

TÜRKİYE'DE İZOLE EDİLEN *SALMONELLA ENTERICA* SEROTİP TYPHIMURIUM SUŞLARININ PLAZMİT PROFİLLERİ VE RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) ANALİZİ

PLASMID PROFILES AND RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA ANALYSIS OF *SALMONELLA ENTERICA* SEROTYPE TYPHIMURIUM ISOLATED IN TÜRKİYE

Birsel ERDEM

Alper TEKELİ

Fikret ŞAHİN

Esra KOYUNCU

Mehseti BAYRAMOVA

Dursun KARASARTOVA

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Anahtar Sözcükler: *Salmonella* serotip Typhimurium, plazmit profili, randomly amplified polimorphic DNA (RAPD), Türkiye

Keywords: *Salmonella* serotype Typhimurium, plasmid profile, randomly amplified polimorphic DNA (RAPD), Turkey

Geliş: 24 Nisan 2007

Kabul: 06 Mayıs 2007

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye'de izole edilen duyarlı ve çoklu dirençli *Salmonella* serotip Typhimurium suşlarının plazmit profillerinin ve RAPD-PZR (randomly amplified polymorphic DNA-PCR) modellerinin araştırılması amacıyla Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Enterobakteri Laboratuvarı'nın kültür koleksiyonlarından seçilen 55 *S. Typhimurium* klinik izolatu incelenmiştir. İncelenen suşların 45'inin (%82), büyüklükleri 1.0 ile 100 kilobaz çifti (kbç) arasında değişen 1 ile 3 plazmiti vardı. En yaygın plazmit 90 kbç büyüklüğündeki plazmitti ve bu plazmiti 35 suş (%64) tek başına veya başka plazmitlerle birlikte taşıyordu. AA/CCSSuT-direnç tipindeki suşların 20'sinde (%80), benzer plazmit profili vardı: 90 kbç büyüklüğünde tek bir plazmit. RAPD yönteminde, OPB-17 primeri kullanıldığında suşların hiçbirisinde herhangi bir bant oluşmadı. Primer p-1254 ile, 46 suş (%84), onsekiz RAPD-PZR kümesine ayrıldı. AA/CCSSuT-direnç tipindeki suşlar (25) yedi farklı RAPD-PZR modeli gösterirken, bu suşların yedisinin küme analiz programı ile %100 benzerlik gösterdiği anlaşıldı. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *S. Typhimurium* suşlarının incelenmesinde primer p-1254 kullanılarak yapılan RAPD-PZR analizi, kolay, hızlı, ayırdedici ve antibiyogram ile plazmit profillerini tamamlayıcı bir yöntemdir ve halen Türkiye'de salgınlara yol açabilen *S. Typhimurium*'un araştırılmasına katkıda bulunabilir. Bu çalışmada, Türkiye'de, duyarlı ve çoklu dirençli (AA/CCSSuT-direnç tipindeki izolatlara da kapsayan) *S. Typhimurium* suşlarının plazmit profilleri ve RAPD-PZR yöntemleri ile elde edilen ilk bulgular sunulmaktadır.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the characteristics of susceptible and multiresistant *Salmonella* serotype Typhimurium strains isolated in Turkey by plasmid profiles and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) patterns. Totally 55 *S. Typhimurium* clinical strains were selected from the culture collection of the Enterobacteria Laboratory of the Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Medical School, Ankara University, for molecular analysis using plasmid profiles and the RAPD method. Forty-five isolates (82%) harbored one to three plasmids ranging in size from 1.0 to 100 kilobase pair (kbp). 90 kbp plasmids were the most common plasmids, and thirty-five strains (64%) carried 90kbp plasmids alone or together with other plasmids. Twenty strains (80%) of the isolates with AA/CCSSuT-R type carried the same plasmid profile: a single plasmid sized at 90 kbp. None of the strains analyzed displayed any RAPD-PCR bands with the primer OPB-17. By using primer p-1254, 46 strains (84%) were divided into 18 RAPD-PCR patterns. While the isolates with AA/CCSSuT-R type were divided into 7 RAPD patterns, 9 of these strains showed 100% similarity by the cluster analysis program. Analysis of RAPD-PCR with primer p-1254 can be used as an easy, rapid and discriminative method complementing antibiogram and plasmid profiles, and may contribute to the investigations of *S. Typhimurium*, which still cause outbreaks in Turkey. This study presents the first report on susceptible and multiresistant (including ones with AA/CCSSuT-R type) *S. Typhimurium* isolates in Turkey investigated by plasmid profiles and RAPD methods.

GİRİŞ

Salmonella infeksiyonları en önemli halk sağlığı problemlerinden biridir (1). Son yıllarda tifo-dışı *Salmonella* infeksiyonlarında çok belirgin bir artış görülmektedir. Türkiye'de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip Typhimurium, gıda kaynaklı infeksiyonlara sık yol açan serotiplerden biri olduğu gibi bağırsaklar dışında da invazif infeksiyonlara yol açan en önemli serotiplerden biridir (2). Tüm dünyada, antibiyotiklere dirençli *Salmonella* suşlarının insidansındaki artış önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Türkiye'den de çoklu dirençli *S. Typhimurium* suşları bildirilmektedir. Özellikle ampicilin (A) amoksisilin/klavulanik asit (A/C), kloramfenikol (C), streptomisin (S), sulfisokzasol (Su) ve tetrasiklin (T)'e dirençli olan ve direnç modeli AA/CCSSuT şeklinde gösterilen çoklu dirençli *S. Typhimurium* suşlarının Türkiye'de pek çok şehirde izole edildiği daha önce bildirilmiştir (2, 3). Bununla birlikte, Türkiye'de *S. Typhimurium* suşlarının epidemiyolojisi üzerine daha fazla bilgi bulunmamaktadır.

Bakterilerin kaynaklarını ve bulaşma zincirlerini belirlemek için epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır. Türkiye'de, *Salmonella* suşları, mikrobiyoloji laboratuvarlarında genellikle serotiplendirme ve antibiyotik duyarlılık testleri ile fenotipik olarak tanımlanmaktadır. Oysa, dünyada yaygın olan bazı *Salmonella* serotiplerinde, faj tiplendirmesi, suşların ayırımında ve alt tiplendirmesinde epidemiyolojik bir yöntem olarak altın standart değerinde kabul edilen fenotipik bir yöntemdir. Ancak *Salmonella* faj tiplendirmesi dünyada birkaç referans merkezinde yapılabilen bir yöntemdir ve Türkiye'de rutin olarak uygulanmamaktadır. Ayrıca faj tiplendirme yöntemi, belirli bölgelerden izole edilen sınırlı sayıda lokal suşların çoğunlukla belirli birkaç faj tipi içinde yoğunlaştığı durumlarda suşların ayırımında çok yararlı olamamaktadır (4). Bu nedenle epidemiyolojik çalışmalarda, *Salmonella* izolatlarını birbirinden ayırtmak ve suşlar arasındaki ilişkiyi (benzerlik ve farklılıkları) değerlendirmek için pratik bir tekniğe gereksinim vardır.

Bu çalışmada; *S. Typhimurium* epidemiyolojisini daha anlaşılır kılmak için, Türkiye'de izole edilen *S. Typhimurium* suşlarını plazmit profil analizi ve randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analizi ile incelemek üzere moleküler bir araştırma planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Enterobakteri

Laboratuvarı'nın kültür koleksiyonlarında bulunan 55 *Salmonella* Typhimurium suşu çalışmaya alınmıştır. Bu suşlar, daha önceki bir çalışma kapsamında (2), çeşitli illerdeki [Ankara (23), Antalya (1), Bursa (7), Edirne (6), Eskişehir (2), İzmir (1), Kayseri (10), Konya (4), Trabzon (1)] klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, 2000 yılından itibaren, klinik örneklerinden [kan (9), dışkı (41), idrar (4) ve katater (1)] standart yöntemlerle izole edilmiş; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda serotiplendirilmiş; National Committee for Clinical Laboratory Standards'ın kılavuzunda açıklandığı şekilde agar dilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal duyarlılıkları belirlendikten sonra, mikrobank kültür saklama tüpleri içinde -80° C'de saklanmakta olan izolatlardır. Çalışmaya alınan her bir izolatin mikrobank kültür saklama tüplerindeki boncuklarından birer örnek alınarak Mac Conkey agar plaklarına ekilip 37° C'de etüvde 24-48 saat inkübe edilerek yeniden üretilmesi sağlanmıştır.

Plazmit eldesi ve plazmit profil analizi: Plazmitler, Kado ve Liu yönteminde (5) küçük değişiklikler yapılarak elde edildikten sonra, 0.5 X Tris-borik asit-EDTA (TBE) solusyonundaki 0.5 µg etidiyum bromit ml⁻¹ içeren %0.7'lik horizontal agaroz jelde (Serva, Heidelberg, Almanya) 100 V'da iki saat yürütülerek ayrılmıştır. İncelenen suşların plazmit büyüklükleri, plazmit büyüklükleri bilinen *E.coli* V517 suşu, *Salmonella* Typhimurium 020255-Ankara suşu (90 kbç), *Salmonella* Enteritidis 006956-Ankara (57, 5.8, 4.8 kbç) suşu ve bir moleküler büyüklük markeri (gene ruler 1kbp DNA Ladder, Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lituanya) ile birlikte elektroforez uygulanarak belirlendi. Plazmit DNA bantları, UV transiluminatörde (TFX 20M-Vilber Lourmat, Marne la Vallee, Fransa) görüntülendi. Kontrol suşları (*S. Typhimurium* 020255-Ankara ve *S. Enteritidis* 006956-Ankara) Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Bulaşıcı Hastalıklar Araştırma Bölümü'nden sağlandı.

RAPD-PZR yöntemi için bakteriyel genomik DNA eldesi: Ling ve ark.(6)'nın uyguladığı fenol-kloroform yöntemi küçük değişikliklerle uygulandı. Her suş için agar plak kültürlerinden alınan tek bir koloni, 3 ml brain-heart infüzyon broth besiyerine (LAB M, Lancashire, İngiltere) pasajlanarak, bir gece 37° C'de inkübe edildi. Bakteri hücreleri çöktürüldü ve 1 ml 50mM Tris-HCl – 20mM EDTA (pH:8) ile yıkandı. Daha sonra çöken hücreler 555 µl, 50mM Tris HCl-10mM EDTA (pH 8), 12 µl RNase (10mg/ml), 30 µl %10 sodyum dodesil sulfat (SDS) ve 10 µl proteinaz K (20mg/ml) içinde yeniden süspanse edildi. Karışım 55° C'de iki saat inkübe edildi

ve DNA eldesi dokudan genomik DNA ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel, Düren, Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. DNA miktarı ve niceliği cyber green (Roche, Mannheim, Almanya) ile inkübasyondan sonra standart DNA eğrisi ile kıyaslanarak spektrofotometre (Jasco FP777, New Jersey, ABD) kullanılarak hesaplandı.

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD-PZR)

analizi: Lin ve ark. (7)'nin yöntemi küçük değişikliklerle uygulandı. Isı döngüleri thermocycler (Techne, Cambridge, İngiltere) kullanılarak uygulandı. Reaksiyon, 50 pmol primer, 200 µm dNTP mix (Larova, Teltow, Almanya), 3.5 mM MgCl₂, 10X reaksiyon buffer (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris HCl pH 8.8, % 0.1 Tween-20), 2 U Taq DNA polimeraz (Bioron, Ludwigshafen, Almanya) ve 50 ng kalıp DNA içeren toplam 50 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Döngü koşulları p-1254 primeri için 4 döngü 4 dakika 94° C, 4 dakika 35° C ve 4 dakika 72° C, takiben 30 döngü 30 saniye 94° C, 60 saniye 35° C, 2 dakika 72° C ve son uzama 72° C de 5 dakika olacak şekilde ayarlandı. OPB-17 primeri için döngü koşulları p-1254 primerininki ile aynı olmakla birlikte döngü sayısı 35 olacak şekilde uygulandı. Her döngüde kalıp DNA içermeyen master miks tüpleri kontrol tübü olarak deneye alındı. Tekrarlanabilirlik için her deney iki kere yapıldı. PCR ürünleri 0.5 X TBE buffer içinde 0.5 µg ethidium bromide ml⁻¹ içeren %2'lik agaroz jelde (Serva, Heidelberg, Almanya) elektroforez uygulandı ve UV transilluminator (TFX 20M-Vilber Lourmat, Marna la Vallee, Fransa) ile görüntüldü.

Görüntüleme: Elektroforez sonrasında jel fotoğrafları DigiGenius görüntüleme sistemi (Syngene-UK) kullanılarak çekildi.

Değerlendirme: RAPD-PZR yönteminde izolatlara ait bant sayıları ve ilişkileri GeneDirectory (Syngene-UK) jel analiz programı kullanılarak incelendi. Küme analizinde Dice benzerlik katsayısı ve UPGMA (unweighted pair-group method average) ilişki kuralı parametreleri kullanıldı. Açık, net olmayan ve deneylerin tekrarında gösterilemeyen bantlar çalışma dışı bırakıldı.

BULGULAR

Bulguları değerlendirmek için, çalışma için seçilen suşlar dört sınıfa ayrıldı: antimikrobialere duyarlı izolatlar (s: 13); bir antimikrobialere dirençli izolatlar (s: 8); iki veya daha çok antimikrobialere dirençli izolatlar (s: 9) ve AA/CCSSuT direnç modeli olan izolatlar (s: 25).

Salmonella Typhimurium izolatlarının plazmit DNA içerikleri kilobaz çifti (kbç) şeklinde molekül ağırlıklarına uygun olarak tanımlanmıştır. İncelenen suşların 45'inin (%82), büyüklükleri 1.0 ile 100 kilobaz çifti (kbç) arasında değişen 1 ile 3 plazmiti vardı, kalan 10 suş (%18) plazmit taşıymıyordu. En yaygın plazmit 90 kbç büyüklüğündeki plazmitti ve bu plazmiti 35 suş (%64) tek başına veya başka plazmitlerle birlikte taşıyordu. AA/CCSSuT-direnç (ampisiline, amoksisilin/klavulanik asite, kloramfenikole, streptomisine, sulfisoksazole, tetrasikline direnç) tipindeki 25 suşun 20'sinde (%80), benzer plazmit profili vardı: 90 kbç büyüklüğünde tek bir plazmit. Dört sınıfta değerlendirilen *S. Typhimurium* izolatlarının plazmit profilleri Tablo 1, 2, 3 ve 4'te görülmektedir.

RAPD yönteminde OPB-17 primeri kullanıldığında, incelenen 55 *S. Typhimurium* suşlarının hiçbirisinde ayırımı sağlayabilecek herhangi bir bant oluşmadı.

Primer p-1254 ile amplifikasyondan sonra, suşların dokuzu (%16) hiçbir bant oluşturmadığı halde, kalan 46 suş (%84), büyüklükleri 100 ile 1500 baz çifti (bç) arasında değişen bantlarla onsekiz RAPD-PZR bant modeline (kümesine: KI - KXVIII) ayrıldı. Dört sınıfta değerlendirilen *S. Typhimurium* izolatlarının p-1254 primeri ile elde edilen RAPD bant modellerinin küme dağılımları Tablo 1, 2, 3 ve 4'te; bant modellerinin dendogramları ise Şekil 1, 2, 3 ve 4'te görülmektedir.

Bu yöntemle elde edilen bantlar, % 2 tolerans değeri ile moleküler ağırlık belirteciye göre, Dice katsayısı ve UPGMA ilişki kuralı ile değerlendirildi (Şekil 1, 2, 3 ve 4).

Duyarlı *S. Typhimurium* suşlarından altısı (no. 8-13) p-1254 primeri kullanıldığında da herhangi bir bant oluşturmadı. Onüç duyarlı izolatın yedisi (%54), oluşturdukları bantların küme analiz programı ile bilgisayarda incelenmesinden sonra dört küme (KI, KII, KIII ve KIV) ayrıldı. Küme I'deki (KI) üç izolat (no.1-3), %92'nin üzerinde benzerlik göstermekteydi ve bu izolatların ikisi (no. 1 ve 2) ise birbirinin tamamen aynıydı. Küme I'deki (KI) yedi izolat (no. 1-7) küme analiz programında birlikte değerlendirildiğinde, birbirleriyle %50'den çok benzer bulundu (Tablo 1 ve Şekil 1).

Bir antimikrobialere direnç gösteren *S. Typhimurium* izolatlarından yedisi birbirlerine %70'den çok benzerlik gösteren üç kümede toplandı (KV, KVI ve KVII). Küme V'teki iki suş (no. 14 ve no. 15) %100 benzerlik göstermekteydi ve küme VI'nın iki suşu (no.18 ve no.19) da tamamen benzerdi. Geri kalan tek izolat (no. 21) bant oluşturmadı (Tablo 2 ve Şekil 2).

Tablo 1. Antimikrobilyallere duyarlı *S. Typhimurium* izolatlarının plazmit profilleri ve RAPD kümeleri

İzolat no.	İzolasyon tarihi	Şehir	Klinik örnek	Plazmit profili (kbç)		RAPD modeli (p-1254)
1	10.10.2000	Edirne	Dışkı	90		K I
2	07.12.2000	Kayseri	Dışkı	90		K I
3	21.12.2000	Bursa	Kan	90	3.0	K I
4	18.09.2000	Ankara	Dışkı	90	2.5	K II
5	29.10.2001	Edirne	Dışkı	90	2.5	K II
6	13.08.2001	Ankara	Kan	-		K III
7	27.08.2000	Ankara	Dışkı		3.3 3.0 1.7	K V
8	10.05.2001	Ankara	İdrar	90		-
9	01.11.2001	Kayseri	Dışkı	-		-
10	01.04.2002	Edirne	Dışkı	90		-
11	10.04.2002	Konya	Kan	-		-
12	13.10.2001	Bursa	Dışkı		4.0 3.0	-
13	13.12.2000	Ankara	Dışkı		3.3 3.0 1.7	-

Tablo 2. Bir antimikrobilyale dirençli *S. Typhimurium* izolatlarının plazmit profilleri ve RAPD kümeleri.

İzolat no.	İzolasyon tarihi	Şehir	Klinik örnek	Direnç modeli	Plazmit profili (kbç)		RAPD modeli (p-1254)
14	24.03.2002	Ankara	Dışkı	T	90		K V
15	23.10.2000	Edirne	Dışkı	C	90	30 2.2	K V
16	19.09.2001	Ankara	İdrar	C		-	K V
17	21.05.2001	Ankara	Dışkı	T	90	2.5	K VI
18	12.09.2001	Ankara	Dışkı	A	90	5.8 2.0	K VI
19	24.10.2001	Ankara	Dışkı	A		-	K VI
20	17.05.2000	Antalya	İdrar	T/S	100	2.6 1.7	K VII
21	03.12.2001	Ankara	Dışkı	C		-	-

A: Ampisilin, A/C: Amoksisilin/Klavulanik asit, C: Kloramfenikol, T: Tetrasiklin, G: Gentamisin, T/S: Trimetoprim/Sulfametoksazol

Tablo 3. İki ve daha çok antimikrobilyale dirençli *S. Typhimurium* izolatlarının plazmit profilleri ve RAPD kümeleri

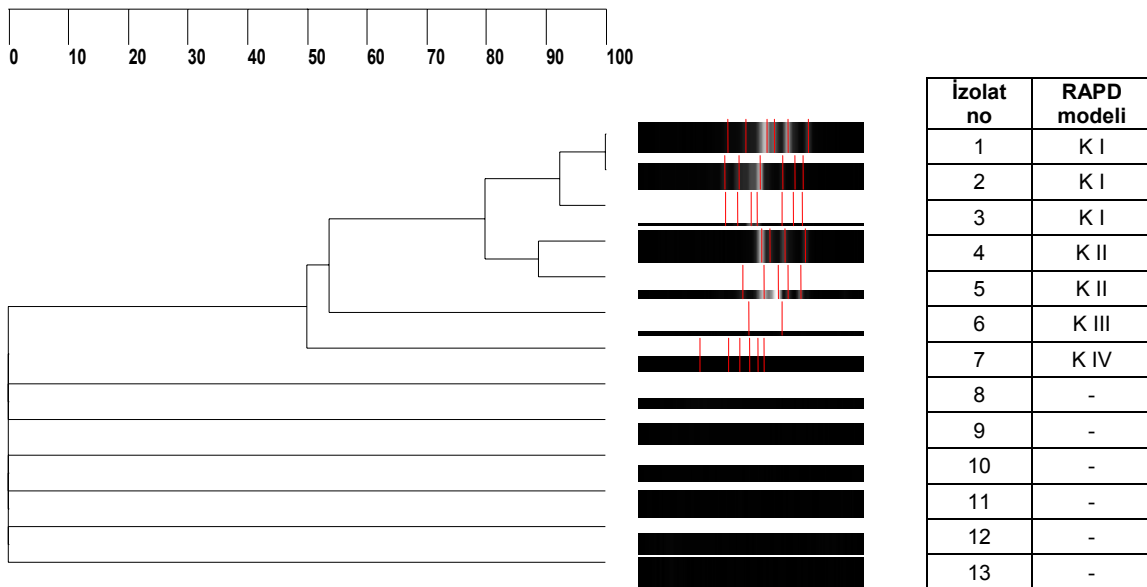
İzolat no.	İzolasyon tarihi	Şehir	Klinik örnek	Direnç modeli	Plazmit profili (kbç)		RAPD modeli (p-1254)
22	27.07.2001	Ankara	Dışkı	A C T		-	K VIII
23	26.03.2001	Ankara	Dışkı	A A/C C		1.0	K VIII
24	12.09.2001	Ankara	Dışkı	AT	90	5.8 2.0	K VIII
25	22.12.2001	Ankara	İdrar	AC		-	K IX
26	23.08.2001	Ankara	Dışkı	AT		-	K IX
27	27.10.2001	Ankara	Dışkı	AA/C	85	6.0 1.5	K IX
28	04.09.2001	Ankara	Kan	AT		-	K X
29	19.01.2002	Trabzon	Kan	AA/C	70		K XI
30	04.09.2001	Bursa	Dışkı	AT	90		-

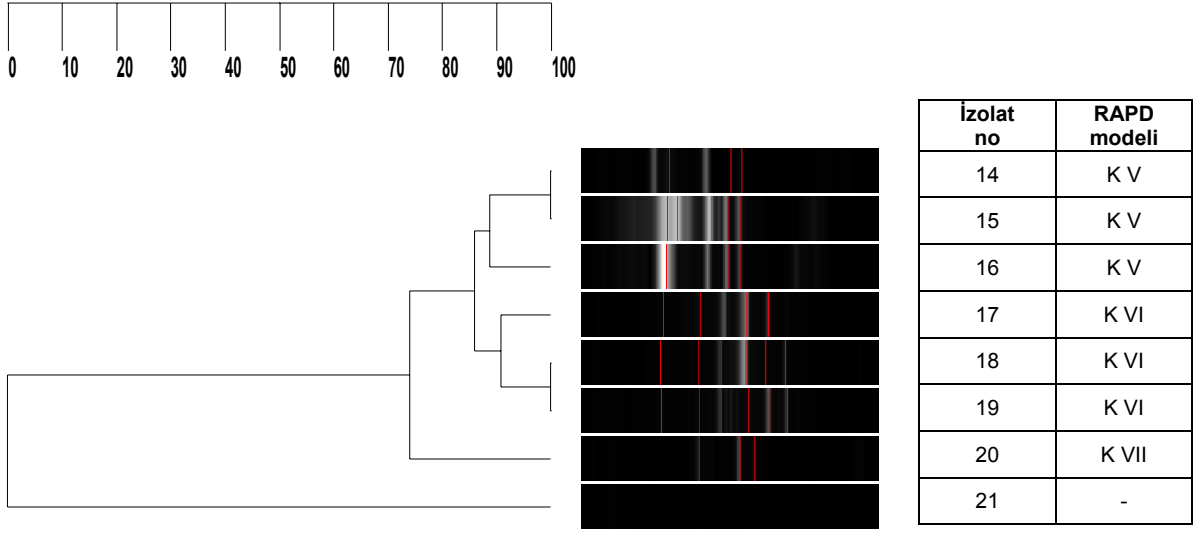
A: Ampisilin, A/C: Amoksisilin /Klavulanik asit, C: Kloramfenikol, T: Tetrasiklin

Tablo 4. AA/CCSSuT-direnç tipindeki S. Typhimurium izolatlarının plazmit profilleri ve RAPD kümeleri

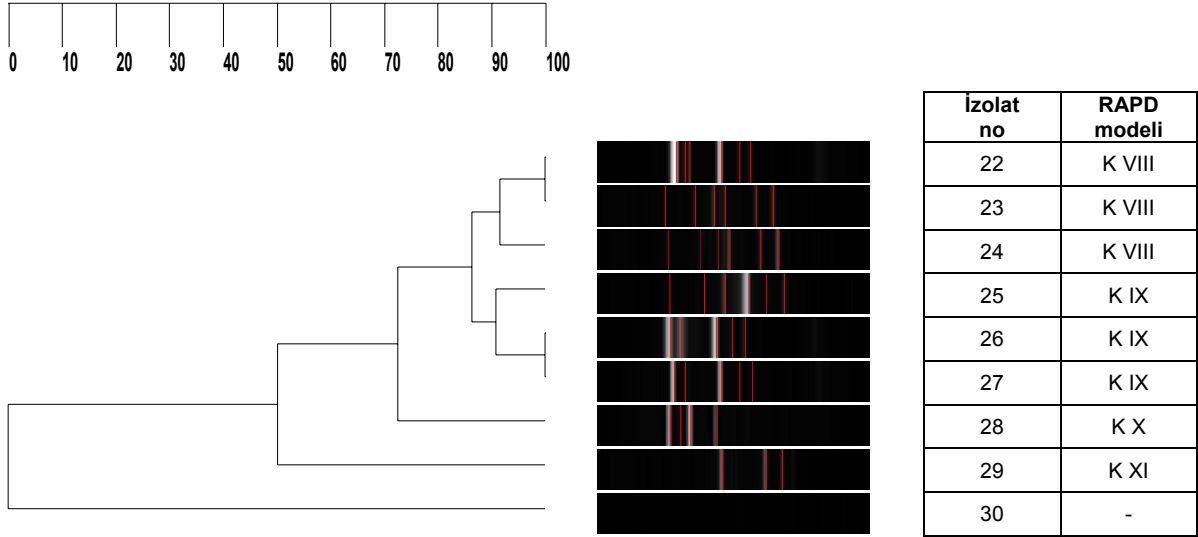
İzolat no.	İzolasyon tarihi	Şehir	Klinik örnek	Direnç modeli	Plazmit profili (kbç)		RAPD modeli (p-1254)
31	30.12.2000	Kayseri	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XII
32	10.11.2000	Kayseri	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XII
33	04.09.2000	Ankara	Katater	A A/CCSSuT	90		K XII
34	11.07.2000	Kayseri	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XII
35	20.12.2000	Bursa	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XII
36	10.10.2000	Kayseri	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XII
37	07.09.2000	Ankara	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XII
38	13.07.2000	Ankara	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XII
39	24.09.2000	Kayseri	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XII
40	10.02.2001	Edirne	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XIII
41	14.08.2001	Konya	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XIII
42	16.10.2001	Bursa	Kan	A A/CCSSuT	90		K XIV
43	24.11.2000	Eskişehir	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XIV
44	25.05.2001	Kayseri	Dışkı	A A/CCSSuT	50	2.7	K XIV
45	10.11.2000	Eskişehir	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XV
46	12.02.2001	Kayseri	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XV
47	07.01.2001	Konya	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XV
48	08.01.2001	Kayseri	Dışkı	A A/CCSSuT		7.0 1.5	K XVI
49	05.02.2001	Izmir	Kan	A A/CCSSuT	90		K XVI
50	10.10.2001	Bursa	Kan	A A/CCSSuT	90		K XVI
51	14.12.2001	Konya	Dışkı	A A/CCSSuT	90		K XVII
52	23.02.2001	Bursa	Dışkı	AA/CCGSSuTT/S	100	4.0 1.0	K XVIII
53	03.07.2000	Ankara	Kan	A A/CSSuTT/S	90	6.0 2.5	K XVIII
54	05.02.2001	Ankara	Dışkı	A A/CCSSuTT/S	90	7.0	K XVIII
55	01.12.2000	Edirne	Dışkı	A A/CCSSuT	90		-

A: Ampisilin, A/C: Amoksisilin/Klavulanik asit, C: Kloramfenikol, G: Gentamisin, S: Streptomisin, Su: Sulfisoksazol, T: Tetrasiklin, T/S: Trimetoprim/Sulfametoksazol

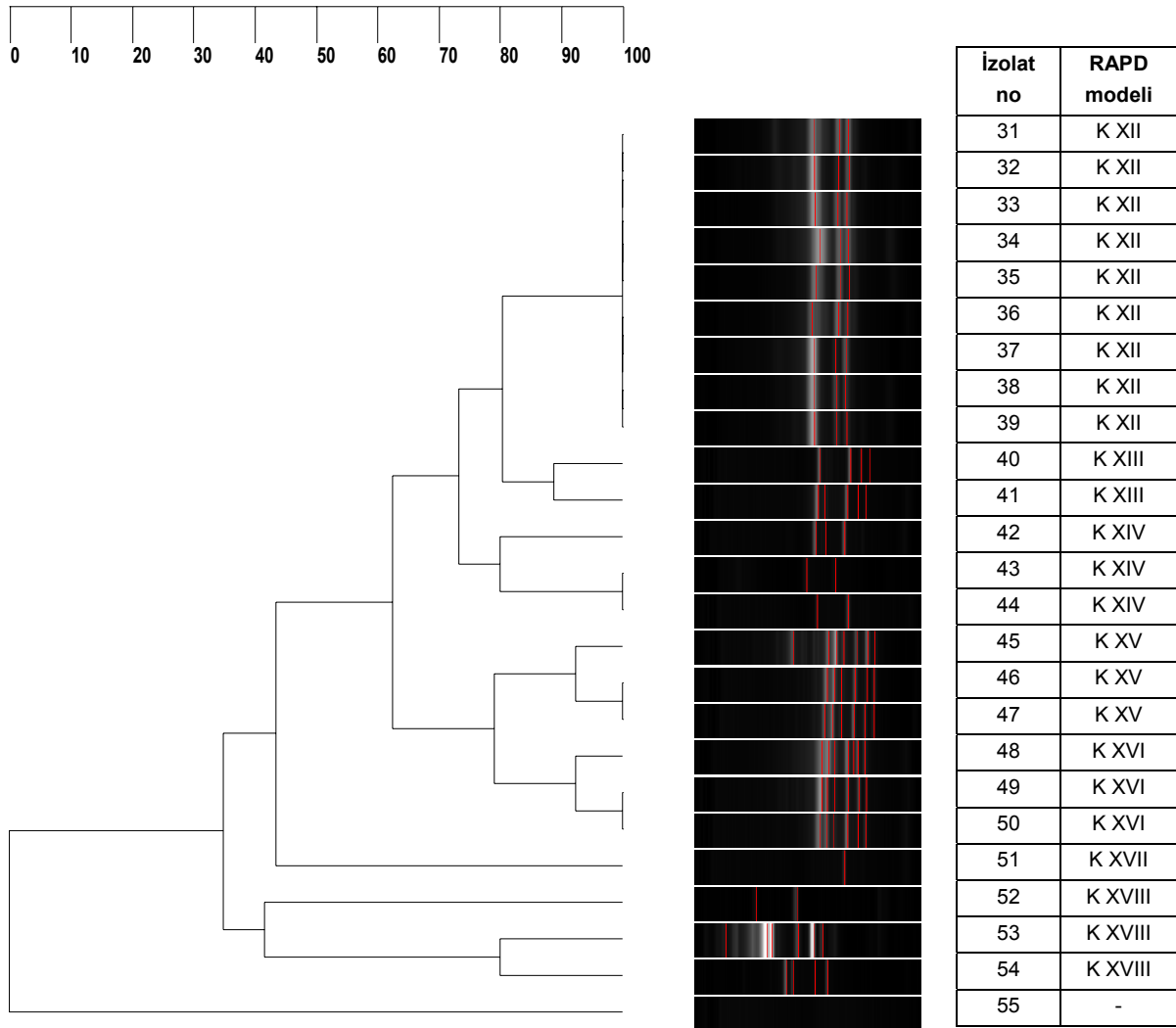
**Şekil 1.** Antimikrobilyelere duyarlı S. Typhimurium izolatlarının p-1254 primeri ile elde edilen RAPD bant modellerinin dendrogramı



Şekil 2. Bir antimikrobiyale dirençli *S. Typhimurium* izolatlarının p-1254 primeri ile elde edilen RAPD bant modellerinin dendogramı



Şekil 3. İki ve daha çok antimikrobiyale dirençli *S. Typhimurium* izolatlarının p-1254 primeri ile elde edilen RAPD bant modellerinin dendogramı



Şekil 4. AA/CCSSuT-direnç tipindeki S. Typhimurium izolatlarının p-1254 primeri ile elde edilen RAPD bant modellerinin dendogramı

İki ve daha çok antimikrobilye dirençli sekiz S. Typhimurium izolatı dört kümede gruplandı (KVIII, KIX, KX ve KXI). Bu sekiz izolat küme analiz programı ile %50'nin üzerinde benzer bulundu. Küme VIII'in iki suşu (no. 22 ve no. 23) birbirleriyle ve küme IX'un suşları da birbirleriyle tamamen benzer bulundu. İki ve daha çok antimikrobilye dirençli olan S. Typhimurium'lardan biri bant oluşturmadı (Tablo 3 ve Şekil 3).

AA/CCSSuT-direnç tipindeki suşlardan biri p-1254 primeri ile amplifikasyondan sonra hiçbir bant oluşturmazken, kalan 24 izolat oluşturdukları bant modelleri ile yedi küme içinde gruplandı (K XII, K XIII, K XIV, K XV, K XVI, K XVII ve K XVIII). Küme XII'nin dokuz suşun (no.31-39) RAPD-PZR bantlarının küme analiz programı

ile tamamen benzer olduğu görüldü. Küme XIV'in iki suşu (no. 43 ve 44) %100 benzerdi ve küme XV'in de iki suşu (no. 46 ve 47) tıpatıp benzemekteydi. Ayrıca küme XVI'nın iki suşu (no. 49 ve 50) tamamen benzer bulundu (Tablo 4 ve Şekil 4).

TARTIŞMA

Bu makalede, Türkiye'de 2000 yılından sonra izole edilen S. Typhimurium suşlarının genotipik ilişkisini araştıran moleküler çalışmanın sonuçları sunulmaktadır. Antimikrobilyelere duyarlı ve çoklu dirençli S. Typhimurium suşlarının alt tiplendirimi için plazmit profilleri ve RAPD-PZR yönteminin kullanılmıştır.

Son yıllarda Türkiye'de çoklu dirençli *S. Typhimurium*'a bağlı infeksiyonlar ve hatta salgınlar dikkati çekmeye başlamıştır. Bu nedenle klinik mikrobiyologlar, *S. Typhimurium* izolatlarının birbiriyle ilgisini belirleme gereksinimi duyarlar. Türkiye'de *S. Typhimurium*'un klinik izolatlarının çoğu en az beş antimikrobial dirençli olan ACSSuT- direnç modelinde olan suşlardır (2, 3, 8). Bu direnç tipi, genellikle *S. Typhimurium*'un DT104 faj tipindeki suşlarda bulunur. Çoklu dirençli *S. Typhimurium* faj tip 104 (DT104), 1990'larda hızla yaygınlaşarak birçok Avrupa ülkesinde, Kuzey Amerika'da, Orta Asya'da, Güney Afrika'da ve Uzak Doğu'da, insan ve hayvanlarda çok büyük oranda infeksiyonlara neden olan önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. *Salmonella* Typhimurium DT 104 suşları, ampisiline, kloramfenikole, streptomisine, sulfonamitlere ve tetrasikline dirençli (ACSSuT) suşlardır (9). Ancak Türkiye'de faj tiplendirme yapılamadığından bu direnç modeline sahip *S. Typhimurium* izolatlarının faj tipi bilinmemekte ve suşlar arasındaki yakınlık tam olarak aydınlatılamamaktadır. Öte yandan Türkiye'de *S. Typhimurium*'un klinik izolatlarının çoğu ACSSuT- direnç modelinde olan suşlar olduğundan (2) antibiyogram, *S. Typhimurium* izolatlarının alt tiplendiriminde yararlı değildir. Ancak, *S. Typhimurium* izolatlarının, epidemiyolojik bulgular elde edilmesi için etkin ve duyarlı moleküler yöntemlerle ayırımı son derece önemlidir.

Plazmitler, çoğunlukla kovalan olarak kapalı, dairesel yapıda, çift iplikçikli kromozom dışı DNA molekülleridir. Bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olurlar. Epidemiyolojik amaçlar için uygulanan plazmit tiplendirme yöntemi (plazmit profil analizi), suşlardaki plazmit DNA'sının ekstraksiyonundan sonra her bir suş taşıdığı plazmitlerin sayısı ve moleküler ağırlıklarının belirlenmesi temeline dayanır. Son yıllarda bakteri suşlarından plazmit DNA'sını elde etmek, agaroz jel elektroforezinde moleküler ağırlıklarına göre ayırmak, etidiyum bromit ile boyamak, kısa dalgalı ultraviyole ışığı altında inceleyip fotoğrafını çekmek için kısmen basit, ucuz ve çabuk yöntemler geliştirilmiştir. Çeşitli *Salmonella* salgınları bu yöntemin kullanılması ile aydınlatılmıştır. Ancak bu metod plazmit taşıyan suşlarla sınırlıdır. *Salmonella* serotiplerinin alt tiplendiriminde, suşların plazmit taşıdığı; suşların sadece serotipe özgü plazmit taşıdığı ya da suşların çok azının plazmiti olduğu durumlarda, plazmit profili faydalı olamamaktadır (4, 10).

Salmonella Typhimurium suşlarının çoğunluğu, 90 kbç (60-62 megadalton-MDa) büyüklüğünde serotipe özgü bir plazmit taşımaktadır (10, 11). Buna rağmen, suşlar

arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi tanımlamakta plazmit profil analizinin en az faj tiplendirme yöntemi kadar spesifik olduğu kabul edilir (4, 12).

Bu çalışmada, 45 (%82) izolatın bir ile üç plazmit taşıdığı gösterilmiştir. En yaygın plazmitin 90 kbç büyüklüğünde bir plazmit olduğu ve *S. Typhimurium* izolatlarının 35'inde (%64) bu 90 kbç'lik plazmitin tek başına veya diğer plazmitlerle birlikte; 26 (%47) izolatla bu plazmitin tek başına bulunduğu gösterilmiştir. AA/CCSSuT-direnç tipindeki 25 *S. Typhimurium* suşunun 20'sinin (%80), benzer plazmit profiline sahip olduğu gösterildi: 90 kbç büyüklüğünde tek plazmit. Bu bulgulara göre, Türkiye'de insanlardan izole edilen *S. Typhimurium* izolatlarının çoğunda serotipe özgü plazmit olan 90 kbç büyüklüğündeki plazmit bulunduğundan, *S. Typhimurium* suşlarının plazmit profil analizi, izolatların ayırımı için yeterli görünmemektedir. Plazmit profilleri, özellikle, AA/CCSSuT-direnç tipindeki *S. Typhimurium* suşlarının ayırımında tatmin edici bulunmamaktadır. Türkiye'de çoğu suşların benzer plazmit profili (90 kbç'lik serotipe özgü tek plazmit) olması nedeniyle, *S. Typhimurium* epidemilerinin izlenmesinde, plazmit profilleri kesinlikle başka bir yöntem ile birlikte kullanılmalıdır.

RAPD yöntemi son zamanlarda *Salmonella* suşlarında moleküler genotipik benzerlik veya farklılıkların ortaya konulması için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile Guanin + Sitozin içeriği yüksek olan ve spesifik bir gen bölgesini değil de genomik DNA üzerinde birçok gen bölgesine komplementer 10-15 bazlık kısa primerler kullanılarak genomik DNA'nın çoğaltılması ve agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi temeline dayanır. PCR ürünlerinin elektroforezinden sonra elde edilen bant modelleri, suşların parmak izini çıkarmada başarıyla kullanılmaktadır. Genetik parmak izi sonuçları epidemiyolojik değer taşıyabilmektedir (13, 14). Bu yöntem 1990'lı yılların başından beri, oluşan bantların sayısı ve dizilişlerindeki benzerlik ve farklılıklara bakılarak, çeşitli *Salmonella* serotiplerinin birbirinden ayrılmasında veya serotipler içindeki suşların alt tiplere ayrılmasında kullanılmaktadır (15). Özellikle *S. Dublin* (16), *S. Panama* (17), *S. Typhimurium* (7), *S. Typhi* (19) ve *S. Enteritidis* (20) serotiplerinde iyi ayırım sağladığı gösterilmiştir. Yöntemin tekrarlanabilirliği ile ilgili bazı görüşler öne sürülmüş (13, 21, 22), ancak yöntemin uygun primerler kullanıldığında, amplifikasyon ve saptama basamaklarının her zaman aynı koşullar altında yapıldığında hızlı, tekrarlanabilir ve ayırım gücü yüksek bir yöntem olduğu ortaya konulmuştur (7, 23-25).

Bu çalışmada RAPD analizi için, daha önce diğer araştırmacılar tarafından yararlı olduğu bildirilen OPB-17 ve p-1254 primerleri seçilmiştir (7). OPB-17 primeri ile incelenen 55 suşun hiçbirinde bant oluşmamasına karşın, p-1254 primeri ile, 55 S. Typhimurium suşunun 46'sı (%84) değerlendirmeye uygun bantlar oluşturmuştur. RAPD-PZR ile elde edilen DNA parçacıklarının oluşturduğu RAPD-PZR modelleri değerlendirilirken, DNA'nın nokta mutasyonları, delesyonları ve insersiyonları gibi tamamen rastlantısal olarak gelişebilen genetik olaylarının RAPD parmak izi modellerini değiştirebileceği gerçeği gözardı edilmemelidir (26). Bu çalışmada, RAPD bantlarındaki farklılıklar, bir veya birden fazla genetik olayın sonucu olabileceği nedeniyle, RAPD parmak izleri küme analiz programı ile inceledikten sonra %50 ve üzerinde benzerlik gösteren izolatlar bir küme içinde toplanmış ve sonuçların değerlendirilmesini kolaylaştırmak üzere her bir RAPD modeli için küme adları KI -KXVIII şeklinde kullanılmıştır. Bu çalışmada değerlendirilen 55 S. Typhimurium suşunun RAPD-PZR modelleri Tablo 1, 2, 3, ve 4'te görülmektedir. Bu bulgularla S. Typhimurium izolatlarının ayırımında RAPD yöntemi ile gözle bile ayırdedilebilen çok sayıda bantlar elde edilmesi, bu yöntemin bu serotiplerin tiplendirilmesinde kullanılabileceği kanısını oluşturmuştur.

Benzer antibiyotik direnç modelini taşıyan S. Typhimurium suşlarının RAPD ile incelenmesiyle tüm antimikrobiallere duyarlı olan S. Typhimurium izolatlarının dört bant modeli oluşturduğu (KI – KIV) ve bu izolatların arasında %50 benzerlik olduğu (Tablo1 ve Şekil 1); her biri birer antimikrobial dirençli olan S. Typhimurium izolatlarının üç farklı bant modeli oluşturduğu (KV – KVII) ve izolatlar arasında %66'nın üzerinde benzerlik olduğu (Tablo 2 ve Şekil 2); iki veya daha çok antimikrobial dirençli olan S. Typhimurium izolatlarının dört farklı bant modeli oluşturduğu (KVIII – KXI) ve bu izolatların %50'nin üzerinde benzer olduğu (Tablo 3 ve Şekil 3); AA/CCSSuT- direnç modeli olan S. Typhimurium izolatlarının yedi farklı bant modeli oluşturduğu (KXII – KXVIII) (Tablo 4 ve Şekil 4) belirlenmiştir. Bazı suşlar herhangi bir bant oluşturmamış olsa bile, RAPD yöntemi ile benzer antibiyotik direnç modelleri taşıyan suşların çok sayıda bant oluşturması, yani RAPD ile kendi içlerinde tiplere ayrılabilmesi, yöntemin bu serotipler üzerindeki ayırım gücünün yüksek olduğunu; Türkiye'de aynı direnç modelini taşıyan suşların farklı klonlara ait olabileceğini göstermektedir. Çalışma sonuçlarının sunulduğu tablolar incelendiğinde, antibiyotik direnç modelleri, plazmit profilleri ve RAPD modelleri birlik-

te değerlendirildiğinde neredeyse tüm suşların birbirinden farklı nitelikler taşıdığı görülebilmektedir.

Tablo 1'de görüldüğü gibi, antibiyotiklere duyarlı 13 S. Typhimurium izolatı, alı farklı plazmit profili gösterirken RAPD ile beş farklı kümeye ayrılmaktadır. Bu bulgu, suşlar arasındaki genetik farklılığı işaret etmektedir. Öte yandan, tamamen aynı özelliklere sahip olduklarından benzer klonal ilişkili kabul edilen iki suş (no. 4 ve 5) Türkiye'nin farklı şehirlerinde bir yıl ara ile izole edilen suşlardır.

Antibiyotik direnci, plazmit profilleri ve RAPD modelleri birlikte değerlendirildiğinde Tablo 2'de bir antimikrobial dirençli sekiz suşun her birinin ayrı bir klona ait olduğu; Tablo 3'teki iki ve daha çok antimikrobial dirençli dokuz suşun ise dokuz ayrı klondan geldiği görülmektedir. Yalnızca bu veri bile, yöntemlerin birlikte kullanılmasıyla ayırım gücünün nasıl yükseldiğini göstermektedir.

Türkiye'de yapılan daha önceki çalışmalarda, surveyans verileri Kayseri'de yüksek oranda izolasyon sayıları ile S. Typhimurium DT104 suşlarının antibiyotik direncine benzer suşlarla gelişen bir salgın belirlenmişti (2). Türkiye'de de beş ilaca dirençli olan suşlar, ciddi halk sağlığı problemi oluşturacağından izolatlar epidemiyolojik açıdan tam olarak değerlendirilmelidir. Bu çalışmada, AA/CCSSuT- direnç tipindeki 25 suşun altı farklı plazmit profili taşıdığı ve 7 RAPD-PZR kümesine ayrıldığı gösterildi. Tablo 4'te küme XII'nin dokuz suşunda 90 kb'lık tek plazmit plazmit vardı ve bu suşlar 2000 yılının ikinci yarısında farklı şehirlerde [Kayseri (5), Ankara (3) and Bursa (1)] izole edilen suşlardı.

Bu çalışma, RAPD-PZR'nin, antibiyogram ve plazmit profilleri ile birlikte kullanıldığında, hem farklı direnç modelleri olan suşlar arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymada hem de aynı direnç fenotipini gösteren suşların ayırımında yararlı olabileceğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, rutin laboratuvarlarında antibiyogram ve plazmit profillerini tamamlayıcı bir yöntem olarak az sayıda izolatın değerlendirilmesinde, p-1254 primeri ile RAPD-PZR yöntemi, kolay, hızlı ve ayırt edici bir yöntemdir ve Türkiye'de halen epidemilere yol açabilen S. Typhimurium suşlarının incelenmesine katkıda bulunabilir.

Bu çalışmada, Türkiye'de insanlardan izole edilen, duyarlı ve çoklu dirençli (AA/CCSSuT-direnç tipindeki izolatları da kapsayan) S. Typhimurium suşlarının plazmit profilleri ve RAPD-PZR yöntemleri ile elde edilen ilk bulgular sunulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK (Proje no: 103S181 SBAG-AYD-440) tarafından desteklenmiştir.

Çalışmada kullanılan izolatları sağlayan *Salmonella* Çalışma Grubu'nun (Koordinatör: B. Erdem, Ankara Üniversitesi) üyelerine (AD Aysev, Ankara Üniversitesi; G Hasçelik, D Gür ve S Ercis, Hacettepe Üniversitesi; S Gedikoğlu, Uludağ Üniversitesi; B Sümerkan, Erciyes Üniversitesi; İ Tuncer, Meram Üniversitesi; M Tuğrul ve

M Tatman-Otkun, Trakya Üniversitesi; Y Akgün, Osmangazi Üniversitesi; A Tünger, Ege Üniversitesi; G Söyletir, Marmara Üniversitesi; M Gültekin, Akdeniz Üniversitesi; İ Köksal, Karadeniz Teknik Üniversitesi); ve Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Bulaşıcı Hastalıklar Araştırma Bölümü'nden kontrol suşlarını [*Salmonella* Typhimurium (020255-Ankara) ve *Salmonella* Enteritidis (006956-Ankara)] sağlayan B Esen ve B Levent'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Töreci K, Anđ Ö. Türkiye'de saptanmış olan *Salmonella* serovarı ve salmonellozların genel değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **1991**; 21: 1-18.
2. Erdem B, Ercis S, Hasçelik 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: 220-5.
3. Aysev AD, Güriz H, Erdem B. Drug resistance of *Salmonella* strains from community infections in Ankara, Turkey, 1993-99. *Scand J Infect Dis* **2001**; 33: 420-2.
4. Erdem B, Threlfall EJ, Schofield S, Ward LR, Rowe B. Plasmid profile provides a method for the differentiation of strains of *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolated in Turkey. *Lett Appl Microbiol* **1994**; 19: 265-7.
5. Kado CI, Liu ST. Procedure for detection of large and small plasmids. *J Bacteriol* **1981**; 145: 1365-73.
6. Ling JM, Lo NWS, Ho YM, et al. Molecular methods for the epidemiological typing of *Salmonella enterica* serotype Typhi from Hong Kong and Vietnam. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 292-300.
7. Lin AW, Usera MA, Baerrett TJ, Goldsbye RA. Application of Random Amplified Polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J Clin Microbiol* **1996**; 34: 870-6.
8. Tatman-Otkun M, Özkan E, Öztürk D, Dündar V, Tuğrul M. 1995-1997 yıllarında dışkıdan izole edilen *Salmonella* serotiplerinin dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları. *Infek Derg* **1998**; 12: 181-5.
9. Threlfall EJ. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT104 - a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother* **2000**; 46: 7-10.
10. Helmuth R, Stephan R, Bunge C, Hoog B, Steinbeck A, Bulling E. Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns with seven common *Salmonella* serovars. *Infect Immun* **1985**; 48: 175-82.
11. Barrow PA, Lovell MA. Functional homology of virulence plasmids in *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, and *S. typhimurium*. *Infect Immun* **1989**; 57: 3136-41.
12. Holmberg SD, Wachsmuth IK, Hickman-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: 100-4.
13. Liebana E, Garcia Migura L, Breslin MF, Davies HR, Woodward MJ. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 154-61.
14. De Cesare A, Manfreda G, Dambaugh TR, Guerzoni ME, Franchini A. Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* strains isolated in Italy. *J Appl Microbiol* **2001**; 91: 780-5.
15. Williams JGK, Kubelik AR, Liviak KJ, Rafalsky JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **1990**; 18: 6531-5.
16. Kerouanton A, Brisabojs J, Grout J, Picard B. Molecular epidemiological tools for *Salmonella* Dublin typing. *FEMS Immunol Med Microbiol* **1996**; 14: 25-9.
17. Soto SM, Guerra A, Del Cerro A, Gonzalez-Hevia MA, Mendoza MC. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. *Int J Food Microbiol* **2001**; 71: 35-43.
18. Carraminana JJ, Humbert F, Ermel G, Colin P. Molecular epidemiological investigation of *Salmonella typhimurium* strains related to an egg-borne outbreak. *Res Microbiol* **1997**; 7: 633-6.
19. Shagkuan YH, Lin HC. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella typhi* and other *Salmonella* species. *J Appl Microbiol* **1998**; 85: 693-702.
20. Laconcha I, Lopez-Molina N, Rementeria A, Audicana A, Perales I, Garaizar J. Phage typing combined with pulse-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis strains. *Int J Food Microbiol* **1998**; 40: 27-34.

21. **Landeras E, Gonzalez Hevia MA, Mendoza MC.** Molecular epidemiology of Salmonella serotype Enteritidis: Relationship between food, water and pathogenic strains. *Int J Food Microbiol* **1998**; 43: 81-90.
22. **Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM.** Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 339-46.
23. **Betancor L, Schelotto F, Martinez A, et al.** Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995-2002. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 1155-62.
24. **Mare L, Dicks LMT, van der Walt ML.** Characterization of South African isolates of *Salmonella enteritidis* by phage typing, numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. *Int J Food Microbiol* **2001**; 64:237-45.
25. **Ruiz M, Rodriguez JC, Sirvent E, Eseribano I, Cebrian L, Royo G.** Usefulness of different techniques in the study of the epidemiology of salmonellosis. *APMIS* **2003**; 111: 848-56.
26. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV.** How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies to bacterial infections: a review for healthcare epidemiologist. Molecular typing working group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* **1997**; 18: 426-39.

İLETİŞİM

Prof. Dr. Birsal ERDEM
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Dekanlık Binası, 3. kat
06100 Sıhhiye, ANKARA
e-posta: birsalerdem@yahoo.com
tekeli@dialup.ankara.edu.tr