

# *Salmonella enterica* Serotip Paratyphi B Klinik İzolatlarının Moleküler Epidemiyolojisi, Antimikrobiyal Direnci ve Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlarının Karakterizasyonu\*

## Molecular Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases of *Salmonella enterica* Serotype Paratyphi B Clinical Isolates

Gülçin BAYRAMOĞLU<sup>1</sup>, Osman Birol ÖZGÜMÜŞ<sup>2</sup>, Fetiye KOLAYLI<sup>3</sup>, Ahu KAMBUROĞLU<sup>1</sup>, Yeşim BEŞLİ<sup>4</sup>, Uğur DİNÇ<sup>5</sup>, İlknur TOSUN<sup>1</sup>, Faruk AYDIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

<sup>1</sup> Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Turkey.

<sup>2</sup> Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize.

<sup>2</sup> Recep Tayyip Erdoğan University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Rize, Turkey.

<sup>3</sup> Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.

<sup>3</sup> Kocaeli University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kocaeli, Turkey.

<sup>4</sup> Gümüşhane Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Gümüşhane.

<sup>4</sup> Gümüşhane State Hospital, Microbiology Laboratory, Gümüşhane, Turkey.

<sup>5</sup> Çorlu Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Tekirdağ.

<sup>5</sup> Çorlu State Hospital, Microbiology Laboratory, Tekirdağ, Turkey.

\* Bu çalışma, Karadeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiş (Proje No: 2007.114.001.8) ve 28. ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi (22-26 Mayıs 2013)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 26.01.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 25.03.2014

### ÖZET

*Salmonella enterica* serotip Paratyphi B tüm dünyada ve Türkiye'de daha az görülen bir serotip olmasına rağmen hastanemizde en sık izole edilen serotip olup, 2007 yılında izolasyon sıklığında belirgin bir artış olmuştur. Bu çalışmada, hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen S.Paratyphi B izolatlarının antibiyotiklere direncinin, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretiminin ve moleküler epidemiyolojisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ekim 2005-Aralık 2012 tarihleri arasında farklı hastalara ait çeşitli klinik örneklerden izole edilen 109 *Salmonella* izolatından S.Paratyphi B olarak tanımlanan 70'i çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatlar konvansiyonel yöntemlere ilaveten Phoenix otomatize mikrobiyoloji

**İletişim (Correspondence):** Doç. Dr. Gülçin Bayramoğlu, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 61080, Trabzon, Türkiye. Tel (Phone): +90 462 377 5653, E-posta (E-mail): gulcinbay@hotmail.com

sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile tanımlanmıştır. İzolatların serotiplendirilmesi lam aglütinasyonu ile Kauffmann-White şemasına göre yapılmıştır. Antibiyotiklere direnç BD Phoenix™ otomatize sistemi ve disk difüzyon testleriyle belirlenmiştir. GSBL enzimleri kombine disk testi, izoelektrik odaklama, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve dizi analizi ile araştırılmıştır. Ekim 2005-Ağustos 2008 tarihleri arasında izole edilen 51 izolatın moleküler epidemiyolojisi *Xba*I enzimi kullanılarak değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE) ile incelenmiştir. S.Paratyphi B izolatları farklı hastalara ait 46 kan, 16 dışkı, 4 kemik iliği, 2 idrar ve 2 yara olmak üzere toplam 70 örnekten izole edilmiştir. İzolatlarda nalidiksik asit direnci %18.6, ampisilin, sefotaksim ve sefepim direnci %2.9, seftazidim ve kotrimoksazol direnci %1.4 olarak belirlenmiştir. İki izolatta GSBL üretimi saptanmış ve birinde TEM-1 ile birlikte CTX-M-15, diğerinde CTX-M-3 bulunmuştur. PFGE ile 51 izolattan 46 (%90)'sının ilişkili olduğu ve A kümesinde olduğu görülmüştür. A kümesinde yer alan izolatlarda A1 (7), A2 (11), A3 (7), A4 (18), A5 (2) ve A6 (1) olmak üzere altı alt tip dağılımı izlenmiştir. Kalan beş izolatta ise A kümesi ile ilişkisiz üç farklı patern (ikisi B, birer adet C, D ve E) saptanmıştır. Sonuç olarak, hastanemizde S.Paratyphi B izolatlarında antibiyotik direnci düşük olmasına rağmen CTX-M-3 ve CTX-M-15 gibi *Salmonella*'larda sık rastlanmayan GSBL'lerin saptanmış olması dikkat çekicidir. Bu çalışma, literatür araştırmasına göre, Türkiye'de *Salmonella* türlerinde *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ve S. Paratyphi B'de *bla*<sub>CTX-M-3</sub> genlerinin ilk bildirimidir. Elde edilen veriler, izolatların çoğunun genetik ilişkili olup bölgemizde salgına neden olduğunu ve *Salmonella* türlerinde saptanan GSBL'lerin tedavide tehdit oluşturduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Salmonella enterica* serotip Paratyphi B; antibiyotik direnci; genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL); moleküler epidemiyoloji.

## ABSTRACT

Although *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B is the less frequently isolated serotype worldwide and in Turkey, it is the most common serotype in our hospital, with a marked increase in 2007. The purpose of this study was to investigate the antibiotic susceptibility and the extended spectrum beta-lactamase (ESBL) profile, and molecular epidemiology of S. Paratyphi B isolates detected in our hospital microbiology laboratory. Seventy isolates identified as S. Paratyphi B from 109 *Salmonella* isolates obtained from clinical specimens from different patients between October 2005 and December 2012, were included in the study. In addition to conventional methods, isolates were identified using the Phoenix automated microbiology system (Becton Dickinson, USA). Serotyping of the isolates was performed on the basis of slide agglutination and the Kauffmann-White scheme. The antibiotic susceptibility of the isolates was determined using the BD Phoenix™ automated system and disk diffusion test. ESBL enzymes were investigated using the combined disk test, isoelectric focusing, polymerase chain reaction (PCR) and sequence analysis. The molecular epidemiology of the 51 isolates obtained between October 2005 and August 2008 was examined with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the *Xba*I enzyme. S. Paratyphi B isolates were obtained from 70 specimens (46 blood, 16 fecal, 4 bone marrow, 2 urine and 2 wound) each from different patients. Resistance to nalidixic acid was determined in 18.6%, resistance to ampicillin, cefotaxime and cefepime in 2.9% and to ceftazidime and co-trimoxazole in 1.4% of the isolates. ESBL production was detected only in two isolates; in one TEM-1 was accompanied by CTX-M-15 and in the other isolate CTX-M-3 was found. Forty-six of the 51 isolates (90%) were found to be genetically related by PFGE and were placed in cluster A. The distribution of the isolates in cluster A revealed six subtypes as A1 (n= 7), A2 (n= 11), A3 (n= 7), A4 (n= 18), A5 (n= 2) and A6 (n= 1). Three different patterns not related to the cluster A were determined in the remaining five isolates (two were B, one of each was C, D and E). In conclusion, although the rate of antibiotic resistance was low in the S. Paratyphi B isolates in our hospital, rare types of ESBLs such as CTX-M-3 and CTX-M-15 were detected in *Salmonellae*. As far as the current literature is considered, this is the first report in Turkey of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in *Salmonella* spp. and *bla*<sub>CTX-M-3</sub> genes in S. Paratyphi B. The results may indicate a possible future threat to the

treatment of *Salmonella* infections. Since most of the isolates were genetically related, this might suggest an epidemic in our region.

**Key words:** *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B; antibiotic resistance; extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), molecular epidemiology.

## GİRİŞ

Tifoidal *Salmonella* serotipleri olan *Salmonella enterica* serotip Typhi (S.Typhi) ve *S. enterica* serotip Paratyphi (S.Paratyphi) A, B ve C her yıl dünyada yaklaşık 21.7 milyon olguda tifoidal ateşe ve 217.000 ölüme neden olmaktadır. Bunların yaklaşık 5.4 milyonunda S.Paratyphi etkindir. *Salmonella* diyaresi genellikle kendini sınırlamakta ve sıklıkla antimikrobiyal tedaviye gerek kalmamaktadır. Ancak tifoidal ateşte uygun antibiyotik tedavisi ile mortalite %30'dan %0.5'e düşmektedir<sup>1</sup>. Tedavide ilk seçenek antibiyotikler olan ampisilin, kloramfenikol ve trimetoprim-sülfametoksazole dirençli olan çoğul dirençli izolatlar artan oranlarda bildirilmektedir<sup>2</sup>. Bu nedenle hayatı tehdit eden *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisinde florokinolonlar ve 3. kuşak sefalosporinler önemli bir yer tutmakta, fakat bu antibiyotiklere karşı da direnç oranları artmaktadır. *Salmonella* izolatlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ilk kez 1989 yılında Fransa'da tanımlanmış ve çok sık olmasa da dünyanın çeşitli bölgelerinden bildirilmeye devam etmiştir. Özellikle çocuklarda florokinolonların kullanımı kontrendike olduğundan tedavide büyük sorun oluşturmaktadır<sup>3</sup>.

*Salmonella* enfeksiyonları, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en önemli halk sağlığı sorunlarından birisidir<sup>3,4</sup>. Buna rağmen ülkemizde, insanlardan izole edilen *Salmonella* izolatlarının moleküler epidemiyolojisinin<sup>5-11</sup> ve antibiyotik direncinin moleküler temellerinin<sup>9,12-15</sup> araştırıldığı çalışma sayısı sınırlı olup, genellikle S.Paratyphi B dışındaki serotipleri içermektedir. S.Paratyphi B tüm dünyada ve ülkemizde daha az görülen bir serotip olarak bilinmektedir<sup>1,4</sup>. Hastanemizde ise en sık izole edilen serotip olup, 2007 yılında izolasyon sayısında belirgin bir artış olmuştur. Bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen S.Paratyphi B serotiplerinin antibiyotik direncinin, GSBL üretiminin ve moleküler epidemiyolojisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Bakteriyel İzolatlar

Çalışmaya, Ekim 2005-Aralık 2012 tarihleri arasında Hastanemiz Mikrobiyoloji Laboratuvarında farklı hastalara ait çeşitli klinik örneklerden izole edilen 109 *Salmonella* izolatından S.Paratyphi B olarak tanımlanan 70'i dahil edildi. Çalışma, Karadeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu onayı (Karar No: 2010-7) ile yapıldı. Her hastadan ilk izolat çalışmaya alındı. İzolatlar konvansiyonel yöntemlere ilaveten Phoenix otomatize mikrobiyoloji sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile tanımlandı. İzolatların serotiplendirilmesi *Salmonella*'ya özgül somatik (O) ve flajel (H) antiserumları (Denka Seiken, Tokyo,

Japonya) kullanılarak lam aglütinasyonu ile Kauffmann-White şemasına göre yapıldı<sup>16</sup>. İzolatlar -80°C'de boncuklu bakteri saklama viallerinde saklandı.

### **Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri ve GSBL Saptanması**

İzolatların antibiyotiklere duyarlılıkları BD Phoenix otomatize sistemine (Becton Dickinson, ABD) ilaveten "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine uygun olarak disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı<sup>17</sup>. Bu yöntemde ampicilin (10 µg), amoksisilin/klavulanik asit (20/10 µg), kloramfenikol (30 µg), nalidiksik asit (30 µg), sefepim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim (30 µg), siprofloksasin (5 µg), tetrasiklin (30 µg) ve trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) (1.25/23.75 µg) diskleri (Bioanalyse, Türkiye) kullanıldı. İzolatlarda GSBL üretimi seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim-klavulanik asit (30/10 µg) ve sefotaksim-klavulanik asit (30/10 µg) diskleri (Bioanalyse, Türkiye) kullanılarak kombine disk yöntemi ile saptandı. Klavulanik asit içeren disklerin inhibisyon zonunun diğer disklerin inhibisyon zonundan 5 mm veya daha büyük olması, GSBL varlığı olarak yorumlandı<sup>17</sup>. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kalite kontrol suşları olarak kullanıldı.

### **İzoelektrik Odaklama Yöntemi**

İzoelektrik odaklama Mini IEF Cell cihazı (Model 111-Bio-Rad, Fransa) ile üretici firma önerileri doğrultusunda poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile yapıldı. Enzimleri izole edilen örnekler Whatman kağıdına emdirildikten sonra her bir örnek jele yerleştirildi. Her elektroforez işleminde kontrol olarak izoelektrik noktaları (pI) bilinen TEM-1 (5.4), SHV-1 (7.6), CTX-M-3 (8.4) ve CTX-M-15 (8.6) enzimleri kullanıldı. Elektroforez işlemi sonlandığında enzim bantlarını görünür hale getirebilmek için jel üzerine 1-2 ml nitrosetin çözeltisi (500 µg/ml) damlatılıp yayıldı. Kırmızı bant şeklinde görülen enzimler pozitif kontroller ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

### **Direnç Genlerinin Amplifikasyonu ve Dizi Analizi**

GSBL saptanan iki *Salmonella* izolatının DNA'ları UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, CA) ile izole edildikten sonra TEM, SHV ve CTX-M enzimlerine özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile direnç genleri tespit edildi (Tablo I).

Dizi analizinden önce üretici firmanın önerileri doğrultusunda NucleoSpin Extract II kiti (Macherey-Nagel GmbH&Co, Almanya) ile PCR ürünleri saflaştırıldı. Dizi analizi BigDye Terminator Sequencing kiti (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak yapıldı ve 3130xl ABI Prism Genetic Analyzer cihazında (Applied Biosystems, ABD) okundu.

### **Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed-Field Gel Electrophoresis; PFGE)**

2007 yılında *S.Paratyphi B* serotiplerinin izolasyonunda artış olduğundan, bu tarihi kapsayan Ekim 2005-Ağustos 2008 tarihleri arasındaki 51 izolatın PFGE ile moleküler epidemiyolojisi araştırıldı. Bu tarihler arasında izole edilen 53 suştan ikisi tekrar canlandırılmadığından PFGE ile çalışılmadı. PFGE standart PulseNet protokolüne göre *XbaI* enzimi kullanılarak yapıldı<sup>22</sup>. Elektroforez CHEF-DRIII (Bio-Rad, Hercules, ABD)

**Tablo 1.** Çalışmada Kullanılan Primerler ve PCR Koşulları

Hedef gen	Primer	Dizi (5'-3')	Bağlanma ısısı (°C)	Uzama zamanı (sn)	Ürün uzunluđu (Baz çifti)	Kaynak
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	TEM-F TEM-R	ATGAGTATTCAACATTTC CG CTGACAGTTACCAATGCTTA	58	60	867	18
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHV-F SHV-R	TCGGGCCCGTAGGCATCAT AGCAGGGCGACAATCCCGCG	60	120	626	19
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	CTX-M F CTX-M R	CGCTTTGCCGATGTCCAG ACCCGGATATCGTTGGT	54	120	550	20
<i>bla<sub>CTX-M</sub> grup 1</i>	CTXM1-F3 CTXM1-R2	GACGATGCTACTGGCTGAGC AGCCCGCCGACCGCTAATA	55	60	499	21
<i>bla<sub>CTX-M</sub> grup 3</i>	CTXM825 F CTXM825 R	CGCTTTGCCATGTCAGCACC GCTCAGTACGATCGAGCC	55	60	307	21
<i>bla<sub>CTX-M</sub> grup 4</i>	CTXM914 F CTXM914 R	GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG GTAAGCTGACCGCAACGCTCTG	55	60	474	21

sisteminde başlangıç vuruş süresi 2.2 saniye, bitiş vuruş süresi 63.8 saniye, akım 6 V/cm ve sıcaklık 14°C olarak 19 saat uygulandı. Jeller etidyum bromür (1 µg/ml) solüsyonunda 20 dakika boyandı ve UV ışığı altında değerlendirildi. Sonuçlar Gel Doc sistemi (Bio-Rad, Hercules, ABD) ile görüntülendi. İzolatların genetik ilişkisi Tenover kriterlerine göre belirlendi; 1-3 bant farkı gösteren izolatlar aynı klon içinde alt tipler olarak değerlendirildi<sup>23</sup>.

## BULGULAR

Çalışmamızda değerlendirilen 70 *S.Paratyphi B* suşunun 46'sı kan, 16'sı dışkı, 4'ü kemik iliği, 2'si idrar ve 2'si yara örneğinden izole edilmiştir. Hastanemizde izole edilen *Salmonella* serotiplerinin yıllara göre dağılımı incelendiğinde, en sık izole edilen serotip *S.Paratyphi B* olmuştur (Tablo II).

İzolatlarda nalidiksik asit direnci %18.6, ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefotaksim ve sefepim direnci %2.9, seftazidim ve SXT direnci %1.4 olarak belirlenmiş; diğer antibiyotiklere karşı direnç saptanmamıştır. İzolatların birinde CTX-M-3, diğerinde TEM-1 ile birlikte CTX-M-15 olmak üzere 2 izolatta GSBL varlığı tespit edilmiş; bunların fenotipik ve genotipik özellikleri Tablo III'te verilmiştir.

PFGE yöntemiyle 51 *S.Paratyphi B* izolatından 46 (%90.2)'sının ilişkili olduğu ve A kümesinde yer aldığı saptanmıştır. A kümesi içinde izolatlar A1 (7), A2 (11), A3 (7), A4 (18), A5 (2) ve A6 (1) olmak üzere altı alt tip dağılımı göstermiştir. Kalan 5 izolat A kümesi ile ilişkisiz bulunmuş ve dört farklı patern (2'si B, 1'i C, 1'i D, 1'i E) içinde yer almıştır. İzolatların PFGE paternlerinin yıllara göre dağılımı Tablo IV'te, PFGE paternlerini temsil eden örneklerin bant profilleri ise Şekil 1'de gösterilmiştir.

**Tablo II.** *Salmonella* Serotiplerinin Yıllara Göre Dağılımı (n= 109)

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Toplam
<i>S.Paratyphi B</i>	2	14	31	9	7	3	3	1	70
Diğer serotipler	3	6	6	7	4	4	6	3	39

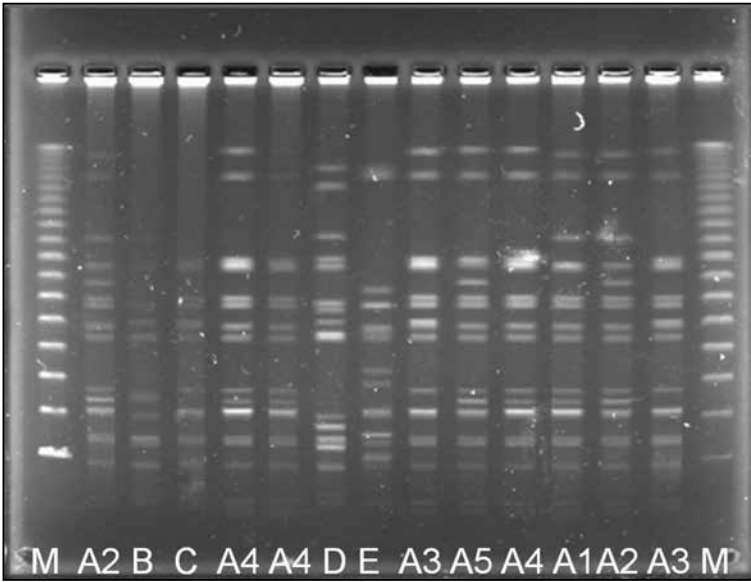
**Tablo III.** *CTX-M* Enzimleri Saptanan İzolatların Fenotipik ve Moleküler Özellikleri

İzolat no	İzolasyon tarihi	Örnek	Beta-laktamaz enzimi	Antibiyotik direnç paterni	<i>Xba</i> I PFGE
1	10.08.2007	Kan	CTX-M-3	AMP, AMC, CTX, FEP, ATM, NAL	A2
2	12.11.2007	Dışkı	TEM-1, CTX-M-15	AMP, AMC, CTX, CAZ, FEP, ATM, SXT	E

AMP: Ampisilin; CTX: Sefotaksim; CAZ: Seftazidim; FEP: Sefepim; ATM: Aztreonam; AMC: Amoksisilin-klavulanik asit; NAL: Nalidiksik asit; SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol.

**Tablo IV.** PFGE Paternlerinin Yıllara Göre Dağılımı

Yıllar	PFGE paterni										Toplam
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B	C	D	E	
2005	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
2006	2	4	2	-	1	1	2	-	-	-	12
2007	2	6	3	17		-	-	1	1	1	31
2008	1	1	2	1	1	-	-	-	-	-	6
Toplam	7	11	7	18	2	1	2	1	1	1	51



**Şekil 1.** *XbaI* ile kesilen *S. Paratyphi B* izolatlarının genomik DNA'sına ait çeşitli PFGE paternlerini temsil eden örneklerin bant profilleri [M: Lambda ladder PFGE marker (G301A, Promega, ABD; band büyüklüğü: 50-1000 kb)].

## TARTIŞMA

Enterik ateş ve gastroenteritin etkeni olan *S. Paratyphi B* daha nadir görülen bir serotip olduğundan antibiyotik direnci ve epidemiyolojisi ile ilgili veriler sınırlı olup Türkiye'ye yurt dışından gelen turistlerde salgın oluşturduğu bilinmektedir<sup>24,25</sup>. Erdem ve arkadaşları<sup>4</sup> 2000-2002 yıllarını kapsayan Türkiye'den 10 ilin katıldığı çalışmalarında, *S. Paratyphi B*'nin 620 *Salmonella* izolatının %6'sını, Trabzon izolatlarının (n= 11) da %18.2'sini oluşturduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada direnç oranları; ampisiline %29.7, kloramfenikole %43.2, tetrasikline %24.3, SXT'ye %2.7 olarak bildirilmiş, siprofloksasin ve 3. kuşak sefalosporinlere direnç bulunmamıştır. Çalışmamızda ise kloramfenikol ve tetrasikline direnç saptanmazken, ampisilin direnci %2.9, SXT direnci %1.4 olarak belirlenmiş ve genel

olarak direnç oranları daha düşük bulunmuştur. Çalışmamızın sonucunda siprofloksasine dirence benzer şekilde rastlanmamış olmasına rağmen, nalidiksik asit direnci %18.6 bulunmuştur ki, bu da florokinolonlara karşı gelişen direnci ve tedavi başarısızlığını yansıtmaktadır. Üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç oranı çok düşük olup, yalnızca iki izolatta GSBL bulunmuştur. Bir kan izolatında CTX-M-3 ve bir dışkı izolatında da CTX-M-15 ile birlikte TEM-1 saptanmıştır. Türkiye'den yapılmış diğer çalışmalarda da, *Salmonella*'larda 3. kuşak sefalosporin direnci ve GSBL'lerin az görüldüğü bildirilmektedir<sup>9,13,15</sup>. GSBL taşıyan *Salmonella* spp. izolatları daha çok Kuzey Afrika ülkeleri, Hindistan ve Güney Kore'den rapor edilmektedir<sup>3</sup>.

Çalışmamızda bir izolatta saptanan TEM-1 enzimi, gram-negatif bakterilerden izole edilen ilk plazmid aracılı beta-laktamaz olup, penisilin ve penisilin türevleri ile 1. kuşak sefalosporinleri hidrolize etmektedir<sup>26</sup>. Türkiye'de 2009 yılında iki *S.Paratyphi B* izolatından birisinde TEM-1 ile SHV-2, diğerinde de TEM-1 ile SHV-2a, SHV-5a bulunmuştur<sup>13</sup>.

CTX-M enzimleri ise plazmid aracılı GSBL'ler içinde TEM ve SHV enzimleri ile çok ilişkili olmayan oldukça yeni bir ailedir ve başlıca *S.Typhimurium* ve *E.coli*'de saptanmışlardır<sup>27</sup>. CTX-M enzimlerinden ilki, Almanya'da 1989 yılında *E.coli* suşunda saptanmış; CTX-M-1 olarak adlandırılmış ve CTX-M türevleri günümüzde 69'a kadar ulaşmıştır<sup>26,27</sup>. Klinik suşlarda, CTX-M enzimlerini kodlayan genler genellikle boyutu 7 kb'dan 160 kb'a kadar değişen plazmidler üzerinde yerleşmiştir. *bla*<sub>TEM-1</sub> geni de sıklıkla aynı plazmidde birlikte bulunmaktadır. Bu plazmidler aminoglikozidler, kloramfenikol, sülfonamidler, trimetoprim ve tetrasiklin gibi diğer antibiyotiklere direnç genlerini de taşıyabilmektedir<sup>27</sup>. CTX-M taşıyan plazmidler, genellikle in vitro olarak transfer sıklığı her donör hücre için 10<sup>2</sup>-10<sup>7</sup> arasında değişen konjugasyonla aktarılmaktadır. Bu da *bla*<sub>CTX-M</sub> taşıyan plazmidlerin kolaylıkla yayılmasına neden olmaktadır. CTX-M enzimlerinin çoğu nozokomiyal enfeksiyon etkenlerinde görülse de *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella* spp. ve *Shigella* spp. gibi toplum kökenli bakterilerde de görülmektedir<sup>26,27</sup>. Türkiye'de *Salmonella* türlerinde CTX-M tipi GSBL'lerden CTX-M-3, ilk olarak 2006 yılında *S.Virchow*'da, 2011 yılında da *S.Typhimurium*'da bildirilmiştir<sup>9,15</sup>. CTX-M-3'ün bir varyantı olan CTX-M-15 enzimi ise *Salmonella* türlerinde ilk kez 2004 yılında Fransa ve Senegal'de bildirilmiştir<sup>28</sup>. Literatür incelemesine göre, ülkemizde *Salmonella* türlerinde CTX-M-15 enzimi saptanmamıştır.

Antibiyotik direnç paternleri çoğul dirençli *Salmonella* spp. izolatlarının epidemiyolojik araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak çalışmamızda olduğu gibi, izolatların çoğunun duyarlı olduğu durumlarda faydalı olamamaktadır. PFGE ise *Salmonella* spp. izolatlarının epidemiyolojik araştırmalarında uluslararası standart bir metot olarak yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>22</sup>. Çalışmamızda, PFGE ile beş farklı klon saptanmış olup, izolatların %90 (46/51)'inin ilişkili olduğu ve A kümesinde yer aldığı bulunmuştur. A kümesinin de A1 (7), A2 (11), A3 (7), A4 (18), A5 (2) ve A6 (1) olmak üzere altı alt tip içerdiği saptanmıştır. İzolatların çoğunun genetik ilişkili olması 2005-2008 yılları arasında bölgemizde *S.Paratyphi B* izolatları ile bir salgın olduğunu düşündürmektedir. Antibiyotik direnci ve PFGE paternleri arasında bir ilişki saptanmayıp, CTX-M-3 üreten izolatın A2, TEM-1 ve CTX-M-15 üreten izolatın E klonunda olduğu belirlenmiştir. Farklı çalışmalarda da çalışmamızla benzer şekilde direnç fenotipi ve PFGE paternleri arasında bir ilişki sap-



tanmamıştır<sup>11,29</sup>. Dolapçı ve arkadaşları<sup>11</sup> 2000 yılı sonrasını kapsayan ve ikisi Trabzon izolatu olan toplam altı ilden 42 *S.Paratyphi B* izolatını PFGE ile değerlendirdikleri çalışmalarında, *XbaI* enzimi ile 12 küme içinde yer aldığını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, bölgemizde *S.Paratyphi B* en sık görülen serotip olup, izolatların çoğunun genetik olarak ilişkili bulunması bölgemizde bir salgın olduğunu düşündürmektedir. *S.Paratyphi B* izolatlarında antibiyotik direnci genel olarak düşük olmasına rağmen nalidiksik asit direncinin %18.6 olması, CTX-M-3 ve CTX-M-15 gibi *Salmonella*'larda sık rastlanmayan GSBL'lerin saptanmış olması dikkat çekicidir. Sunulan bu çalışma, literatür incelemesine göre, Türkiye'de *Salmonella* türlerinde *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ve *S.Paratyphi B*'de *bla*<sub>CTX-M-3</sub> genlerinin saptandığı ilk çalışmadır ve tedavide bir tehdit oluşturabileceğini göstermektedir.

## TEŐEKKÜR

İzolatların merkezimizde tanımlandıktan sonra serotiplerin Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığında doğrulanmasını sağlayan Dr. Berrin Esen ve Dr. Belkis Levent'e teőekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Harish BN, Menezes GA. Antimicrobial resistance in typhoidal salmonellae. *Indian J Med Microbiol* 2011; 29(3): 223-9.
2. Crump JA, Mintz ED. Global trends in typhoid and paratyphoid fever. *Clin Infect Dis* 2010; 50(2): 241-6.
3. Yates C, Amyes S. Extended-spectrum beta-lactamases in non-typhoidal *Salmonella* spp. isolated in the UK are now a reality: why the late arrival? *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(2): 262-4.
4. 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.
5. Us E, Erdem B, Tekeli A, et al. Investigation of *Salmonella* serotype Enteritidis isolates by plasmid profile analysis and pulsed field gel electrophoresis. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(2): 210-27.
6. Bayram Y, Güdücüođlu H, Otlu B, et al. Epidemiological characteristics and molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi during a waterborne outbreak in Eastern Anatolia. *Ann Trop Med Parasitol* 2011; 105(5): 359-65.
7. Kilic A, Bedir O, Kocak N, et al. Analysis of an outbreak of *Salmonella enteritidis* by repetitive-sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Intern Med* 2010; 49(1): 31-6.
8. Us E, Erdem B, Tekeli A, et al. Molecular investigation of *Salmonella choleraesuis* and *Salmonella hadar* strains isolated from humans in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62(5): 362-7.
9. Ađın H, Ayhan FY, Gülay Z, et al. The evaluation of clusters of hospital infections due to multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the neonatal unit: a two-year experience. *Turk J Pediatr* 2011; 53(5): 517-21.
10. Tekeli A, Erdem B, Sahin F, Koyuncu E, Karasartova D, Bayramova M. Plasmid profiles and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains from outbreaks and sporadic cases in Turkey. *New Microbiol* 2006; 29(4): 251-60.
11. Dolapçı İ, Erdem B, Tekeli A, et al. Molecular analyses of *Salmonella* serotype Typhi and *Salmonella* serotype Paratyphi B strains isolated in Turkey. *Turk J Med Sci* 2010; 40(3): 447-58.
12. Coban AY, Nohut OK, Tanrıverdi aycı Y, et al. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae*: a multicenter study. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(3): 366-74.

13. Budak F, Nordmann P, Girlich D, Gür D. Characterization of extended spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolates in a children's hospital in Ankara--first report of SHV-2a and SHV-9 in *Salmonella* spp. from Turkey. *Turk J Pediatr* 2009; 51(1): 28-34.
14. 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.
15. Bahar G, Mert A, Catania MR, Koncan R, Benvenuti C, Mazzariol A. A strain of *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated in Turkey and carrying a CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase. *J Chemother* 2006; 18(3): 307-10.
16. Grimont F, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 2007. WHO-Institut Pasteur. Available at [www.pasteur.fr/ip/portal/action/ WebdriveAction Event](http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/ WebdriveAction Event).
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 21th Informational Supplement. Document M100-S21. 2011, CLSI, Wayne, PA.
18. Lim KT, Yasin R, Yeo CC, Puthuchery S, Thong KL. Characterization of multidrug resistant ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from hospitals in Malaysia. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: 165637.
19. Arlet G, Philippon A. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol Lett* 1991; 66(1): 19-25.
20. Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, et al. CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 beta-lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(2): 534-7.
21. Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12): 5715-21.
22. Centers for Disease Control and Prevention. PulseNet. Available at: <http://www.cdc.gov/pulsenet>
23. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9): 2233-9.
24. Miko A, Guerra B, Schroeter A, Dorn C, Helmuth R. Molecular characterization of multiresistant d-tartrate-positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B isolates. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9): 3184-91.
25. Grewal HM, Jureen R, Steinsland H, Digranes A. Molecular epidemiological study of *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B infections imported from Turkey to Western Norway. *Scand J Infect Dis* 2002; 34(1): 5-10.
26. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1): 1-14.
27. Giamarellou H. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 (Suppl 4): 1-16.
28. Weill FX, Perrier-Gros-Claude JD, Demartin M, Coignard S, Grimont PA. Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-15)-producing strains of *Salmonella enterica* isolated in France and Senegal. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 238(2): 353-8.
29. Goh YL, Yasin R, Puthuchery SD, et al. DNA fingerprinting of human isolates of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B in Malaysia. *J Appl Microbiol* 2003; 95(5): 1134-42.