

## Tavuk Orijinli *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* Suşlarının Plazmid Profil Analizi

Hakan KALENDER<sup>1\*</sup> Selahattin ŞEN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi Süleyman Demirel Keban Meslek Yüksek Okulu, Elazığ, Türkiye

<sup>2</sup>Etlük Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara, Türkiye

Geliş tarihi: 03.11.2008

Kabul Tarihi: 02.12.2008

### ÖZET

Bu çalışma tavuk orijinli *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (*S. enteritidis*) suşlarının Plazmid Profil Analizi ile tiplendirilmesi amacıyla yapıldı. İncelenen toplam 38 *S. enteritidis* suşunun 25'inde (% 65.78) bir plazmid, 11'inde (%28.94) birden fazla plazmid saptandı. İki suş (%5.26) plazmid içermedi. Plazmid DNA'nın *SmaI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda 5 farklı plazmid profili saptandı. Suşların 25'i (%65.78) aynı plazmid profiline (P2) sahipti. Bu çalışmanın sonuçları tavuk orijinli *S. enteritidis* suşlarının çoğunun genetik olarak ilişkili olduğunu göstermektedir.

### Anahtar Kelimeler

Tavuk, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar *enteritidis*, Plazmid Profil Analizi

### Plazmid Profile Analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar *Enteritidis* Strains Originated from Chickens

### SUMMARY

The aim of this study was to examine *S. enteritidis* strains originated from chickens by plasmid profile analysis. Twenty five (65.78 %) of 38 *S. enteritidis* strains harbored one plasmid. Eleven strains (28.94 %) harbored more than one plasmid. No plasmid was detected in two strains (5.26 %). *SmaI* restriction enzyme was used for digestion of plasmid DNA. Five different plasmid profiles were observed among the strains. Twenty five (65.78 %) of the strains had the same plasmid profile (P2). The results of this study shows that the majority of *S. enteritidis* strains originated from chickens are genetically related.

### Key Words

Chicken, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar *enteritidis*, Plasmid Profile Analysis

### GİRİŞ

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (*S. enteritidis*) hem insan hem de hayvanlarda enfeksiyonlara neden olan bir bakteridir. İnsanlarda gıda kaynaklı enfeksiyonların oluşumunda *S. enteritidis* ile kontamine tavuk et ve yumurtaları önemli bir rol oynamaktadır (8, 20).

Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalarda insanlardan (9), tavuklardan ve tavuk etlerinden (4, 7, 11, 12, 18) en fazla izole edilen *Salmonella* türü *S. enteritidis*'dir. *S. enteritidis* suşlarının tiplendirilmesinde klasik tiplendirme yöntemlerine alternatif olarak son yıllarda Plazmid Profil Analizi (2, 14, 17, 21-23), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) (6), Ribotipleme (19), Random Amplified Polymorphic DNA (5) ve Restriction Fragment Length Polymorphism (16) gibi moleküler yöntemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler, suşlar arasında klonal ilişkiyi ortaya koyarak salgınların kaynağı, bulaşma yolları ve bulaşma dereceleri hakkında bilgiler sunmaktadır. Plazmid Profil Analizi kromozom dışı genetik yapı olan plazmid DNA'nın elde edilmesinden sonra sayı ve boyutunun agaroz jel elektroforezi ile belirlenmesi esasına dayanan bir moleküler yöntemdir (1).

Bu çalışma tavuk ve tavuk etlerinden izole edilen *S.*

*enteritidis* suşlarını Plazmid Profil Analizi yöntemiyle tiplendirmek amacıyla yapıldı.

### MATERYAL VE METOT

#### *S. enteritidis* Suşları

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen tavuk eti orijinli 21 ve tavuk bağırsağı orijinli 17 olmak üzere toplam 38 suş kullanıldı.

#### Plazmid Profil Analizi

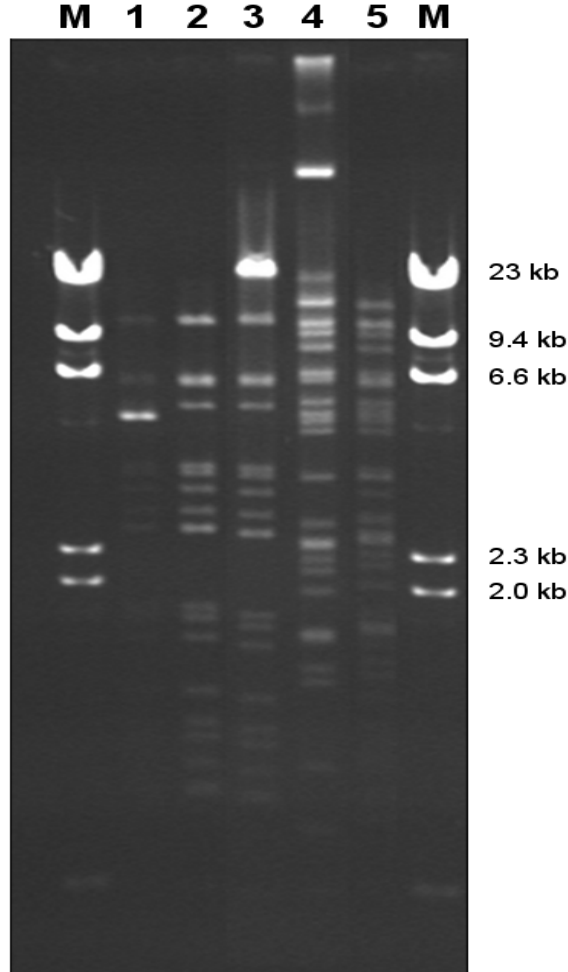
Plazmid DNA, Qiagen plazmid kiti (Tip 100) kullanılarak elde edildi (3). Kanlı agarda üreyen mikroorganizmalardan tek koloni alınarak 100 ml BHI broth besiyerine geçildi. Bu besiyeri çalkalayıcı(100 rpm) inkubatörde 37 °C'de 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresi sonunda kültür 50 ml'lik santrifüj tüplerine alındı ve 6000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelet plazmid DNA izolasyonu için kullanıldı. Plazmid DNA izolasyon yöntemi kitin protokolüne göre yapıldı. Elde edilen plazmid DNA'ların üzerine 100 µl Tris-EDTA buffer(10:1) ilave edilerek süspanse edildi. Plazmid DNA'nın bir kısmı *SmaI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Bunun için 10 µl enzim karışımı içerisine (7 µl distile su, 2 µl buffer ve 1 µl enzim) 10 µl DNA ilave edildi ve 30 °C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Kesim yapılan ve kesim yapılmayan plazmid DNA'lar % 0.8'lik agaroz jel içerisine yüklenerek 120 V'da 2 saat elektroforez işlemine tabi

\*Sorumlu araştırmacı: hakgg@yahoo.com

tutuldu. Elektroforez işleminden sonra jel ethidium bromid ile boyandı ve UV ışığında görüntülendi. Suşların plazmid büyüklükleri, plazmid büyüklüğü bilinen *E.coli* 39R suşu ve *Hind* III marker kullanılarak belirlendi.

### BULGULAR

İncelenen 38 suşun 25'inde (%65.78) yaklaşık 55-60 kbp büyüklüğünde tek plazmid ve 11'inde (%28.94) birden fazla plazmid saptandı. İki suş (% 5.26) plazmid içermedi. Plazmid DNA'nın enzim ile kesimi sonucunda suşlar arasında 5 farklı plazmid profili tespit edildi (Şekil 1). Suşların 25'inde (% 65.78) P2, 6'sında (% 15.78) P4, 2'sinde (%5.26) P3, 2'sinde (%5.26) P5 ve 1'inde (% 2.63) P1 profili saptandı (Tablo 1).



**Şekil 1.** Plazmid DNA'nın *Sma*I restriksiyon enzim profilleri. M,  $\lambda$  DNA *Hind*III marker, 1, Profil 1; 2, Profil 2;3, Profil 3; 4, Profil 4; 5, Profil 5.

**Tablo 1.** 38 *S. enteritidis* suşunun Plazmid Profil Analiz sonuçları

Plazmid profili	Suş	
	n	%
P1	1	2.63
P2	25	65.78
P3	2	5.26
P4	6	15.78
P5	2	5.26
Plazmid saptanamayan	2	5.26

### TARTIŞMA VE SONUÇ

*S. enteritidis*, son yıllarda tüm dünyada giderek önemi artan bir bakteridir. Bu bakterinin alt tiplerinin belirlenmesi amacıyla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda klasik tiplendirme yöntemi olarak faj tiplendirme kullanılmaktadır (10, 24). Ancak faj tiplendirme referans laboratuvarlarda yapılabilmektedir. Ayrıca suşlar arasında zamanla faj değişimlerinin görülebilmesi nedeniyle de faj tiplendirme yöntemi bazı dezavantajlara sahiptir (13).

Bununla birlikte son yıllarda *S. enteritidis* suşlarının tiplendirilmesinde moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler yöntemler içerisinde Plazmid Profil Analizi ile gerek insan ve gerekse hayvan orijinli *S. enteritidis* suşlarının tiplendirilmesi konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Liebana ve ark. (13), kanatlı orijinli 104 *S. enteritidis* suşunun 14 plazmid profili gösterdiğini ve suşların % 55.78'inin yaklaşık 57 kbp'lik tek plazmid içerdiğini bildirmişlerdir. Tsen ve Lin (23) tarafından Taiwan'da yapılan bir çalışmada, gıda kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen insan orijinli 63 *S. enteritidis* suşunun 3 plazmid profili gösterdiği bildirilmiştir. Çin'de insanlardan izole edilen 275 *S. enteritidis* suşunun 264'ünün 1 ile 5 arasında plazmid içerdiği ve suşların 21 plazmid profili gösterdiği bildirilmiştir (15). İngiltere'de insanlardan ve hayvanlardan izole edilen 250 *S. enteritidis* suşunun 17 plazmid profili gösterdiği ve suşların % 59'unun yaklaşık 57 kbp'lik tek plazmid içerdiği bildirilmiştir (14). Kore'de (21) tavuklardan izole edilen 10 *S. enteritidis* suşunun 6 plazmid profiline sahip olduğu, Pakistan'da (17) tavuk eti ve tavuk orijinli 14 *S. enteritidis* suşunun 7 plazmid profili gösterdiği bildirilmiştir.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda (2, 22) insan orijinli *S. enteritidis* suşları Plazmid Profil Analizi ile tiplendirilmiştir. Bununla birlikte yapılan literatür taramalarına göre Türkiye'de hayvan orijinli *S. enteritidis* suşlarının Plazmid Profil Analizi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada tavuk etleri ve tavuklardan izole edilen 38 *S. enteritidis* suşunun 25'inde (%65.78) yaklaşık 55-60 kbp büyüklüğünde tek plazmid ve 11'inde (%28.94) birden fazla plazmid saptandı. *Sma*I enzimi kullanılarak yapılan kesim sonucunda 5 farklı plazmid profili saptandı. Suşların % 65.78'i aynı plazmid (P2) profilini gösterdi. Bu çalışmada suşların çoğunun aynı plazmid profilini göstermesi ve tek plazmide sahip olması diğer çalışmalar (2, 13-15, 22) ile benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak, ülkemizde tavuklarda farklı genotipe sahip suşlar bulunmakla birlikte suşların çoğunun aynı genotipe sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte Türkiye'de hayvan orijinli *S. enteritidis* suşlarının genotiplendirilmesi amacıyla detaylı epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

### KAYNAKLAR

- Altaş K, Midilli K (2003): Enfeksiyon Hastalıklarında Moleküler Tanı Yöntemleri. Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu. S. 59-71. Elazığ.
- Anğ-Küçük M, Tolun V, Helmuth R, Rabsch W, Büyükbabalı B, Ö, Törümkünney-Akbulut D, Susever S, Anğ Ö (2000): Phage Types, Antibiotic Susceptibilities and Plasmid Profiles of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* Strains Isolated in Istanbul, Turkey. Clin. Microbiol. Infect. 6, 11: 593-599.
- Anonim (2005): Plazmid Purification Handbook. Protocols. Third Edition. Qiagen.

4. Bekar M, Ayaz Y, Akman A, Yazıcıoğlu N, Uysal Y, Tekin C, Korkut N, Mirioğlu M, Aslan A, Ergün A, İldeş Z (1993): Tavuk Mezbahalarının *Salmonella* Yönünden Taranması. Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg. 7, 4: 1-23.
5. Betancor L, Schelotto F, Martinez A, Pereira M, Algorta G, Rodriguez MA, Vignoli R, Chabalgoity JA (2004): Random Amplified Polymorphic DNA and Phenotyping Analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Isolates Collected from Humans and Poultry in Uruguay from 1995 to 2002. J. Clin. Microbiol. 42, 3: 1155-1162.
6. Boonmar S, Bangtrakulnonh A, Pornrunangwong S, Terajima J, Watanabe H, Kaneko K, Ogawa M (1998): Epidemiological Analysis of *Salmonella enteritidis* Isolates from Humans and Broiler Chickens in Thailand by Phage Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 36, 4: 971-974.
7. Çarlı KT, Eyigör A, Caner V (2001): Prevalence of *Salmonella* Serovars in Chickens in Turkey. J. Food Microbiol. 64, 11:1832-1835.
8. De Jong B, Ekdahl K (2006): The Comparative Burden of Salmonellosis in the European Union Member States Associated and Candidate Countries. BMC Public Health, 6:4.
9. Erdem B, Ercis S, Haşcelik G, Gür D, Gedikoğlu S, Aysev AD, Sümerkan B, Tatman-Otkun M, Tuncer İ (2005): Antimicrobial Resistance Patterns and Serotype Distribution Among *Salmonella enterica* Strains in Turkey. 2000-2002. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24, 3: 220-225.
10. Hickman-Brenner FW, Stubbs AA, Farmer JJ (1991): Phage Typing of *Salmonella enteritidis* in the United States. J.Clin.Microbiol. 29, 12: 2817-2823.
11. Kalender H, Muz A (1999): Elazığ Bölgesindeki Tavuklardan İzole Edilen *Salmonella* Türlerinin Tiplendirilmesi. Tr. J. Vet. Anim. Sci. 23, 2: 297-303.
12. Kılınç Ü, Aydın F (2006): Kayseri Yöresindeki Tavukçuluk İşletmelerinden Toplanan Tavuklardan İzole Edilen *Salmonella* Türlerinin Antibiyotiklere Duyarlılıkları. Erciyes Üniv. Sağ. Bil. Derg. 15, 1: 35-40.
13. Liebana E, Garcia-Migura L, Breslin MF, Davies RH, Woodward MJ (2001): Diversity of Strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from English Poultry Farms Assessed by Multiple Genetic Fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 39, 1: 154-161.
14. Liebana E, Clouting C, Garcia-Migura L, Clifton Hadley FA, Lindsay E, Threlfall EJ, Davies RH (2004): Multiple Genetic Typing of *Salmonella enteritidis* Phage-Types 4, 6, 7, 8 and 13 Isolates from Animals and Humans in the UK. Vet. Microbiol. 100, 3-4: 189-195.
15. Ling JM, Koo IC, Kam KM, Cheng AF (1998): Antimicrobial Susceptibilities and Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis Strains Isolated in Hong Kong from 1986 to 1996. J. Clin. Microbiol. 36, 6: 1693-1699.
16. Lopes VC, Velayudhan BT, Halvorson DA, Lauer DC, Gast RK, Nagaraja KV (2004): Comparison of Methods for Differentiation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Phage Type 4 Isolates. Am. J. Vet. Res. 65, 5: 538-543.
17. Mirmomemini MH, Colagar AH, Ghazaey S (2007): Molecular Study of *Salmonella enteritidis* in Poultry Samples by PCR, Plasmid Curing, Antibiotic Resistance and Protein Pattern Analysis. Pakistan J. Biol. Sci. 10, 10: 1562-1570.
18. Mutluer B, Yargülü B, Hartung M, Erol İ (1992): Incidence and Serovar Distribution of *Salmonella* in Market Broilers in Turkey. 3 rd. World Congress Foodborne Infectious and Intoxications. Proceedings. Vol. II. 16-19 June, Berlin, 1075-1079.
19. Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B (1998): Genotypic Characterization of *Salmonella enteritidis* Phage Types by Plasmid Analysis, Ribotyping and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 36, 8: 2314-2321.
20. Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B (1990): International Increase in *Salmonella enteritidis*: A New Pandemic? Epidemiol. Infect. 105, 1: 21-7.
21. Suh DK, Song JC (2006): Analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Isolated from Human and Chickens by Repetitive Sequence-PCR Fingerprinting Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles. J. Vet. Sci. 7, 1: 37-41.
22. Tekeli A, Erdem B, Şahin F, Koyuncu E, Karasartova D, Bayramova M (2006): Plasmid Profiles and Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis Strains from Outbreaks and Sporadic Cases in Turkey. New Microbiol. 29, 4: 251-260.
23. Tsen HY, Lin JS (2001): Analysis of *Salmonella enteritidis* Strains Isolated from Food-Poisoning Cases in Taiwan by Pulsed Field Gel Electrophoresis, Plasmid Profile and Phage Typing. J. Appl. Microbiol. 91, 1: 72-79.
24. Ward LR, De Sa JD, Rowe B (1987): A Phage-Typing Scheme for *Salmonella enteritidis*. Epidemiol. Infect. 99, 2: 291-294