

Antibiyotik Dirençli *Salmonella enterica* Serotiplerinde Sınıf 1 İntegron Varlığının Araştırılması

M. Dilek Avşaroğlu¹, Nefise Akkoç², Beatriz Guerra³, Mustafa Akçelik², Faruk Bozoğlu¹, Reiner Helmuth³

¹Gıda Mühendisliği Bölümü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 06531, Ankara

²Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Ankara Üniversitesi, 06100, Ankara

³Federal Alman Risk Değerlendirme Enstitüsü, Berlin, Almanya

Özet

Bu çalışmada, antibiyotik direnç gen kasetlerini içeren sınıf 1 integronların Türkiye ve Almanya orijinli farklı *Salmonella enterica* serotiplerinde varlığı araştırıldı. Bu amaçla, Ankara Üniversitesi Kültür Koleksiyonu'ndan 23 adet Türkiye orijinli ve Alman Federal Risk Analizi Enstitüsü, *Salmonella* Referans Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan 49 adet Almanya orijinli antibiyotik dirençli suş kullanıldı. Bu suşlarda sınıf 1 integronlar ve içerdikleri gen kasetleri PCR, PCR-RFLP ve DNA dizi analizleri kullanılarak incelendi. Toplam 72 adet suştan 42 adedinde (%58) integron varlığı değişken bölgelerin PCR amplifikasyonu sonucu saptandı. Saptanan integronların ampikon büyüklükleri sırasıyla 700 bç (baz çifti), 1000 bç, 1200 bç ve 1600 bç olarak tespit edildi. 700 bç'lik integron, 42 suştan yalnız *S. Agona* serotipinde belirlendi. DNA dizi analizleri ile bu integronun trimetoprim dirençliliği kodlayan *dfr25* gen kasetine sahip olduğu kanıtlandı. Öte yandan, test edilen suşlar arasında en yaygın (22 suş) görülen integronun *aadA1* gen kasetini (streptomisin dirençlilik) içeren 1000 bç'lik sınıf 1 integron olduğu tespit edildi. Bu integronu içeren Türkiye orijinli *S. Infantis* suşlarının PCR-RFLP analizleri ile, tümünün aynı integron içeriğine sahip olduğu doğrulandı. Elde edilen 1200 bç'lik integronun *bla_{pse-1}* (ampisilin dirençlilik) gen kasetini ve 1600 bç'lik integronun ise *aadA1* ve *aadB* (gentamisin dirençlilik) olmak üzere iki adet gen kasetini taşıdığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, yatay gen transferi, sınıf 1 integronlar

Giriş

Gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalarda hayvansal orijinli *Salmonella*'nın antibiyotiğe direnç kazanmasında, çiftlik hayvanlarında antibiyotiklerin tedbirsiz olarak kullanımının rol oynadığı görülmüştür (1). Antimikrobiyel dirençliliğin bakteri suşları arasında plasmid ve/veya transposon aracılığıyla aktarıldığı tespit edilmiştir (2). Buna ek olarak, Gram-negatif bakterilerde bulunan ve hareketli DNA elementleri içinde yeni bir grup olan integronlar, site-spesifik rekombinasyon ile antibiyotik direnç genlerini kazanabilmektedir (3, 4). Klinik bakteri izolatları

arasında şimdiye kadar 4 Sınıf integron bulunmuştur. *Enterobacteriaceae* ailesi içinde en yaygın olanının Sınıf 1 integronlar olduğu gösterilmiştir.

Materyal Yöntem

Çalışmada kullanılan 72 adet antimikrobiyel dirençli, gıda kaynaklı Salmonella suşu Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Kültür Koleksiyonu (DMC kodlu) ve Federal Alman Risk Değerlendirme Enstitüsü Salmonella Referans Laboratuvarları'ndan (Bfr kodlu) sağlandı. Bu suşlarda integron varlığının saptanması amacıyla sınıf 1 integronların ait farklılaşmış bölgeler, 5'CS-GGCATCCAAGCAGCAAGC / 3'CS-AAGCAGACTTGACCTGAT primer çifti kullanılarak PZR tekniği ile çoğaltıldı (5). PZR amplifikasyonları sonunda agaroz jel elektroforezi ve jellerin görüntülemesi yapıldı. Tespit edilen integron bölgeleri içinde benzerliğinden şüphe edilenler PZR-RFLP analizlerine tabi tutuldu. Bu amaçla Taq I endonükleaz (Roche GmbH., Germany) enzimi kullanıldı. Elde edilen profiller elektroforez işleminin ardından agaroz jelde görüntüledi (6). Seçilen bazı sınıf 1 integronların sahip oldukları gen kasetlerini tanımlamak amacıyla DNA dizi analizleri yapıldı.

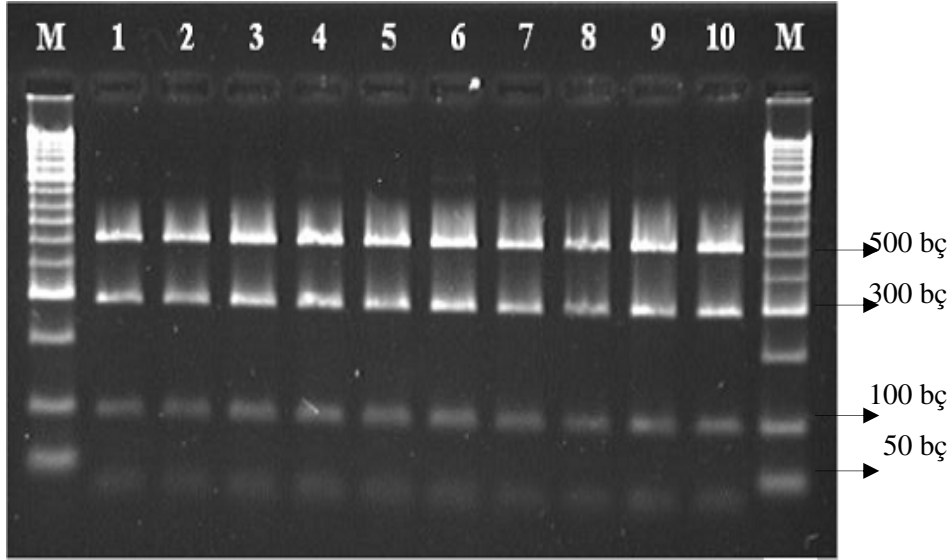
Bulgular ve Tartışma

Tablo 1' de de görüldüğü gibi PZR analizleri, test edilen 72 adet antibiyotik dirençli suştan 42 adedinde integron varlığını ortaya koydu (dirençli suşların % 61'i). Bu serotipler *S. Infantis* (21 suş), *S. Typhimurium* (17 suş), *S. Agona* (1 suş), *S. Enteritidis* (1 suş), *S. Kentucky* (1 suş), ve *S. subsp. I Roughform* (1 suş)'dur. Toplam 5 farklı integron profili elde edildi ve 700 bç (1 suş), 1000 bç (37 suş), 1200 bç (16 suş) ve 1600 bç'lik (3 suş) farklı integronlar saptandı.

Bu integronlar içerdikleri gen kasetleri bakımından DNA dizi analizi yapıldığında ise farklı tipte gen kasetleri içerdikleri belirlendi. 700 bç'lik farklılaşmış bölgeye sahip tek suş olan Bfr-1 (*S. Agona*) taşıdığı sınıf I integronun *dfr25* genine sahip olduğu belirlendi. Bu gen ise trimetoprim ve trimetoprim/sulfametoksazol dirençliliği kodlayan dirençliliği belirledi. Literatürde yer alan bu gen, *S. Agona* serotipinde bulunmuştur (7). Öte yandan 1000 bç'lik integron taşıyan 10 adet Türkiye orijinli suş ile yapılan PZR-RFLP analizi sonucunda bu integronların değişken bölgeleri bakımından da aynı olduğu görüldü (Şekil 1). Bu nedenle yalnız DMC58 (*S. Infantis*) ve DMC34 (*S. Kentucky*) DNA dizi analizine tabi tutuldu ve elde edilen sonuç *aadA1* gen kasetine işaret etti.

Almanya orijinli 1000 bç'lik tek bir integron içeren suşlardan Bfr14'den ve Bfr39'dan elde edilen sonuçlar ise *aadA1* gen kasetine sahip oldukları sonucuna varıldı. Diğer bir integron profili ise yine Almanya orijinli suşlardan elde edilen 1200 bç'lik integron oldu. Buna göre Bfr25 suşunun değişken bölgedeki gen kaseti *bla_{pse-1}* olarak belirlendi. Son olarak 1600 bç'lik değişken bölgeye sahip

integronu olan Bfr-6'dan ise elde edilen sonuca göre *aadA1* ve *aadB* iki adet gen kaseti oldu.



Şekil 1. Türkiye orijinli suşlara ait PZR-RFLP analiz sonuçları. M: Marker (50-2000 bç; Hyperladder II, Bioline, UK); 1-10: Farklı *S. Infantis* suşları (DMC7, DMC12, DMC20, DMC23, DMC40, DMC57, DMC58, DMC70, DMC75); 11: *S. Kentucky* (DMC34).

Sonuç

Elde edilen sonuçlara göre test edilen suşlar sınıf 1 integron içerikleri bakımından literatür verilerinden farklılık göstermedi. Yalnızca 700 bç'lik integron içerdiği gen kaseti bakımından literatürde yeni tanımlanan bir integrondur. Bu integron Almanya orijinli bir suştan elde edilmiş olup Türkiye orijinli suşlarda görülmedi.

Kaynaklar

1. Furuya EY. and Lowy FD. 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Rev. Microbiol*, 4:36-45.
2. Schwarz S, Cloeckaert A. and Roberts MC. 2006. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*, Aarestrup F. M. (eds.), pp.73-98, ASM Press, Washington D. C.
3. Carattoli A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res*, 32: 243-259.
4. Mazel D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Rev. Microbiol*, 4:608-620.

Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum

5. Guerra B, Junker E, Miko A, Helmuth R. and Mendoza MC. 2004. Characterization and localization of drug resistance determinants in multi-resistant, integron carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. Microbial Drug Resistance-Mech. Epidemiol. Disease, 10: 83-91.
6. Guerra B, Soto S, Cal S. and Mendoza MC. 2000b. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. Antimic. Agents and Chem., 44, 2166-2169.
7. Agerso Y, Peirano G. and Aarestrup FM. 2006. *dfrA25*, a novel trimethoprim resistance gene from *Salmonella* Agona isolated from a human urine sample in Brazil. J.Antimic. Chem, 58:1044-1047.