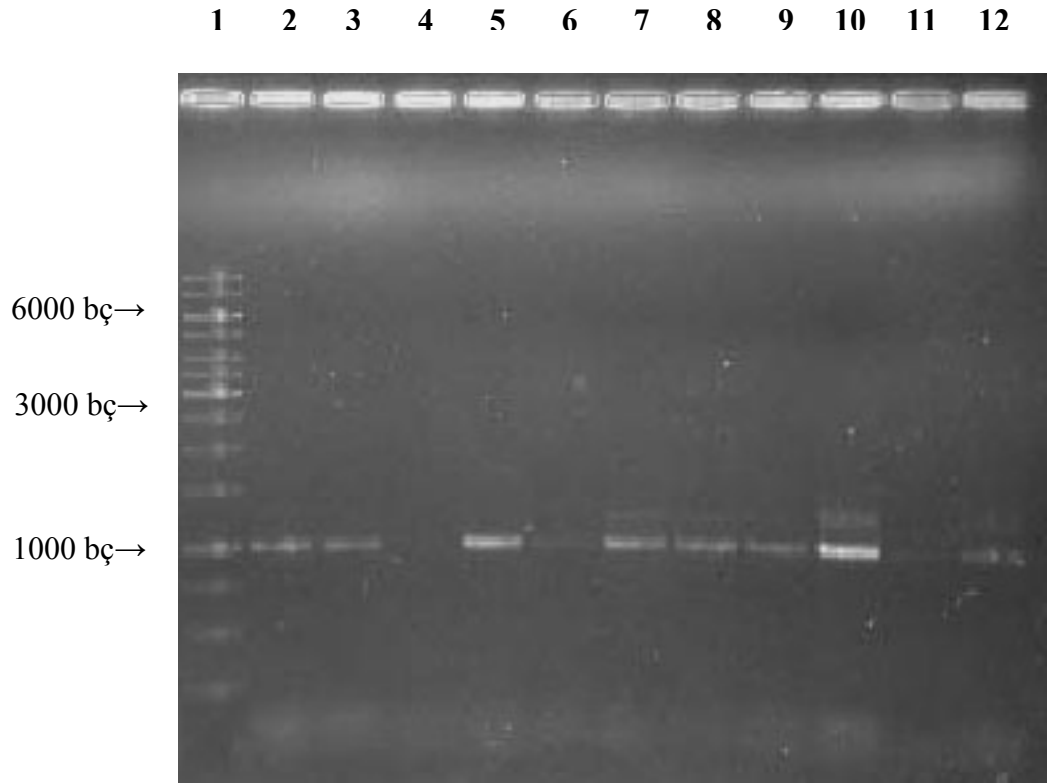
Şekil 4.6 *Salmonella* suşlarında Sınıf I integronların analizi

Kuyu sırası	Suş	PZR ürünü (bç)
1	Marker	250-10000
2	IS64	1000
3	IS69	1000
4	IS72	1200; 1000
5	IS73	1200
6	IS80	1200; 1000; 700
7	IS81	1200; 1000; 700
8	IS83	1200; 1000; 700
9	IS84	1200; 1000; 700
10	IS89	1600
11	IS91	1000



Şekil 4.7 *Salmonella* suşlarında Sınıf I integronların analizi

Kuyu sırası	Suş	PZR ürünü (bç)
1	IS96	1000
2	IS97	1200; 1000
3	IS98	1600; 1000;
4	IS100	1000
5	IS101	1000
6	IS104	1000
7	IS107	1000
8	IS112	-
9	IS117	1000
10	IS124	1000
11	Marker	250-10000



Şekil 4.8 *Salmonella* suşlarında Sınıf I integronların analizi

Kuyu sırası	Suş	PZR ürünü (bç)
1	Marker	250-10000
2	IS128	1000
3	IS134	1000
4	IS135	-
5	IS137	1000
6	IS140	1000
7	IS141	1200; 1000
8	IS148	1200; 1000
9	IS162	1000
10	IS163	1200; 1000
11	IS174	1000
12	IS177	1200; 1000

4.5 Klasik Mutasyon Testleri ve Konjugasyon

Akriflavin uygulaması ile gerçekleştirilen klasik mutasyon denemeleri sonucunda, plazmidleri giderilen hiçbir suşun antibiyotik dirençlilik profilinde değişim meydana gelmemiştir. Elde edilen veriler, antibiyotik dirençli *Salmonella* suşlarında dirençlilik fenotiplerinin plazmid kökenli olmadığına işaret etmektedir. Bu sonuçlar konjugatif aktarım çalışmaları ile de doğrulanmıştır. Konjugasyon denemelerinin hiçbirinde antibiyotik dirençli verici suşlardan alıcı suşlara plazmid transferi gerçekleşmemiştir. Bu durum söz konusu bakterilerde konjugatif sistemlerin etkin olmadığını kanıtlamamaktadır. Kullanılan yöntem özellikle konjugatif transpozonların düşük aktarım etkinliğini belirlemede yetersiz olabilir. Bu nedenle genomda transpozon spesifik primerler aracılığı ile transpozon tanımlama çalışmalarının yapılması ve tanımlanması, transpozonların integronlarla ilişkisinin belirlenmesi planlanmaktadır.

4.6 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Analizleri

Salmonella izolatları arasındaki genetik benzerlik düzeylerinin tahmini için 2 farklı primer kullanılarak RAPD-PZR profili oluşturulmuştur. İzolatlar arasındaki ilişkiyi tanımlamada amplifikasyon ürünleri temel alınmıştır.

P1254 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PZR bant içeriklerine göre *Salmonella* izolatları 15 farklı genetik profil oluşturmuştur (Şekil 4.9).

11 izolat (IS4, IS58, IS64, IS69, IS72, IS73, IS80, IS81, IS97, IS100, IS137) A₁ profilinde 364 bç' lik tek amplifiye ürüne,

4 izolat (IS101, IS104, IS117, IS128) B₁ profilinde 1944; 1666; 1241; 921; 850; 665; 585; 500; 364 bç olmak üzere 9 amplifiye ürüne,

4 izolat (IS20, IS23, IS52, IS53) C₁ profilinde 750; 364 bç olmak üzere 2 amplifiye ürüne,

3 izolat (IS162, IS163, IS177) D₁ profilinde 1241; 1000; 364 bç olmak üzere 3 amplifiye ürüne,

3 izolat (IS89, IS91, IS98) E₁ profilinde 2227; 2000; 1396; 1137; 895; 842; 750; 364 bç olmak üzere 8 amplifiye ürüne,

3 izolat (IS83, IS124, IS134) F₁ profilinde 1944; 1666; 1241; 364 bç olmak üzere 4 amplifiye ürüne,

3 izolat (IS141, IS148, IS174) G₁ profilinde 1944; 1241;1000; 364 bç olmak üzere 4 amplifiye ürüne,

2 izolat (IS2, IS63) H₁ profilinde 881; 364 bç olmak üzere 2 amplifiye ürüne,

2 izolat (IS135, IS140) I₁ profilinde 1944; 364 bç olmak üzere 2 amplifiye ürüne,

1 izolat (IS6) J₁ profilinde 2136; 1972; 1722; 1413; 1258; 1120; 1000; 828; 710; 500; 403; 364; 292 bç olmak üzere 13 amplifiye ürüne,

1 izolat (IS46) K₁ profilinde 881; 750; 364 bç olmak üzere 3 amplifiye ürüne,

1 izolat (IS84) L₁ profilinde 1241; 364 bç olmak üzere 2 amplifiye ürüne,

1 izolat (IS96) M₁ profilinde 895; 842; 364 bç olmak üzere 3 amplifiye ürüne,

1 izolat (IS107) N₁ profilinde 1944; 1846; 1396; 1000; 895; 760; 665; 500; 403; 364 bç olmak üzere 10 amplifiye ürüne,

1 izolat (IS112) O₁ profilinde 1944; 1846; 1474; 1396; 1200; 895; 750; 665; 500; 403; 364 bç olmak üzere 13 amplifiye ürüne, sahip bulunmuştur.

P1254 primeri kullanılarak gerçekleştirilen RAPD-PZR çalışmaları sonucunda bütün *Salmonella* izolatlarının 364 bç'lik ortak bir fragmente sahip olduğu belirlenmiştir.

P1283 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PZR bant içeriklerine göre *Salmonella* izolatları 8 farklı genetik profil oluşturmuştur (Şekil 4.10).

29 izolat (IS4, IS6, IS58, IS64, IS69, IS72, IS73, IS80, IS81, IS83, IS84, IS97, IS100, IS101, IS104, IS107, IS112, IS117, IS124, IS128, IS134, IS135, IS137, IS140, IS141, IS148, IS162, IS163 ve IS174), A₂ profilinde 1966; 1065; 937; 765; 607; 535; 437 bç olmak üzere 7 amplifiye ürüne,

3 izolat (IS91, IS96 ve IS98), B₂ profilinde 1566; 1413; 1065; 573; 500; 205 bç olmak üzere 6 amplifiye ürüne,

2 izolat (IS2 ve IS63), C₂ profilinde 1966; 1700; 1326; 1087; 1065; 937; 765; 535; 437 bç olmak üzere 10 amplifiye ürüne,

2 izolat (IS20 ve IS23) D₂ profilinde 1966; 1900; 1065; 984; 937; 765; 607; 535; 437 bç olmak üzere 9 amplifiye ürüne,

2 izolat (IS52 ve IS53) E₂ profilinde 1966; 1900; 1326; 1065; 984; 937; 765; 607; 535; 437 bç olmak üzere 10 amplifiye ürüne,

1 İzolat (IS46) F₂ profilinde 1966; 1900; 1065; 984; 937; 765; 535; 437 bç olmak üzere 8 amplifiye ürüne,

1 izolat (IS89) G₂ profilinde 1566; 1413; 1065; 937; 765; 573; 500; 437; 205 bç olmak üzere 9 amplifiye ürüne,

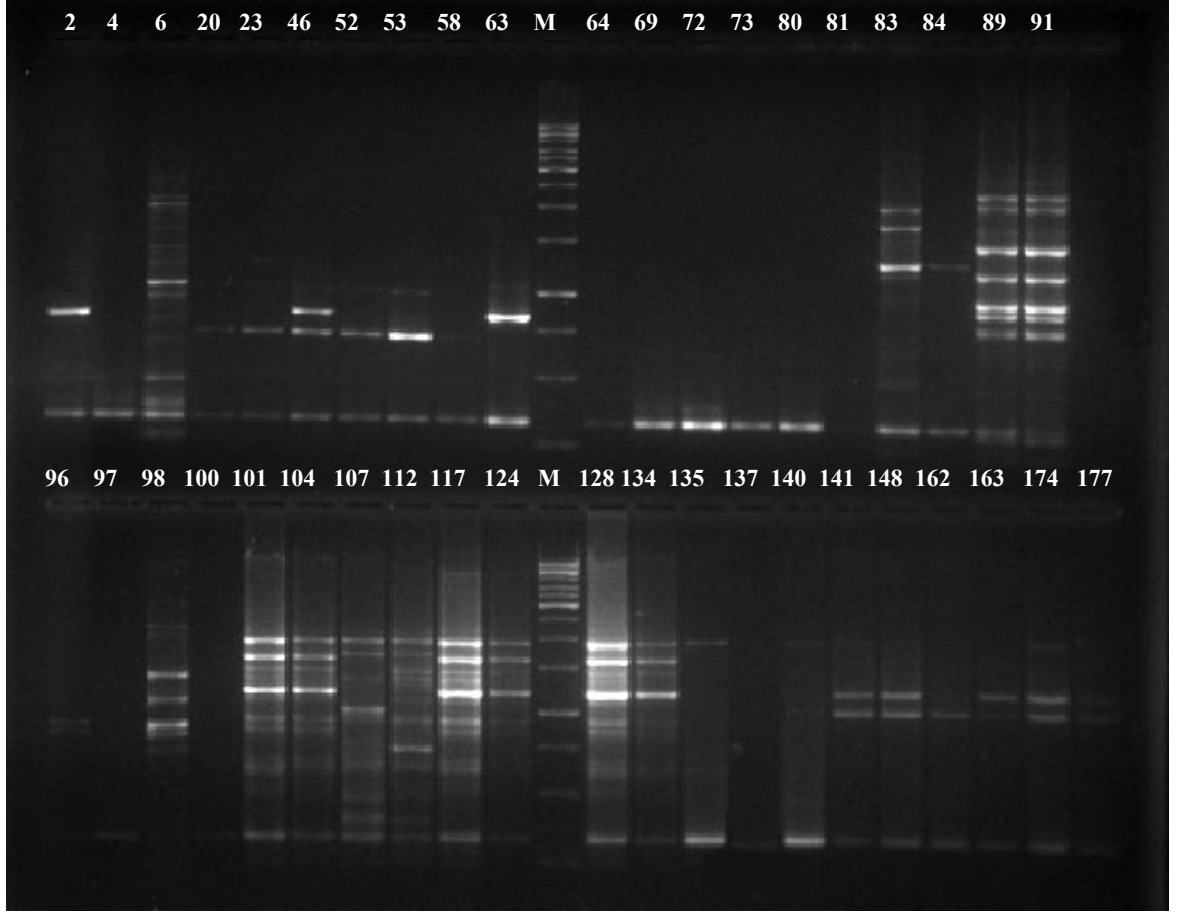
1 izolat (IS177) H₂ profilinde 1065; 607; 535 bç olmak üzere 3 amplifiye ürüne, sahip bulunmuştur.

P1283 primeri kullanılarak gerçekleştirilen RAPD-PZR çalışmaları sonucunda bütün *Salmonella* izolatlarının 1065 bç'lik ortak bir fragmente sahip olduğu belirlenmiştir.

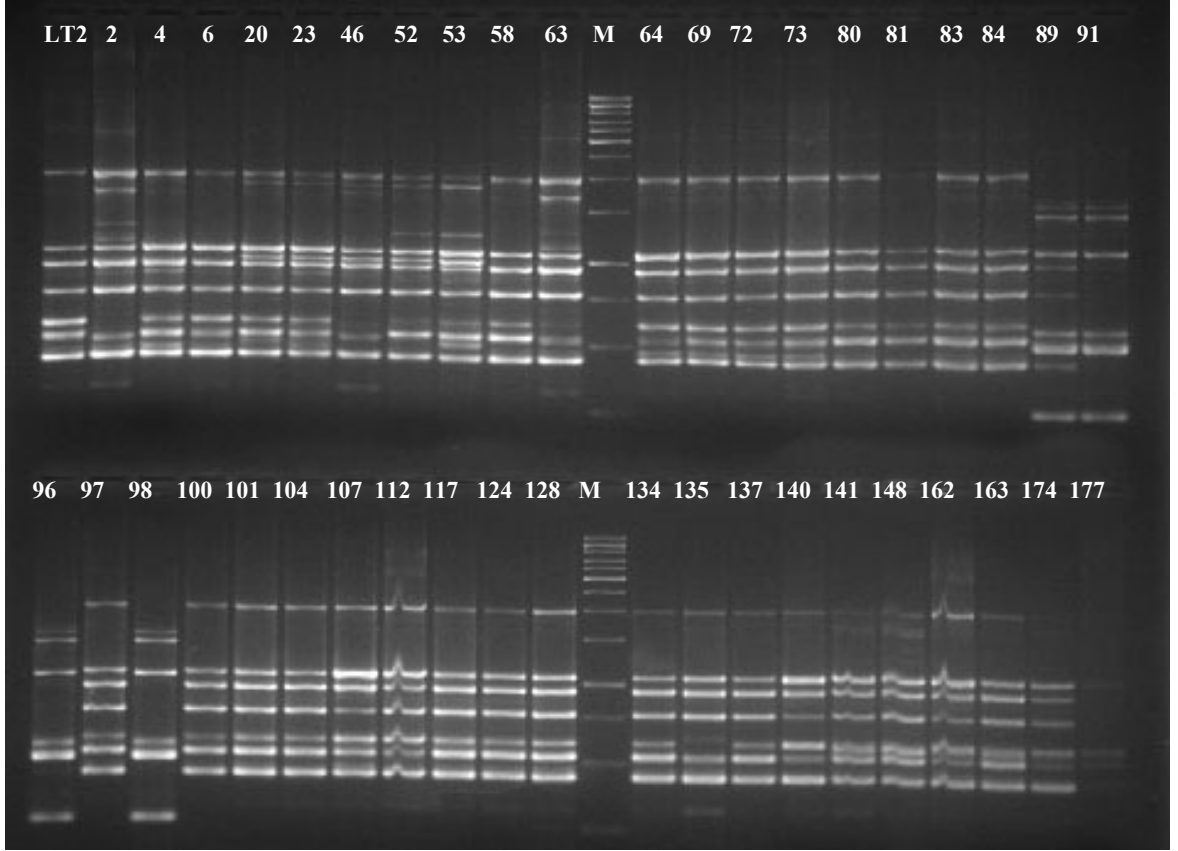
P1254 ve P1283 primerleri kullanılarak yapılan RAPD-PZR amplifikasyonu sonucunda elde edilen profillerle yürütülen dendogram analizleri suşların filogenetik ilişkisini tanımlamış (Şekil 4.11) ve bu esasa göre suşlarda filogenetik ilişkiyi belirleyen 18 farklı RAPD-PZR profili saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Salmonella suşlarının yayılmasının klonal ya da farklı kaynaktan olup olmadığının belirlenmesi, bu suşların yol açtığı enfeksiyonların takibi, kontrolü ve tedavisinde ana stratejilerin geliştirilmesi için temel hareket noktasını teşkil etmektedir (Olive ve Bean 1999, Yan vd. 2003). Bu amaçla kullanılan en etkin yöntemlerden biri RAPD-PZR tekniğidir (Laconcha vd. 1998, Betancor vd. 2004, Oliveira vd. 2007).

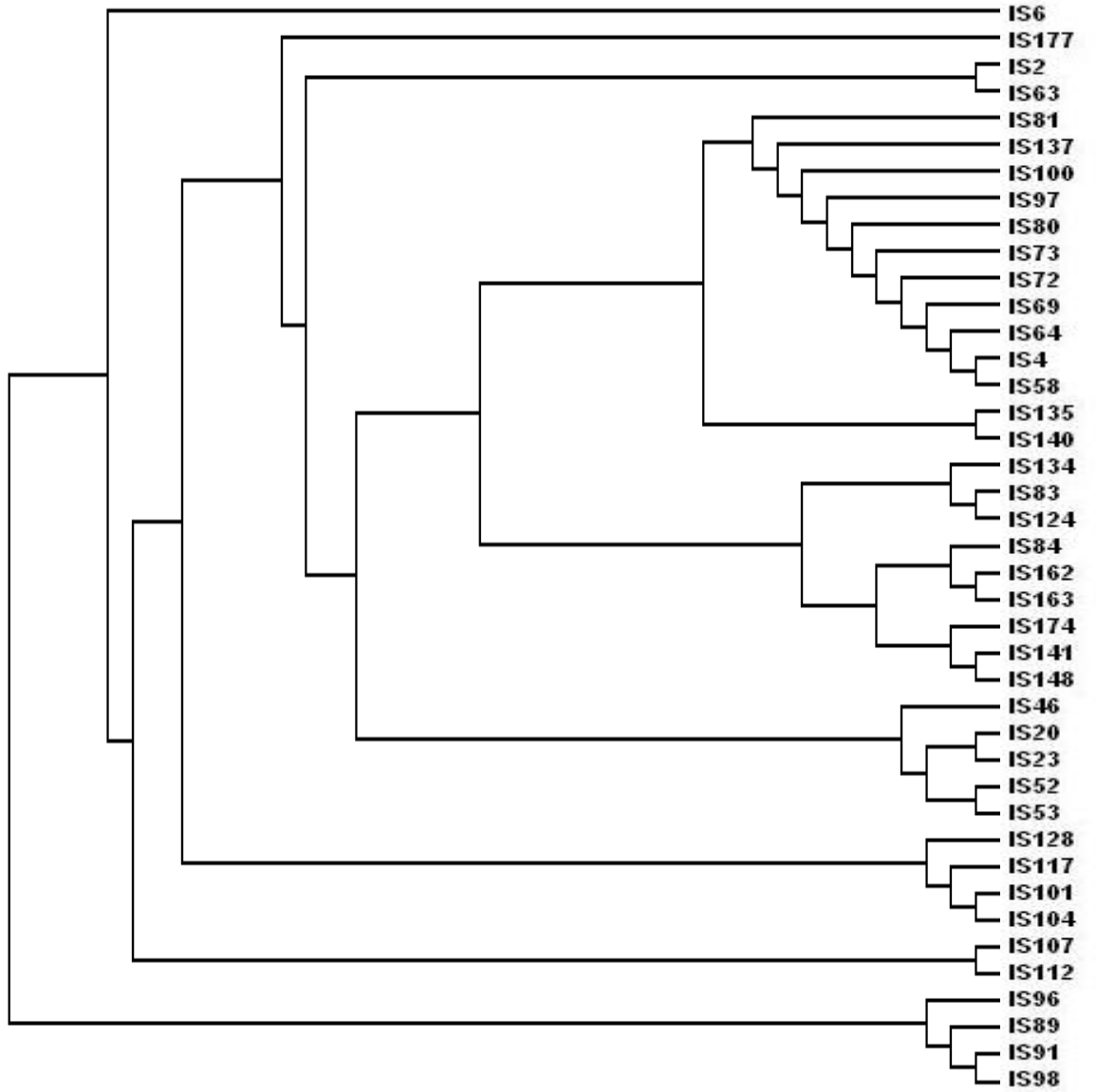
İki farklı primer kullanılarak gerçekleştirilen RAPD-PZR analizleri; bu çalışmada tanımlanan *Salmonella* izolatlarının hem farklı kökenlerini ve hem de klonal yayılımlarını saptamada etkin bulunmuştur. Farklı gruplar içinde klonal yayılmanın genetik esasının detaylandırılması, bu ana şema esas alınarak gerçekleştirilebilir. Gıda kökenli *Salmonella* suşlarının ve söz konusu suşların yol açtığı enfeksiyonların izlenmesinde zorunluluk arz eden bu aşama, ancak tüm Türkiye'de tanımlanan *Salmonella* suşlarına ait bütün genetik, biyokimyasal ve serolojik verilerin, bir otorite kontrolünde toplanması ile mümkündür.



Şekil 4.9 Suşlarda P1254 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PZR bant profilleri



Şekil 4.10 Suşlarda P1283 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PZR bant profilleri



Şekil 4.11 RAPD-PZR amplifikasyon sonucu elde edilen verilere göre izolatlar arasındaki genetik benzerliği gösteren dendrogram

Çizelge 4.4 *Salmonella* suşlarında P1254 ve P1283 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RAPD-PZR amplifikasyonu sonrasında elde edilen RAPD-PZR profilleri

SUŞLAR	P1254	P1283
IS4, IS58, IS64, IS69, IS72, IS73, IS80, IS81, IS97, IS100, IS137	A ₁	A ₂
IS101, IS104, IS117, IS128	B ₁	A ₂
IS20, IS23	C ₁	D ₂
IS52, IS53	C ₁	E ₂
IS162, IS163	D ₁	A ₂
IS177	D ₁	H ₂
IS91, IS98	E ₁	B ₂
IS89	E ₁	G ₂
IS83, IS124, IS134	F ₁	A ₂
IS141, IS148, IS174	G ₁	A ₂
IS2, IS63	H ₁	C ₂
IS135, IS140	I ₁	A ₂
IS6	J ₁	A ₂
IS46	K ₁	F ₂
IS84	L ₁	A ₂
IS96	M ₁	B ₂
IS107	N ₁	A ₂
IS112	O ₁	A ₂

5. SONUÇ

Açıkta satılan et örnekleri, özellikle tavuk etleri *Salmonella* kontaminasyonu açısından en yüksek riski taşımaktadır. Diğer yandan tanımlanan *Salmonella* suşlarının % 59'unun çoklu antibiyotik dirençlilik özelliğine sahip bulunması, ülkemizde *Salmonella* enfeksiyonlarının kontrolünün giderek zorlaştığını kanıtlamaktadır. Tez kapsamında elde edilen bulgular, çoklu ilaç dirençlilik fenotipinin kontrolsüz antibiyotik kullanımının yarattığı seçici baskıdan kaynaklandığına işaret etmesi; gerek klinik ve gerekse hayvan beslemede antibiyotik kullanımının sınırlandırılmasının ve takibinin acil olarak gerçekleştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Türkiye kökenli bazı *Salmonella* suşlarında, ilaç dirençlilik gen kasetlerinin yakalanması ve yatay transferi ile yakından ilişkili sınıf I integronların farklı genetik varyantlar içermesi, antibiyotik direnç gelişiminde bazı farklı mekanizmaları kullandıklarına işaret etmektedir. Özellikle bu değişken sınıf I integronların detaylı genetik analizi *Salmonella*'da çoklu ilaç dirençliliğin evrimine yeni bir bakış açısı kazandıracaktır.

Salmonella kontaminasyonlarının klonal dağılımının izlenmesi, çoklu ilaç dirençliliğin gelişiminin tanımında önemli ipuçları sunmaktadır. Bu çalışmada Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) analizleri oluşturulan veri tabanı, Türkiye'de benzer çalışmalara temel oluşturması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- Alcaine, S.D., Warnick, L.D. and Wiedmann, M. 2007. Review Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. Journal of Food Protection, 70(3), 780-790.
- Anđ-Küçüker, M., Tolun, V., Helmuth, R., Rabsch, W., Boral, Ö., Akbulut, D., Susever, S. and Ang, Ö. 2000. Phage types, antibiotic susceptibilities and plasmid profiles of *Salmonella* typhimurium and *Salmonella* enteritidis strains isolated in İstanbul, Turkey. Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 6, 593-599.
- Anonim. 2002. BS EN ISO 6579: (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- Anonymous. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 18th informational supplement. CLSI, M100-S18 Clinical and Laboratory Standards Institute, 940, PA, USA.
- Asai, T., Ishihara, K., Harada, K., Kojima, A., Tamura, Y., Sato, S. and Takahashi, T. 2007. Long-Term Prevalence of Antimicrobial-Resistant *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Serovar Infantis in the Broiler Chicken Industry in Japan. Microbiology and Immunology, 51(1), 111-115.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1994. Current protocols in molecular biology, 4. Baskı, New York.
- Avşaroğlu, M.D., Helmuth, R., Junker, E., Hertwig, S., Schroeter, A., Akçelik, M., Bozoglu, F. and Guerra, B. 2007. Plasmid-mediated quinolone resistance conferred by qnrS1 in *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated from Turkish food of avian origin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60, 1146-1150.
- Batchelor, M., Hopkins, K., Threlfall, E.J., Clifton-Hadley, F.A., Stallwood, A.D., Davies, R.H. and Liebana, E. 2005. blactx-m genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 1319-1322.
- Baumler, A.J., Tsolis, R.M., Bowe, F.A., Kusters, J.G., Hoffmann, S. and Heffron, F. 1996. The pef fimbrial operon of *S. Typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. Infection and Immunity, 64(1), 61-68.

- Betancor, L., Schelotto, F., Martinez, A., Pereira, M., Algorta, G., Rodríguez, M.A., Vognoli, R. and Chabalgoity, J.A. 2004. Random Amplified Polymorphic DNA and Phenotyping Analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1155-1162.
- Bolton, A.J., Osborne, M.P. and Stephen, J. 2000. Comparative study of the invasiveness of *Salmonella* serotypes Typhimurium, Choleraesuis and Dublin for Caco-2 cells, HEp-2 cells and rabbit ileal epithelia. *International Journal of Medical Microbiology*, 49(6), 503-511.
- Campbell, G.S. 1974. A Simple Method for Determining Unsaturated Conductivity From Moisture Retention Data. *Soil Science*, 177(6), 311-387.
- Carattoli, A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32, 243-259.
- Carattoli, A., Tosini, F., Giles, W.P., Rupp, M.E., Hinrichs, S.H., Angulo, F.J., Barrett, T.J. and Fey, P.D. 2002. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1269-1272.
- Carattoli, A. 2003. Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica*. *Current Issues in Molecular Biology*, 5, 113-122.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L. and Threlfall, E.J. 2005. Identification of plasmids by PZR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 219-228.
- Casadesus, J. and Camacho, E. M. 2002. Genetic Mapping in *Salmonella enterica*. In: *Prokaryotic genomics*. M. Blot (ed). Birkhäuser, pp. 10-20, Basel/Switzerland.
- Chen, Y.T., Shu, H.Y., Li, L.H., Liao, T.L., Wu, K.M., Shiao, Y.R., Yan, J.J., Su, I.J., Tsai, S.F. and Lauderdale, T.L. 2006. Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum-beta-lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 3861-3866.
- Chessa, D., Winter, M.G., Nuccio, S., Tükel, Ç. and Bäumlér, A.J. 2008a. RosE represses Std fimbrial expression in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 68(3), 573-587.
- Chessa, D., Dorsey, C.W., Winter, M. and Bäumlér, A.J. 2008b. Binding Specificity of *Salmonella* Plasmid-encoded Fimbriae Assessed by Glycomics. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8118-8124.

- Clewell, D.B., An, F.Y., White, B.A. and Gavron-Burke, C. 1985. Sex pheromones and plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: a pheromone, cAM373, which is also excreted by *Staphylococcus aureus*. *Basic Life Science*, 30, 489-503.
- Duijkeren, E., Wannet, W.J.B., Houwers D.J. and Pelt, W. 2002. Serotype and Phage Type Distribution of *Salmonella* Strains Isolated from Humans, Cattle, Pigs and Chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3980-3985.
- Elder, J.K. and Southern E.M. 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis II: Comparison of methods for relating mobility to fragment length. *Analytical Biochemistry*, 128(1), 227-231.
- Elder, R.T., Loh, E.Y. and Davis, R.W. 1983. RNA from the yeast transposable element *TyI* has both ends in the direct repeats, a structure similar to retrovirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 80, 2432-2436.
- Erdem, B., Ercis, S., Hascelik, G., Gur, D., Gedikoglu, S., Aysev, A.D., Sumerkan, B., Otkun, M. ve Tuncer, I. 2005. Antimicrobial resistance patterns and serotype distribution among *Salmonella enterica* strains in Turkey, 2000-2002. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24, 220-225.
- Erol, İ. 1999. Hayvansal gıdalardan kaynaklanan *Salmonella* infeksiyonları. *İnfeksiyon Dergisi*, 13, 123-127.
- Esaki, H., Morioka, A., Kojima, A., Ishihara, K., Asai, T., Tamura, Y., Izumiya, H., Terajima, J., Watanabe, H. and Takahashi, T. 2004. Epidemiological characterization of *Salmonella* Typhimurium DT104 prevalent among food-producing animals in the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program (1999-2001). *Microbiology and Immunology*, 48, 553-556.
- Fajardo, A., Martinez-Martin, N. and Mercadillo, M. 2008. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS ONE*, 3, e1619.
- Fitzgerald, C., Sherwood, R., Gheesling, L.L., Brenner, F.W. and Patricia, I. 2003. Fields molecular analysis of the *rfb* O antigen gene cluster of *Salmonella enterica* serogroup O:6,14 and development of a serogroup-specific PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 6099-6105.
- Fluit, A.C. and Schmitz, F.J. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 272-288.
- Fluit, A.C. 2005. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43, 1-11.

- Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P. and Lambert, T. 2005. Worldwide Disseminated *armA* Aminoglycoside Resistance Methylase Gene Is Borne by Composite Transposon *Tn1548*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2949-2953.
- Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, H.C., Jacoby, G., Barrett, T.J., Medalla, F., Chiller, T.M. and Hooper, D.C. 2006. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Non-Typhi Serotypes of *Salmonella enterica*. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 297-304.
- Gebreyes, W.A. and Altier, C. 2002. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine 2002. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2813-2822.
- Gerber, M., Walch, C., Löffler, B., Tischendorf, K., Reischl, U. and Ackermann, G. 2008. Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 776-783.
- Gibson, D.L., White, A.P., Snyder, S.D., Martin, S., Heiss, C. and Azadi, P. 2006. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, 188(22), 7722-7730.
- Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R. and Mendoza, M.C. 2002. Characterisation of a Self-Transferable Plasmid from *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Clinical Isolates Carrying Two Integron-Borne Gene Cassettes Together with Virulence and Drug Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 2977-2981.
- Guerra, B., Junker, E., Miko, A., Helmuth, R. and Mendoza, M.C. 2004. Characterization and localization of drug resistance determinants in multi-resistant, integron carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease*, 10, 83-91.
- Haas, D., and Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 307-319.
- Halawani, E. and Shohayeb, M. 2008. Molecular Characterisation of Multiple Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Enteritidis Isolated in Saudi Arabia. *World Journal of Medical Sciences*, 3(1), 43-49.
- Hamilton-Miller, J. M. 2004. Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23, 209-212.

- Hastings, P.J., Rosenberg, S.M. and Slack, A. 2004. Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 12(9), 401-404.
- Helms, M., Ethelberg, S., Molbak, K. and the DT104 Study Group 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 Infections, 1992-2001. *Emerging Infectious Diseases*, 11(6), 859-867.
- Helmuth, R., Stephan R., Bunge C., Hoog B., Steinbeck A. and Bulling E. 1985. Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infection and Immunity*, 48, 175-182.
- Hohmann, E. L. Nontyphoidal salmonellosis. 2001. *Clinical Infection Diseases*, 263-269.
- Hradecka, H., Karasova, D. and Rychlik, I. 2008. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium conjugative plasmids transferring resistance to antibiotics and their interaction with the virulence plasmid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 932-941.
- Kado, C.I. and Liu, S.T. 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *Journal of Bacteriology*, 145, 1365-1373.
- Kehrenberg, C., Friederichs, S., de Jong, A., Michael, G.B. and Schwarz, S. 2006. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 18-22.
- Kehrenberg, C., de Jong, A., Friederichs, S., Cloeckert, A. and Schwarz, S. 2007. Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian *Salmonella* serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 886-892.
- Küplülü, Ö. 1999. Sığır karkaslarında *Salmonella* kontaminasyonu ve serotip dağılımı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 46, 25-34.
- Laconcha, I., López-Molina, N., Rementeria, A., Audicana, A., Perales, I. and Garaizar, J. 1998. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 40, 27-34.
- Lapierre, L., Cornejo, J., Borie, C., Toro, C. and San Martin, B. 2008. Genetic Characterisation of Antibiotic Resistance Genes Linked to Class 1 and Class 2 Integrons in Commensal Strains of *Escherichia coli* isolated from Poultry and Swine. *Microbial Drug Resistance*, 14, 265-272.

- Lawson, A.J., Dassama, M.U., Ward, L.R. and Threlfall, E.J. 2002. Multiply resistant (MR) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 12 and DT 120: a case of MR DT 104 in disguise? *Emerging Infection Diseases*, 8, 434–436.
- Lee, C.A., Silva, M., Siber, A.M., Kelly, A., Galyov, J.E. and McCormick, B.A. 2000. A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. *PNAS*, 97(22), 12283-12288.
- Levy, S.B. 1998. Multidrug resistance – a sign of the times. *The New England Journal of Medicine*, 338, 1376–1378.
- Levy, S.B. and Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10, 122–129.
- Lévesque, C., Piché, L., Larose, C. and Roy, P.H. 1995. PZR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1), 185-191.
- Liebana, E., Clouting, C., Cassar, C.A. Randall, L.P., Walker, R.A. Threlfall, E.J., Clifton-Hadley F.A., Ridley, A.M. and Davies, R.H. 2002. Comparison of *gyrA* mutations, cyclohexane resistance, and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1481–1486.
- Lin, A.W., Usera, M.A., Barrett, T.J. and Godsby, R.A. 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 870–876.
- Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F. and Martinez, J.L. 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceeding The National Academy of Sciences of the USA*, 103, 19484–19489.
- Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L. and Woodford, N. 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 165-174.
- Lubelski, J., Konings, W.N. and Driessen, A.J. 2007. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 463–476.
- Macia, M.D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Perez, J. L. and Oliver, A. 2005. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49, 3382–3386.

- Macrina, F.L., Kopecko, D.J., Jones, K.R., Ayers, D.J. and McCowen, S.M. 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid*, 1(3), 417-420.
- Malorny, B., Schroeter, A., Guerra, B. and Helmuth, R. 2003. Incidence of quinolone resistance in strains of *Salmonella* isolated from poultry, cattle and pigs in Germany between 1998 and 2001. *The Veterinary Record*, 22, 643-648.
- Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., Martinez, L. and Nordmann, P. 2005. Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 71-76.
- Marimón, J.M., Gomáriz, M., Zigorraga, C., Cila, G. and Perez-Trallero, E. 2004. Increasing Prevalance of Quinolone Resistance in Human Nontyphoid *Salmonella enterica* Isolates Obtained in Spain from 1983 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 3789-3793.
- Martinez, J.L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J.F., Solano, L. and Sánchez, M.B. 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Review*, 33, 44-65.
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nquyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R. and Wilson, R. K. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413(6858), 852-856.
- Miriagou, V., Carattoli, A. and Fanning, S. 2006. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes and Infection*, 8, 1923-1930.
- Morgan, E., Bowen, A.J., Carnell, S.C., Wallis, T.S. and Stevens, M.P. 2007. SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infection and Immunity*, 75(3), 1524-1533.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A. and Pollard, T.D. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *PNAS*, 95(11), 6181-6186.
- Ngwai, Y.B., Adachi, Y., Ogawa, Y. and Hara, H. 2006. Characterization of biofilm-forming abilities of antibiotic-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 on hydrophobic abiotic surfaces. *Journal of Microbiology Immunology and Infection* 39(4), 278-291.

- Nógrády, N., Tóth, A., Kostyák, A., Pászti, J. and Nagy, B. 2007. Emergence of multidrug-resistant clones of *Salmonella* Infantis in broiler chickens and humans in Hungary. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 645-648.
- Nógrády, N., Kardos, G., Bistyák, A., Turcsányi, I., Mészáros, J., Galántai, Z., Juhász, Á., Samu, P., Kaszanzyitzky, J. É., Pászti, J. and Kiss, I. 2008. Prevalence and characterization of *Salmonella* Infantis isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 162-167.
- Ohl, M.E. and Miller, S.I. 2001. *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52(1), 259-274.
- Olive, D.M. and Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1661-1669.
- Oliveira, F.A., Frazzon, A.P.G., Brandelli, A. and Tondo, E.C. 2007. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. *Journal of Infection in Developing Countries*, 1(2), 170-176.
- Pepper, J.W. 2003. The evolution of evolvability in genetic linkage patterns. *BioSystems*, 69, 115-126.
- Peron, G.G., Bell, G. and Quessy, S. 2008. Paralel evolution of multidrug-resistant *Salmonella enterica* from swine. *FEMS Microbial Letter*, 281, 17-22.
- Pigliucci, M. 2008. Is evolvability evolvable? *Nature Reviews Genetics*, 9, 75–82.
- Poirel, L., Leviandier, C. and Nordmann, P. 2006. Prevalence and genetic analysis of plasmid mediated quinolone resistance determinants *qnrA* and *qnrS* in Enterobacteriaceae in a French University Hospital. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 50, 3992-3997.
- Rabatsky-Her, T., Rossiter, J.W., Holland, S.B., Stamey, K., Headrick, M.L., Barrett, T.J. and Frederick, A.J. 2004. Multidrug-resistant Strains of *Salmonella enterica* Typhimurium, United States, 1997-1998. *Emerging Infection Diseases*, 10, 795- 801.
- Raffatellu, M., Wilson, R.P., Chessa, D., Andrews-Polymenis, H., Tran Q.T. and Lawhon, S. 2005. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity*, 73(1), 146–154.
- Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Tükel, Ç., Akçelik, M. and Baumler, A.J. 2006. Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infection and Immunity*, 74(1), 19-27.

- Randall, L.P., Cooles, S.W., Osborn, M.K., Piddock, L.J.V. and Woodward, M.J. 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 208-216.
- Rychlik, I., Gregorova, D. and Hradecka, H. 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology*, 112, 1-10.
- Schaffer, H.E. and Sederoff, R.R. 1981. Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 115(1), 113-122.
- Schroeter, A., Hoog, B. and Helmuth, R. 2004. Resistance of *Salmonella* isolates in Germany. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 51, 389-392.
- Schwarz, S. and Chaslus-Dancla, E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 32, 201-225.
- Schwarz, S., Cloeckert, A. and Roberts, M.C. 2006. Mechanisms and Spread of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. In: *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. Frank M. Aarestrup (ed). ASM Press, pp.73-98, Washington, DC.
- Serdaroğlu, E., Ersoy, B., Atlıhan, F., Aydoğan, A. ve Serçin, B. 1996. *Salmonella* infeksiyonlu 127 olgunun değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi*, 10, 333-336.
- Shahada, F., Sugiyama, H., Chuma, T., Sueyoshi, M. and Okamoto, K. 2009. Genetic analysis of multi-drug resistance and the clonal dissemination of β -lactam resistance in *Salmonella* Infantis isolated from broilers. *Veterinary Microbiology*, in Press.
- Singleton, P. and Sainsbury, D. 1996. *Salmonella*. In: Singleton P and Sainsbury D, eds. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. 3rd ed. Chichester: John Wiley and Sons, p.685-686.
- Southern, E.M. 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 100(2), 319-323.
- Srivatsan, A. and Wang, J.D. 2008. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p) ppGpp. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), 100-105.
- Sturenburg, E. and Mack, D. 2003. Extended spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of Infection*, 47, 273-295.

- Su, L., Chen, H., Chia, J., Liu, S., Chu, C., Wu, T. and Chiu, C. 2006. Distribution of a transposon-like element carrying *bla*CMY-2 among *Salmonella* and other Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 424-429.
- Suar, M., Jantsch, J., Hapfelmeier, S., Kremer, M., Stallmach, T. and Barrow, P. A. 2006. Virulence of broad- and narrow-host-range *Salmonella enterica* serovars in the streptomycin-pretreated mouse model. *Infection and Immunity*, 74(1), 632–644.
- Suh, Y.C. and Odeh, E.N. 2008. Plasmids: A Vehicle for rapid transfer of antibiotic resistance markers of *Salmonella* species in animals. *International Journal of Integrative Biology*, 2(1), 55-61.
- Şenses, Z., Baysallar, M., Aydoğan, H., Güçlü, A.U. ve Doğançıl, L. 2007. Kan ve dışkı örneklerinden izole edilen *Salmonella* izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri. *Gülhane Tıp Dergisi*, 49, 141-146.
- Tindall, B.J., Grimont P.A.D., Garrity G.M. and Euzéby J.P. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 521-524.
- Tükel, Ç., Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Akçelik, M. and Baumler, A.J. 2006. Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 46(3), 320 – 329.
- Unsworth, K.E., Way, M., McNiven, M., Machesky, L. and Holden, D.W. 2004. Analysis of the mechanisms of *Salmonella*-induced actin assembly during invasion of host cells and intracellular replication. *Cellular Microbiology*, 6(11), 1041–1055.
- van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Veldman, K. and Mevius, D. 2007. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 746-750.
- Varma, J.K., Greene, K.D., Ovitt, J., Barrett, T.J., Medalla, F. and Angulo, F.J. 2005. Hospitalization and antimicrobial resistance in *Salmonella* outbreaks, 1984–2002. *Emerging Infection Diseases*, 11, 943–946.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A.J., Falkow, S., Brown, W., Le, M., Falkow, S., Brown, W., Breggen, R., Parks, T. and Fang, F.C. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* via CD18-expressing phagocytes. *Nature*, 401(6755), 804-808.
- Villa, L. and Carattoli, A. 2005. Integrons and Transposons on the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Virulence Plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), 1194-1197.

- Voetsch, A.C., Gildler, T.J.V., Angulo, F.J., Farley, M.M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P.R., Deneen, V.C. and Tauxe, R.V. 2004. FoodNet Estimate of the Burden of Illness Caused by Nontyphoidal *Salmonella* Infections in the United States. *Estimate of Salmonella Incidence*, 38 (3), 127-134.
- Wain, J., House, D., Zafar, A., Baker, S., Nair, S. and Kidgell, C. 2005. Vi Antigen Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhi Clinical Isolates from Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1158–1165.
- Walsh, C. 2003. *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*. ASM Press, pp. 23-49, Washington, DC.
- Waturangi, D.E., Suwanto, A., Schwarz, S. and Erdelen, W. 2003. Identification of class 1 integrons-associated gene cassettes in *Escherichia coli* isolated from *Varanus* spp. in Indonesia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 175-177.
- White, D.G., Zhao, S., Sudler, R., Ayers, S., Friedman, S., Chen, S., McDermott, P.F., McDermott, S., Wagner, D.D. and Meng, J. 2001. The isolation of antibiotic resistant *Salmonella* from retail ground meat. *New England Journal of Medicine*, 345, 1147-1154.
- Yan, S.S., Pendrak, M.L., Abela-Ridder, B., Punderson, J.W., Fedorko, D.P. and Foley, S.L. 2003. An overview of *Salmonella* typing Public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4, 189-204.
- Yazıcıoğlu, N., Kaya, K., Ayaz, K., Şen, S., Özkök, S., Aksoy, M., Yavuz, M. K., Kaplan, Y.Z., Tunca, Ş.T., Vural, Ş., Evgin, N., Karakoç, S.R., Miroğlu, M. ve Turut, N. 2005. Kanatlı kesimhanelerinin parçalama ünitelerinden alınan boyun ve kanat örneklerinden *Salmonella* izolasyonu, serotiplenmesi ve antibiyotik dirençliliğinin araştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 16, 23-36.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.H. and Mao, J.X. 1997. POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada*.
- Zhou, D., Chen, L.M., Hernandez, L., Shears, S.B. and Galan, J.E. 2001. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Molecular Microbiology*, 39(2), 248–259.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Neslihan TAŞKALE
Doğum Yeri : ANKARA
Doğum Tarihi : 29.11.1985
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : İnönü Lisesi (YDA) (2003)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2007)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (Eylül 2007-Ocak 2010)