

Türkiye’de İnsanlardan İzole Edilen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Suşlarının Moleküler Özellikleri

Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strains Isolated from Humans in Turkey

İştar DOLAPÇI¹, Alper TEKELİ¹, Fikret ŞAHİN¹, Birsal ERDEM¹

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Ankara University School of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 21.04.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 27.07.2015

ÖZ

Çoklu ilaç direnci (ÇİD) olan suşlarla gelişen *Salmonella* enfeksiyonları, özellikle de *Salmonella* Typhimurium DT104 faj tipi suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar, dünyanın pek çok bölgesinde yayılım gösteren ve ciddi halk sağlığı sorunu oluşturan enfeksiyonlardır. *S.Typhimurium*, Türkiye’de salmonellozlu olgulardan en sık izole edilen serotiplerinden, ancak bu suşların faj tipleri hakkında yeterli bilginiz yoktur. Bu çalışma, Türkiye’de insanlardan izole edilen ÇİD olan *S.Typhimurium* suşlarının DT104 (definitive faj tipi 104) suşları olup olmadığını; sınıf 1 integron taşıyıp taşımadıklarını; bu özelliklerin plazmid profilleri ve değişken alanlı (pulsed-field) jel elektroforezi (PFGE) profilleri ile ilişkisini araştırmak için planlanmıştır. Çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Enterobakteri Laboratuvarının kültür koleksiyonlarından seçilen 66 *S.Typhimurium* suşu, plazmid profil analizi (PPA); XbaI ve SpeI enzimleri kullanılarak PFGE; DT 104 faj tipi ve sınıf 1 integron varlığı için standart polimeraz zincir reaksiyonu ile incelenmiştir. Çalışmaya alınan izolatlar, 2000 yılından sonra, yedi ilde, sporadik olguların çeşitli klinik örneklerinden izole edilmiş olan ACSSuT (n: 63), ACGSSuT/S (n: 1), ACSSuT/S (n: 1) ve ASSuT/S (n: 1) direnç tipine sahip suşlardır [ampisilin (A), kloramfenikol (C), gentamisin (G), streptomisin (S), sülfonamid (Su), tetrasiklin (T), trimetoprim/sülfametoksazol (T/S)]. Suşların 65’inin (%98.5) DT104 faj tipinde olduğu bulunmuştur. *S.Typhimurium* DT104 suşlarının 43’ünün (%66.2), büyüklükleri 350-1600 baz çifti (bc) arasında değişen beş farklı bant olmak üzere, sınıf 1 integron taşıdıkları; tüm suşların 1.0-180 kbç arasında değişen büyüklüklerde 1-4 plazmid taşıdıkları; ayrıca serotipe özgü ve virülansla ilişkili olan 90 kbç büyüklüğündeki plazmidin 62 izolatta (%95.3) bulunduğu belirlenmiştir. *S.Typhimurium* DT104 suşları, XbaI enzimi ile beş (X1-X5) ve SpeI ile de yedi (S1-S7) profile ayrılmaktadır. Her iki enzim profilleri birlikte değerlendirildiğinde, 65 izolatın 58’inin (%89.2) benzer PGFE profili (X1.S1) gösterdiği belirlenmiştir. Sınıf 1 integron, plazmid ve PFGE profilleri birlikte değerlendirildiğinde, çalışmada incelenen *S.Typhimurium*

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. İştar Dolapçı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06100, Sıhhiye, Ankara. Tel (Phone): +90 312 595 8072, E-posta (E-mail): dolapci@medicine.ankara.edu.tr

suşlarının büyük çoğunluğunun benzer moleküler profillerde toplandığı görülmektedir. Bu çalışma ile Türkiye’de izole edilen ve beş antimikrobiyal ilaca (ACSSuT) dirençli *S.Typhimurium* suşlarının neredeyse tümünün DT104 suşları olduğu gösterilmiştir. Sporadik olgulardan elde edilen bu izolatların PFGE profilleri, epidemiyolojik olarak birbiriyle ilişkili suşlar olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: *Salmonella* serotip *Typhimurium*; DT104; integron; plazmid profil analizi; PFGE; Türkiye.

ABSTRACT

Multidrug resistant (MDR) *Salmonella* infections, especially infections due to *Salmonella* Typhimurium DT104 phage type strains are an important public health issue in many parts of the world. *S.Typhimurium* is the most common serotype isolated from clinical samples in Turkey but we have limited data about the phage types of these isolates. The aims of this study were to find out whether these MDR *S.Typhimurium* isolates are DT104 phage type isolates and have class 1 integrons and to investigate the relationships of these characteristics between plasmid and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) profiles. A total of 66 *S.Typhimurium* stock strains selected from Enterobacteria Laboratory culture collections of Ankara University School of Medicine, Department of Medical Microbiology were investigated by plasmid profile analysis (PPA) and PFGE with the use of *Xba*I and *Spe*I enzymes. The presence of class 1 integrons and the phage type 104 were investigated by polymerase chain reaction (PCR). The strains used in the study were sporadically isolated cases from seven provinces after year 2000 with ACSSuT (63), ACGSSuT/S (1), ACSSuT/S (1) and ASSuT/S (1) resistance types [ampicillin (A), chloramphenicol (C), gentamicin (G), streptomycin (S), sulphonamide (Su), tetracycline (T), trimethoprim/sulfamethoxazole (T/S)]. Of the isolates 65 were found as DT104 phage type. Forty-three *S.Typhimurium* DT104 isolates that carry class 1 integrons had five different bands between 350-1600 base pairs (bp); all of the isolates harbored 1-4 plasmids with sizes ranging from 1.0-180 kbp and 62 isolates had 90 kbp plasmid which was serotype specific and virulence related. *S.Typhimurium* DT104 isolates were grouped into five (X1-X5) and seven (S1-S7) profiles with *Xba*I and *Spe*I enzymes, respectively. When the profiles of the two enzymes were evaluated, 58 of the 65 (89.2%) isolates showed similar (X1.S1) profile. The molecular characteristics of the most *S.Typhimurium* isolates were clustered in similar groups when class 1 integron, plasmid and PFGE types were analyzed together. In this study we showed that nearly all *S.Typhimurium* isolates with five drug resistance pattern (ACSSuT) were DT104 isolates. PFGE profiles of these sporadic isolates suggested that they were epidemiologically related.

Keywords: *Salmonella* serotype *Typhimurium*; DT104; integron; plasmid profile analysis; PFGE; Turkey.

GİRİŞ

Salmonella enfeksiyonları, dünyanın pek çok bölgesinde olduğu gibi Türkiye’de de yaygın olarak görülen ve ciddi halk sağlığı sorunu oluşturan enfeksiyonlar olarak bilinmektedir¹⁻⁴. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip Typhimurium, klasik gıda kaynaklı gastroenterit etkeni olarak tanımlanmakla birlikte bağırsak dışı invazif enfeksiyonlara da yol açabilmektedir. Geniş bir hayvan rezervuarına sahip olduğu için yayılım kapasitesi çok yüksektir; ayrıca çevre sularında canlı kalabilme özelliğindedir^{1,3,5}. *Salmonella*’larda antimikrobiyal direncin, özellikle çoklu ilaç direncinin (dört ya da daha fazla ilaca direnç) artması, tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir^{1,2,3,5}. *Salmonella* Typhimurium, Türkiye’de klinik enfeksiyonlu insanlardan en sık izole edilen serotiplerdendir ve bu izolatların önemli bir kısmı çok ilaca dirençli suşlardır^{1,6}. *Salmonella* serotiplerinin alt ayırımında temel yöntem faj tiplendirmesidir, ancak Türkiye’de izole edilen *S.Typhimurium* suşlarının faj tipleri hakkında yeterli bilgimiz yoktur.

S.Typhimurium DT104 [tanımlayıcı (definitive) faj tipi 104] suşları; 1990’lı yıllarda İngiltere ve birçok Avrupa ülkesinde, Amerika Birleşik Devletleri’nde ve Kanada’da yaygın olarak görülen, hayvan kaynaklı enfekte gıdalarla insanlara bulaşan, virülan ve beş antimikrobiyal ilaca [ampisilin (A), kloramfenikol (C), streptomisin (S), sülfonamid (Su) ve tetrasiklin (T)] dirençli suşlar olarak tanınırlar^{3,5}. Antimikrobiyallere çoklu direncin yayılması, esas olarak antibiyotik direnç genlerinin, özellikle plazmidler ve integronlar gibi hareketli genetik elemanlar yoluyla horizontal transferi sonucunda gerçekleşmektedir. İç değişken bölgelerinde antimikrobiyal direnç genleri içeren klinik izolatlar arasında en sık bulunanlar sınıf 1 integronlardır^{7,8}. Antibiyotik direnç gen kümesi içeren sınıf 1 integronlar, *S.Typhimurium* serotipinin *Salmonella* genomik adası 1 (SGI1)’in 3’ ucunun yakınında bulunur⁹. DT104 izolatları sıklıkla, hareketli genetik eleman SGI1’in kazanılmasıyla ilişkili, çoklu antibiyotik direnci taşırlar¹⁰.

Salmonella alt tiplendirmesinde kullanılan biyotiplendirme, faj tiplendirmesi, serotiplendirme ve antimikrobiyal duyarlılık testleri gibi konvansiyonel yöntemler, genellikle sınırlı ayırım gücü gösterirler. Bu nedenle, son yıllarda fenotipik tiplendirme yöntemlerini tamamlamak üzere DNA temelli diğer ayırıcı teknikler sıklıkla kullanılır olmuştur. Bu tekniklerden, değişken alanlı (pulsed-field) jel elektroforezi (PFGE) uygulamasının *Salmonella enterica* serotiplerinin epidemiyolojik özelliklerinin araştırılması ve serotiplerin alt ayırımları için yararlı olduğu kanıtlanmıştır^{2,9}. Bu çalışma, Türkiye’de insanlardan izole edilen, çoklu ilaç direnci (ÇİD) olan *S.Typhimurium* suşlarının DT104 faj tipine ait suşlar olup olmadığını; sınıf 1 integron taşıyıp taşımadıklarını ve bu özelliklerin plazmid ve PFGE profilleri ile ilişkisini araştırmak için planlanmıştır. Moleküler yaklaşımlar kullanılarak, Türkiye’de izole edilen *S.Typhimurium* suşlarının epidemiyolojilerinin daha iyi anlaşılmasına ışık tutulmaya çalışılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri Suşları

Çalışmaya, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Enterobakteri Laboratuvarı kültür koleksiyonundan, 66 *S.Typhimurium* suşu alındı. Bu suşlar, daha önceki çalışmalar kapsamında, 2000 yılından sonra, farklı illerden [Kayseri (n: 35), Ankara (n: 14), Bursa (n: 4), Eskişehir (n: 4), İzmir (n: 4), Konya (n: 3), Edirne (n: 2)], sporadik olgulardan ve farklı klinik örneklerden [dışkı (n: 55), kan (n: 9), kateter (n: 1), plevral sıvı (n: 1)] izole edilen, serotiplendirilen ve gliserollü buyyonda, -80°C’de saklanan suşlardır. Çalışma için seçilen 66 *S.Typhimurium* suşunun antimikrobiyal duyarlılık testleri Mueller-Hinton agarda (Difco, 0252-170, ABD), CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerileri¹¹ doğrultusunda disk difüzyon yöntemiyle yapılmış olup, hepsi ÇİD’e sahiptirler [ACSSuT (n: 63), ACGSSuTT/S (n: 1), ACSSuTT/S (n: 1) ve ASSuTT/S (n: 1) direnç tipinde; (A: ampisilin, C: kloramfenikol, G: gentamisin, S: streptomisin, S: sülfonamid, T: tetrasiklin, T/S: trimetoprim/sülfametoksazol)].

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İçin Kalıp DNA’nın Hazırlanması

DNA ekstraksiyonu Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Invitac, Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

DT104 Faj Tipinin Saptanması

Suşların DT104 faj tipine ait olup olmadığı, özgül primerler [104F: 5'-ATG CGT TTG GTC TCA CAG CC-3' ve 104R: 5'-GCT GAG GCC ACG GAT ATT TA-3'; beklenen ürün boyutu 102 baz çifti (bç)] kullanılarak PCR ile araştırıldı¹². PCR, 25 µL Dream Taq Green PCR Master Mix (Fermentas, Litvanya), 1 µL (25 pmol) her bir primerden, 5 µL kalıp DNA ve 18 µL dH₂O olacak şekilde hazırlanan PCR karışımı ile 50 µL son hacimde gerçekleştirildi. PCR koşulları; başlangıç denatürasyonu 95°C'de 3 dk, sonrasında 95°C'de 30 sn, 48°C'de 30 sn ve 72°C'de 30 sn'den oluşan 30 döngü ve 72°C'de 5 dk'lık son uzama olacak şekilde ayarlandı.

İntegronların Araştırılması

Suşlarda sınıf 1 integronların varlığı, literatürde daha önce tarif edildiği üzere 5'CS ve 3'CS primerleri kullanılarak PCR yöntemiyle araştırıldı⁷. *Hot start* PCR ile, 25 µL son hacimde, 1x PCR tamponu, 2 mM MgCl₂, 200 µM her bir dNTP'den, 25 pmol her bir primerden, 3 µL BSA, 5 µL kalıp DNA ve 2.5 U Taq DNA polimerazdan (Fermentas, Litvanya) oluşan PCR karışımı çalışıldı. Ön inkübasyon 94°C'de 12 dk olarak gerçekleştirildi. PCR şu koşullarda 30 döngü olarak uygulandı: Denatürasyon 94°C'de 30 s, bağlanma 58°C'de 30 sn ve uzama 72°C'de 2 dk, son uzama; 72°C'de 7 dk. Amplifikasyon reaksiyonuna, hedef DNA hariç tüm bileşenleri içeren bir negatif kontrol konuldu. Elektroforez ile %0.7'lik agaroz jelde (Vivantis, Malezya), 10 µL reaksiyon ürünü 1.5 µL 6x yükleme boyası (Fermentas, Litvanya) ile 1 saat 100 V'da yürütüldü. PCR ürünleri etidyum bromür ile boyandıktan sonra UV transilüminatörde (TFX 20M-Vilber Lourmat, Fransa) görüntüldü.

Plazmid Eldesi ve Plazmid Profil Analizi (PPA)

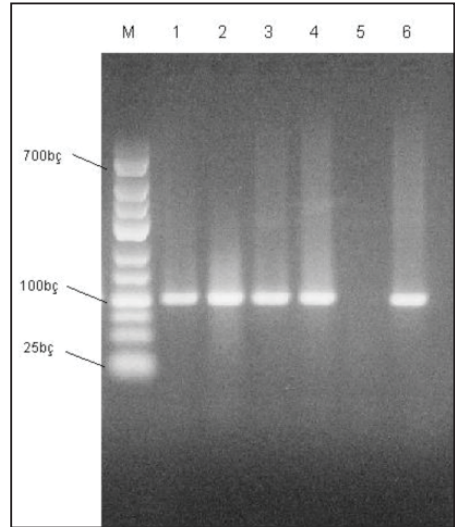
Plazmidler Kado ve Liu'nun¹³ yönteminde küçük değişiklikler yapılarak elde edildi ve PPA, Dolapçı ve arkadaşlarının¹⁴ açıkladığı biçimde uygulandı.

PFGE

PFGE, Dünya Sağlık Örgütü protokollerine¹⁵ göre ve Dolapçı ve arkadaşlarının¹⁴ açıkladığı biçimde gerçekleştirildi. Genomik DNA, *SpeI* ve *XbaI* (Fermentas, Litvanya) restriksiyon endonükleazları ile kesildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 66 *S.Typhimurium* suşunun 65'inin (%98.5) DT104 faj tipi suşları olduğu saptanmıştır. PCR ile biri hariç tüm suşların 102 bç büyüklüğündeki özgül bant taşıdığı gösterilmiştir (Şekil 1). Özgül bant taşımayan, yani DT104 faj tipinde olmayan suş, ASSuTT/S direnç profili olan bir suştur.



Şekil 1. DT104 pozitif ve negatif suşlar. M hattı: Moleküler belirteç (Gene ruler DNA ladder Low range, Fermentas, Litvanya), Hat 1-4 ve 6: DT104 pozitif suşlar; Hat 5: DT104 negatif suş.

İntegron Analizi

S.Typhimurium DT104 suşu olduğu belirlenen 65 izolatin 43'ünün (%66.2) sınıf 1 integron taşıdığı gösterilmiştir. Sınıf 1 integronların PCR amplifikasyonu, 350-1600 bç arasında beş farklı bant varlığını ortaya koymuştur. Toplam 8 integron profili tanımlanmıştır. Biri hariç tüm suşların 850 bç büyüklüğündeki integronu taşıdığı saptanmıştır (Tablo I, Şekil 2).

PPA

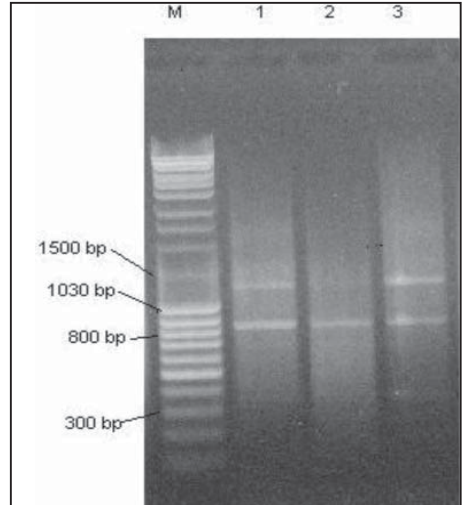
S.Typhimurium DT104 suşu olduğu belirlenen 65 izolatin plazmid DNA'sı kilobaz çifti (kbç) olarak moleküler ağırlıklarına göre tanımlanmıştır. Tüm suşların büyüklükleri 1.0-180 kbç arasında değişen 1-4 adet plazmid taşıdıkları saptanmıştır. Büyüklüğü 90 kbç olan plazmidin en yaygın görülen plazmid olduğu, suşların 62'sinin (%95.3) 90 kbç'lik plazmidi tek başına ya da diğer plazmidlerle birlikte; 37'sinin (%56.9) ise tek başına taşıdığı gösterilmiştir. *S.Typhimurium* suşları plazmid profillerine göre 9 grupta toplanmaktadır (Tablo II).

Tablo II. *S.Typhimurium* DT104 Suşlarının Plazmid Profilleri

Plazmid Profilleri (kbç)	Suş sayıları (%)
90	37 (56.9)
180, 150, 90	14 (21.5)
150, 90	6 (9.2)
90, 2.0	3 (4.6)
180, 150, 90, 20	1 (1.5)
100, 4.0, 1.0	1 (1.5)
90, 7.0	1 (1.5)
50, 2.7	1 (1.5)
7.0, 1.5	1 (1.5)
Toplam	65

Tablo I. *S.Typhimurium* DT104 Suşlarının Sınıf 1 Integron Profilleri

İntegron profilleri (bç)	Suş sayısı (%)
850	22 (33.8)
350; 850	3 (4.6)
850; 1400	7 (10.7)
600; 850	1 (1.5)
350; 600; 850	1 (1.5)
350; 850; 1400	7 (10.7)
350; 600; 1400	1 (1.5)
850; 1400; 1600	1 (1.5)
Negatif	22 (33.8)
Toplam	65

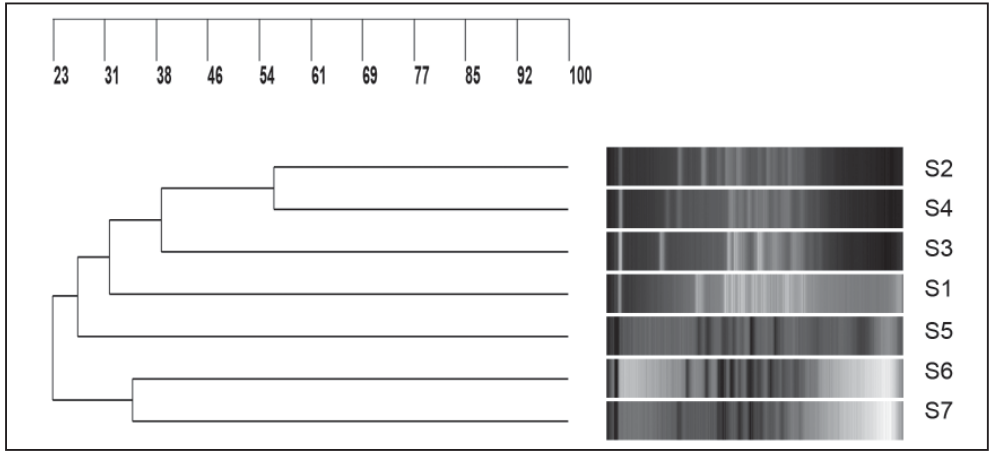


Şekil 2. Sınıf 1 integron bant örnekleri. M hattı: Moleküler belirteç (Mass Ruler, Fermentas, Litvanya); Hat 1: 850-1400 bç; Hat 2: 850 bç; Hat 3: 350-850-1400 bç büyüklüğünde bantlar.

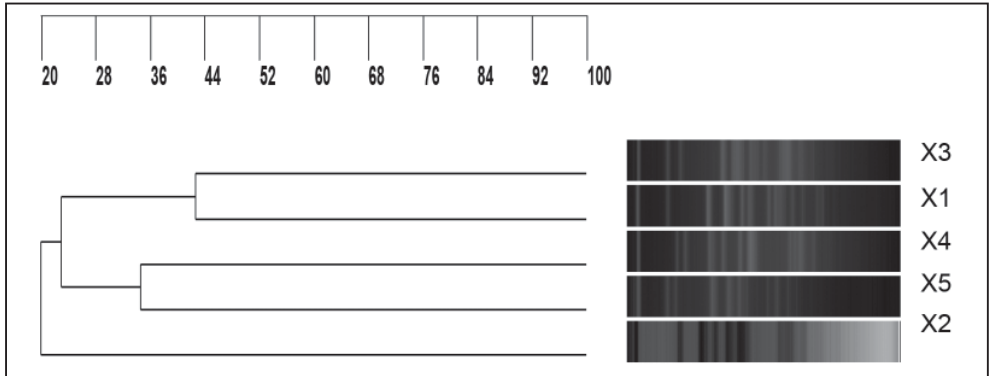
PFGE

S.Typhimurium DT104 suşları PFGE’nde *SpeI* kesim enzimi ile 7 (S1-S7) ve *XbaI* kesim enzimi ile 5 (X1-X5) profile ayrılmıştır (Şekil 3 ve 4). Küme analizi sonucunda, *XbaI* enzimiyle ve *SpeI* enzimiyle 65 suşun 59’unun (%90.7) tek bir profile yer aldığı (X1 ve S1) gösterilmiştir. X2 profilinde 3; X3, X4 ve X5 profillerinde ise birer suşun yer aldığı; S2, S3, S4, S5, S6 ve S7 profillerinin her birinin birer suş içerdiği saptanmıştır. *XbaI* ve *SpeI* kesim enzimleri ile elde edilen sonuçlar birlikte yorumlandığında, toplam 8 farklı profile ulaşılmıştır; 65 suşun 58’inin (%89.2) X1.S1 profilinde yer aldığı bulunmuştur (Tablo III).

S.Typhimurium DT104 suşlarının PPA, PFGE ve sınıf 1 integron profilleri birlikte değerlendirildiğinde, izolatların çoğunun belirli moleküler profillerde toplandığı görülmektedir. İki ve daha fazla izolatın toplandığı moleküler profillerin (A-K) sayısı dokuzdur. Kırk



Şekil 3. *S.Typhimurium* DT104 suşlarının *SpeI* enzimi ile elde edilen PFGE profillerine ait, Gene Directory Software programı kullanılarak, %0.5 bant toleransı ile elde edilen dendogramları.



Şekil 4. *S.Typhimurium* DT104 suşlarının *XbaI* enzimi ile elde edilen PFGE profillerine ait, Gene Directory Software program kullanılarak, %0.5 bant toleransı ile elde edilen dendogramları.

Tablo III. *Typhimurium* DT104 Suşlarının *Xba*I ve *Spe*I Enzimleri ile Elde Edilen PFGE Profilleri

No	<i>Xba</i> I		<i>Spe</i> I		<i>Xba</i> I ve <i>Spe</i> I	
	Profil	Suş sayısı (%)	Profil	Suş sayısı (%)	Profil	Suş sayısı (%)
1	X1	59 (90.7)	S1	59 (90.7)	X1.S1	58 (89.2)
2	X2	3 (4.6)	S2	1 (1.5)	X4.S2	1 (1.5)
3	X3	1 (1.5)	S3	1 (1.5)	X2.S3	1 (1.5)
4	X4	1 (1.5)	S4	1 (1.5)	X2.S4	1 (1.5)
5	X5	1 (1.5)	S5	1 (1.5)	X2.S6	1 (1.5)
6			S6	1 (1.5)	X5.S1	1 (1.5)
7			S7	1 (1.5)	X3.S5	1 (1.5)
8					X1.S7	1 (1.5)
Toplam	5	65	7	65	8	65

altı izolat, dokuz profilde toplanmıştır. Moleküler profil A (90; X1.S1; integronsuz), en fazla sayıda izolatın (n: 15; %23) toplandığı gruptur (Tablo IV).

TARTIŞMA

Salmonella enfeksiyonları, dünyanın hemen her bölgesinde olduğu gibi Türkiye için de devam eden bir halk sağlığı sorunudur. Türkiye'de klinik örneklerden üretilen her *Salmonella* izolatı ayrıntılı olarak incelenememektedir. Referans merkezlerine gönderilen az sayıdaki izolatlar, Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA) ve benzeri özel projeler çerçevesinde serotiplendirildikten sonra antibiyotik duyarlılık testleri ile birlikte rapor edilmektedir^{1,4}. Dünyada yaygın olan bazı *Salmonella* serotiplerinde, faj tiplendirmesi, suşların ayırımında ve alt tiplendirmesinde epidemiyolojik bir yöntem ola-

Tablo IV. *S.Typhimurium* DT104 Suşlarının Moleküler Profilleri*

Moleküler profil	PPA profili	PFGE profili		Sınıf 1 Integron profili	Suş sayısı (%)
		<i>Xba</i> I- <i>Spe</i> I			
A	90	X1 - S1	-	-	15 (23)
B	180, 150, 90	X1 - S1	-	-	5 (7.7)
C	90	X1 - S1	850	850	7 (10.8)
D	180, 150, 90	X1 - S1	850	850	5 (7.7)
E	90	X1 - S1	850, 1400	850, 1400	5 (7.7)
F	90	X1 - S1	350, 850, 1400	350, 850, 1400	3 (4.6)
G	180, 150, 90	X1 - S1	350, 850, 1400	350, 850, 1400	2 (3.0)
H	150, 90	X1 - S1	350, 850, 1400	350, 850, 1400	2 (3.0)
K	150, 90	X1 - S1	850	850	2 (3.0)

* İki ve daha fazla izolatın yer aldığı moleküler profiller tabloda yer almaktadır.

rak altın standart değerinde kabul edilir¹⁶. Ancak *Salmonella* faj tiplendirmesi dünyada birkaç referans merkezinde yapılabilen bir yöntemdir ve Türkiye’de uygulanamamaktadır. Bu nedenle izole edilen *Salmonella* serotiplerinin faj tipleri ve moleküler özellikleri konusunda çok sınırlı olan bilgilerimiz, birkaç özel çalışmaya dayanmaktadır ve özellikle ÇİD *S.Typhimurium* suşlarının faj tipleri ve moleküler özellikleri konusunda yeterince bilgi bulunmamaktadır¹⁷.

Bu çalışmada, Türkiye’de insanlardan izole edilen ÇİD 66 *S.Typhimurium* suşunun PCR ile DT104 faj tipine ait suşlar olup olmadığı; sınıf 1 integron taşıyıp taşımadıkları araştırılarak, bu özelliklerin plazmid ve PFGE profilleri ile ilişkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Moleküler yöntemlerin gelişmesi ve primerlerin daha kolay elde edilmesi ile, *Salmonella* serotiplerinin bazı önemli faj tipleri için özel uygulamalar geliştirilmiştir^{12,18,19}. Bu çalışmada, DT104 suşları için özgül kabul edilen 102 bç büyüklüğündeki bant taşıyıp taşımadığı PCR ile araştırılmıştır. ÇİD [ACSSuT (n: 63), ACGSSuTT/S (n: 1), ACSSuTT/S (n: 1), ASSuTT/S (n: 1) direnç tiplerindeki] *S.Typhimurium* suşlarının sadece birinin 102 bç büyüklüğündeki özgül bant taşımadığı anlaşılmış ve bu suşun DT104 faj tipinde olmadığına karar verilmiştir. Bu izolat ASSuTT/S direnç profili olan, ampisilin, streptomisin, sülfonamid, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfametoksazol (T/S)’e dirençli, ancak kloramfenikole duyarlı olan bir suştur. DT104 faj tipindeki *S.Typhimurium* suşlarının genellikle ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfonamid ve tetrasikline (ACSSuT) dirençli oldukları bilinmektedir^{3,18,19}. DT104 suşlarının invazifliği ile ilgili birbiriyle çelişen sonuçlar sunan araştırmalar bulunmaktadır. Bir çalışmada, DT104 suşlarının septisemi ile ilişkili olduğu bildirilirken; bir başka çalışmada, diğer *Salmonella* suşları kadar invazif olduğu belirtilmiştir⁵. Bu çalışmada, suşlarımızın büyük çoğunluğu dışkı izolatıdır (n: 55; %83.3) ve gastroenterit olguları ile ilişkilidir. Çalışmamız, Türkiye’de insanlardan elde edilen ACSSuT direnç tipindeki *S.Typhimurium* izolatlarının DT104 suşları olduğunu göstermektedir. Bu sonuçların, başka çalışmalarla uyum içinde olduğu görülmektedir^{3,20,21}. *S.Typhimurium* içinde öne çıkan başka faj tipleri de bildirilmiştir. Slovakya’da ACSSuT direnç tipi prevalansı ile ilgili yapılan bir çalışmada, Majtanova ve arkadaşları¹⁸ DT104 faj tipi prevalansının azalmakta olduğunu, buna karşın U302 faj tipinde artış olduğunu ortaya koymuşlardır. Epidemiyolojik veriler için *S.Typhimurium* izolatlarının faj tiplerinin belirlenmesinin yararlı olacağı görüşündeyiz.

Integronlar, çoklu antibiyotik direncinin yayılmasında en büyük etkenlerden biridir. İçlerinde sınıf 1 integronlar en sık izlenenlerdir ve genellikle iki korunmuş segment (5’CS ve 3’CS) tarafından sarılan değişken bir bölge üzerinde bir ya da daha fazla direnç gen kaseti içerirler²². Guerra ve arkadaşlarına²³ göre, 1000-1200 bç büyüklüğünde değişken bölgeye sahip integronlar, ÇİD DT104 *S.Typhimurium*’lar arasında oldukça yaygın görülmektedir. Bu çalışmada, integron analizi sınıf 1 integronlar için yapılmış; 65 *S.Typhimurium* DT104 izolatının 43’ünün (%66.2) sınıf 1 integron taşıdığı gösterilmiştir. İntegron büyüklükleri 350-1400 bç arasında değişmektedir. Biri hariç, diğer izolatlarda 850 bç büyüklüğünde integron saptanmıştır (n: 42; %97.6). Toplam sekiz integron profili tanımlanmıştır. Bu integronu taşımayan izolatın moleküler profilinin (90; X1.S1; 350, 600, 1400) olduğu görülmüştür. Çalışmamızın kısıtlamalarından biri, integron içerikleri-

nin dizi analizlerinin olmamasıdır. Bazı sınıf 1 integronlar araya giren gen kasetleri içermemektedirler. Bu boş integronlar, integre gen kasetlerini hiç edinmemiş olabilecekleri gibi, ilgili antimikrobiyalin yokluğu durumunda direnç geni içeren bölgelerin değişken bölge üzerinden ayrılmasıyla boşalmış da olabilirler²⁴. Bu çalışmadaki suşların tamamının plazmid içermesi ve bazılarının integron içermemesi nedeniyle, direncin hem plazmid hem de integron tarafından yönetilen mekanizmalarla gerçekleştiği yorumunda bulunabiliriz.

Çalışmamızda, *S.Typhimurium* DT104 izolatlarının 43'ünün (%66.2) sınıf 1 integron taşıdığı bulunmuştur. Ülkemizde *Salmonella* suşları arasında integron taşıyıcılığı ve antimikrobiyal direnç paternleri arasındaki ilişkiyi değerlendiren çok az çalışma bulunmaktadır. Bu nadir çalışmalardan biri olan Aktaş ve arkadaşlarının çalışmasında²⁵, ACSSuT direnç tipindeki sadece dört *S.Typhimurium* suşu sınıf 1 integron varlığı açısından incelenmiş ve 1.2 ve 1 kb büyüklüğünde parçalar amplifiye edilmiştir. ÇİD *S.Typhimurium* suşları arasında sınıf 1 integron pozitifliği oranları farklılık göstermektedir. Perez-Moreno ve arkadaşlarının²⁶ çalışmasında, ÇİD *S.Typhimurium* suşlarında sınıf 1 integron pozitifliği %78.9 olarak bildirilmiştir. Bir başka çalışmada bu oran %39.1 olarak verilmiştir²⁷. Bu durum, muhtemelen farklı coğrafi bölgelerde farklı direnç mekanizmalarının etkin olmasıyla açıklanabilir. İntegron analizi ve takibi, bakterilerin antimikrobiyal direnci ile ilgili değerli bilgi sağlayacağı için, enfeksiyon kontrolünde bir araç olarak kullanılabilir.

Plazmid profiline dayalı analiz, özellikle de dirençli suşlardaki plazmidlerin istikrarsızlığı göz önüne alındığında, kesin bir tiplendirme metodu olarak nitelendirilmemektedir²⁸. Bu çalışmada PPA, suşların tümünün, büyüklükleri 1.0-180 kb arasında değişen 1-4 adet plazmid taşıdığını ortaya koymuştur. *S.Typhimurium* suşları plazmid profillerine göre dokuz grupta toplanmaktadır. Serotipe özgü ve virülans ile ilişkili plazmid (90 kb), DT104 suşlarının 62'sinde (%95.3) gösterilmiştir. Sırasıyla (100, 4.0, 1.0); (50, 2.7); (7.0, 1.5) plazmid profilleri olan ve serotipe özgü plazmid içermeyen üç izolatın, iki farklı şehirde, gastroenteritli hastaların dışkı örneklerinden izole edilen DT104 suşları oldukları saptanmıştır.

Çalışmamızda trimetoprim dirençli izolatlar, ACGSSuTT/S (n: 1), ACSSuTT/S (n: 1) ve ASSuTT/S (n: 1) direnç tipindeki suşlardır. ASSuTT/S direnç tipindeki suş, DT104 faj tipinde olmayan; sınıf 1 integron taşımayan ve 90, 6.0 ve 2.5 kb büyüklüğünde plazmidleri olan izolatdır. ACGSSuTT/S izolatında 100, 4.0 ve 1.0 kb ve ACSSuTT/S izolatında ise 90, 7.0 kb'lık plazmidler bulunmaktadır. Cooke ve arkadaşları¹⁰ 13 *S.Typhimurium* DT104 suşunu incelemişler; suşların üç farklı direnç tipine karşılık dokuz farklı plazmid içerdiklerini göstermişler ve trimetoprim dirençli suşların (n: 4), direnci kodlayan *dfra14* bölgesini içeren 6.8 kb'lık plazmidi olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmayla uyumlu olarak, bizim çalışmamızdaki T/S dirençli iki izolat, 6.0 ve 7.0 kb'lık plazmid içermektedir.

PFGE, yöntemin ayırım gücünü artırmak amacıyla iki ayrı kesim enzimiyle gerçekleştirilmiştir. DT104 suşları *XbaI* enzimi ile beş, *SpeI* enzimi ile yedi profil oluştururken, her iki enzimde de suşların %90.7'si aynı grupta toplanmıştır [X1 (n: 59) ve S1 (n: 59)]. Her iki kesim enzimi ile elde edilen sonuçlar birlikte yorumlandığında, toplam sekiz farklı profile ulaşılmış ve 65 suşın 58'inin (%89.2) X1.S1 profilinde yer aldığı bulunmuştur. Suşların

izole edildikleri tarih, şehir, klinik örnek ve direnç profillerine göre bir farklılık oluşturmaları gözlenmiştir. Bu veriler, farklı şehirlerden elde edilen suşların klonal olarak birbirleriyle ilişkili olduklarını ortaya koymuştur.

Salmonella suşlarının tiplendirilmesinde yüksek ayırım gücüne ulaşmak için PFGE ve PPA gibi farklı yöntemlerin birlikte kullanımı önerilmektedir^{2,14}. Çalışmada PPA, dokuz farklı grup vermekle birlikte, 90 kb'lık plazmidi tek başına taşıyan suşları birbirinden ayırmada yetersiz kalmıştır. Oysa, PFGE'de suşlar *Xba*I ve *Spe*I enzimleriyle sırasıyla beş ve yedi farklı gruba ayrılmıştır.

Bu araştırma, ülkemizde farklı şehirden izole edilen *S.Typhimurium* DT104 suşlarının özelliklerini araştıran ilk çalışmadır. Araştırmada elde edilen PFGE profilleri, DT104 suşlarının epidemiyolojik olarak birbirleriyle ilişkili izolatlar olduğunu göstermektedir. Epidemiyolojik suşlar, belirli bir coğrafi bölgede bir süre baskın olabilir ve sonrasında farklı bir suş ile değişim gözlenebilir. Dolayısıyla suşların klonal özelliklerinin ortaya konulmasında, moleküler yöntemler ile muhtemel değişimlerin sürekli olarak izlenmesine ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Erdem B, Ercis S, Hascelik G, et al. Antimicrobial resistance patterns and serotype distribution among *Salmonella enterica* strains in Turkey, 2000-2002. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24(3): 220-5.
2. Abbassi-Ghozzi I, Jaouani A, Aissa RB, Martinez-Urtaza J, Boudabous A, Gtari M. Antimicrobial resistance and molecular analysis of non-typhoidal *Salmonella* isolates from human in Tunisia. *Pathol Biol (Paris)* 2011; 59(4): 207-12.
3. Weill FX, Guesnier F, Guibert V, et al. Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003). *J Clin Microbiol* 2006; 44(3): 700-8.
4. Gülmez D, Gür D, Haşcelik G, Güleşen R, Levent B. Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Süveyası Ağına (UEPLA) dahil olan bir üniversite hastanesinin deneyimleri: Dört yıllık *Salmonella*, *Shigella* ve *Campylobacter* verileri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2012; 42(3): 85-92.
5. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiology Rev* 2002; 26(2): 141-8.
6. Aysev AD, Guriz H, Erdem B. Drug resistance of *Salmonella* strains isolated from community infections in Ankara, Turkey, 1993-99. *Scand J Infect Dis* 2001; 33(6): 420-2.
7. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(1): 185-91.
8. Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. *Annu Rev Genet* 2010; 44: 141-66.
9. Doudai B, Thong KL, Watanabe H, Puthucherry SD. Characterization of drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium by antibiograms, plasmids, integrons, resistance genes and PFGE. *J Microbiol Biotechnol* 2010; 20(6): 1042-52.
10. Cooke FJ, Brown DJ, Fookes M, et al. Characterization of the genomes of a diverse collection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *J Bacteriol* 2008; 190(24): 8155-62.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fourth Informational Supplement, M100-S24, 2014. CLSI, Wayne, PA.
12. Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, et al. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4): 1734-8.
13. Kado CI, Liu ST. Procedure for detection of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145(3): 1365-73.

14. Dolapci I, Erdem B, Tekeli A, et al: Molecular analysis of *Salmonella* serotype Typhi and *Salmonella* serotype Paratyphi B strains isolated in Turkey. *Turk J Med Sci* 2010; 40(3): 447-58.
15. Hendriksen Rs, Larsen JN (eds). Global Salm-Surv. A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. 2004, 6th ed. Available at: http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/salmonella4_pdf.pdf
16. Holmberg SD, Wachsmuth IK, Hicman-Brenner FW, Cohen MI. Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella* Typhimurium isolates from outbreaks. *J Clin Microbiol* 1984; 19(2): 100-4.
17. Küçüker MA, Tolun V, Helmuth R, et al. Phage types, antibiotic susceptibilities and plasmid profiles of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains isolated in Istanbul, Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6(11): 593-9.
18. Majtánová L, Majtán T, Majtán V. Detection of the class 1 integrons and SGI1 among *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104, U302, DT120, DT193, and nontypable human isolates. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63(4): 292-5.
19. Briggs CE, Fratacoma PM. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(4): 846-9.
20. Helms M, Ethelberg S, Molbak K; DT104 Study Group. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(6): 859-67.
21. Rabatsky-Ehr T, Whichard J, Rossiter S, et al; NARMS Working Group. Multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* Typhimurium, United States, 1997-1998. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(5): 795-801.
22. Rodriguez I, Rodicio MR, Herrera-Leon S, Echeita A, Mendoza MC. Class 1 integrons in multidrug-resistant non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated in Spain between 2002-2004. *Int J Antimicrob Agent* 2008; 32(2): 158-64.
23. Guerra B, Junker E, Miko A, Helmuth R, Mendoza MC. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb Drug Resist* 2004; 10(2): 83-91.
24. Wannaprasat W, Padungtod P, Chuanchuen R. Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37(5): 457-61.
25. Aktas Z, Day M, Kayacan CB, Diren S, Threlfall EJ. Molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by plasmid analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30(6): 541-5.
26. Perez-Moreno MO, Centelles-Serrano MJ, Cortell-Ortola M, et al. Multidrug resistance related to class 1 integrons in human *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates and emergence of atypical sul3-associated integrons. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34(4): 381-3.
27. Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, et al. High prevalence of integron-mediated resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63(6): 417-21.
28. Olsen JE, Brown DJ, Baggese L, Bisgaard M. Stability of plasmids in five strains of *Salmonella* maintained in stab culture at different temperatures. *J Appl Bacteriol* 1994; 77(2): 155-9.