

Salmonella enterica* Plazmitlerinin Antibiyotik Duyarlılığı ve *Caenorhabditis elegans* Patojenitesindeki Rollerinin Belirlenmesi

Determination of the Role of *Salmonella enterica* Plasmids in Antibiotic Susceptibility and *Caenorhabditis elegans* Pathogenicity

Deniz AKSOY¹, Ece ŞEN¹

¹ Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balkan Yerleşkesi, Edirne.

¹ Trakya University Faculty of Sciences, Department of Biology, Basic and Industrial Microbiology Section, Balkan Campus, Edirne, Turkey

* Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TÜBAP) tarafından 2013-59 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 13.06.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 22.09.2017

ÖZ

Kümes hayvanları ve kümes hayvanlarından elde edilen ürünler, Salmonellozis için önemli bir risk kaynağıdır. S.Kentucky ve S.Infantis, satışa sunulan tavuk ürünlerinden sıklıkla izole edilen ve Türkiye'den de izolasyonu bildirilmiş serovarlar arasında yer almaktadır. Bu çalışmada, S.Kentucky ve S.Infantis izolatlarının taşıdıkları plazmitlerin, izolatların antibiyotik dirençlerindeki ve *Caenorhabditis elegans* nematod model sistemi üzerindeki patojenitelerindeki rolü araştırılmıştır. Çalışmaya, Edirne ilinde satışa sunulan tavuk karkaslarından izole edilmiş ve *C.elegans*'taki patojenite potansiyelleri ve virülans determinantları belirlenmiş olan gıda kökenli *Salmonella* izolatlarından plazmit taşıyan, *C.elegans* model sistemde patojen olarak tanımlanan ve çok ilaca dirençli olan biri Kentucky ve ikisi Infantis serotipine ait üç izolat dahil edilmiştir. Çalışmada, ampisilin, nalidiksik asit, tetrasiklin, siprofloksasin, trimetoprim ve sulfonamide karşı dirençli ve 31.6 kb büyüklüğünde bir adet plazmit taşıyan S.Kentucky A10 izolatı; ampisilin, streptomisin, nalidiksik asit, tetrasiklin, trimetoprim, neomisin, sülfonamid ve kanamisine karşı dirençli ve 19.9 kb büyüklüğünde bir adet plazmit taşıyan S.Infantis A15 izolatı; streptomisin, nalidiksik asit, tetrasiklin, trimetoprim, neomisin, sülfonamid ve kanamisine karşı dirençli ve 42.4, 1.5 and 1.2 kb büyüklüğünde üç adet plazmit taşıyan S.Infantis A16 izolatı kullanılmıştır. Plazmitlerin antibiyotik

İletişim (Correspondence): Dr. Deniz AKSOY, Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balkan Yerleşkesi, Edirne, Türkiye.
Tel (Phone): +90 284 235 2824/1145, **E-posta (E-mail):** denizyuksele@trakya.edu.tr

direnci ve *C.elegans* nematod model sistemde patojenitedeki rollerinin araştırılması için öncelikle plazmit eliminasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Plazmit eliminasyonu için etidyum bromür (EtBr) boyası kullanılmıştır. Farklı EtBr konsantrasyonu (50, 75, 100, 125 µg/ml) içeren LB buyyonda geliştirilen bakteri kültürlerinden Kado ve Liu'nun yöntemi kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiş ve plazmit eliminasyonu için en etkili EtBr konsantrasyonu 125 µg/ml olarak belirlenmiştir. *Salmonella* izolatlarının taşıdıkları plazmitlerin *C.elegans* patojenitesindeki gerekliliğinin belirlenmesi için plazmidi giderilmiş izolatlar kullanılarak *C.elegans* patojenite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Plazmidi giderilmiş izolatlar ile beslenen nematod gruplarından elde edilen nematodların %50'sinin ölmesi için geçen zaman (TD50) verileri ile plazmit taşıyan izolatlar ile beslenen nematod gruplarından daha önce elde edilmiş olan TD50 verileri karşılaştırılmıştır. İki TD50 değeri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı Student's t-testi ($p < 0.05$) ile analiz edilmiştir. TD50 değerleri pozitif kontrol olarak kullanılan *S.Typhimurium* ATCC 14028 ile beslenen nematod grubu için 4.0 ± 0.4 gün, negatif kontrol olarak kullanılan *Escherichia coli* OP50 ile beslenen nematod grubu için ise 8.0 ± 0.02 gün olarak hesaplanmıştır. Plazmit taşıyan ve plazmidi giderilen *S.Kentucky* (A10) (4.9 ± 0.04 'ten 6.2 ± 0.1 'e) ve *S.Infantis* (A16) (4.4 ± 0.01 'den 6.2 ± 0.2 'ye) izolatları ile beslenen nematod gruplarından elde edilen TD50 değerleri arasında anlamlı bir fark tespit edilirken, plazmit taşıyan ($p < 0.05$) ve plazmidi giderilen *S.Infantis* (A15) (5.7 ± 0.39 'dan 5.8 ± 0.16 'ya) ile beslenen nematod gruplarından elde edilen TD50 değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. İzolatların plazmit eliminasyon işlemi öncesi direnç gösterdikleri antibiyotiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonlarında (MİK) herhangi bir değişiklik olup olmadığı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Plazmit taşıyan ve plazmit eliminasyonu yapılan *Salmonella* izolatlarının dirençli oldukları antibiyotiklerin MİK değerleri arasında bir fark olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışma, Kentucky ve Infantis serovarlarının taşıdıkları plazmitlerin *C.elegans* nematod model sistemde patojenitede rol aldığına dair ilk in vivo verileri ortaya koyması bakımından önem taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: *Salmonella*; *Caenorhabditis elegans*; plazmit; patojenite; antibiyotik direnci.

ABSTRACT

Poultry animals and poultry associated products are important risk sources for Salmonellosis. *S.Kentucky* and *S.Infantis* are among the serovars frequently isolated from retail chickens and were reported to be isolated in Turkey. In this study, the role of plasmids carried by *S.Kentucky* and *S.Infantis* isolates in antibiotic resistance profiles of the isolates and their pathogenicity on *Caenorhabditis elegans* nematode model system were investigated. The isolates used, 1 of Kentucky and 2 of Infantis serotypes, were selected among food-borne *Salmonella* isolated from chicken carcass in Edirne. All three isolates were previously shown to contain plasmids carrying multidrug resistance and were known to be pathogenic on *C.elegans* nematode model system. *S.Kentucky* A10 isolate was resistant to ampicillin, nalidixic acid, tetracycline, ciprofloxacin, trimethoprim and sulphonamide and carried one plasmid with 31.6 kb size. *S.Infantis* A15 isolate was resistant to ampicillin, streptomycin, nalidixic acid, tetracycline, neomycin, sulphonamide and kanamycin and carried a plasmid with 19.9 kb size while the other *S.Infantis* isolate (A16) was resistant to streptomycin, nalidixic acid, tetracycline, trimethoprim, neomycin, sulphonamide and kanamycin and carried 3 plasmids with 42.4, 1.5 and 1.2 kb sizes. Plasmid curing experiments were performed to investigate the role of plasmids in antibiotic resistance and pathogenicity in *C.elegans*. Ethidium bromide (EtBr) dye was used as the plasmid curing agent. Plasmids were isolated from cultures grown in LB broth with different concentrations of EtBr (50, 75, 100, 125 µg/ml) according to the Kado-Liu method and the most effective EtBr concentration was determined as 125 µg/ml. *C.elegans* pathogenicity assays were carried out using plasmid cured isolates. The time 50% of the nematode die (TD50) values of the nematode groups fed with plasmid cured isolates were compared with previously obtained TD50 values of the nematode groups fed with wild type *Salmonella* isolates. Student's t-test ($p < 0.05$) was used to show the level of significance between TD50 values of the two groups. TD50 values of the positive control group fed with *S.Typhimurium* ATCC 14028 and the negative control group fed with *Escherichia coli* OP50 were found as 4.0 ± 0.4 and 8.0 ± 0.02 days, respectively. The differences between TD50 values of nematode groups fed with wild type and plasmid cured isolates were statistically significant both for

S.Kentucky (A10) (4.9 ± 0.04 - 6.2 ± 0.1) and S.Infantis (A16) (4.4 ± 0.01 - 6.2 ± 0.2) ($p < 0.05$) strains, but no significant difference was observed for the groups fed with wild type and plasmid cured S.Infantis (A15) (5.7 ± 0.39 - 5.8 ± 0.16) strain. Broth microdilution method was used to determine whether there was any change in minimal inhibitory concentrations (MIC) of the antibiotics for which the isolates were resistant before plasmid elimination. No significant difference was found between the MIC values of the resistant antibiotics among *Salmonella* isolates carrying plasmids and with cured plasmid. This study is important since the first in vivo results about the role of Kentucky and Infantis serovar plasmids on *C.elegans* nematode model system were presented.

Keywords: *Salmonella*; *Caenorhabditis elegans*; plasmid; pathogenicity; antibiotic resistance.

GİRİŞ

Tifo dışı *Salmonella enterica* serotiplerinin neden olduğu ve kontamine gıdaların tüketimi ile ilişkili olan Salmonelloz olguları tüm dünyada gıda kökenli önemli hastalıkların başında gelmektedir¹. Sürveyans verileri, *Salmonella* izolatlarının antimikrobiyal direnç seviyelerinde bir artış olduğunu göstermektedir². Antimikrobiyal ajanların tıbbi kullanımlarının yanı sıra zirai ve veterinerlik alanlarında kullanımlarının neden olduğu seçici baskı dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır³.

Caenorhabditis elegans, serbest yaşayan küçük bir toprak nematodudur ve patojen bakteri izolatları ile beslendiği zaman yaşamı kısa sürmektedir. Bu basit beslenme sistemi, *C.elegans*'ı memeli sistemlerde patogeneze için gerekli virülans faktörlerinin çalışılmasında etkili ve pratik bir model sistem haline getirmektedir^{4,5}.

Bu çalışmada, *S.enterica* izolatlarının taşıdıkları plazmitlerin, izolatların antibiyotik dirençlerinde ve *C.elegans* nematod model sistemi üzerindeki patojenitelerindeki rolü araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri İzolatları ve Nematod Modeli

Edirne ilinde satışa sunulan tavuk karkaslarından izole edilmiş ve *C.elegans*'daki patojenite potansiyelleri ve virülans determinantları (antibiyotik direnç ve plazmit profilleri) önceki bir çalışma⁶ ile belirlenmiş olan gıda kökenli *Salmonella* izolatlarından plazmit taşıyan, *C.elegans* model sistemde patojen olarak tanımlanan ve çoklu ilaç dirençliliği gösteren biri Kentucky ve ikisi Infantis serotipine ait üç izolat çalışmaya dahil edildi. Çalışmada, ampisilin, nalidiksik asit, tetrasiklin, siprofloksasin, trimetoprim ve sülfonamid karşı dirençli ve 31.6 kb büyüklüğünde bir adet plazmit taşıyan S.Kentucky A10 izolatı; ampisilin, streptomisin, nalidiksik asit, tetrasiklin, trimetoprim, neomisin, sülfonamid ve kanamisin karşı dirençli ve 19.9 kb büyüklüğünde bir adet plazmit taşıyan S.Infantis A15 izolatı; streptomisin, nalidiksik asit, tetrasiklin, trimetoprim, neomisin, sülfonamid ve kanamisin karşı dirençli ve 42.4, 1.5 and 1.2 kb büyüklüğünde 3 adet plazmit taşıyan S.Infantis A16 izolatı kullanıldı. *C.elegans* atasal N2 nematod ve *Escherichia coli* OP50 suşları Minnesota Üniversitesi *Caenorhabditis* Genetik Merkezinden temin edildi.

Plazmit Eliminasyonu

Plazmit eliminasyonu için etidyum bromür (EtBr) boyası kullanıldı. Dört farklı EtBr konsantrasyonu (50, 75, 100, 125 µg/mL) LB-buyyon ortamına eklendi ve ardından %1 konsantrasyonda plazmit taşıyan *Salmonella* izolatları inoküle edildi. Kültürler 37°C'de 48 saat inkübe edildi⁷. Farklı EtBr konsantrasyonlarında geliştirilen bakteri kültürlerinden Kado ve Liu'nun⁸ yöntemi kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmitlerin analizinde 1X Tris asetat EDTA (TAE) tampon ile hazırlanan %0.7'lik agaroz jel kullanıldı. Elektroforez işlemi 100V sabit elektrik akımında 15 dk ve ardından 120V elektrik akımında 3 saat süre ile gerçekleştirildi. Jel EtBr boya çözeltisinde (2 µg/ml) 20 dk süre ile boyandı ve UV ışık altında fotoğrafları çekildi (Cleaver, ABD). Plazmit büyüklükleri Lambda HindIII DNA Marker (Promega, ABD) kullanılarak hesaplandı.

Caenorhabditis elegans Sağ Kalım Testi

Plazmidi giderilen izolatlar 125 µg/ml EtBr içeren LB buyyon ortamına %1 konsantrasyonda inoküle edildi ve 37°C'de 16-18 saat inkübe edildi. Bu kültürlerden 1.5 ml alınarak mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen bakteri çökeltisi 3 defa steril fosfat tamponlu tuz (PBS) ile yıkandı ve 10 µl'lik hacimde olacak şekilde nematod üreme besiyeri NGM agar içeren petri plaklarına ekilerek 37°C'de bir gece inkübe edildi. Petri plaklarının 22°C'ye kadar soğuması beklendi ve platin uçlu bir aktarıcı yardımı ile her bir petri plağına 20 adet larva eş zamanlı olarak aktarıldı. Yirmi dört saatte bir bütün petri plaklarındaki nematodlar sayılarak canlı ve ölü nematodların sayıları belirlendi. Deney süresince platin uç ile nazik dokunma sonucu tepki vermeyen nematodlar ölü olarak kabul edildi. Petri duvarı ile besiyeri arasına sıkışarak ölen nematodlar analizden çıkarıldı. Ölen nematodlar petrilere uzaklaştırılırken canlı nematodlar ise deney süresince 48 saatte bir bulundukları petrilere alınarak yeni hazırlanmış NGM agar içeren petrilere aktarıldı. Deneye tüm nematodlar ölene kadar devam edildi^{9,10}.

İstatistiksel Analiz

Sonuçların analizinde GraphPad Prism programı kullanıldı. Nematodların %50'sinin ölmesi için geçen zaman (TD50) programdaki $Y = y_{\min} + [y_{\max} - y_{\min}] / [1 + 10(\log_{EC50} - X)]$ (Tepe eğimi) denklemini kullanılarak hesaplandı. X değeri günlerin logaritması, Y değeri ise o gün canlı kalan kurtların yüzdesi olarak değerlendirildi. $y_{\max}$ değeri 100, $y_{\min}$ değeri ise 0 olarak kabul edildi. Belirlenen EC50 değeri ise TD50 olarak yorumlandı.

Plazmit eliminasyonu yapılmış izolatların kullanıldığı deney grubunda elde edilen TD50 değeri, plazmit eliminasyonu yapılmadan önce elde edilen TD50 değeri⁶ ile karşılaştırıldı ve iki TD50 değeri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı Student's t-testi ($p < 0.05$) ile değerlendirildi.

Antimikrobiyal Duyarlılığın Belirlenmesi

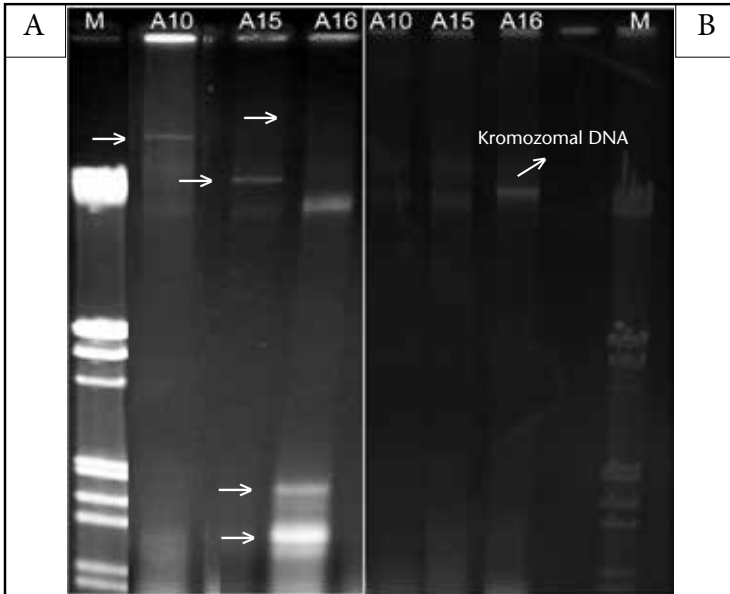
İzolatların plazmit eliminasyon işlemi öncesi dirençli oldukları antibiyotiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonlarında (MİK) değişiklik olup olmadığı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlendi¹¹.

BULGULAR

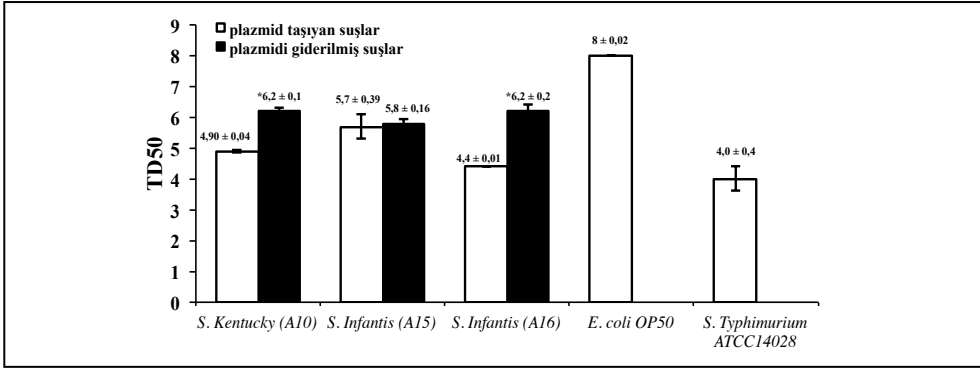
Sonuçlar, üç *Salmonella* izolatında görülen plazmitlerin EtBr varlığında başarılı bir şekilde elimine olduğunu göstermiştir (Şekil 1) ve plazmit eliminasyonu için en etkili EtBr konsantrasyonu 125 µg/ml olarak belirlenmiştir.

C.elegans nematod model sistemi kullanılarak gerçekleştirilen sağ kalım analizlerinde, plazmit taşıyan ve plazmit eliminasyonu yapılmış *S.Kentucky* (A10) ve *S.Infantis* (A16) izolatları ile beslenen nematod gruplarından elde edilen TD50 değerleri arasında anlamlı bir fark tespit edilirken, plazmit taşıyan ve plazmit eliminasyonu yapılmış *S.Infantis* (A15) ile beslenen nematod gruplarından elde edilen TD50 değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 2).

Plazmit eliminasyonu için kullanılan EtBr'ün yıkama işlemi ile uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığının ve nematodların yaşam süreleri üzerinde bir etkisinin olup olmadığının



Şekil 1. (A) Plazmit taşıyan ve (B) Plazmidi giderilmiş *Salmonella* izolatlarının plazmit izolasyonu sonucunu gösteren agaroz jel fotoğrafı. Beyaz oklar plazmitleri göstermektedir. **A10:** *Salmonella Kentucky*, 31.6 kb plazmit **A15:** *Salmonella Infantis* 19.9 kb plazmit, **A16:** *Salmonella Infantis* 42.4, 1.5, 1.2 kb plazmitler. **M:** Lambda HindIII DNA belirteci (Promega, USA), (21.226 bp, 5.148 bp, 4.268 bp, 3.530 bp, 2.027 bp, 1.904 bp, 1.584 bp, 1.357 bp, 947 bp, 831 bp).



Şekil 2. *C.elegans* model sistem kullanılarak gerçekleştirilen sağ kalım analizi sonucu plazmit taşıyan, plazmidi giderilmiş izolatlarla ve kontrol suşları (*E.coli* OP50: patojen olmadığı gösterilmiş suş, negatif kontrol suşu, *S.Typhimurium* ATCC14028: patojen olduğu gösterilmiş suş, pozitif kontrol suşu) ile beslenen nematod gruplarından ve elde edilen TD50 verileri, TD50: Nematodların %50'sinin ölmesi için geçen zaman, *plazmit taşıyan ve plazmidi giderilmiş izolatlar ile beslenen nematod gruplarından elde edilen TD50 verileri arasındaki anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$).

belirlenmesi amacıyla kontrol olarak EtBr içeren LB buyyonda üretilen *E.coli* OP50 suşu kullanılmıştır. Sağ kalım analizlerinde hesaplanan TD50 değeri EtBr içermeyen besiyerinde geliştirilen *E.coli* OP50 suşu ile beslenen nematod grubu için 8.00 ± 0.02 gün, EtBr içeren LB buyyon ortamında geliştirilen *E.coli* OP50 suşu ile beslenen nematod grubu için 7.8 ± 0.45 gün olarak hesaplanmıştır ve bu iki TD50 değeri arasındaki farkın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). *S.Typhimurium* ATCC14028 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve bu suş ile beslenen nematod grubu için TD50 değeri 4.0 ± 0.4 gün olarak hesaplanmıştır.

Plazmit taşıyan ve plazmit eliminasyonu yapılmış *Salmonella* izolatlarının dirençli oldukları antibiyotiklerin MİK değerleri arasında bir fark olmadığı belirlenmiştir (Tablo I).

Tablo 1. Plazmit Taşıyan ve Plazmidi Giderilmiş *Salmonella* İzolatlarının Dirençli Oldukları Antibiyotiklerin MİK Değerleri

	MİK değerleri (µg/ml)		
	S.Kentucky (A10)	S.Infantis (A15)	S.Infantis (A16)
Ampisilin	512	> 512	< 4
Streptomisin	128	256	256
Nalidiksik asit	256	512	512
Tetrasiklin	256	256	256
Siprofloksasin	8	< 1	< 1
Trimetoprim	> 512	> 512	> 512

TARTIŞMA

Kümes hayvanları ve kümes hayvanlarından elde edilen ürünler salmonellozis için önemli bir risk kaynağıdır. *S.Kentucky* ve *S.Infantis*, satışa sunulan tavuk ürünlerinden sıklıkla elde edilen ve Türkiye’den de izolasyonu bildirilmiş serovarlar arasında yer almaktadır^{12,13}. Çok ilaca dirençli, gıda kökenli *Salmonella* izolatlarının yaygınlığı halk sağlığı açısından önem arz etmektedir¹⁴. *Salmonella* serovarlarının virülans ve antibiyotik direnç genlerini kodlayan plazmitler taşıyabildikleri bilinmektedir¹⁵. Bu çalışma, Kentucky ve Infantis serovarlarının taşıdıkları plazmitlerin *C.elegans* nematod model sistemde patojenitede rol aldığını göstermiştir.

Plazmitlerin antibiyotik direnci ve nematod model sistemde patojenitedeki rollerinin araştırılması için plazmit eliminasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmitler, mutajenik ajanların sub-inhibitor konsantrasyonlarının kullanılması sonucu izolatlardan elimine edilebilirler¹⁶. Molina-Aja ve arkadaşları¹⁷ ve Shahid ve arkadaşları¹⁸ EtBr’ün *Vibrio* türleri ve *Pseudomonas aeruginosa*’nın taşıdıkları plazmitler için etkili bir eliminasyon ajanı olduğunu çalışmalarında göstermiştir. Benzer şekilde, bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar *Salmonella* türlerinin taşıdığı çeşitli büyüklükteki plazmitlerin eliminasyonunda EtBr’ün etkin bir madde olduğunu göstermiştir.

Çalışmada kullanılan *Salmonella* izolatlarının taşıdıkları plazmitlerin *C.elegans*’taki patojenitede gerekli olup olmadığını göstermek için, plazmit eliminasyonu yapılmış *Salmonella* izolatları ile beslenen nematod gruplarından elde edilen TD50 verileri ile plazmit taşıyan *Salmonella* izolatları ile beslenen nematod gruplarından daha önce elde edilmiş olan TD50 verileri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonuçları, tavuk karkaslarından izole edilmiş olan *S.Kentucky* ve *S.Infantis* suşlarının taşıdıkları plazmitlerin *C.elegans* patojenitesi için gerekli olduğunu göstermiştir. *C.elegans*, *S.Typhimurium*’un virülans faktörlerinin araştırılmasında başarılı bir şekilde kullanılan bir nematod model sistemidir⁵. Önceki çalışmalar, *S.enterica*’nın farklı serovarlarının *C.elegans*’ta patojenite açısından önemli farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur¹⁹. S.Heilderberg izolatları ile yapılan bir çalışmada plazmit taşıyan ve taşımayan izolatların *C.elegans*’a karşı olan patojeniteleri arasında bir fark olmadığı tespit edilmiştir²⁰. Daha önceki çalışmamızda, plazmit taşıyan *S.Kentucky* (A10) ve *S.Infantis* (A16) izolatlarının *C.elegans* nematod model sistemine patojen olduğu gösterilmiştir⁶. Devam niteliğindeki bu çalışma, plazmit eliminasyonu yapıldıktan sonra *Salmonella* izolatlarının *C.elegans*’a karşı patojenitelerini kaybettiklerini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, *S.Kentucky* A10 izolatının taşıdığı 31.6 kb büyüklüğündeki plazmidin ve *S.Infantis* A16 izolatının taşıdığı 42.4, 1.5, 1.2 kb büyüklüğündeki plazmitlerin *C.elegans*’ta patojenite için gerekliliğini ortaya koymuştur. Benzer şekilde, Burton ve arkadaşları²¹ *Shigella flexneri*’nin taşıdığı virülans plazmidinin *C.elegans*’ta patojeniteden sorumlu olduğunu göstermiştir.

İzolatların taşıdıkları plazmitlerin antibiyotik direnç genleri taşıyıp taşımadığını belirlemek amacı ile plazmit eliminasyonu yapılmış *Salmonella* izolatlarının dirençli olduğu

antibiyotiklerin MİK değerleri belirlenmiştir. İzolatların taşıdıkları plazmitler *C.elegans* patojenitesi için gerekli olmasına rağmen, bu plazmitlerin eliminasyonu izolatların antibiyotik direnç profillerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu sonuçlar, S.Kentucky A10 ve S.Infantis A15 ve A16 izolatlarında çoklu ilaç direncinin kromozomal kökenli olduğuna işaret etmektedir.

Bu çalışma, Kentucky ve Infantis serovarlarının taşıdıkları plazmitlerin *C.elegans* nematod model sistemde görülen patojenitede rol aldığına dair ilk in vivo verileri ortaya koyması bakımından önem taşımaktadır ve *Salmonella* patojenitesinin anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Elde verilen veriler ışığında, *C.elegans* patojenitesi için gerekli bu plazmitlerin taşıdıkları virülans genlerinin tespiti ve plazmitlerin aktarılabiliirliğinin belirlenmesi çalışmanın bir sonraki basamağı olarak planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Panisello PJ, Rooney R, Quantick PC, Stanwell-Smith R. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. *Int J Food Microbiol* 2000; 59(3): 221-34.
2. Su LH, Chiu CH, Chu C, Ou JT. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clin Infect Dis* 2004; 39(4): 546-51.
3. Bouchrif B, Paglietti B, Murgia M, et al. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3(1): 35-40.
4. Sifri CD, Begun J, Ausubel FM. The worm has turned -microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol* 2005; 13(3): 119-27.
5. Aballay A, Yorgey P, Ausubel FM. *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 2000; 10(23): 1539-42.
6. Aksoy D, Şen E. Gıda kökenli *Salmonella* enterica suşlarının patojenik fenotiplerinin ve virülans determinantlarının *Caenorhabditis elegans* hayvan modelinde incelenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(4): 513-24.
7. Zaman MA, Pasha MH, Akhter MZ. Plasmid curing of *Escherichia coli* Cells with ethidium bromide, sodium dodecyl sulfate and acridine orange. *Bangladesh J Microbiol* 2010; 27(1): 28-31.
8. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145(3): 1365-73.
9. Ikeda T, Yasui C, Hoshino K, Arikawa K, Nishikawa Y. Influence of lactic acid bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against *Salmonella* enterica serovar enteritidis. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(20): 6404-9.
10. Labrousse A, Chauvet S, Couillault C, Kurz CL, Ewbank JJ. *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr Biol* 2000; 10(23): 1543-5.
11. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008; 3(2):163-75.
12. Foley SL, Johnson TJ, Ricke SC, Nayak R, Danzeisen J. *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. *Microbiol Mol Biol Rev* 2013; 77(4): 582-607.
13. Töreci K, Erdem B, Öngen B. Türkiye’de 2011 yılı sonuna kadar izolasyonu bildirilen *Salmonella* serovarları. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(3): 442-60.
14. Swartz MN. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clin Infect Dis* 2002; 34(Suppl 3): S111-22.

15. Ramirez MS, Traglia GM, Lin DL, Tran T, Tolmasky ME. Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* paradigm. *Microbiol Spectr* 2014; 2(5): 1-15.
16. Letchumanan V, Chan KG and Lee LH. An insight of traditional plasmid curing in *Vibrio* species. *Front Microbiol* 2015; 6: 735.
17. Molina-Aja A, García-Gasca A, Abreu-Grobois A, Bolán-Mejía C, Roque A, Gomez-Gil B. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured Penaeid shrimp. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 213(1): 7-12.
18. Shahid M, Malik A, Sheeba. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring R-plasmids and AmpC beta-lactamases isolated from hospitalised burn patients in a tertiary care hospital of North India. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 228(2): 181-6.
19. Chai-Hoon K, Jiun-Horng S, Shiran MS, et al. *Caenorhabditis elegans*-based analysis of *Salmonella enterica*. *Int Food Res J* 2010; 17(4): 845-52.
20. Hoffmann M, Zhao S, Pettengill J, et al. Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates from humans, retail meats, and animals. *Genome Biol Evol* 2014; 6(5): 1046-68.
21. Burton EA, Pendergast AM, Aballay A. The *Caenorhabditis elegans* ABL-1 tyrosine kinase is required for *Shigella flexneri* pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(7): 5043-51.