



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SALMONELLA SEROTİPLERİNİN KONVANSİYONEL VE  
MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ

Dr. Burcu DALYAN CİLO

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2011



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SALMONELLA SEROTİPLERİNİN KONVANSİYONEL VE  
MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ

Dr. Burcu DALYAN CİLO

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt ÖZAKIN

BURSA-2011

## İÇİNDEKİLER

Özet.....	ii
Summary.....	iv
Giriş.....	1
Gereç ve Yöntem.....	28
Bulgular.....	36
Tartışma ve Sonuç.....	47
Kaynaklar.....	56
Teşekkür.....	61
Özgeçmiş.....	62

## ÖZET

*Salmonella enterica* serotiplerinin belirlenmesi epidemiyolojik çalışmalar açısından önem taşır. *Salmonella* serotipleri hücre duvarında yer alan somatik (O) antijeni ve flagellar (H) antijeni temel alınarak belirlenir. Bu çalışmanın amacı multipleks PCR yöntemi ile belirlenen moleküler serotiplendirme sonuçlarının konvansiyonel serotiplendirme sonuçları ile karşılaştırılmasıdır.

Referans laboratuvarı tarafından 14 farklı serotipte tanımlanmış toplam 100 *Salmonella* suşu, *Salmonella* serogrupları (A, B, C1, D ve E) ve Vi antijen gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak multipleks PCR yöntemi ile moleküler olarak serogruplandırıldı. H antijenleri (H: a, -b, -d, -g,m, -i, -r, -z<sub>10</sub>) ve iki antijen kompleksinde yer alan (H:1,2, -1,5, -1,6, -1,7 ve H: enz, enz<sub>15</sub>) antijenleri kodlayan *fliC* ve *fliB* genlerine yönelik ardışık dört multipleks PCR yöntemi uygulanarak serotipler belirlendi.

Konvansiyonel serotiplendirme Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA) kapsamında Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi'nde yapıldı.

Multipleks PCR sonuçları konvansiyonel yöntemle belirlenen serogruplarla %100 uyum gösterdi. Serogruplara yönelik multipleks PCR'ın duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak bulundu.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık izole edilen *Salmonella* serotipleri olan *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi* multipleks PCR ile başarılı bir şekilde serotiplendirildi. Bu serotipler için multipleks PCR sonuçları konvansiyonel serotiplendirme sonuçları ile uyumlu bulundu. Multipleks PCR'ın *S. Typhi*'nin serogruplandırma ve serotiplendirilmesi açısından duyarlılığı %100 olarak bulundu.

Multipleks PCR klinik laboratuvarlarda izole edilen suşların tanımlanmasında konvansiyonel serotiplendirmeye göre daha ucuz ve daha hızlı bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte moleküler

tiplendirme metodunun konvansiyonel serotiplendirme ile birlikte kullanılması uygun olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Salmonella*, serotiplendirme, multipleks PCR.

## SUMMARY

### Convantional and Molecular Determination of *Salmonella* Serotypes

Determination of *Salmonella enterica* serotypes is very important for epidemiological studies. *Salmonella* serotypes are defined on the basis of somatic (O) antigens and flagellar (H) antigens, both of which are present in the cell wall of *Salmonella*. The major aim of this study is the comparison of the results of molecular serotyping obtained by multiplex PCR method with the results of conventional serotyping results.

A total of 100 *Salmonella* strains, defined into 14 different serotypes by the reference laboratory have been serogrouped molecularly by using specific primers for *Salmonella* serogroups (A, B, C1, D and E) and Vi antigen gene clusters via multiplex PCR method. Serotypes have been determined by applying four sequential multiplex PCR targeting the *fliC* and *fliB* genes which are encoding the H1 antigens (H1: a, -b, -d, -g,m, -i, -r, -z<sub>10</sub>) and H2 antigen complexes (H2:1,2, -1,5, -1,6, -1,7 and H: enx, enz<sub>15</sub>).

Conventional serotyping has been made in Ministry of Health Refik Saydam Hygiene Center as part of the National Laboratory of Enteric Pathogenes Surveillance Network (UEPLA).

The results of multiplex PCR showed %100 consistency with the serogroups determined by the conventional method. Both sensivity and specivity of multiplex PCR devoted to serogroups was found to be 100%.

*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi*, which are the most frequently isolated *Salmonella* serotypes in clinical microbiology laboratories, have been successfully serotyped by multiplex PCR. The results of multiplex PCR for these serotypes showed consistent with the results of conventional serotyping. The sensitivity of multiplex PCR to identify *S. Typhi* in terms of serogrouping and serotyping was 100%.

Multiplex PCR is claimed to be a rather cheaper and a faster method than conventional serotyping method for the determination of strains isolated

in clinical laboratories. However, it would be appropriate to use molecular identification method together with conventional serotyping methods.

**Key words:** *Salmonella*, serotyping, multiplex PCR

## GİRİŞ

*Salmonella* enfeksiyonları, tüm dünyada önemini koruyan başlıca halk sağlığı sorunlarından (1). Son yıllarda tifo gibi sistemik enfeksiyon şeklindeki formları daha az görülmekle beraber, birçok ülkede, hijyenik koşullarda iyileşmeye rağmen, çeşitli *Salmonella* suşlarıyla oluşan besin zehirlenmeleri, salgın ölçütlerine varmaktadır. *Salmonella* enfeksiyonlarının ve salgınlarının, doğru ve tam değerlendirilmesi için, izole edilen suşların ayrıntılı biçimde tanımlanması gerekir (2, 3). *Salmonella*'ların kesin identifikasyonu, selektif katı besiyerinden elde edilen saf kültürlerle biyokimyasal ve serolojik testlerin uygulanmasıyla yapılır (4).

*Salmonella* genusu oldukça polimorfiktir ve çok sayıda serotip içerir. Serotiplendirme ulusal sürveyansın oluşumu, suşların epidemiyolojik sınıflandırılması, salgınların incelenmesi ve uluslararası bir dil oluşması açısından önem taşır (5).

*Salmonella* izolatları Kauffmann-White şeması kullanılarak antijenik yapılarına göre hücre duvarında bulunan; somatik (O) antijeni, kapsüler (Vi) antijeni, flagellar (H) antijenlerine göre serotiplendirilir. Özgül *Salmonella* antiserumları ile lamda veya tüpte aglütinasyon tekniği kullanılarak mikroorganizmanın önce "O" somatik antijenine göre serogrubu, daha sonra "H" kirpik antijeninin identifikasyonu ile serotipi belirlenir (6).

Konvansiyonel serotiplendirme; zaman alan, yorumlanması subjektif olabilen ve bu nedenle iyi eğitilmiş kişilerce çalışılması gereken, yüksek kaliteli çok sayıda antiserum gerektiren, pahalı bir yöntemdir (5). Kaynakları sınırlı olan laboratuvarlarda bu koşulların sağlanması zordur. Bu nedenle tiplendirmelerin referans laboratuvarlarında yapılması önerilmektedir (7).

Son yıllarda, *Salmonella* serotiplerinin tanımlanması için DNA amplifikasyonuna dayalı çeşitli moleküler metotlar üzerinde çalışılmaktadır. Bugüne kadar multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (RCR), ribotipleme, plazmid profili analizi, pulsed-field jel elektroforezi, polimorfik DNA'nın



random amplifikasyonu (RAPD), DNA mikroarray analizi gibi yöntemlerle tiplendirme çalışmaları yapılmıştır (8).

Bu yöntemlerden biri olan multipleks PCR; duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı, tekrarlanabilir, tekniği kolay, PCR ekipmanı olan tüm laboratuvarlarda kullanılabilecek, maliyet etkin bir yöntem olarak değerlendirilmektedir (9-13).

Bu çalışmada; *Salmonella* serotiplerini multipleks PCR yöntemi ile belirleyip, referans laboratuvarı serotiplendirme sonuçları ile uyumunu değerlendirmek ve multipleks PCR yöntemi ile *Salmonella* tiplendirmesinin laboratuvar hizmetinde uygulanabilirliğini göstermek amaçlanmıştır.

## 1. Genel Özellikler

*Enterobacteriaceae* ailesindeki *Salmonelleae* kabilesinde tek bir cins bulunur. *Salmonella* cinsi adını Amerikalı bir veteriner olan Daniel E. Salmon'dan almıştır. Bugün *Salmonella* cinsi içinde, eskiden *Arizona* cinsi içerisinde bulunan bakteriler de yer almaktadır (14).

*Salmonella* cinsindeki bakteriler, lipopolisakkarit yapısında O (somatik) ve protein yapısındaki H (kirpik, flagella) antijenlerinin farklılıkları temeline dayanılarak 1926'da White'ın düzenlediği ve 1972-78'de Kauffmann'ın genişlettiği şemaya göre serotiplere (serovarlara) ayrılırlar (15).

*Salmonella* cinsinin sınıflandırma ve adlandırmasında çok sayıda değişiklik yapılmıştır. Bu yüzden karışıklıklar oluşmaktadır. İlk sınıflandırma bir serotip-bir tür kavramından köken almış ve her bir serotipin ayrı bir tür olduğu düşünülmüştür (16). Le Minor ve Popoff, tek tür adının *S. enterica* olması gerektiğini 1987 yılında ileri sürerken, Quinn ise 1994'de *Salmonella*'ları 7 alt grupta gruplandırmıştır (4).

Günümüzde, *Salmonella* genusu, *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere iki türe ayrılmaktadır. *S. enterica* biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak 6 alt gruba ayrılmaktadır.

*S. enterica* subsp. *enterica* (subsp. I)

*S. enterica* subsp. *salamae* (subsp. II)

- S. enterica* subsp. *arizonae* (subsp. IIIa)
- S. enterica* subsp. *diarizonae* (subsp. IIIb)
- S. enterica* subsp. *houtenae* (subsp. IV)
- S. enterica* subsp. *indica* (subsp. VI)
- S. bongori*'nin ise alt türü bulunmamaktadır (17).

*Salmonella* serotiplerini tür olarak kullanma sistemi artık geçerliliğini yitirmiş, ancak sınıflandırma ve adlandırmanın yaratacağı karışıklığı önlemek için Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'nin de önerisi ile *Salmonella enterica* subspecies *enterica* içinde yer alan serotiplerin tür adları gibi adlandırılmasına devam edilmiştir (7).

Serotip isminin büyük harfle başlaması ama italik yazılmaması kabul edilmektedir. Örnek: *Salmonella* Typhimurium (*Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip Typhimurium gibi). Bu şekilde adlandırılan serotiplerin *Salmonella enterica*'nın *enterica* alt türüne ait olduğu anlaşılır (7).

*Salmonella* alt grupları, alt tür olarak kabul edilmektedir. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* (alt tür I)'nin 2557 serotipi vardır (17).

İnsanlarda ve sıcakkanlı hayvanlarda enfeksiyonlara yol açan en yaygın serotipler alt tür I'e aittir. İnsanlardan izole edilen *Salmonella*'ların %99'u alt tür I'de yer alan suşlardır. Diğer alt türler ve *S. bongori* daha çok çevreden ve sürüngenlerden izole edilen ve klinik olarak önemi olmayan suşlardır (14).

*Salmonella* serotipleri adlarını, yaptığı hastalıktan (*S. Enteritidis*), izole edildiği hayvandan (*S. Gallinorum*-*Pullorum*), izole edildiği hayvandan ve hastalıktan (*S. Typhimurium*), izole eden araştırmacıdan (*S. Schottmülleri*); izole edildiği ülkeden (*S. Panama*), bölgeden (*S. Kentucky*), şehirden (*S. İstanbul*), hastaneden (*S. Virchow*) alırlar (14).

*Salmonella* suşları neden oldukları hastalığa göre tifo ve tifo dışı olmak üzere sınıflandırılır. Tifo dışı *Salmonella* suşları, bir hafta veya daha uzun süren barsak enfeksiyonlarına, özellikle immün düşkün kişilerde bakteriyemi, idrar yolu enfeksiyonu ve osteomyelit gibi barsak dışı enfeksiyonlara neden olabilir (18).

*Salmonella* enfeksiyonları her yaştaki insanı etkileyebilir ancak insidans bebekler ve küçük çocuklarda yüksektir. Hayvanlarda da *Salmonella* enfeksiyonları görülür ve insandaki klinik tablolar genellikle hayvansal gıdalar ile bağlantılıdır (14).

*Salmonella* enfeksiyonları; hayvanlarla direkt temas veya ürünleri, hayvansal olmayan gıdalar, sular ve zaman zaman insanlar arası temas aracılığı ile bulaşmaktadır (18). Tifo dışı salmonelloz, her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) tahminen 1,4 milyon hastalık olgusu ve 600 civarında ölüme neden olmaktadır (19). Türkiye'de *Salmonella* enfeksiyonlarının hastaların yaklaşık 1/5'inde invaziv-sistemik klinik tablolar şeklinde seyrettiği ve bu hastaların 1/3'ünden fazlasının hastaneye yatırılarak izlenen hastalar olduğu bildirilmiştir. Bu veriler, bir yandan hastaların belirtilerinin ayakta tedavi edilebilecek kadar hafif olmadığını, öte yandan da Türkiye'de hastalıktan dolayı ekonomik kaybın yüksek olduğunu göstermektedir (20).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün 2004/129 sayılı "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi" genelgesi ve 2005 yılı Ocak ayından itibaren yürürlüğe konan "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi " yönergesine göre Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi'nde Grup D enfeksiyon etkenleri arasında yer alan dışkıdan izole edilmiş *Salmonella* izolatlarının bildirimini doğrudan laboratuvarlar tarafından yapılmaktadır.

## **2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri**

*Salmonella*'lar 2-5 µm boyunda, 0.7-1.5 µm eninde, sporsuz, kapsülsüz basillerdir. Ancak *S. Paratyphi B*'nin bazı suşlarında olduğu gibi mukoid koloniler oluşturan *Salmonella*'larda, az miktarda kapsül bulunabilir. Ayrıca *S. Typhi* ve nadiren diğer serotiplere (*S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi C*) ait suşlarda, özellikle konak organizmadan yeni izole edildiklerinde O somatik antijeninin dışında, glikolipit yapısında, bakteri hücrelerini çevreleyen ve Vi antijeni denen kapsülömsü bir yapı bulunur (14).

S. Gallinarum-Pullorum dışındaki *Salmonella*'lar peritrichia flagellaları sayesinde hareketlidir (14). Ancak flagellasız olarak bilinen S. Pullorum'un özel besiyeri koşullarında hareketli olduğu, hareketli S. Pullorum kültürlerinin elektron mikroskopisinde hücreden çıkan flagellayı andıran uzun fibröz çıkıntıların görüldüğü ve bu çıkıntıların S. Enteritidis flagellasından daha az sayıda ve daha ince olduğu, S. Pullorum ve S. Gallinarum'un faz 1 antijenini kodlayan *fliC* genine sahip olduğu tespit edilmiştir (21, 22).

Bakteriyolojik boyalarla kolay ve iyi boyanırlar. Gram negatiftirler. Çoğu *Salmonella* suşlarında tip1 (mannoza duyarlı ve hemagglütinasyon yapan) fimbrialar bulunur. S. Gallinarum ve başka serotiplere ait suşlarda tip 2 (mannoza dirençli) fimbrialar bulunmaktadır. S. Paratyphi A fimbriasızdır (14).

### 3. Üreme Özellikleri

*Salmonella*'lar fakültatif anaerob bakterilerdir. *Salmonella* türleri 7-48°C'de ve pH 4-8 arasında canlılıklarını sürdürebilirler. Üremeleri için optimal ısı 37°C ve pH 7,4'tür. Bazı özel şartlarda 4°C'nin altında çoğalabilir ve pH:4'ün altına dayanırlar. Üremek için besiyerinde zenginleştirici maddelere gerek duymazlar. Kolay ve çabuk ürerler. Buyyonda homojen bulanıklık meydana getirirler. Adi agarda 2-3 mm çapında, düzgün kenarlı, yuvarlak, hafif kubbeli ve parlak koloniler oluştururlar. Kanlı agarda gri, nemli görünümlü, 2-3 mm çapında koloniler yaparlar (4, 18).

*Salmonella*'lar barsaklara yerleştiği için, *Salmonella* enfeksiyonlarında etkenin dışkıdan izolasyonu gerekir. *Salmonella* türlerinin safra, bazı kimyasal maddeler ve boyalara diğer enterobakterilerden daha dirençli olması bu bakterilerin dışkıdan izolasyonunda kullanılan çeşitli seçici besiyerlerinin hazırlanmasına temel oluşturur (14).

İzolasyonda enterobakteriler için ayırtıcı-seçici besiyerleri olan MacConkey agar veya Eosin-Methylene Blue (EMB) agar kullanılabilir. Bu besiyerlerine, biraz daha fazla seçici özelliği olan Salmonella-Shigella agar (SS), Hektoen Enterik (HE) agar veya Ksiloz Lizin Deoksikolat (XLD) agar da

ilave edilebilir. Bunlara ek olarak özellikle *Salmonella* salgınları sırasında *Salmonella*'lar için ileri derecede seçici olan brillant yeşili veya bizmut sülfid içeren besiyerleri de kullanılabilir. Ayrıca dışkıda az sayıda *Salmonella* bulunduğu zamanlarda, tetrasyonatlı buyyon veya Selenit F besiyeri gibi *Samonella*'ları çoğaltıcı sıvı besiyerlerine gereksinim vardır (14, 23).

#### 4. Biyokimyasal Özellikleri

*Salmonella* türleri hem oksidatif hem de fermentatif metabolizmaya sahiptir. Glikoz fermentasyonu sonucu asit ve genellikle gaz oluştururlar. *S. Typhi* ve *S. Gallinarum* gaz oluşturmayıp, sadece asit oluştururlar. *Salmonella*'lar genellikle laktozu kullanmazlar, fakat bir istisna olarak Arizona grubundaki suşların büyük kısmı laktozu fermente eder. *Salmonella* türlerinin fermente ettiği karbonhidratlar içinde arabinoz, maltoz, mannitol, mannoz, ramnoz, sorbitol, trehaloz, dulsitol ve ksiloz vardır. İndol negatif, metil red pozitif, Voges – Proskauer negatif, sitrat pozitif (IMViC reaksiyonu -,+,-,+)' tir. *S. Typhi* ve *S. Paratyphi A*, *S. Pullorum* sitratı karbon kaynağı olarak kullanmaz, lizin ve ornitin dekarboksilaz enzimi genellikle vardır, arginin hidrolaz reaksiyonu suştan suşa değişiklik gösterir. Üreyi hidroliz etmezler. Beta galaktozidaz enzimi yoktur. ONPG (ortho-nitrophenyl - beta-D-galactoside) reaksiyonu negatiftir. *S. Paratyphi A*, bazı *S. Choleraesuis* suşları, *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* hariç *Salmonella*'lar tiyosülfat redüktaz enzimleri ile hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) oluştururlar (Tablo-1) (14, 23).

**Tablo-1:** *Salmonella* serotiplerinin biyokimyasal özellikleri (23).

Reaksiyon	Genel	Typhi	Paratyphi A	Choleresuis	Gallinarum	Pullorum
Gaz oluşturma	+	-	+	+	-	+
Sitrat	+	-	-	+	+	-
H <sub>2</sub> S	+	***	-	-***	-	-
Lizin dekarboksilaz	+	+	-	+	+	+
Ornitin dekarboksilaz	+	-	+	+	-	+
Hareket	+	+	+	+	-	-

\* Zayıf pozitif reaksiyon

\*\* TSI agarda zayıf pozitif reaksiyon

\*\*\* Bazı suşlar pozitif olabilir

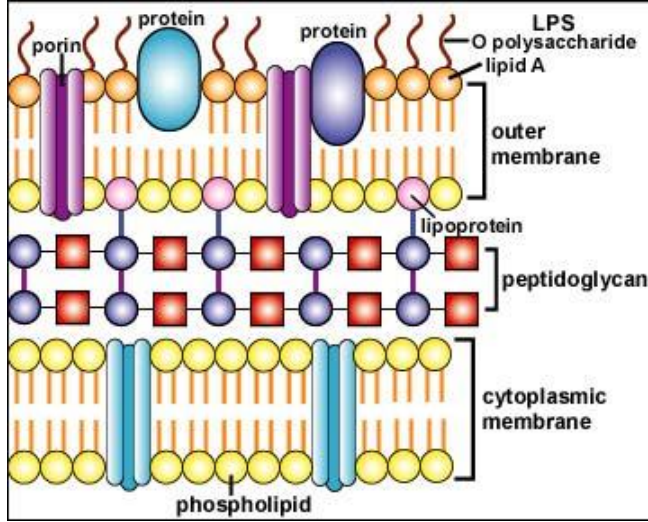
## 5. Antijenik Yapı

*Salmonella*'ların somatik (O) antijeni, kapsüler (Vi) antijeni, flagellar (H) antijenleri vardır. Kauffmann-White şemasında O antijenlerine göre serogruplara ayrılırlar. Taşıdıkları H antijenine göre ise serotipleri belirlenir. Vi antijeni her suşta bulunmaz (14).

### 5.A. *Salmonella* O Antijeni

Bakteri hücre yüzeyinde bulunan lipopolisakkarit (LPS) birçok Gram negatif bakterinin majör virülans faktörüdür (24). *Salmonella* LPS'i O-polisakkarit zinciri, kor oligosakkarit yapı ve lipit A olmak üzere üç yapısal bölgeden oluşmaktadır (Şekil-1) (25). Lipit A tüm LPS yapı boyunca hücre dışı zarına gömülü olarak bulunur ve birçok Gram negatif bakteride aynı özellikleri taşır. O antijenlerinin antijenik kısmı, polisakkarit bölümlerince belirlenir. Bu polisakkaritin iç kor, dış kor ve O antijen polimeri olarak adlandırılan üç bölümü vardır. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, kor oligosakkaritlerinin *Salmonella* türleri içerisinde sadece bir tek varyasyon gösterdiği bulunmuştur (26). Bunların aksine çok sayıda tekrarlayan oligosakkarit ünitelerinden

oluşan O polisakkarit zinciri, A ve E grupları arasında 3 ila 6 şekerli ünitelerin tekrarlaması ile oluşan ve antijenik açıdan oldukça değişken bir bölgedir. Bu antijenik farklılık *Salmonella* türlerinin serolojik sınıflandırmasının temelini oluşturur (27, 28).

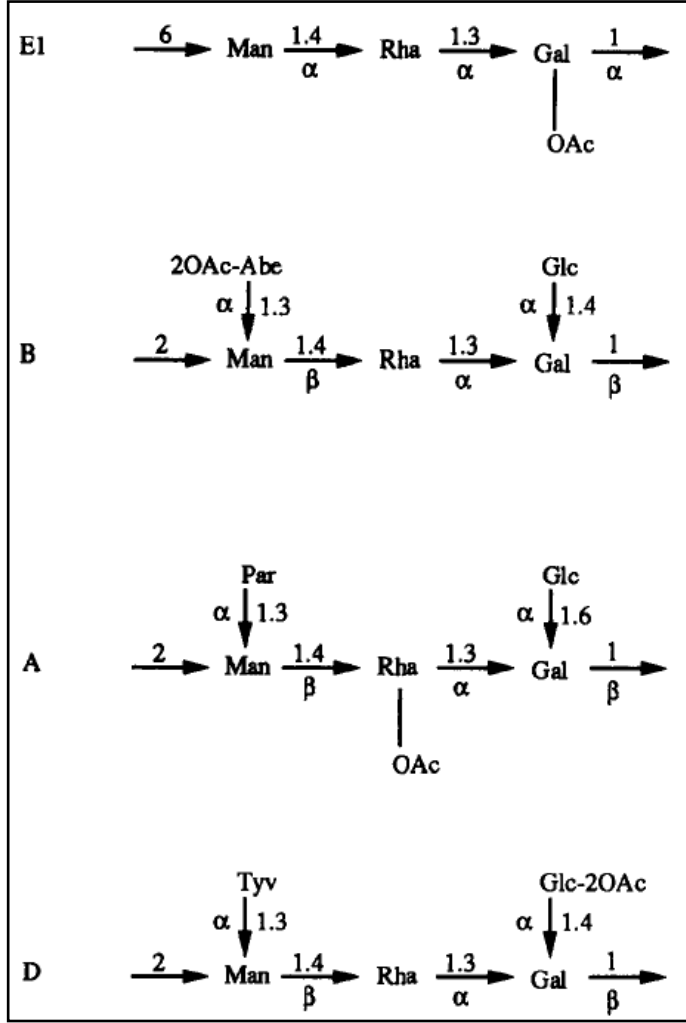


**Şekil-1:** Gram negatif bakterilerin hücre duvar yapısı (29).

O antijeni yapısındaki farklılık; farklı tipteki şekerlerden oluşması, şekerlerin düzeni (sırası), şeker dallarının eklenmesi, yan grupların değişikliği gibi nedenlerle meydana gelir (5).

*Salmonella* O antijeni üzerinde yapılan immünokimyasal çalışmalar 3,6-dideoksihekzoz şekerinin; serogrup A'da paratoz, serogrup B ve C2'de abequose, serogrup D'de tyveloz, mikroorganizmanın O özgülüğünün en önemli belirleyicisi olduğunu göstermiştir (30).

*Salmonella* serogrup B ve D1'de O ünitesi aynı şeker iskeletine sahiptir, tek farklılık grup B'de abequose, grup D1'de tyvelozdan oluşan dideoksihekzoz şeker yan dallarına sahip olmalarıdır (Şekil-2). Bu farklılık, grup B için O4, grup D1 için O9 olmak üzere iki farklı epitopu belirler. *Salmonella* serogrup E1, serogrup D2 ile aynı şeker iskeletine sahip olmakla beraber, tyveloz yan dalının olmaması ile ayırt edilir (31).



**Şekil-2:** *Salmonella* serogrup E1, B, A ve D'de tekrarlayan O ünitelerinin yapısı (32).

*Salmonella* türlerinde O antijenlerinin sentezinden sorumlu olan genler, kromozom üzerinde grup olarak *rfb* gen kümesi olarak adlandırılan bölgede yer alır. Bu bölge kromozom üzerinde yaklaşık 42 dakikada lokalize ve *his* operonuna bağlıdır (32). Tekrarlayan oligosakkarit ünitelerinin biyosentezi için gerekli, glikozil sentaz ve transferaz enzimlerini kodlar. Son basamak olan dideoksihekzoz sentezinden sorumlu genlerdeki değişiklikler serogrup spesifik problemlerin tasarlanmasına olanak sağlamıştır (28). *rfb* gen bölgesi *Salmonella* serotiplerinin belirlenmesinde hedef olarak kullanılan bir moleküler markerdir ve bugüne kadar *Salmonella* serotiplendirmesinde üzerinde en yaygın çalışılan gen bölgesidir (5).

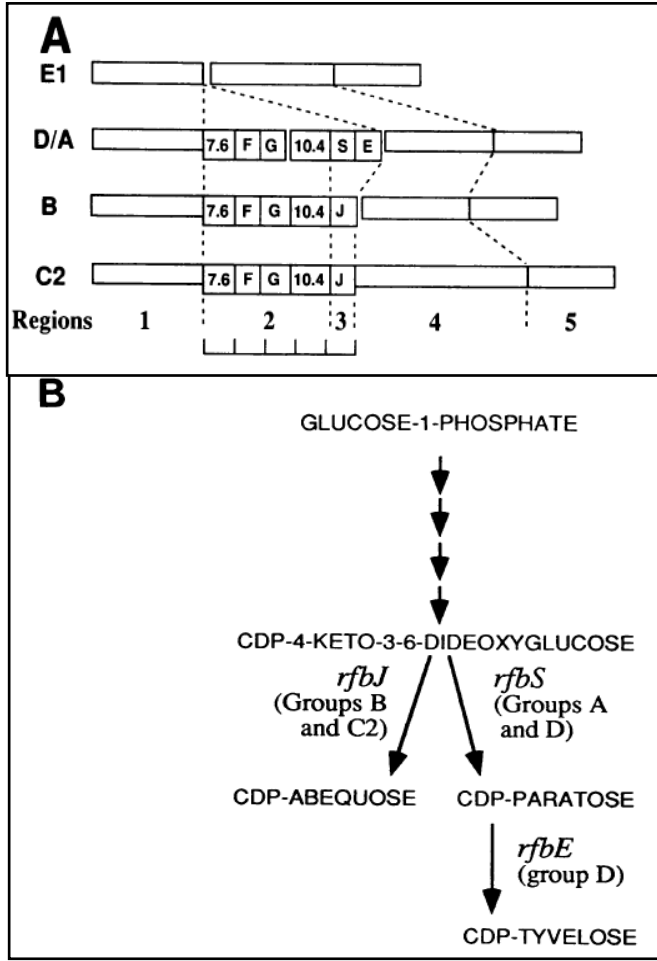


Serogrup E1, D, A ve C2'nin *rfb* gen bölgeleri şekil 3A'da şematize edilmiştir. Bölge 1'de rhamnoz sentez yolu için gerekli ve beş serogrupta identik olan genler yer alırken, bölge 2'deki ilk dört gen tüm gruplarda yaygın olarak bulunan dideoksiheksoz sentezinden sorumlu genleri, bölge 3'de abequose, paratoz ve tyveloz sentezinden sorumlu *rfbJ*, *rfbS* ve *rfbE* genleri, bölge 4'te serogrup A ve D'de neredeyse identik ama diğer serogruplardan farklı olan serogrup spesifik genleri, bölge 5'te beş serogrupta da bulunan mannoz yolu ve galaktoz transferaz genleri bulunmaktadır (28).

Serogrup A, B, C2 ve E'deki *rfb* gen bölgeleri mannoz, ramnoz ve galaktozdan oluşan trisakkarit O subünitesi, serogrup C1'deki *rfb* gen bölgesi dört mannoz rezidüsü, bir N-asetilglukozamin rezidüsü ve glikoz yan dalından oluşan O subünitesini kodlar (27).

Serogrup A ve D'de *rfbJ* yerine, *prt* (eski adı *rfbS*) geni bulunmaktadır. *prt* geni CDP-4-keto-3,6-dideoksiglukoz'un CDP-paratoz'a dönüşmesini sağlayan paratoz sentaz enzimini kodlar. Bir sonraki biyosentetik basamakta CDP-tyveloz epimeraz enzimi, CDP-paratoz'dan CDP-tyveloz'un sentezini sağlar. CDP-tyveloz epimeraz, *tyv* (eski adı *rfbE*) geni tarafından kodlanmaktadır (Şekil-3B) (34).

Serogrup A ve D'nin *rfb* gen bölgesinin restriksiyon haritası, fenotipik ekspresyona belirgin etkisi olmayan bir bölgedeki triplikasyon dışında aynı görünmektedir (Şekil-3A). Ancak *tyv* (*rfbE*) geni sekanslandığında serogrup A'da 1 bp'lik delesyona bağlı oluşan çerçeve kayması mutasyonu sonucu dördüncü kodonun stop kodonuna dönüştüğü görülmüştür. Bunun sonucu olarak grup A'daki *tyv* (*rfbE*) geni aktif olarak CDP-tyveloz epimeraz üretememektedir (34, 35).



**Şekil-3:** *Salmonella* serogrup E1, D, A, B ve C2'nin *rfb* gen bölgeleri ve dideoksiheksoz şekerlerinin sentez yolu (27).

*Salmonella* serogrup B ve C2'de abequose içeren O antijeni bulunur, bunun için CDP-4-keto-3,6-dideoksiglikoz'u CDP-abequose'a dönüştüren abequose sentaz enzimine sahiptirler. Abequose sentaz *rfbJ* geni tarafından kodlanmaktadır (Şekil 3B) (35, 36).

Serogrup B'deki *rfbJ*(B) geninin baz sekansı serogrup C2 *rfbJ*(C2)'den oldukça farklıdır, bu farklılık nükleotid düzeyinde %44, aminoasit düzeyinde %64'tür. E1 grubundaki *rfbD* ve *rfbN* genlerinde ve diğer gruplardaki genlerde de farklılıklar mevcuttur (35, 36).

*wzx* geni (eski adı *rfbX*) tüm *Salmonella* O antijen gen kümelerinde bulunur. 12 potansiyel transmembran segmentten oluşan bir proteini kodlar. Bu protein tamamlanan O antijen subünitelerinin sitoplazmik membrandan periplazmik aralığa aktarımını sağlar (37). Değişik O antijen kümelerinde yer

alan wzx proteinleri aminoasit sekansı düzeyinde çok az benzerlik gösterir, bu nedenle serogrup spesifik primerlerin seçilmesinde iyi bir hedeftir (38).

*Salmonella rfb* gen bölgelerindeki ilişkili homolog sekansların görüntülenerek, farklı moleküler parmak izlerinin belirlenmesi, serolojik özgüllüğü ile birlikte major *Salmonella* serogruplarının ayırt edilmesinde avantaj sağlar (39).

O antijenleri ısıya ve alkole dayanıklı, formole dayanıksızdır. Uygun bağışık serumu ile küçük, sağlam, granüllü aglütinasyon verir. O antijenlerine karşı gelişen antikolar, genellikle IgM yapısındadır (14).

### **O Antijen Değişiklikleri**

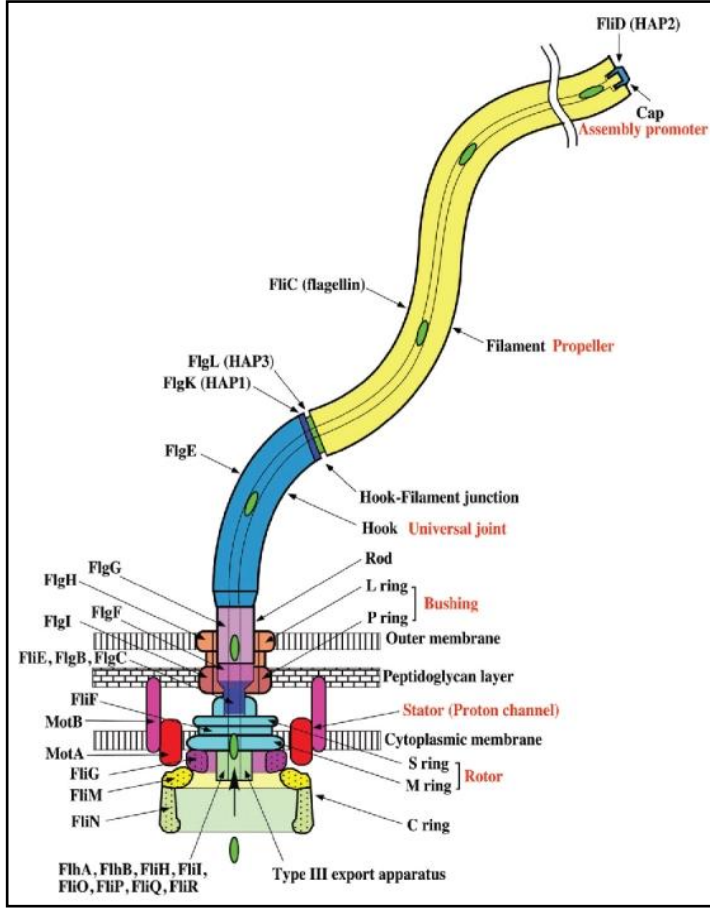
Birden çok antijen faktörü bulunduran bakterilerde, bir ya da daha fazla faktörün kaybolmasıyla değişiklikler olabilir. Bu değişiklikler kendiliğinden olabildiği gibi, bakteriyofaj etkisiyle de olabilmektedir. Bakterilerin bakteriyofajlarla lizojenik ilişkide olmaları, onlara bir antijen faktörü kazandırabilir veya bir faktörün değişmesine neden olabilir. Bakteriyofajlarla olan değişiklik sonunda bir serotip başka bir serotipe geçiş gösterebilir. Örneğin; *S. Anatum*'un 3,10 şeklindeki O antijen yapısı, 15 bakteriyofajı ile 3,15'e dönüştürülürse *S. Newington* serotipi ortaya çıkar (14).

### **S-R Değişikliği**

S-R değişikliği; laboratuvarında besiyerinde uzun inkübasyonlarda ve uygunsuz ortamda olan değişikliklerdir. Bakterilerde S→R geçişi olurken O antijenlerini kaybederler. R kolonili bakterilerde R antijenleri oluşur ve R antijenlerine göre Ra, Rb, Rc gibi gruplara ayrılabilirler. R şekline dönüşen bakterilerde; virülans kaybolur, fajlara duyarlılık değişir, tuzlu suda homojen süspansiyon oluşmaz, normal serumun bakteriler üzerindeki bakterisit etkisi artar (14).

### **5.B. Salmonella H Antijeni**

*Salmonella* cinsindeki bakterilerin çoğu flagellaları sayesinde hareketlidir. *Salmonella* H (kirpik) antijenleri protein yapısındadır. Flagella yapısı bazal cisim, flagellar kanca ve dönüş hareketini sağlayan flagellar filament olmak üzere üç bölgeden oluşur (Şekil-4) (40).



**Şekil-4:** Flagella yapısı (39).

Flagellar filament; flagellin olarak adlandırılan çok sayıda protein yapının bir araya gelerek oluşturduğu bir polimerdir. Flagellin proteini *fliC* (faz1) ve *fliB* (faz2) genleri tarafından kodlanmaktadır. Flagellin çok iyi korunmuş bir uç kısım ve değişken orta kısımdan oluşmaktadır. Yapılan kimyasal ve immünolojik analizlerle tüm antijenik özgüllüğün flagellin polipeptidinin orta bölgesi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (39). Orta kısım bölge IV olarak adlandırılan, 120 aminoasitlik çok değişken bölgeyi içermektedir. Bu bölgenin flagellar yerleşim ve fonksiyonla ilişkili olmadığı, ancak antijenik özgüllüğü sağladığı bilinmektedir (40).

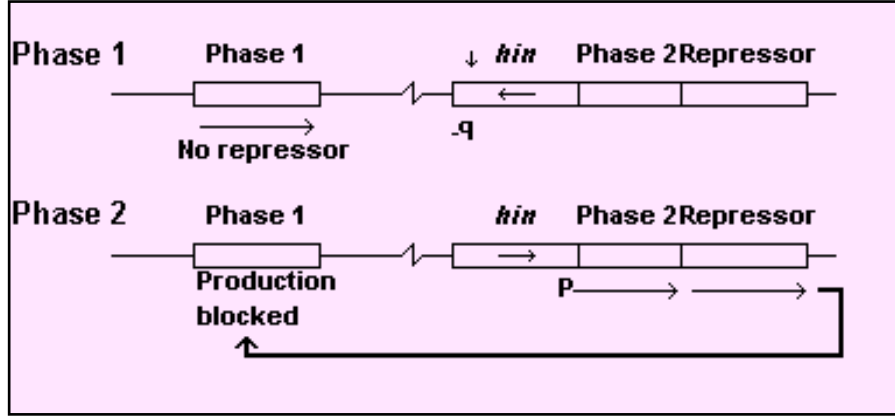
Hareketsiz olan (non-motil = Mot<sup>-</sup>) *Salmonella* serotiplerinde hareketli olan diğer türlere benzer morfolojik ve antijenik yapıda flagellalar bulunabilir. Mot<sup>-</sup> suşlardaki flagellaların dönüş yeteneğindeki azalma ya da kaybolmanın enerji üretimi mekanizmalarındaki bozukluğa bağlı olabileceği düşünülmektedir. *S. Gallinorum* (9,12:-:-) muhtemelen flagellar genlerdeki

çok sayıda mutasyon ve delesyonlara bağılı olarak hareketsizdir. Yapılan çalışmalarda *S. Gallinorum* serotipinin g,m tip flagellar antijen taşıdığı ancak flagellalı ya da hareketli bir suşun henüz raporlanmadığı belirtilmektedir (23).

*Salmonella* serotiplerinin büyük çoğunluğu, iki değişik antijen kombinasyonu içeren yani iki değişik antijen yapısında olan kirpikler oluşturur. Difazik varyasyon olarak adlandırılan bu fenomen ilk kez Andrewes tarafından 1922'de tanımlanmıştır. Bu antijen yapılarına spesifik faz ve non spesifik faz ya da 1. faz ve 2. faz adı verilir. Örneğin *S. Typhimurium* faz 1'de spesifik "i" antijeni, faz 2'de ise "1,2" antijeni yapısını gösterir. Bakteri faz 1-faz 2 dönüşümünü  $10^{-3}$  ile  $10^{-5}$  bölünmede bir gerçekleştirirken, faz 2'den faz 1'e dönüşüm daha seyrek gözlenmektedir. Faz değişimi laboratuvar ortamında *Salmonella* bakterilerinin semisolid agarlardaki kültürlerine spesifik faz 1 ya da faz 2 antiserumlarının eklenmesi ile indüklenebilir. Örneğin; faz 2 antijenleri "1,2" ye karşı antiserum içeren besiyerinde *S. Typhimurium*, faz 1 antijenleri sentezlenmektedir (23).

*fliC* ve *fljB* genleri faz 1 ve faz 2 flagellini kodlar. Bu genler kromozom üzerinde iki farklı lokalizasyonda bulunur (11). Lederberg ve Edwards (42) 1953'te, iki flagellar fazın birbirinden bağımsız iki gen tarafından kodlandığını göstermişlerdir.

Faz varyasyonu *hin* geni tarafından kontrol edilen bir rekombinasyon mekanizması ile düzenlenir. *fljBA* operonundaki *hin* geni *hin* rekombinazı, *fljB* geni faz 2 flagellini ve *fljA* geni *fliC* geni represörünü kodlar. *hin* rekombinaz, kromozom üzerinde *fljBA* operonunun promoteri olan 993bp segmentin, geri dönüşümlü değişimini kataliz eder. *fljBA* operonunun promoter bölgesi, yaklaşık  $10^6$  bölünmede bir, *fljBA* operonunun eksprese edilmesini önleyerek, dönüşüme izin verir. İkinci fazda promoter *fliC* geninin represyonunu indükleyerek *fljB* ve *fljA* genlerinin transkripsiyonunu sağlar. *hin* geninin diğer dönüşümünde, *fljB* ve *fljA* eksprese edilmez, faz 2 flagellin devre dışı kalır, *fliC* dereprese olur ve faz 1 flagellin eksprese edilir (Şekil-5) (43, 44).



**Şekil-5:** *Salmonella enterica*'nın faz varyasyonu (45).

*Salmonella* serotiplerinin bazıları monofaziktir. Daima aynı antijen veya antijen kombinasyonlarını taşıyan kirpik oluşur. Doğal olarak tek faz içeren serotiplerin, *hin* genindeki bir mutasyona bağlı geliştiği düşünülmektedir (44).

Monofazik varyantlar flagellar genlerin kaybolmasına ya da inaktive olmasına bağlı ortaya çıkar. Bu olay flagellar antijen genlerinin eksprese edilmemesi, ya da iki faz arasındaki değişimi sağlayan faz inversiyon mekanizması ile ilgili bir mutasyon sonucu oluşur. Bu durumun genin bütün parçalarında delesyona yol açabileceği sadece *fliB* geni ile ilgili çalışmalarda gösterilmiştir (46). Hareketsiz varyantlar çok çeşitli mutasyonlara bağlı ortaya çıkmakta ve fonksiyonel flagella üretilmesini önlemektedir, ancak flagellin genleri bu izolatlarda neredeyse her zaman sağlamdır (47).

*S. Typhi* (9,12: d: -) faz 1 monofazik olarak bilinmektedir, H2 homolog lokusu yoktur. Ancak H-antiserum "d" içeren kültürlerinde doğada bulunmayan "j" antijeni içeren suşlar gözlenmiştir. Kauffmann 1936 yılında bunları R faz H antijenleri olarak adlandırmıştır. Bu antijenin *fliC-d* geninin delesyonu ile oluşan 261 bp'lik bir derivesi olan *fliC-j* geni tarafından eksprese edildiği gösterilmiştir (48).

Doğada bulunan bazı nadir serotiplerde üç ya da daha fazla H fazı eksprese edilebilir. Bu durum H1 ve/veya H2 genlerinin duplikasyonuna bağlı ortaya çıkmaktadır (23).

Bazı H antijenlerinin çok sayıda antijenik epitopa sahip olduğu gösterilmiş ve "antijenik ilişkili kompleksler" olarak adlandırılmıştır. Antijen

kompleksleri major bir epitopa, bir veya daha fazla sekonder epitopun eklenmesiyle oluşur ve major immünolojik epitopları temel alınarak isimlendirilir. EN kompleks, 1 kompleks, G kompleks, L kompleks ve Z4 kompleks gibi. Antijen kompleksleri belirlenirken önce major antijeni belirlenir (H:1), daha sonra sekonder epitoplarına göre (H:2, -5, -6, -7) ayrılır. EN kompleks içerisinde üç (H:e,n,x, -e,n,z<sub>15</sub>, -e,n,x,z<sub>15</sub>), 1 kompleks içinde sekiz (H:1,5, -1,6, -1,7, -1,5,7...), Z4 komplekste dört (H:z<sub>4</sub>,z<sub>23</sub>, -z<sub>4</sub>,z<sub>24</sub>...) L komplekste altı ( H: l,v, -l,w, -l,z<sub>13</sub>...) ve G komplekste yirmi bir (H: f,g,t, -g,m...) antijen kombinasyonu yer alır (47).

*Salmonella* H antijeni ısıya ve alkole duyarlı, formole dayanıklıdır. Uygun bağışık serumları ile kolay dağılan, büyük flakonlu gevşek aglütinasyon verirler. H antijenlerine karşı organizmada oluşan antikolar, genellikle IgG yapısındadır (14).

### **H Antijen Değişiklikleri**

#### **OH→O Değişikliği**

Flagellası olan *Salmonella*'lar bazen flagellasız (H<sup>-</sup>) hale gelebilir. Bu değişim laboratuvar ortamında ya da doğada gerçekleşebilir ve OH→O varyasyonu olarak adlandırılır. Uygun koşullarda bu olay tersine (O→OH) döner (14).

#### **Faz Değişikliği**

Genetik mutasyon ya da genetik olmayan koşullarda difazik bakteriler, bir faza ait kirpik antijenlerini kaybederek, monofazik hale geçebilirler. Böylece 1. Faz→2. Faz veya 2. Faz→1. Faz değişimi olur (14).

### **5.C. Salmonella Vi Antijeni**

Zarf ya da kapsül antijeni olarak bilinen "Vi antijeni" bakteri hücrelerinin dış yüzeyini örten N-asetilgalaktozamin üronik asit homopolimeridir. *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, bazı *S. Dublin* ve *Citrobacter freundii* suşları tarafından eksprese edilir (5).

Vi antijeni aslında yüzeysel bir somatik antijendir ve diğer O antijenlerini örttüğü için bakterinin O antijenlerine karşı hazırlanmış bağışık serumlarla aglütinasyon vermesini önler. Bu bakteriler yalnızca anti-Vi serumları ile aglütinasyon verir. Bakteri süspansiyonu ısıtılınca Vi antijeni

bakteri hücrelerinden ayrılıp ortama geçer. Böylece ısıtılmış bakteri süspansiyonu O antijenlerine karşı hazırlanmış anti-O serumları ile aglütinasyon verir.

S. Typhi'nin Vi antijeni, *C. freundii*'nin Vi antijenine, yapısal ve immünolojik olarak benzemektedir. *Salmonella*ların laboratuvar tanısında kullanılan anti-Vi antiserumları, tavşanlara *C. freundii*'nin Vi antijeni enjekte edilerek hazırlanmaktadır (14).

Vi antijenlerinin üretimi *viaA* ve *vibB* olarak adlandırılan iki kromozomal lokus tarafından kontrol edilmektedir. *viaB* bölgesinin Vi antijeni ekspresyonu için özgül yapısal genlerden oluştuğu düşünülmektedir. Vi antijeni S. Typhi'nin serumda canlılığını sürdürebilmesi için esansiyeldir (49).

#### **Vi Antijeni Değişimleri**

Farklı S. Typhi suşları değişik miktarlarda Vi antijeni içerir. Tekrarlayan laboratuvar pasajları sırasında Vi antijeni pozitif suşlar negatif hale gelebilir. Vi antijeninden zengin olan suşlar Vi negatif olanlara ya da daha az Vi antijeni içerenlere göre daha opak koloniler oluştururlar (14).

Almanca çok anlamına gelen "viel" sözcüğünün ilk harfi ile ifade edilen V form bakteri, tam miktar Vi antijeni bulunan ve bu yüzden anti-Vi serumu ile aglütinasyon verdiği halde anti-O serumu ile aglütine olmayan *Salmonella* bakterisini tanımlar. Almandada az anlamına gelen "weing" sözcüğünün ilk harfi ile ifade edilen W form bakteri, Vi antijeni tamamına yakını kaybolacak şekilde azalan ve bu nedenle anti-O serumları ile aglütine olabilen *Salmonella* bakterisini tanımlar. VW form bakteri ise orta derecede Vi antijeni bulunduran *Salmonella* suşlarını tanımlar. Bunlar anti-Vi serumlarıyla ve anti-O serumlarıyla zayıf olarak aglütinasyon verebilmektedir (6).

#### **5.D. M Antijeni**

S. Paratyphi B ve mukoid koloni oluşturan bazı *Salmonella*ların kültürleri oda sıcaklığında birkaç gün bekletildiğinde, polisakkarit yapısında olan ve Vi antijeni gibi anti-O serumları ile aglütinasyonunu önleyen bir M antijeni oluşturur (14).



### 5.E. Fimbria (pilus) Antijeni

*Salmonella* türlerinin çoğunda tip 1 fimbrialar ve bunlarla ilişkili olarak fimbria (pilus) antijenleri bulunmaktadır. Bu bakteriler, anti-fimbrial antikorları içeren bağışık serumlarla aglütinasyon verir (50).

### 6. Kauffmann-White Şeması

Bir bakterinin *Salmonella* genusunda bulunduğu belirlenmesinde öncelikle biyokimyasal özellikleri dikkate alınır. *Salmonella*'ların oldukça fazla varyasyonlar gösteren antijenik yapılarının saptanması ise sınıflandırma ve tiplendirme açısından büyük önem taşır (14, 23).

*Salmonella* antijenlerinin identifikasyon ve sınıflandırması White (1926, 1929) tarafından başlatılmış, Kauffmann (1929, 1934) tarafından genişletilerek sürdürülmüş ve genel kullanımda da benimsenmiştir (14).

Antijenik formül sırası ile O somatik antijenleri, faz 1 ve faz 2 H antijenleri olmak üzere üç kısımdan oluşur. Bir bakteride bulunan tüm antijenik faktörler, bu sıra ile ve araları " : " ile ayrılarak yazıldığında her *Salmonella* bakterisi için bir antijenik formül ortaya çıkar (23).

O antijenleri sayılarla belirtilir. Faz 1 H antijenleri j harfi dışında a'dan z'ye kadar harflerle ve bundan sonra z<sub>68</sub>'e kadar z'nin yanına rakam ilavesiyle gösterilirken, faz 2 H antijenleri rakamlarla gösterilir. Faz 2 "e" serisi ve "z" serisi antijenik komponentleri de içerebilir. Bazı H antijenleri sadece 1. fazda görülürken, bazıları sadece 2. fazda görülür. "e", "1", "w" ve bazı "z" faktörleri ise her iki fazda da görülebilirler (23).

Bazı antijenler bir serotipe ait bazı suşlarda görülebilir. Bu durumda bu antijenler parantez içinde gösterilir. Örneğin O faktör, 5 S. Paratyphi'nin bazı suşlarında görülmediğinden antijenik formülde 1,4,[5],12; b: 1,2 şeklinde yer alır. Yine bazı antijenlerin altlarının çizili olması bu antijenlerin sadece faj varlığında sentezlenebildiğini belirtir. Örneğin *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12: i: 1,2 (23).

*Salmonella*'lar sınıflandırılırken ilk önce serogrubu belirlenir. Bunun için yaygın olarak bulunan O somatik antijenlerinin varlığı araştırılır. Bir suшта

aynı anda birden fazla O antijeni var olabilir, bu antijenlerden bazıları o suşun hangi gruba ait olduğunu belirleyen major O antijenleridir (23, 50).

O antijenleri ile belirlenen gruplar A'dan Z'ye kadar harflerle gösterilir. Bazı gruplar C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, E<sub>1</sub>-E<sub>4</sub> gibi subgruplara ayrılmıştır. A-Z arasındaki gruplar 2-50 arasındaki O antijenlerini içerir. Bundan sonra saptanan antijenlere göre O<sub>51</sub>-67 şeklinde gruplandırılmıştır. Bu şekilde her O serogrubunu içerdiği O antijenlerine göre adlandırma yöntemi daha mantıklı bulunarak daha önce ayrılan grupların da bu şekilde belirtilmesi yoluna gidilmiştir. Örneğin; O<sub>4</sub>:B, O<sub>7</sub>:C1 gibi. Fakat daha sonra bazı antijenlerin nadiren *Salmonella* dışındaki bakterilerde de bulunabileceği, bu 67 O antijenlerinden bazılarının, minör O antijenleri olabileceği ve ayırt edici değeri olmadığı, bazı antijenlerin bilinen major bir antijenin kimyasal değişikliğe uğramasıyla ya da faj konversiyonu ile ortaya çıkabileceği düşüncesi ile bu şekildeki isimlendirme daha fazla sürdürülmemiştir (17-23).

Kauffmann-White şeması *Salmonella*'nın tüm antijenik yapısını gösteren bir şema değildir. Bakterilerin çoğu, şemada yer alan formülden çok daha kompleks bir yapıya sahiptir. Eğer minör antijenik farklılıklar hesaba katılsaydı, tanımlanabilen serotipler neredeyse sınırsız olurdu ve sistem kullanılabilirliğini yitirirdi. Bu nedenle sadece tanısal değeri olan antijenlere Kauffmann-White şemasında yer verilmiştir (23).

Kauffmann-White şemasının 2007 yılında yayınlanan son baskısına göre günümüzde 2579 *Salmonella* serotipi vardır (17).

<i>S. enterica</i>	2557
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1 531
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	505
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	99
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	336
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	73
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	22

## 7. *Salmonella* serotiplendirmesi

Serotiplendirme ile bakterinin epidemiyolojik karakteri belirlenmektedir. *Salmonella* suşlarının serotip identifikasyonunda taşıdıkları yüzey antijenleri (lipopolisakkarit, O antijenleri) ve flageller (protein, H antijenleri) antijenleri araştırılmaktadır. Serotiplerin tanımlanmasında "Kauffmann-White" şemasındaki antijen kombinasyonları temel alınmaktadır (5).

Serotiplendirme; sürveyans, gıda kaynaklı salgınların tespiti, kontrolü ve önlenmesi, yeni türlerin ve geçiş mekanizmalarının belirlenmesi, suşların epidemiyolojik sınıflandırması, uluslararası bir dil oluşması açısından önemlidir (5).

### 7.A. Konvansiyonel Serotiplendirme Metodu

#### Polyvalan O Antiserumları ile Aglütinasyon

Biyokimyasal reaksiyonları ile *Salmonella* ile uygunluk gösteren bakterilerin nutrient agar gibi boyasız, inhibitörsüz bir besiyerinde saf kolonileri elde edilerek *Salmonella* poly O antiserumları ile aglütinasyonu incelenir. *Salmonella* poly O antiserumu ile pozitiflik saptandıktan sonra monovalan antiserumlarla Kaufmann-White şemasına göre aglütinasyona devam edilir (51).

#### O Antijen Tiplendirmesi

Nutrient agarda bir gecelik inkübasyon sonrasında üretilmiş olan *Salmonella* kolonilerinden bir öze dolusu alınıp, daha önce bir lama damlatılmış olan birer damla steril serum fizyolojik ile homojenize edilir. Yaklaşık McFarland no 3 standart bulanıklığında homojen bir süspansiyon elde edilir. Lamdaki bu süspansiyonların birinin üzerine 1 damla *Salmonella* polivalan O antiserumu damlatılırken, ikinci serum fizyolojik ile muamele edilmiş süspansiyon kontrol olarak kullanılır (7).

Lamlar, damlalar birbirine karışmayacak şekilde nazikçe, antiserum üreticisinin önerdiği sürece çevrilerek birinci ve ikinci damlalardaki görünüm karşılaştırılır. Birinci damlada kümelenme olurken ikinci damlada bu izlenmiyorsa pozitif olarak değerlendirilir. Ancak kontrol olarak kullanılan

damlada da kümelenme izleniyorsa bu o *Salmonella* suşunun R tipi koloni yapısında olduğunu gösterir ve subkültürleri yapılarak S tipi koloni morfolojisi sağlandıktan sonra testin tekrarını gerektirir (7, 50).

Bazen O antiserumlarıyla aglütinasyonu engelleyen Vi antijenleri bulunabileceğinden, Vi antijenlerini uzaklaştırmak için bakteri süspansiyonunun 60°C'de 1 saat ısıtılması gerekebilir. Bundan sonra O aglütinasyonu tekrarlanmalıdır (7).

### **H Antijen Tiplendirmesi**

H antijenleri solid besiyerinde tam olarak gelişemeyeceğinden semi-solid agara subkültür gereklidir. Nutrient agardaki saf kültür cragy tüplü hareket besiyerine pasajlanır. Bakterinin H antijenini eksprese etmesi için hareket besiyeri pasajları üç gün boyunca yapılır. Daha sonra semi solid bir besiyeri olan swarm agara bakteri kolonisi inoküle edilip 37°C'de bir gece inkübe edilir. H antiserumları ile lam aglütinasyonu uygulanır (7).

Kaufmann-White şemasına göre, bulunan O ve H antijenlerine göre bakterinin olası serotipi belirlenir. Eğer bakterinin faz 2 antijeni taşıdığı düşünülüyorsa swarm agara pasajlanır. Daha önce hazırlanıp burgulu kapaklı tüplere 5 ml olarak dağıtılıp otoklavda sterilize edilmiş olan swarm agarlar 55°C'lik su banyosunda eritilir. Bakterinin belirlenen ilk faz antijeni ile baskılanması sonucunda faz iki antijenleri ortaya konabilir. Bakteriyi hangi H antijenine göre baskılayıp faz 2 antijenlerini çıkarmak istiyorsak, yüksek konsantrasyonlu faz 1 antiserumundan steril küçük petri plaklarına eklenir. Erimiş ve dökülmeye hazır hale gelmiş olan swarm agar petrilerdeki antiserumla karıştırılır. Petrilerdeki agar donduktan sonra hareket besiyerinden incelenen bakterinin 1µl'lik özelerle alınan miktarı swarm agara ekilir ve bir gece inkübasyona bırakılır. Eğer bakterinin faz 2 antijeni varsa bunu eksprese edecektir. Swarm agarlar değerlendirilir. Ekim çizgisinden en uzağa yayıldığı alandan bakteri kolonisi alınarak H antiserumları ile lam aglütinasyonu tekrarlanır (7, 50).

Bu şekilde O ve H antijenleri saptanan bakterinin serotipi Kaufmann-White şemasına bakılarak belirlenir (7).

## 7.B. Moleküler Serotiplendirme

*Salmonella* serotiplendirmesi için bugün hala altın standart olan konvansiyonel serotiplendirme zaman alan, iyi eğitilmiş kişilerce çalışılması gereken ve yüksek kaliteli çok sayıda antiserum gerektiren, pahalı bir yöntemdir. Kaynakları sınırlı olan laboratuvarlarda bu koşulların sağlanması zordur. Bu nedenle tiplendirmeler referans laboratuvarlarında yapılmakta, ancak özellikle salgın dönemlerinde sonuca hızlı ulaşmak gerekli olmaktadır.

Son yıllarda, *Salmonella* serotiplerinin tanımlanmasında konvansiyonel serotiplendirmeye alternatif ya da tamamlayıcı, DNA amplifikasyonuna dayalı moleküler metotlar üzerinde çalışılmaktadır. Bugüne kadar multipleks PCR, ribotipleme, plazmid profili analizi, pulsed-field jel elektroforezi, polimorfik DNA'nın random amplifikasyonu (RAPD), DNA mikroarray analizi gibi yöntemlerle tiplendirme çalışmaları yapılmıştır (8).

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Tekniği

PCR tekniği 1983 yılında Dr. Kary B. Mullis tarafından bulunmuştur. PCR basit in-vitro kimyasal bir reaksiyondur ve hedef nükleik asit ve dizinin sınırsız sentezine olanak sağlar. Bu işlem uygun koşullarda DNA zincirini kopyalayabilen DNA polimeraz aktivasyonuna bağlıdır.

Basit olarak bir PCR reaksiyonu hedef DNA, iki oligonükleotid primer, ısıya dayanıklı DNA polimeraz, eşit olarak karıştırılmış deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP; dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), MgCl<sub>2</sub>, KCl, ve bir Tris-HCl tampon içermektedir.

Kullanılacak iki primer dizisinin, amplifiye olacak çift zincirli DNA dizisine uygun ve genellikle yüzden birkaç yüz baz çifte kadar değişebilen büyüklükteki hedef zinciri çevreleyen özellikte olması gerekir.

PCR işleminin başında karışım hedef DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması için ısıtılır ve sonrasında diziyeye özgül primerlerin hedef DNA'ya yapışması için ısı düşürülür. DNA polimeraz enzimi, bağlanmış olan primeri 3' ucundan başlayarak uzatır. Uzamış primer uzantıları ısıtılma ile hedef DNA'dan ayrılır. İşlem tekrar başa döner ve orijinal hedefler gibi her bir ürün bir sonraki aşamalarda oluşacak bağlanma ve uzamalarda kalıp olarak kullanılır.

Her bir reaksiyonun sonunda PCR ürünleri teorik olarak çift zincir şeklinde oluşur. Böylece hedef dizi reaksiyon sonunda  $2^n$  kat ( $n$ = siklus sayısı) amplifiye edilmiş olur. Tüm işlemler siklus sayısı, reaksiyon karışımının işlemden tutulacağı zaman ve ısı ayarlarını kontrol eden thermal cycler cihazında gerçekleştirilir. İdeal olarak 20 siklus sonunda  $10^6$  katlık amplifikasyona, 30 siklus sonunda ise  $10^9$  katlık bir amplifikasyona ulaşılır (18).

### **Multipleks PCR Yöntemi**

Multipleks PCR'da iki veya daha fazla primer çifti farklı hedefleri amplifiye etmek için aynı reaksiyon karışımında bulunur. Bu yöntemde birden fazla hedef dizisi tek bir tüpte çoğaltılabilir. Bu reaksiyonda seçilen primerlerin aynı yapışma ısısına sahip olacak şekilde seçilmesi gerekir. Multipleks PCR yöntemi tek primer setli PCR yöntemine göre daha karmaşıktır ve duyarlılığı daha azdır (18).

*Salmonella* O ve H antijenlerinin biyosentezini kodlayan genlerin nükleotid sekans analizi ile spesifik primerler elde edilebilmektedir. Bu primerlerden faydalanılarak multipleks PCR yöntemi ile *Salmonella* serogrupları ve H antijenleri saptanabilmekte ve elde edilen antijen gen allel kombinasyonları ile *Salmonella* serotipleri belirlenebilmektedir (5).

Yapılan çalışmalarda multipleks PCR'ın; duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı, tekrarlanabilir, tekniği kolay, tüm laboratuvarlarda uygulanabilecek bir yöntem olduğu gösterilmiştir (5).

## **8. Salmonella Epidemiyolojisi**

*Salmonella* enfeksiyonları tüm dünyada yaygındır. Son yıllarda tifo insidansı azalmakta, *Salmonella* gastroenteritlerinde artış gözlenmektedir. *S. Typhi* serotipi sadece insanda hastalık yapar. Sağlıklı ve duyarlı kişiye tifo bulaşması hastalardan veya taşıyıcı kişilerden fekal-oral yolla olmaktadır. İnsanda hastalık oluşturan diğer serotiplerin başlıca bulaş kaynağı hayvansal besinler olmakla birlikte, kirlenen çevreden kontamine olan sular ve bitkiler de bulaşta önemlidir (14, 41, 52).

*Salmonella* enfeksiyonları endemik bölgelerde, yaz ve sonbahar aylarında sık görülmektedir. Çocuklarda ve genç erişkinlerde sık görülür. Hastane enfeksiyonları ve salgınlar şeklinde de görülebilir (14). Özellikle son on yılda dünyanın hemen her bölgesinde değişik *Salmonella* serotiplerinden kaynaklanan gıda kaynaklı enfeksiyonlarda artış gözlenmektedir (53).

Besin zehirlenmelerinin ve *Salmonella* enterokolitlerinin neden olduğu ekonomik yük oldukça fazladır. ABD’de *Salmonella* enfeksiyonlarına bağlı medikal harcamalar ve iş gücü kaybının maliyeti yıllık 983 milyon dolar ile 1.4 milyar dolar arasındadır (54).

*Salmonella* serotiplendirmesi, sürveyansı kolaylaştırmak ve salgınların tanınmasına olanak sağlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (18).

CDC, 2006 yılında yayınladığı raporda aynı yıl insanlardan en fazla izole edilen *Samonella* serotiplerini; %16.9 S. Typhimurium, %16.6 S. Enteritidis, %8,3 S. Newport olarak bildirmiştir (55).

Ülkemizde 1990’lı yıllara kadar en sık izole edilen *Salmonella* serotipi S. Typhimurium iken, 2000’li yıllarda S. Enteritidis insidansının giderek arttığı ve görülmektedir (Tablo-2) (16, 56-59).

**Tablo-2:** Türkiye’de yıllara göre *Salmonella* suşlarında serotip dağılımı (60).

<b>1987-1989 n:360</b>	<b>%</b>	<b>1992-1994 n:353</b>	<b>%</b>	<b>1995-1997 n:339</b>	<b>%</b>
S. Typhimurium	68	S. Typhimurium	62	S. Typhimurium	48
S. Enteritidis	15	S. Enteritidis	23	S. Enteritidis	41
S. Typhi	4.4	S. Typhi	6.8	S. Paratyphi B	2.7
S. Hafnia	2.5	S. Corvallis	1.4	S. Typhi	1.8
S. Paratyphi B	2.2	S. Paratyphi B	1.1	S. Infantis	1.2
<b>1998-2000 n:282</b>	<b>%</b>	<b>2000-2002 n:620</b>	<b>%</b>		
S. Enteritidis	65	S. Enteritidis	48		
S. Typhimurium	23	S. Typhimurium	35		
Serogrup C2	3.5	S. Paratyphi B	6		
S. Paratyphi B	2.5	S. Typhi	2.9		
S. Typhi	2.1	S. Choleraesuis	1.8		
Serogrup C1	1.8	S. Hadar	1.1		

Ekim 2007 - Ağustos 2008 döneminde, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı’nda doğrulaması ve tiplendirilmesi yapılan 279 *Salmonella* suşunun 24 farklı serotipe dağıldığı belirtilmiştir. En sık rastlanan *Salmonella* serotipi S. Enteritidis (%46.7) olup, bunu S. Paratyphi B (%15.4) ve S. Typhimurium (%11.1) izlemiştir. Gıda kaynaklı enfeksiyonların başlıca etkenleri arasında yer alan *Salmonella*’lar içinde S. Enteritidis, günümüzde Türkiye’de en yaygın gözlenen *Salmonella* serotipidir. *Salmonella* suşları arasında ikinci sıklıkta gözlenen serotip ise hem sistemik enfeksiyona hem de gastroenterit tablosuna neden olabilen S. Paratyphi B olmuştur. Ülkemizde klinik bildirim yapılan ve sistemik tutulumu yol açan tifonun etkeni olan S. Typhi ise %2.5’luk saptanma oranı ile yedinci sırada yer almıştır (Tablo-3) (59).



**Tablo-3:** 2007-2008 Yıllarına ait *Salmonella* suşlarının serotiplere göre dağılımı (59).

<b>Salmonella serotipi</b>	<b>Sayı(n)</b>	<b>Yüzde(%)</b>
S. Enteritidis	130	46.7
S. Paratyphi B	43	15.4
S. Typhimurium	31	11.1
S. Corvallis	9	3.2
S. Kentucky	9	3.2
S. Agona	7	2.5
S. Typhi	7	2.5
S. Braenderup	5	1.8
S. Muenchen	5	1.8
S. Paratyphi A	5	1.8
S. Hartford	4	1.4
S. Infantis	4	1.4
S. Hadar	3	1.1
S. Virchow	3	1.1
Diğer serotipler	14	5
<b>TOPLAM</b>	<b>279</b>	<b>100</b>

Uludağ Üniversitesi'nde yapılan, 1987-1989 yılları arasında Bursa'da izole edilen 534 *Salmonella* suşunun serotip dağılımının incelendiği çalışmada en sık 466 izolat ile *S. Typhimurium* (%87.27), takiben 41 izolat ile *S. Enteritidis* (%7.74), 16 izolat ile *S. Typhi* (%2.99), 4 izolat ile *S. Paratyphi B* (%0.74) serotipi saptanmış, aynı çalışmada birer izolat olarak serotiplendirilen *S. Ullevi*, *S. Onarimon*, *S. Mendoza* Türkiye'de ilk kez izole edilen serotipler olarak belirlenmiştir (61).

İzole edilen suşların dağılımına bakıldığında *S. Enteritidis* izolasyonlarının gittikçe arttığı belirtilmiştir. Özellikle besin zehirlenmeleri ile ilişkili olduğu bilinen *S. Enteritidis* izolasyonlarından sekiz tanesinin iki ailenin üyelerinden izole edilmiş olması dikkat çekmiştir. Yine aynı dönemde

Bursa'nın Trilye kazasında görülen *S. Typhi* izolasyonlarının muhtemelen su kaynaklı bir epidemiyeye bağı olabileceği düşünölmüştür (61).

Tüm dünyada olduğu gibi ölkemizde de *Salmonella* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlarda sayısal dalgalanmalar yaşanmasının yanı sıra suş dağılımında da farklılıklar olduğu bilinmektedir. Bu nedenle özellikle hasta örneklerinden *Salmonella* türlerinin izolasyonu için daha duyarlı yöntemlerin kullanılması, ayrıca hassas identifikasyon teknikleri ile hızlı ve doğru serotiplendirmenin yapılması büyük önem taşımaktadır (61).

*Salmonella* serotiplerinin konvansiyonel yöntemle serolojik olarak tiplendirilmesi hem uzun süren laboratuvar işlemleri hem de oldukça pahalı olan antiserumların her birinin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarınca temin edilmesi mümkün olmadığından referans laboratuvarlarında yapılmaktadır. Bu çalışmada, son yıllarda *Salmonella* serotiplerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere dünyanın çeşitli yerlerindeki laboratuvarlarda geliştirilerek kullanıma sunulan, daha kolay ve ucuz bir yöntem olduğu öne sürölen multipleks PCR'ın laboratuvarımızda uygulanabilirliğini araştırmak, elde edilen sonuçların referans laboratuvarından gelen konvansiyonel serotiplendirme sonuçları ile uyumunu karşılaştırarak duyarlılığını değerlendirmek amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1. Bakteriyel İzolatlar

Çalışmaya 2005-2010 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen 100 adet *Salmonella* suşu rastgele seçilerek dahil edildi. Çalışmaya alınan suşların 69'u dışkı, 22'si kan, 6'sı idrar, 3'ü ise balgam örneğinden izole edilmişti. Çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan 15 Haziran 2010 tarihinde 2010-3/3 karar numarası ile alınan onay doğrultusunda yapıldı.

### 2. Bakteriyolojik çalışma

#### Örneklerden kültür yapılması:

Çalışmaya alınan suşların izole edildiği örnekler laboratuvarında rutin olarak aşağıda tanımlanan işlemler uygulanarak değerlendirildi.

Dışkı örnekleri; %5 Koyun Kanlı Colombia agar (BD, BBL, Almanya), EMB agar (BD, BBL, Almanya), SS agar (BD, BBL, Almanya) ve Selenite-F broth (BD, BBL, İrlanda) besiyerlerine ekildi. Selenit-F besiyerinden 6 saat sonra SS besiyerine pasaj yapıldı. 35°C'de bir gecelik inkübasyon sonucunda oluşan koloniler incelendi. SS besiyerinde oluşan laktoz negatif, H<sub>2</sub>S pozitif koloniler *Salmonella* şüpheli olarak değerlendirildi. Şüpheli kolonilerden Kligler Iron Agar (BD, BBL, İrlanda), Lysine Iron Agar (LIA) (BD, BBL, İrlanda), Simmons Citrate Agar (BD, BBL, İrlanda) ve indol-motilite-üre (IMU) besiyerine pasaj yapıldı. Biyoşimi besiyerleri ile biyokimyasal özellikleri laktoz (-), glikoz (+), H<sub>2</sub>S pozitif, sitrat (+/-), lizin dekarboksilaz (+), üre (-), motilite (+), indol (-) olarak saptanan suşlara serolojik değerlendirme için anti-H Poly a-z antiserumu (Difco™) ile lam aglütinasyon testi uygulandı. Serolojik ve biyokimyasal olarak *Salmonella* ile uyumlu bulunan izolatlar kapsamlı biyokimyasal identifikasyon ve antibiyotik duyarlılıklarının

belirlenmesi için Phoenix otomatize sisteminde (BD, Sparks, MD, ABD) NMIC/ID-70 paneli ile işleme alınarak *Salmonella spp.* olarak tanımlandı.

Kan örnekleri; laboratuvara hasta başında BACTEC PLUS (+) Aerobic/F ve PEDS PLUS<sup>TM</sup>/F (BD, Sparks, MD, ABD) kan kültür şişelerine alınarak gönderildi ve laboratuvarında kabulü yapılan kan kültür şişeleri özellikli durum belirtilmemiş ise 7 gün süreyle BACTEC 9240 (BD, Sparks, MD, ABD) sisteminde inkübe edildi. Üreme saptanan kültür şişelerinden yapılan pasajlarda saptanan Gram negatif basiller, Phoenix sisteminde (BD, Sparks, MD, ABD) BD PHONIX<sup>TM</sup> 25 NMIC/ID-70 paneli ile *Salmonella species* olarak tanımlandı.

İdrar örnekleri; %5 Koyun Kanlı Colombia Agar (BD, BBL, Almanya) ve EMB (BD, BBL, Almanya) agar besiyerine ekilerek, balgam örnekleri ise %5 Koyun Kanlı Colombia Agara (BD, BBL, Almanya) ve Çikolata Agara (BD, BBL, Almanya) ekilerek etken olarak değerlendirilen Gram negatif basiller Phoenix sisteminde (BD, Sparks, MD, ABD) BD PHONIX<sup>TM</sup> 25 NMIC/ID-70 paneli ile *Salmonella spp.* olarak tanımlandı.

Tüm örneklerden izole edilerek, biyokimyasal testler ve otomatize sistem ile *Salmonella spp.* olarak tanımlanan suşlara polivalan *Salmonella* O Antiserum O A-I & Vi, O antiserum grup B (faktör 1,4,5,12), O antiserum grup D1 (faktör 1,9,12), O antiserum grup D2 (faktör 9, 46) (Difco<sup>TM</sup>) ile ayrıca monovalan *Salmonella* antiserum-Vi (Difco<sup>TM</sup>) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda lamda aglütinasyon testi yapıldı.

O Grup antiserumları ile serogrubu belirlenen suşlara bölgemizde sık saptanan serotiplere yönelik olarak laboratuvarımızda bulundurulan monovalan *Salmonella* H antiserum d, H antiserum m, H antiserum i, H antiserum b (Difco<sup>TM</sup>) ile aglütinasyon testi uygulandı.

Mevcut antiserumlarla tiplendirilen veya tiplendirilemeyen suşlar serotiplendirme için, Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA) kapsamında, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı'na gönderildi.

### **Moleküler Çalışma**

Moleküler çalışmaya alınacak izolatların kanlı agarda elde edilen saf kültürlerinden steril eküvyonla bol miktarda alınarak mikrobank (Mast Diagnostics) saklama tüpleri içerisindeki koruyucu sıvıda yoğun süspansiyon haline getirildi. Mikrobank çalkalanmak sureti ile bakteri süspansiyonunun tüp içerisinde yer alan adsorban boncuklarla temas etmesi sağlandı. Daha sonra içerisindeki sıvı steril pastör pipeti ile aspire edildi. Moleküler tiplendirme amacıyla multipleks PCR yapılana kadar mikrobanklar -20 °C'de saklandı.

### **3. DNA Ekstraksiyonu**

1. Mikrobankta saklanan bakterilerin canlandırılması için adere boncuklardan SS agara pasaj yapıldı.

2. SS agardaki kültürden %5 Koyun Kanlı Colombia Agara tek koloni pasajı yapılarak saf kültür elde edildi.

3. Kanlı agar plağında saf olarak elde edilen *Salmonella* kolonileri distile su ile McFarland 5 bulanıklığında süspansiyon edildi.

4. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan 500µl ependorf tüpe alınarak -80°C'de en az 24 saat bekletildi, bu süre sonunda oda sıcaklığında iyice çözülmeye kadar tutuldu.

5. Daha sonra 99°C'de, 15 dakika kuru ısı bloğunda (Wealtec Corp. HB- 1) tutuldu.

6. 11.000xg'de 3 dakika, + 4°C'de santrifüj edildi.

7. 200 µl süpernatant alınarak yeni bir ependorfa aktarıldı. Spektrofotometrede (THERMO NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer) DNA kantitasyonu yapılan örnekler PCR ile amplifikasyon işleminde kalıp olarak kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

#### 4. Primerlerin Seçilmesi

O serogruplarını belirlemek için yapılan multipleks PCR için; primerler A, B, C1, D ve E gruplarına özgül *rfb* gen bölgeleri ve Vi pozitif izolatları tespit etmek için *viaB* geni hedef alınarak seçildi (Tablo-4) (5, 11, 13, 48).

H antijenlerini belirlemek için primerler; faz 1 H antijenleri H:a, -b, -d, -i, -g,m, -r, -z<sub>10</sub> ve faz 2 H antijenleri H:1,2, 1,5, 1,6, 1,7, -e,n,x, e,n,z<sub>15</sub>'i tespit etmek üzere *fliB* ve *fliC* gen bölgelerine yönelik olarak seçildi (Tablo-4) (13, 62).

Yanlış negatif sonuçları önlemek için internal kontrol olarak *oriC* bölgesine yönelik P1-P2 primerleri kullanıldı (Tablo-4).

Serogrup A, D, B, C1, C2-C3 ve E' de bulunan ve çeşitli *fliB*, *fliC* allellerini içeren *Salmonella enterica* serovarlari primerlerin özgüllüğünün değerlendirilmesi için kullanıldı.

Serogrup spesifik primerlerin özgüllüğü serogrubu bilinen *Salmonella* izolatları kullanılarak test edildi. Tüm izolatlarda, serogruba özgül (serogrup A 256 bp, serogrup B 662 bp, serogrup C1 483 bp, serogrup D 256 bp ile 614 bp ve serogrup E 345 bp) PCR ürünleri elde edildi. Serogrup C2-C3'te yer alan *Salmonella* izolatları ile primerlerin özgüllüğü test edildiğinde çapraz reaksiyon görülmedi.

Multipleks PCR yöntemleri ile H antijenlerine yönelik; "a" 423 bp, "b" 551 bp, "d" 763 bp, "g,m" 309 bp, "i" 508 bp, "r" 169 bp, "z<sub>10</sub>" 363 bp, "1,2; 1,5; 1,6; 1,7" 294 bp ve "e,n,x; e,n,z<sub>15</sub>" 152 bp PCR ürünleri elde edildi.

P1-P2 primerleri ile *Salmonella* suşlarında 163 bp'lik özgül PCR ürünleri saptanırken, *Salmonella* dışı bakterilerde özgül bant görülmedi.

**Tablo-4: Multipleks PCR' da Kullanılan Primerler (5,62).**

Hedef	Primer	Sekans (5'->3')	Beklenen size (bp)
B Grup	F-rfbJ	CCAGCACCAGTTCCAACCTTGATAC	662
	R-rfbJ	GGCTTCCGGCTTTAT TGGTAAGCA	
D Grup	F-tyv	GAGGAAGGGAAATGAAGCTTTT	614
	R-tyv	TAGCAAACGTCTCCCACCATAC	
Vi	F-vi	GTTATTTTCAGCATAAGGAG	439
	R-vi	CTTCATACCACTTTCCG	
A&D	F-prt	CTTGCTATGGAAGACATAACGAACC	256
	R-prt	CGTCTCCATCAAAAGCTCCATAGA	
C1 Grup	F-wzxC1	CAGTAGTCCGTAATAACAGGGTGG	483
	R-wzxC1	GGGGCTATAAATACTGTGTTAAATTCC	
E Grup	F-wzx E1	TAAAGTATATGGTGCTGATTTAACC	345
	R-wzx E1	GTTAAATGACAGATTGAGCAGAG	
H1-1 multipleks	H-for	ACTCAGGCTTCCCGTAACGC	423
	H-rev	GAGGCCAGCACCATCAAGTGC	
	Hb-rev	GCTTCATACAGACCATCTTTAGTTG	551
	Hd-rev	GGCTAGTATTGTCCTTATCGG	763 (d), 502 (j)
H1-2 multipleks	fliC(i)	AACGAAATCAACAACAACCTGC TAGCCATCTTTACCAGTTCCC	508
	fliC(g,m)	GCAGCAGCACCGGATAAAG CATTAAACATCCGTCGCGCTAG	309
H1-3 multipleks	fliC(r)	CCTGCTATTACTGGTGATC GTTGAAGGGAAGCCAGCAG	169
	fliC(z <sub>10</sub> )	GCACTGGCGTTACTCAATCTC GCATCAGCAATACCACTCGC	363
H2 multipleks	fliB(l:1,2;1,5;1,6;1,7)	AGAAAGCGTATGATGTGAAA ATTGTGGTTTTAGTTGCGCC	294
	fliB(II:e,n,x;e,n, z <sub>15</sub> )	TAACGGCGATACATTGACTG TAGCACCGAATGATACAGCC	152
oriC	P1	TTATTAGGATCGCGCAGGC	163
	P2	AAAGAATAACCGTTGTTCCAC	

## 5. O Grup Multipleks PCR

DNA amplifikasyonu 25µl PCR karışımında gerçekleştirildi. Her reaksiyon karışımı 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTPs, 0.4 µM F-prt, R-prt, F-rfbJ, R-rfbJ, F-Vi, R-Vi, F-wzxC1, R-wzxC1, F-tyvD, R-tyvD, F-wzxE, R-wzxE primerlerinin her biri, 0.2 µM pozitif kontrol primerleri (P1-P2), 1.75 U Taq DNA polimeraz, 2µl *Salmonella* DNA ekstraktı ve distile su ile 25µl'ye tamamlandı.

Amplifikasyon şartları, Lim ve ark.'nın (5) çalışmasında uygulanan 68°C'de 30 saniye ekstansiyon süresi 1 dakikaya uzatılarak ve siklus sayısı 40'a çıkarılarak laboratuvar koşullarımıza göre optimize edildi. Termal döngü cihazında (ESCO Swift Max Thermal Cycler/ABD) 95°C'de 5 dakika ilk denatürasyon; sonrasında 40 siklus 95°C'de 40 saniye denatürasyon, 50°C'de 30 saniye bağlanma (annealing), 68°C'de 1 dakika uzama (extension) ve son uzama 72°C'de 7 dakika olarak gerçekleştirildi.

## 6. H Antijenlerine Yönelik Multipleks PCR

Birinci faz H antijenlerine yönelik üç farklı multipleks PCR yöntemi ve 2. faz antijenlerine yönelik multipleks PCR yöntemi ardışık olarak uygulandı.

### H1-1 Multipleks PCR

Her reaksiyon karışımı, 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTPs, H-for, H-rev, Hb-rev, Hd-rev primerlerinin her birinden 0.4 µM, 1.75 U Taq DNA polimeraz ve 2µl *Salmonella* DNA ekstraktı içerecek şekilde hazırlanarak distile su ile toplam 25µl' ye tamamlandı.

DNA amplifikasyon döngüsü, 95°C'de 2 dakika ilk denatürasyon; sonrasında 35 siklus 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 59°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 30 saniye uzama ve son uzama 72°C'de 5 dakika olarak gerçekleştirildi.

Lim ve ark.'nın (5) çalışmasında uygulanan 55°C'de 30 saniye bağlanma, 59°C'de 1 dakika olarak laboratuvar koşullarımıza göre optimize edildi.



### **H1-2 Multipleks PCR**

Her reaksiyon karışımı, 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTPs, fliC(i), fli(g,m) primerlerinin her birinden 0.4 µM, 1.75 U Taq DNA polimeraz ve 2µl *Salmonella* DNA ekstraktı içerecek şekilde hazırlandı ve distile su ile toplam volüm 25 µl'ye tamamlandı.

### **H1-3 Multipleks PCR**

Her reaksiyon karışımı, 1x PCR buffer, 3.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTPs, fliC(r), fli(z<sub>10</sub>) primerlerinin her birinden 0.8 µM, 1.75 U Taq DNA polimeraz ve 2µl *Salmonella* DNA ekstraktı içerecek şekilde hazırlandı ve distile su ile toplam volüm 25 µl olacak şekilde tamamlandı.

### **H2 Multipleks PCR**

25 µl'lik PCR reaksiyon volümü, 1x PCR buffer, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTPs, fliB(I:1,2, 1,5, 1,6, 1,7), fliB(II:e,n,x, e,n,z<sub>15</sub>) primerleri her biri 0.4 µM, 1.75 U Taq DNA polimeraz ve 2µl *Salmonella* DNA ekstraktı içerecek şekilde hazırlandı ve distile su ile volüm tamamlandı.

H1-2, H1-3 ve H2 multipleks PCR için DNA amplifikasyon döngüsü: 94°C'de 1 dakika ilk denatürasyon, sonrasında 25 siklus 94°C'de 5 saniye denatürasyon, 55°C'de 5 saniye bağlanma, 72°C'de 10 saniye uzama ve son uzama 72°C'de 4 dakika olarak gerçekleştirildi.

## **7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezisi İle Tespiti**

Amplifikasyon işlemi sonrasında oluşan farklı büyüklükteki fragmentlerin varlığını gösterebilmek amacı ile ampliconlar agaroz jel içerisinde elektrik akımında yürütüldü.

1. Elektrofrez matrisi olarak kullanılmak üzere %2'lik agaroz jel, 0.5xTris-Borik asit-EDTA (TBE) solüsyonu ile hazırlandı.

a. Tartılarak bir balon içerisine konulan 0.6 gr agaroz (Agarose low EEO, AppliChem, Germany) üzerine 40 ml 0.5xTBE ilave edildi.

b. Karışım homojenizasyon sağlanana kadar mikrodalga fırında eritildi.

c. Oda ısısında 60°C'nin altına düşmeyecek şekilde bekletilerek soğutuldu.

d. Eriyik haldeki agaroz içerisine 10 mg/ml'lik etidyum bromid stok solüsyonundan 5 µl eklendi.

e. Hazırlanan agaroz jel, önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş jel kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü.

f. Oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletilerek jel kalıbının katılaşması sağlandı.

g. Jel kalıbı elektroforez tankına (BioRad MINI-SUB<sup>R</sup> Cell GT, USA) yerleştirilerek taraklar yavaşça çıkarıldı.

2. Örneklerden 10'ar µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl yükleme tamponuna (BioRad Basic inc. Loading buffer) karıştırıldı. Son kuyuya DNA markerı (BIB Basic inc. DNA 100bp Marker) ve diğer kuyulara her birine bir örnek olacak şekilde bu karışımdan 10 µl yüklendi.

3. Tankın güç kaynağı (BioRad Power PAC 300,USA) çalıştırılarak 100 V akımda, 50 dakika elektroforez uygulandı.

## **8. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi**

Elektroforezden sonra DNA bantları BioDocAnalyse (Biometra, Transilluminator, Almanya) cihazında UV ışığı altında görüntülenerek, dijital olarak fotoğraflandı ve TIFF formatında kayıt edildi.

## BULGULAR

Klinik örneklerden izole edilerek rastgele seçilen 100 *Salmonella* spp. izolatu, serotiplendirme sonucu bilinmeden, ardışık beş farklı multipleks PCR ile değerlendirildi.

Serogrup A, B, C1, D ve E' ye özgül primerler kullanılarak yapılan multipleks PCR ile 100 *Salmonella* suşunun 14 tanesinde serogrup B'ye özgül 662 bp, 17'sinde serogrup C1'e özgül 483 bp, 65'inde serogrup D'ye özgül 256 bp ve 614 bp bantlar görüldü. Kullanılan primerler ile 7 izolatta serogrup spesifik bant elde edilemedi (Şekil-6 ve Şekil-7). Konvansiyonel serotiplendirme sonuçları ile karşılaştırdığımızda O grup Multipleks PCR'in serogrup B, C1 ve D grubundaki izolatları saptamadaki duyarlılığı %100 olarak bulundu. *Salmonella* serogruplarının belirlenmesinde multipleks PCR'in özgüllüğü %100 olarak değerlendirildi.

O grup multipleks PCR ile serogrup D'de yer aldığı saptanan iki izolatta Vi antijenine özgül 439 bp PCR ürünü elde edildi. Konvansiyonel serotiplendirme sonuçları bu iki izolatın Vi antijeni taşıyan *S. Typhi* olduğunu doğruladı. Multipleks PCR'in Vi pozitif suşları saptamadaki duyarlılığı %100 olarak bulundu.

P1-P2 primerleri kullanılarak elde edilen 163 bp'lik PCR ürünleri, test edilen tüm *Salmonella* suşlarında saptandı.

H1 antijenleri "a", "b" ve "d"yi hedef alan H1-1 multipleks PCR ile iki izolatta "d" antijenine özgül 763 bp, iki izolatta da "b" antijenine özgül 551 bp bantlar elde edildi (Tablo-4) (Şekil-8 ve Şekil-9). Serolojik tiplendirme sonuçları "d" antijeni pozitif olarak bulunan iki izolatın bu antijeni taşıyan *S. Typhi* "b" antijeni taşıyan iki izolatın ise bu antijeni taşıyan *S. Paratyphi B* olduğunu gösterdi.

H1-2 multipleks PCR ile fliC(i), fliC(g,m) primerleri kullanılarak 69 izolatta "g,m" antijenlerine spesifik 309 bp, 11 izolatta ise "i" antijenine özgül 508 bp bantlar elde edildi (Şekil-10 ve Şekil-11). Moleküler yöntem ile "g,m" antijenine yönelik PCR ürünleri elde edilen 69 izolatın konvansiyonel

yöntemle “g,m” antijeni taşıyan *S. Enteritidis* (63), *S. Montevideo* (2), *S. Othmarchen* (1), *S. Agona* (3) yine moleküler yöntemle “i” antijenine özgül PCR ürünleri elde edilen suşların ise “i” antijeni taşıyan *S. Typhimurium* (9) ve *S. Kentucky* (2) olarak serotiplendirildiği görüldü (Tablo-5).

fliC(r) ve fliC(z<sub>10</sub>) primerleri kullanılarak H1-3 multipleks PCR ile 10 izolatta “r” antijenine özgül 169 bp bant ve 1 suшта “z<sub>10</sub>” antijenine özgül 363 bp PCR ürünü elde edildi (Şekil-12 ve Şekil-13). Referans laboratuvarından gelen konvansiyonel serotiplendirme sonuçlarına göre “r” antijenine özgül bant saptanan 10 suştan 8 tanesi bu antijeni taşıyan *S. Infantis*, 2 si *S. Virchow* olarak, “z<sub>10</sub>” antijenine özgül PCR ürünü elde edilen izolat ise bu antijene sahip *S. Mbandaka* olarak saptandı (Tablo-4).

H2 multipleks PCR’da fliB(I:1,2, 1,5, 1,6, 1,7) ve fliB(II:e,n,x, e,n,z<sub>15</sub>) primerleri ile 22 suшта “1,2, 1,5, 1,6, 1,7” antijenlerine özgül 294 bp, 1 suшта da “e,n,x, e,n,z<sub>15</sub>” antijenlerine özgül 152 bp bantlar elde edildi (Şekil-14 ve Şekil-15). Moleküler yöntemle “1,2, 1,5, 1,6, 1,7” antijenlerine özgül bant elde edilen 22 suşun konvansiyonel yöntem ile 9’u *S. Typhimurium*, 8’i *S. Infantis*, 2’si *S. Virchow*, 2’si *S. Paratyphi B*, 1’i *S. Blockley* olarak, “e,n,x, e,n,z<sub>15</sub>” kompleksine özgül bant saptanan suş ise *S. Mbandaka* olarak serotiplendirilmişti (Tablo-4).

H grup antijenleri ile yapılan ardışık 4 multipleks PCR ile hedeflenen antijenlere yönelik gen bölgesi içermeyen suşlarla çapraz reaksiyon görülmedi.

Çalışmamızda serotiplendirme sonucu bilinmeden rastgele seçilen 100 *Salmonella* suşunun multipleks PCR yöntemi ile 93’ünün (%93) tüm antijenik yapıları belirlenirken, 7 (%7) izolatta var olan tüm antijenik yapılar, bu bölgeleri hedefleyen özgül primerler çalışmada bulunmadığından saptanamadı.

Ardışık beş multipleks PCR ile antijenik formülleri belirlenen suşların Kauffmann-White şemasına göre serotipi belirlenmeye çalışıldı. Moleküler tiplendirme sonucu elde edilen antijenik formüle göre, kesin olarak bir suşu işaret eden izolatlar kesin sonuç, birden fazla serotipi işaret edenler

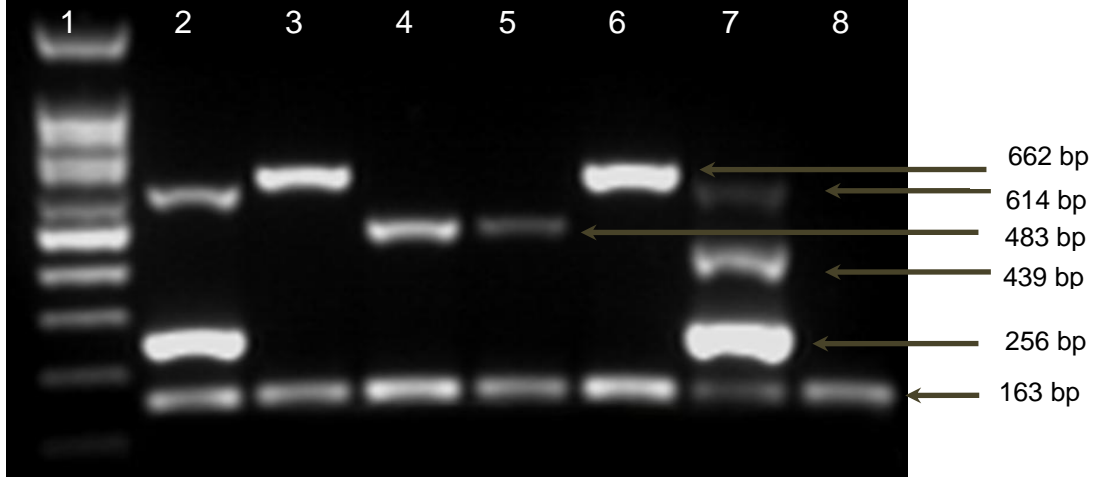
muhtemel sonuç, antijenik formülü tam olarak belirlenemeyen suşlar ise tamamlanamayan formül olarak tablo 6'da sunulduğu gibi değerlendirildi.

Buna göre 2 izolat (%2) kesin sonuç, 91 izolat (%91) muhtemel sonuç, 7 izolat ise (%7) tamamlanamayan formül olarak değerlendirildi.

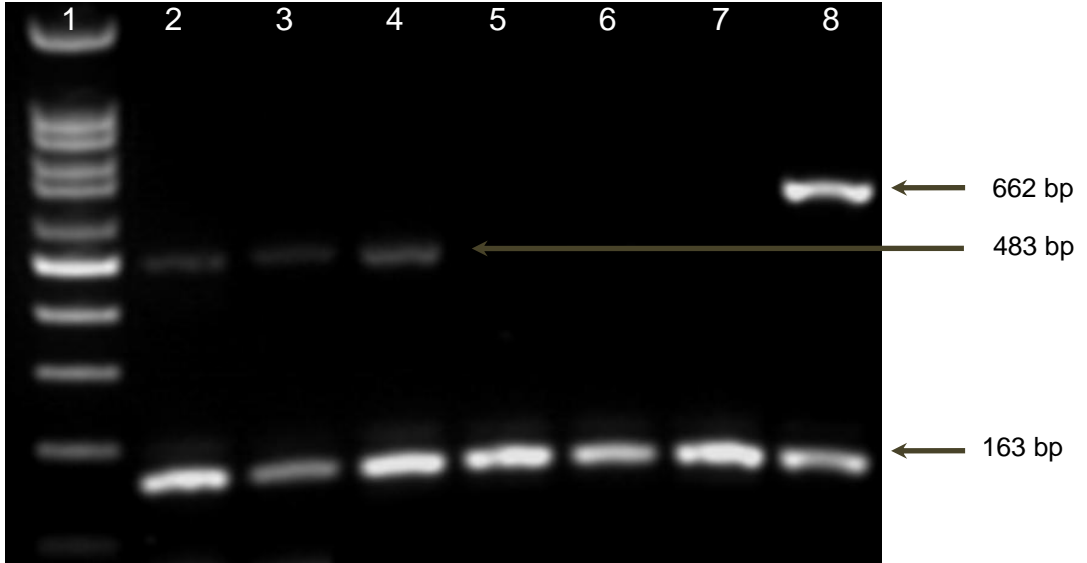
Kesin sonuç elde edilen iki suşta O gruplarına yönelik mutipleks PCR ile serogrup D ve Vi antijenine özgül bantlar, H1-1 mutipleks PCR ile de "d" antijenine özgül bant elde edildi. Bu bulgular bir araya getirildiğinde ortaya çıkan antijenik formülün yalnızca S. Typhi serotipi ile uyumlu olduğu saptandı (Tablo-6). Konvansiyonel yöntemle yapılan serotiplendirme sonucu ile izolatların S. Typhi olduğu doğrulandı. Mutipleks PCR yönteminin S. Typhi'yi saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak değerlendirildi.

Antijenik formülü ile birden fazla serotipe uyum gösteren ve muhtemel sonuç olarak değerlendirilen suşlar ile uyumlu bulunan serotipler tablo 6'da sunuldu. Muhtemel sonuç olabilecek serotiplerin ülkemizde ve laboratuvarımızda görülme sıklığı dikkate alındığında, serogrup D'de olduğu saptanan ve "g,m" antijenlerine özgül PCR ürünleri saptanan 63 suş S. Enteritidis, serogrup B'de olduğu saptanan ve H1 mutipleks PCR ile "i", H2 mutipleks PCR ile "1,2, 1,5, 1,6, 1,7" antijenlerine özgül PCR ürünleri saptanan 9 izolat S. Typhimurium, yine serogrup B'de olduğu saptanan ve H1 mutipleks PCR ile "b", H2 mutipleks PCR ile "1,2, 1,5, 1,6, 1,7" antijenlerine özgül PCR ürünleri saptanan 2 izolat ise S. Paratyphi B olarak yorumlandı. Konvansiyonel serotiplendirme sonuçlarının da bununla uyumlu olduğu görüldü.

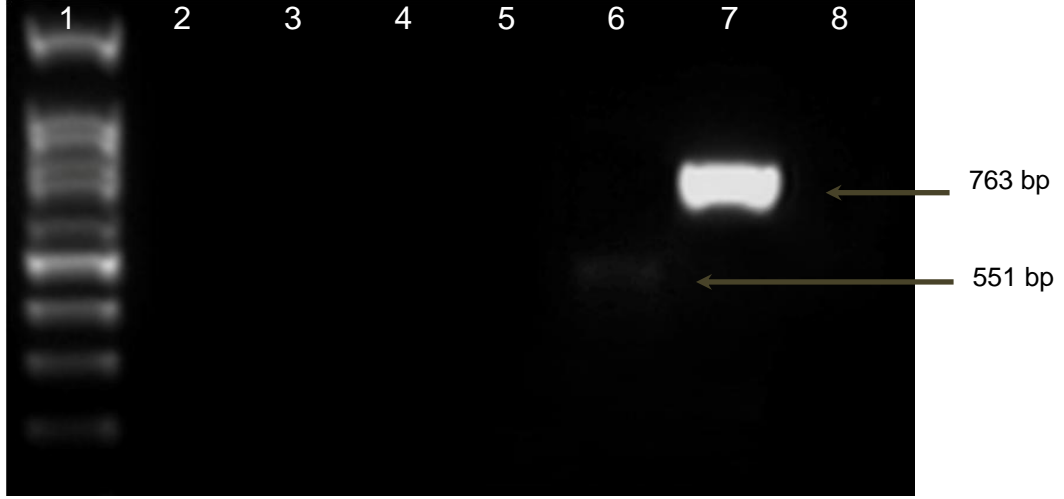
Ülkemizde *Salmonella* serotiplendirmesi için referans laboratuvarı olarak hizmet veren Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi'nde *Salmonella* serotiplendirme sonuçları 10-12 günde raporlanmakta ve 2010 Mali Yılı Bütçe Uygulama Talimatı'na göre 61 TL olarak ücretlendirilmektedir. Çalışmamızda bakteriyolojik identifikasyon yapılarak saklanmış olan suşların canlandırılması, DNA ekstraksiyonu ve mutipleks PCR işlemlerinin gerçekleştirilmesi ile 48 saat gibi kısa bir sürede serotiplerin tanımlanabildiği ve yüz suşun serotiplendirilmesi için gerekli maliyetin 550 TL olduğu belirlenmiştir.



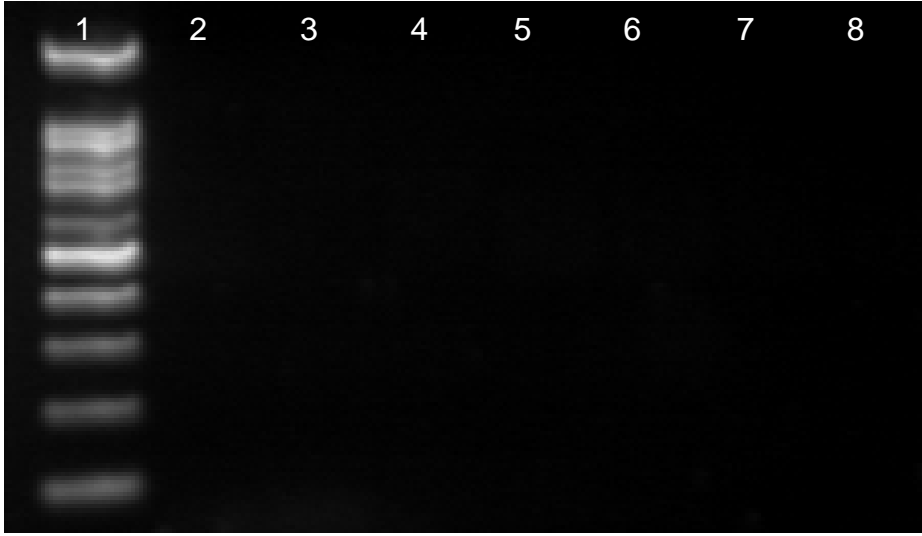
**Şekil-6:** Serogrup spesifik *Salmonella* O antijen gen bölgelerine yönelik multipleks PCR. *Salmonella* spesifik bant 163 bp, serogrup spesifik bantlar: yaklaşık 256 bp (serogrup A&D), yaklaşık 662 bp (serogrup B), yaklaşık 483 bp (serogrup C1), yaklaşık 614 bp (serogrup D ve S Typhi Vi bandı 439bp). Lane1, 100bp ladder, lane 2, *S. Enteritidis*; lane 3, *S. Typhimurium*; lane 4, *S. Infantis*; lane 5, *S. Virchow*; lane 6, *S. Paratyphi B*; lane 7. *S. Typhi*; lane 8, *S. Corvallis*.



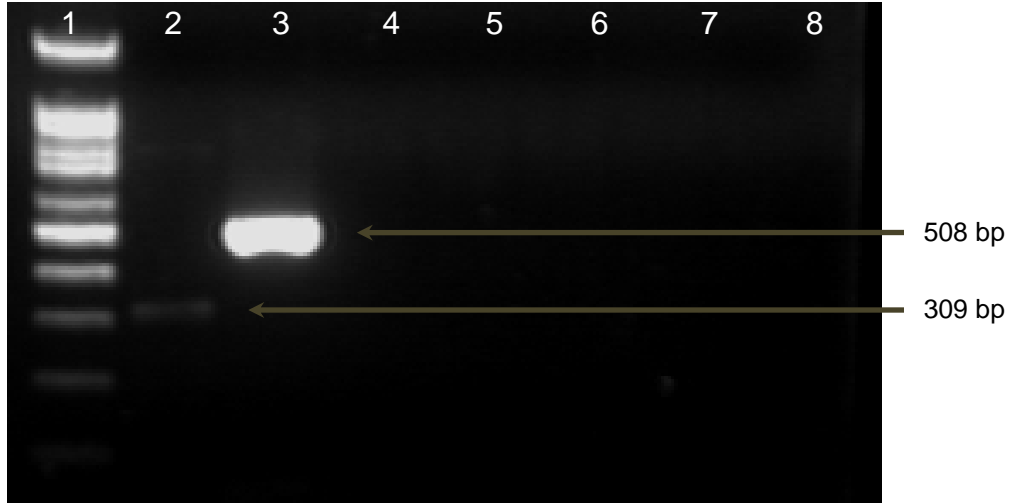
**Şekil-7:** Serogrup spesifik *Salmonella* O antijen gen bölgelerine yönelik multipleks PCR. *Salmonella* spesifik bant 163 bp, serogrup spesifik bantlar: yaklaşık 256 bp (serogrup A&D), yaklaşık 662 bp (serogrup B), yaklaşık 483 bp (serogrup C1), yaklaşık 614 bp (serogrup D ve S Typhi Vi bandı 439bp). Lane1, 100bp ladder, lane 2, *S. Othmarschen*; lane 3, *S. Montevideo*; lane 4, *S. Mbandaka*; lane 5, *S. Kentucky*; lane 6, *S. Blockley*; lane 7, *S. Albany*; lane 8, *S. Agona*.



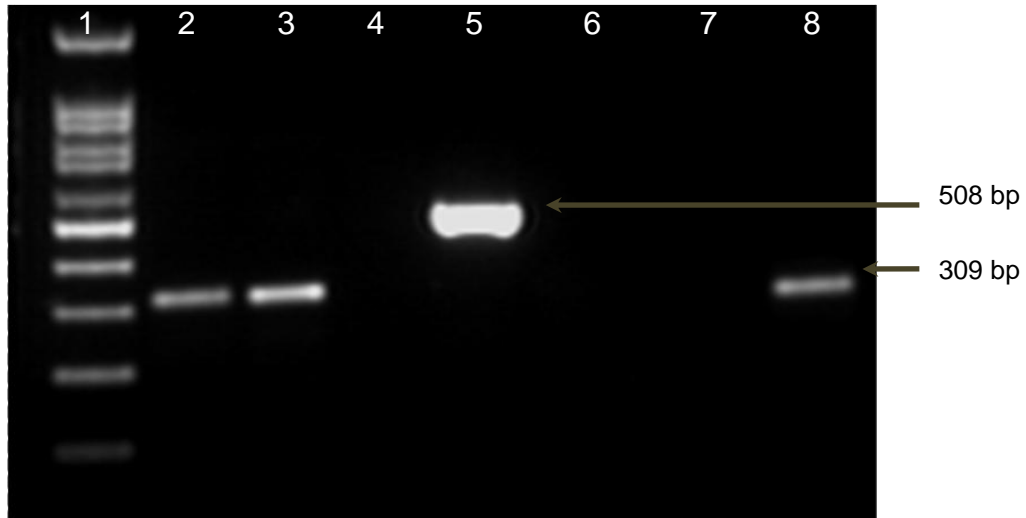
**Şekil-8:** *Salmonella* H1 antijen (a,b,d) gen bölgelerine yönelik H1-1 Multipleks PCR. *Salmonella* (a) antijen spesifik bantlar yaklaşık 423 bp, (b) antijen spesifik bantlar yaklaşık 551 bp, (d) antijen spesifik bantlar yaklaşık 763 bp. Lane1, 100bp ladder, lane 2, *S. Enteritidis*; lane 3, *S. Typhimurium*; lane 4, *S. Infantis*; lane 5, *S. Virchow*; lane 6, *S. Paratyphi B*; lane 7, *S. Typhi*; lane 8, *S. Corvallis*.



**Şekil-9:** *Salmonella* H1 antijen (a,b,d) gen bölgelerine yönelik H1-1 Multipleks PCR. *Salmonella* (a) antijen spesifik bantlar yaklaşık 423 bp, (b) antijen spesifik bantlar yaklaşık 551 bp, (d) antijen spesifik bantlar yaklaşık 763 bp. Lane1, 100bp ladder, lane 2, *S. Othmarschen*; lane 3, *S. Montevideo*; lane 4, *S. Mbandaka*; lane 5, *S. Kentucky*; lane 6, *S. Blockley*; lane 7, *S. Albany*; lane 8, *S. Agona*.

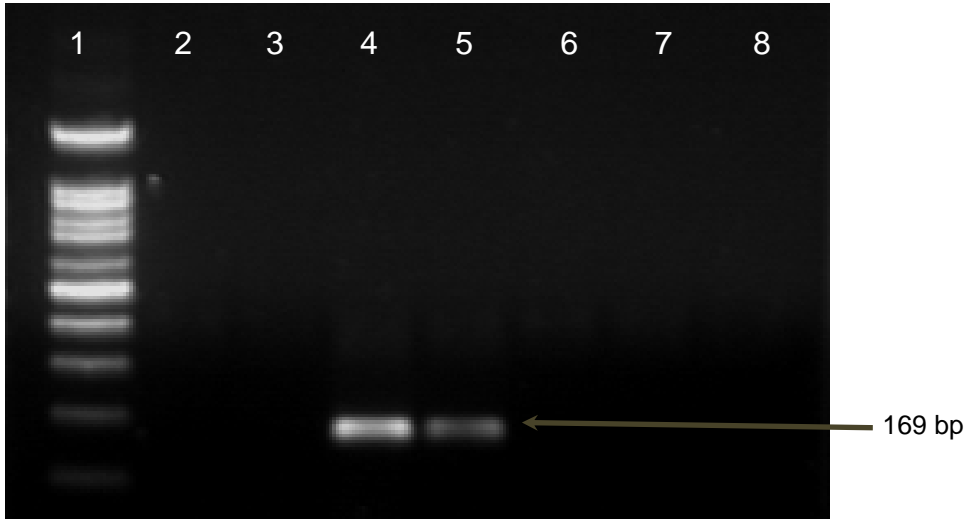


**Şekil-10:** *Salmonella* H1 antijen (g, m, i) gen bölgelerine yönelik H1-2 Multipleks PCR. *Salmonella* (g,m) antijen spesifik bantlar yaklaşık 309 bp, (i) antijen spesifik bantlar yaklaşık 508 bp.  
Lane1, 100bp ladder, lane 2, *S. Enteritidis*; lane 3, *S. Typhimurium*; lane 4, *S. İnfantis*; lane 5, *S. Virchow*; lane 6, *S. Paratyphi B*; lane 7, *S. Typhi*; lane 8, *S. Corvallis*.

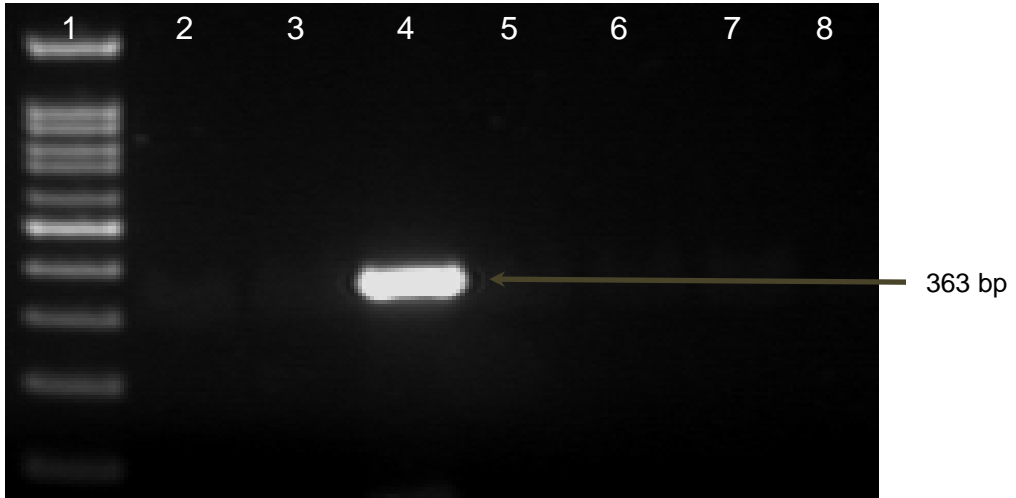


**Şekil-11:** *Salmonella* H1 antijen (g, m, i) gen bölgelerine yönelik H1-2 Multipleks PCR. *Salmonella* (g,m) antijen spesifik bantlar yaklaşık 309 bp, (i) antijen spesifik bantlar yaklaşık 508 bp.  
Lane1, 100bp ladder, lane 2, *S. Othmarschen*; lane 3, *S. Montevideo*; lane 4, *S. Mbandaka*; lane 5, *S. Kentucky*; lane 6, *S. Blockley*; lane 7 *S. Albany*; lane 8, *S. Agona*.

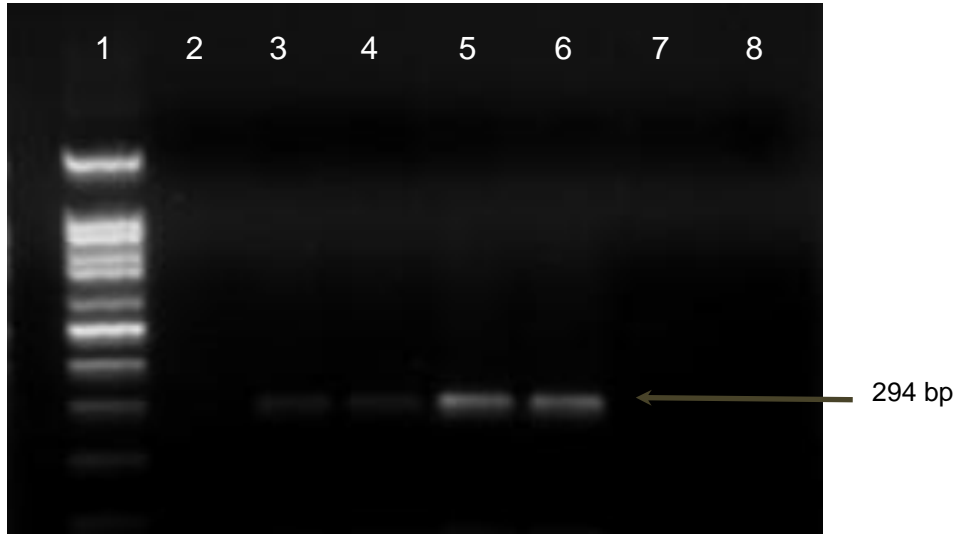




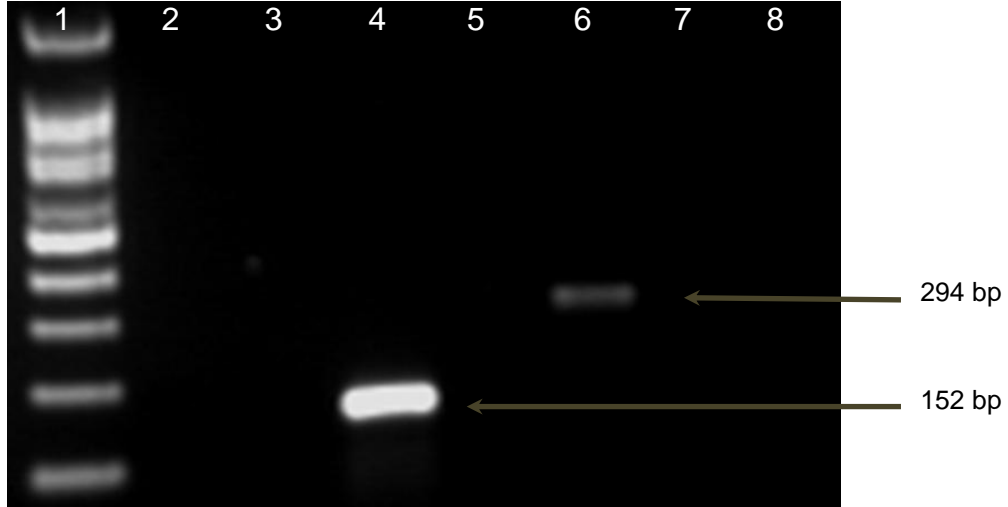
**Şekil-12:** *Salmonella* H1 antijen (r, z<sub>10</sub>) gen bölgelerine yönelik H1-3 Multipleks PCR. *Salmonella* (r) antijen spesifik bantlar yaklaşık 169 bp, (z<sub>10</sub>) antijen spesifik bantlar yaklaşık 363 bp.  
Lane1, 100bp ladder, lane 2, *S. Enteritidis*; lane 3, *S. Typhimurium*; lane 4, *S. İnfantis*; lane 5, *S. Virchow*; lane 6, *S. Paratyphi B*; lane 7, *S. Typhi*; lane 8, *S. Corvallis*.



**Şekil-13:** *Salmonella* H1 antijen (r, z<sub>10</sub>) gen bölgelerine yönelik H1-3 Multipleks PCR. *Salmonella* (r) antijen spesifik bantlar yaklaşık 169 bp, (z<sub>10</sub>) antijen spesifik bantlar yaklaşık 363 bp.  
Lane1, 100bp ladder, lane 2, *S. Othmarschen*; lane 3, *S. Montevideo*; lane 4, *S. Mbandaka*; lane 5, *S. Kentucky*; lane 6, *S. Blockley*; lane 7, *S. Albany*; lane 8, *S. Agona*.



**Şekil-14:** *Salmonella* H2 antijen kompleks (I: 1,2; 1,5; 1,6; 1,7 ve II: e,n,x; e,n,z<sub>15</sub>) gen bölgelerine yönelik Multipleks PCR. *Salmonella* H2 antijen kompleks (I: 1,2; 1,5; 1,6; 1,7 ) spesifik bantlar yaklaşık 294 bp, *Salmonella* H2 antijen kompleks (II: e,n,x; e,n,z<sub>15</sub>) spesifik bantlar yaklaşık 152 bp. Lane1, 100bp ladder, lane 2, *S. Enteritidis*; lane 3, *S. Typhimurium*; lane 4, *S. Infantis*; lane 5, *S. Virchow*; lane 6, *S. Paratyphi B*; lane 7, *S. Typhi*; lane 8, *S. Corvallis*.



**Şekil-15:** *Salmonella* H2 antijen kompleks (I: 1,2; 1,5; 1,6; 1,7 ve II: e,n,x; e,n,z<sub>15</sub>) gen bölgelerine yönelik Multipleks PCR. *Salmonella* H2 antijen kompleks (I: 1,2; 1,5; 1,6; 1,7 ) spesifik bantlar yaklaşık 294 bp, *Salmonella* H2 antijen kompleks (II: e,n,x; e,n,z<sub>15</sub>) spesifik bantlar yaklaşık 152 bp. Lane1, 100bp ladder, lane 2, *S. Othmarschen*; lane 3, *S. Montevideo*; lane 4, *S. Mbandaka*; lane 5, *S. Kentucky*; lane 6, *S. Blockley*; lane 7, *S. Albany*; lane 8, *S. Agona*.

**Tablo-5:** Multipleks PCR ile saptanan antijen bölgelerinin dağılımı.

Serotip	O Grup	H1 Antijen	H2 Antijen	Suş Sayısı	Pozitif Saptanan Suş Sayısı															
					Prt	rfbj	wzx1	tyv	Vi	wzxE	Ha	Hb	Hd	fliC (g,m)	fliC (i)	fliC (r)	fliC (z <sub>10</sub> )	fliB (I:1,2;1,5;1,6;1,7)	fliB (II:e,n,x;e,n, z <sub>15</sub> )	P1-P2
S. Enteritidis	D	g,m		63	63			63						63						63
S. Typhimurium	B	i	1,2	9		9								9				9		9
S. Infantis	C1	r	1,5	8			8								8			8		8
S. Virchow	C1	r	1,2	2			2								2			2		2
S. Paratyphi B	B	b	1,2	2		2					2							2		2
S. Typhi	D+Vi	d		2	2			2	2				2							2
S. Corvallis	C2-C3	z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub>		3																3
S. Agona	B	f,g,s		3		3							3							3
S. Albany	C2-C3	z <sub>4</sub>		1																1
S. Blockley	C2-C3	k	1,5	1														1		1
S. Kentucky	C2-C3	i	z <sub>6</sub>	2										2						2
S. Mbandaka	C1	z <sub>10</sub>	e,n,z <sub>15</sub>	1			1									1			1	1
S. Montevideo	C1	g,m,s		2			2						2							2
S. Othmarchen	C1	g,m		1			1						1							1
<b>TOPLAM</b>				<b>100</b>	<b>65</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>65</b>	<b>2</b>			<b>2</b>	<b>2</b>	<b>69</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>22</b>	<b>1</b>	<b>100</b>

**Tablo-6:** Konvansiyonel ve moleküler tiplendirme sonuçlarının karşılaştırmalı değerlendirmesi.

Suş Sayısı	Konvansiyonel Serotiplendirme Sonucu	Moleküler Serotiplendirme Sonucu			Moleküler Tiplendirme Sonucu	Sonuç
		Grup	H1	H2		
63	S. Enteritidis (9,12: g,m: -)	D	g,m		S. Enteritidis (9,12: g,m; -) S. Blegdam (9,12: g,m,q: -) S. Naestved (1,9,12: g,p,s: -) S. Rostock (1,9,12: g,p,u: -) S. Moscow (1,9,12: g,q: -) S. Antartica (9,12: g,z <sub>63</sub> : -) S. Rosenberg (9,12: g,z <sub>85</sub> : -)	MS
9	S. Typhimurium (1,4,5,12: i: 1,2)	B	İ	1,2;1,5;1,6;1,7	S. Typhimurium (1,4,5,12: i: 1,2) S. Lagos (1,4,5,12: i: 1,5)	MS
8	S. İnfantis (6,7: r: 1,5)	C1	r	1,2;1,5;1,6;1,7	S. İnfantis (6,7: r: 1,5) S. Virchow (6,7: r: 1,2) S. Nigeria (6,7: r: 1,6) S. Colindale (6,7: r: 1,7)	MS
2	S. Virchow (6,7: r: 1,2)	C1	r	1,2;1,5;1,6;1,7	S. Virchow (6,7: r: 1,2) S. İnfantis (6,7: r: 1,5) S. Nigeria (6,7: r: 1,6) S. Colindale (6,7: r: 1,7)	MS
2	S. Paratyphi B (4,5,12: b: 1,2)	B	b	1,2;1,5;1,6;1,7	S. Paratyphi B (1,4,[5],12: b: 1,2) S. Limete (1,4,12, [27]: b: 1,5) S. Canada (4,12, [27]: b: 1,6) S. Uppsala (1,4,12, 27: b: 1,7)	MS
2	S. Typhi VI+ (9,12: d: -)	D+ Vi	d		S. Typhi VI+ (9,12: d: -)	KS
1	S. Mbandaka (6,7: z <sub>10</sub> : e,n,z <sub>15</sub> )	C1	z <sub>10</sub>	e,n,x; e,n, z <sub>15</sub>	S. Mbandaka (6,7: z <sub>10</sub> : e,n,z <sub>15</sub> ) S. Djugu (6,7: z <sub>10</sub> : e,n,x)	MS

MS: Muhtemel sonuç , KS: Kesin sonuç,TF: Tamamlanmamış formül

**Tablo-6 (devamı):** Konvansiyonel ve moleküler tiplendirme sonuçlarının karşılaştırmalı değerlendirilmesi.

Suş Sayısı	Konvansiyonel Serotiplendirme Sonucu	Moleküler Serotiplendirme Sonucu		Moleküler Tiplendirme Sonucu	Sonuç
		Grup	H1 H2		
2	S. Montevideo (6,7: g,m,s: -)	C1	g,m	S. Montevideo (6,7: g,m,s: -) S. Othmarschen (6,7: g,m,t: -) S. Plumaugat (6,7: g,s,q: -) S. Riggil ( 6,7: g,t: -) S. Larose (6,7: g,z <sub>51</sub> : -) S. Haelsingborg (6,7: m,p,t,u: -) S. Oakey (6,7: m,t: -) S. Oranienburg (6,7,14: m,t: [z <sub>57</sub> ])	MS
1	S. Othmarschen (6,7: g,m,t: -)	C1	g,m	S. Othmarschen (6,7: g,m,t: -) S. Montevideo (6,7: g,m,s: [1,2,7]) S. Plumaugat (6,7: g,s,q: -) S. Riggil ( 6,7: g,t: -) S. Larose (6,7: g,z <sub>51</sub> : -) S. Haelsingborg (6,7: m,p,t,u: -) S. Oakey (6,7: m,t: -) S. Oranienburg (6,7,14: m,t: [z <sub>57</sub> ])	MS
3	S. Agona (4,12: f,g,s: -)	B	g,m	S. Agona (4,12: f,g,s: -) S. Derby (1,4,[5],12: f,g: [1,2]) S. Essen (4,12: g,m: -) S. Hato (1,4,[5],12: g,m,s: [1,2]) S. Kingston (1,4,[5],12,[27]: g,s,t:[1,2]) S. Budapest (1,4,12,[27]: g,t: -) S. Banana (1,4,[5],12: m,t: [1,5])	MS
3	S. Corvallis (8,20: z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> : -)				TF
1	S. Albany (8,20: z <sub>4</sub> ,z <sub>24</sub> : -)				TF
1	S. Blockley (6,8: k: 1,5)			1,2;1,5;1,6;1,7	TF
2	S. Kentucky (8,20: i: z <sub>6</sub> )				TF

MS: Muhtemel sonuç , KS: Kesin sonuç,TF: Tamamlanmamış formül

## TARTIŞMA VE SONUÇ

*Salmonella* enfeksiyonlarının tanısı ve sürveyans için izole edilen suşların ayrıntılı biçimde tanımlanması gerekir. Bu amaçla suşların fenotipik ve genotipik özellikleri incelenmelidir (63).

*Salmonella*'ların tiplendirilmesi ve çeşitli özelliklerinin araştırılması; bir olgu ile diğer olguların ilişkilerini, bir olgunun yiyecekler ve diğer bulaşma yolları, hayvanlar, coğrafi bölge, mevsim-ay-gün gibi süreçler ile ilişkilerini ortaya çıkarabilir (63).

*Salmonella*'larda serotiplendirme, daha ileri ayrımlar olmaksızın bazı serotiplerin prevalansında total değişikliklerin gözlenmesini sağlar. 1986'dan sonra Avrupa ülkelerinde *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ile yer değiştirerek insanlarda besin zehirlenmesine yol açan en yaygın serotip olmuştur (63). Aynı şekilde Türkiye'de 1998'den itibaren *S. Typhimurium* sıklığı azalırken, *S. Enteritidis* sıklığının arttığı belirlenmiştir (64).

Serotiplendirme nadir görülen serotiplerin neden olduğu salgınlarda tek başına yeterli olabilir. İngiltere'de bebeklerde birbiriyle ilişkisiz *S. Ealing* olgularının belirlenmesi süt tozu tüketimine bağlanmış, kontamine ürünlerin imhasına ve fabrikaların kapatılmasına neden olmuştur (65). Ankara'da 1987'de görülen *S. Haifa* salgınında ve 1994'te İzmir'de *S. Corvallis* izolasyonlarında olguların sorgulaması yapılamamış ve salgın kaynağı araştırılamamıştır. Bununla beraber Türkiye'de ilk defa izole edilen serotipler olmaları ve çok nadir görülmeleri nedeniyle yalnızca serotiplendirme bu muhtemel salgınlar hakkında ipucu vermiştir (66, 67).

Kauffmann-White şeması uzun yıllardan beri *Salmonella* türlerinin serotiplendirmesinin temelini oluşturmuş, aynı zamanda mikrobiyoloji ve halk sağlığı uzmanları arasında uluslar arası bir dil oluşmasını sağlamıştır (5).

*Salmonella* türlerinin serolojik tiplendirmesi zaman alıcı, zahmetli ve pahalı bir yöntemdir (5). Bir suşun antijen formülünün tam olarak belirlenmesi 3-5 gün sürebilir (47). Serotiplerin belirlenmesi için gerekli çok sayıda antiserumun imkanları kısıtlı olan laboratuvarlarda temin edilmesi mümkün

olmadığından, klinik laboratuvarlarda *Salmonella* türleri polivalan antiserumlarla tiplendirilmeye çalışılmakta en azından serogrubu belirlenmekte ve tam serotip tayini için referans laboratuvarlara gönderilmektedir (60).

Ancak özellikle salgın durumlarında suşların serotiplerinin hızlı bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle son yıllarda *Salmonella* serotiplerinin belirlenmesinde moleküler yöntemlerin kullanılması ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar multipleks PCR'ın *Salmonella* serotiplerinin belirlenmesinde duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, aynı zamanda serolojik tiplendirmeye göre oldukça ucuz ve hızlı bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur (8, 13).

*Salmonella* serotiplerinin belirlenmesi için kullanılan konvansiyonel serolojik testlerde görülebilen çapraz reaksiyonlardan doğabilecek olumsuzluklar da antijen-antikor ilişkisi olmayan PCR gibi DNA bazlı metotların kullanılması ile engellenebilir.

Moleküler serotiplendirme Kauffmann-White şeması temel alınarak yapılmaktadır. Böylelikle sürveyans için veri analizi yapılabilen, dekatlar boyunca toplanmış olan bilgilere yenileri eklenerek değerlendirilebilmekte ve veriler biriktirilmektedir (68).

*Salmonella enterica* içinde yer alan serotipleri tanımlamak için değişik primer kombinasyonları kullanılarak uygulanan çeşitli PCR yöntemleri geliştirilmiştir (9-13).

Çalışmamızda ülkemizde ve laboratuvarımızda en sık izole edilen *Salmonella* serotipleri göz önüne alınarak; A, B, C1, D, E grupları ve Vi antijenine özgül primerler, faz 1 H antijenleri H:a, -b, -d, -i, -g,m, -r, -z<sub>10</sub> ve faz 2 H antijenleri H:1,2; 1,5; 1,6; 1,7 , -e,n,x; e,n,z<sub>15</sub>'e yönelik primerler ile kombine edilerek moleküler çalışma yapılmıştır.

Bu güne kadar serogrup A, B, C1, C2, D ve H'yi saptamaya yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Luk ve ark. (27) 1993'te *Salmonella*'ları serogruba ayırmak için *rfb* gen bölgesine yönelik bir multipleks PCR yöntemini denemişler ve 55 *Salmonella* suşundan 40 tanesini serogrup A, B, C2 ve D olarak doğru tanımlayabilmişlerdir. Herrera-Leon ve ark. (11)

2007'de serogrup B, C1, C2, D ve E'yi tanımlayan bir multipleks PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Levy ve ark. (13) 2008'de O gruplarını ayıran multipleks PCR yöntemiyle serogrup A, B, D ve Vi pozitif suşları saptayabilmüşlerdir. Lim ve ark. (5) A, B, C1, D, E ve Vi pozitif suşları ayırabilmek ve sistemin çok yönlülüğünü geliştirmek için iki yöntemi birleştirerek çalışmışlar, fakat Herrera-Leon ve ark.'nın (11) grup C2'yi tanımlamak için kullandığı wzxC2 primerinin 154bp'lik ampikonu internal kontrol ampikonuna (163bp) çok yakın olduğu için çalışmaya dahil etmemişlerdir.

Hong ve ark. (62) serogrup A, B, C1, C2, D1 ve E1'e yönelik primerler kullanarak 239 *Salmonella* izolatu ile yaptıkları çalışmada serogrup A ve D1 dışındaki serogrupları belirlemede multipleks PCR'in duyarlılığını %100 olarak bulmuşlar ancak serogrup A ve D'deki paratoz sentaz genlerinin yüksek homoloji göstermesi nedeni ile *prt* genine yönelik olarak kullandıkları primer ile serogrup A ve D1'i ayırt edememişlerdir.

Serogrup A ve D *tyv* genlerindeki bir nükleotitlik fark ile birbirlerinden ayrılabilir. Bu nükleotid farkı serogrup A'da mutasyon sonucu erken oluşan stop kodona bağlıdır ve serogrup A'da sadece paratoz içeren O antijeni bulunmasına yol açar. Bu farklılık serogrup A ve D'nin ayırt edilmesinde *tyv* geninin hedef olarak kullanılabilmesini sağlamıştır (33).

Lim ve ark. (5) yaptıkları çalışmada serogrup A, B, C1, D ve E'yi saptamada multipleks PCR yönteminin duyarlılığını %100 olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda O grup Multipleks PCR'in serogrup B, C1 ve D grubundaki izolatları saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğü diğer çalışmalardakine benzer şekilde %100 olarak bulundu.

Çalıştığımız suşlar arasında grup A ve E'de yer alan suşa rastlanmazken, 7 *Salmonella* izolatında kullanılan primerler ile serogrup spesifik bant elde edilemedi. Referans laboratuvarından gelen konvansiyonel serotiplendirme sonuçları ile karşılaştırıldığında bu 7 izolatın çalışmamızda hedef primeri olmayan C2-C3 grubundan serotipler olduğu görüldü.



Çalışmamızda uygulanan O grup antijenlerine yönelik multipleks PCR yöntemi; hem serogrubu, hem de Vi antijenini saptamaya yönelik primerler içeriyordu.

*Salmonella* serotiplerinden S. Typhi, S. Paratyphi C, S. Dublin Vi antijeni taşımaktadır (5, 60). İnsana özgül patojenler olan S. Typhi ve S. Paratyphi, enterik ateş etkenleridir. Kan örneklerinden bir *Salmonella* bakterisi izole edildiğinde bunun S. Typhi ya da S. Paratyphi olduğunun gösterilmesi için ek testlere gereksinim vardır (14, 60).

Çalışmaya aldığımız 100 *Salmonella* suşundan iki tanesinin D serogrubunda olduğu ve Vi antijeni taşıdığı saptandı. *Salmonella* serogrup D içerisinde sadece S. Typhi ve S. Dublin'de Vi antijeni bulunmaktadır (5). S. Typhi H antijen "d" pozitifken, S. Dublin "d" antijeni taşımaz. O grup multipleks PCR ile serogrup D'de yer alan, Vi antijeni pozitif bir suş saptandığında, H antijen "d" nin varlığı araştırılmalıdır. Uyguladığımız H1-1 multipleks PCR ile bu iki izolatin "d" antijeni pozitif olduğu gösterilerek, serotipinin S. Typhi olduğu belirlendi. Multipleks PCR yönteminin S. Typhi serotipinin saptanmasında duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak bulundu. Lim ve ark. (5) yaptıkları çalışmada multipleks PCR'ın S. Typhi'yi saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğünü benzer şekilde %100 olarak saptamışlardır.

Bazı nadir S. Typhi suşları H-1 fazının alternatifi olan *fliC-j* geni eksprese ederler, *fliC-j* geni, *fli-d* geninin delesyonu ile oluşan 261 bp'lik bir derivesidir. O-gruplarına yönelik multipleks PCR ile *Salmonella* serotip Typhi "j" ile "d" antijeni eksprese edenler birbirinden ayrılamaz. Ancak H gruplarına yönelik PCR' da kullanılan H-for ve Hd-rev primerleri, serotip Typhi "d" ve "j" türlerini birbirinden ayırabilir. Primerler 261 bp delesyona uğramış *fliC-d* DNA' sına eksternal olarak bağlanıp 763 bp'lik amplikon yerine 502 bp'lik parçayı amplifiye edebilir (5). Çalışmamızda "j" flagellar antijeni eksprese eden S. Typhi suşu saptanmadı ve konvansiyonel serotiplendirme sonuçları da bu veriyi doğruladı.

Çalışmamızda serogrup B'de yer alan 2 izolatin, H1-1 multipleks PCR ile "b" antijeni, H2 multipleks PCR ile de faz 2 antijenleri "1,2; 1,5; 1,6; 1,7" taşıdığı gösterildi. Bu antijenik formül serogrup B'de yer alan S.

Paratyphi B (1,4,[5],12: b: 1,2), S. Limete (1,4,12,27: b: 1,5), S. Canada (4,12,27: b: 1,6), S. Uppsala (1,4,12,27: b: 1,7) ile uyumlu bulundu (Tablo-6). Ancak diğer üç serotipin epidemiyolojik verilere göre ülkemizde görülme olasılığı zayıf olduğundan bu suşlar S. Paratyphi B olarak değerlendirildi ve konvansiyonel serotiplendirmenin de aynı sonucu verdiği gözlemlendi.

Lim ve ark. (5) yaptıkları çalışmada sadece serogrup B ve "b" antijenini saptamaya yönelik primerler ile S. Paratyphi B'nin S. Abony (1,4,[5],12,27: b: e,n,x) gibi çok sayıda suştan ayırt edilemeyeceğini ve sistemin S. Paratyphi B'nin tiplendirilmesinde tek başına yeterli olmadığını saptamışlardır. Çalışmamızda faz 2 H antijenlerine yönelik PCR'in da yapılması ile muhtemel suş sayısı azalmakla beraber, H2 antijen kompleks 1 içerisindeki antijenler ayrı ayrı belirlenemediğinden S. Paratyphi B'nin kesin olarak serotiplendirilmesi için yeterli olmadığı saptanmıştır.

Kullandığımız yöntem ile *Salmonella* serogrup A'da yer alan ve H1 "a" antijeni taşıyan tek serotip olan S. Paratyphi A ve serogrup C1'de yer alan ve Vi antijeni taşıyan tek serotip olan S. Paratyphi C kesin olarak tiplendirilebilirken, konvansiyonel serotiplendirme sonuçları ele alındığında moleküler serotiplendirme yaptığımız suşlar arasında bu iki serotipin yer almadığı görülmüştür.

Çalışmada serogrup D'de yer alan 63 *Salmonella* izolatında H1-1 multipleks PCR ile "g,m" antijeni pozitif bulunurken, faz 2 antijenleri ile pozitiflik saptanmadı. Dünyada ve ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda (55,56,59) S. Enteritidis serotipinin en sık izole edilen serotip olması nedeniyle bu izolatlar S. Enteritidis olarak yorumlandı. Serolojik tiplendirme sonuçları ile bu suşların S. Enteritidis olduğu doğrulandı.

Kullandığımız fliC(g,m) primeri ile "g,m" antijenlerinin her ikisinin, tek başına "g" ya da "m" antijeninin, ya da "g,m,q" gibi "g,m" antijenlerini içeren antijen kombinasyonlarının varlığında aynı büyüklükte PCR ürünleri oluşmaktadır.

Epidemiyolojik verilere dayanılarak, bu antijenik yapıları taşıyan S. Blegdam, S. Naestved S. Rostock, S. Moscow, S. Antartica, S. Rosenberg gibi serotipler dışlanabilmekle birlikte (Tablo-6) nadir de olsa bu suşların da

görülebilmek olasılığından dolayı bu yöntemin *S. Enteritidis*'in serotiplendirilmesinde tek başına yeterli olmadığı ve konvansiyonel serotiplendirme ya da farklı primer setleri kullanılarak yapılacak multipleks PCR testleri ile desteklenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Hong ve ark. (62) *fliC(g,m)* primerini kullanarak yaptıkları çalışmada çalışmamızdakine benzer olarak *S. Enteritidis* suşlarının bu primer setleri ile kesin olarak ayıramayacağını belirtmişler ve ek testlere olan gereksinimi vurgulamışlardır.

Agron ve ark. (69) yaptıkları çalışmada *S. Enteritidis*'e özgül olan ve diğer serotiplerde bulunmayan *SdfI* lokusunun bu serotipin belirlenmesinde hedef olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. G kompleks (H:g,m, -g,m,s, -g,m,t, -g,p, -g,p,s, -g,m,q, -g,q, -g,m,p, -g,m,p,s, -g,m,s,t, -g,s,t, -m,t, -m,p,t,u, -f,g,s, -f,g,m,t, -g,z51, -g,z63) primeri ile *Sdf* primerini birlikte kullanarak, 161 *Salmonella* izolatu ile yapılan bir çalışmada *S. Enteritidis* suşları konvansiyonel yöntemle %100 korele olarak saptanmıştır (68) .

Ardışık olarak uyguladığımız multipleks PCR yöntemleri ile 9 *Salmonella* suşunda serogrup B, H1 "i" ve H2 "1,2; 1,5; 1,6; 1,7;" antijenlerini saptadık. Bu veriler ile uyumlu *Salmonella* serotipleri *S. Typhimurium* ve *S. Lagos*' tur (Tablo-6). Epidemiyolojik veriler dikkate alınarak bu izolatları *S. Typhimurium* olarak yorumlamanın uygun olacağı kanaatine varılmış, konvansiyonel serotiplendirme sonuçları da kanaatimizi desteklemiştir. Çalışmamızın sonuçlarına paralel olarak, Hong ve ark.'nın (62) çalışmasında aynı yöntemin *S. Typhimurium* suşlarını saptamadaki duyarlılığı %100 olarak belirlenmiştir.

Çalışmaya alınan 10 izolatta serogrup C1, H1 "r" ve H2 "1,2; 1,5; 1,6; 1,7;" antijenleri saptandı. Kauffmann-White şemasına göre bu antijenik formülün ülkemizde sık izole edilen suşlardan *S. Infantis* ve *S. Virchow* ile uyumlu olduğu görüldü. Ayrıca oldukça nadir görülen serotipler olan *S. Nigeria* ve *S. Colindale* de tablo 6'da sunulduğu gibi aynı antijenik yapıya sahiptir. Konvansiyonel serotiplendirme sonuçları bu suşlardan 8 tanesinin *S. Infantis*, 2 tanesinin *S. Virchow* olduğunu gösterdi. Kullandığımız moleküler

yöntem bu suşların serotipinin belirlenmesi açısından yeterli özgüllüğe sahip bulunmadı.

Multipleks PCR ile test edilen 100 izolattan yalnızca 1 tanesinde birinci faz antijenlerinden “z<sub>10</sub>” ve ikinci faz antijenlerinden “e,n,x; e,n,z<sub>15</sub>” saptandı. C1 serogrubunda olduğu belirlenen bu serotipin Kauffmann-White şemasına göre S. Mbandaka (6,7: z<sub>10</sub>: e,n,z<sub>15</sub>) veya S. Djugu (6,7: z<sub>10</sub>: e,n,x) olabileceği düşünüldü. Referans laboratuvarından gelen sonuçla bu suşun serotipinin S. Mbandaka olduğu doğrulandı.

Çalışmada kullanılan H2 multipleks PCR yöntemi ile antijen kompleksleri ayrı ayrı değerlendirilemediğinden, aynı O ve H1 antijen yapılarına sahip olan S. Typhimurium (H2: 1,2) ile S. Lagos (H2: 1,5) ve S. Mbandaka (H2: e,n,z<sub>15</sub>) ile S. Djugu (H2: e,n,x) gibi serotipler kesin olarak ayırt edilemedi. Bu antijenik yapıların ayrı ayrı değerlendirilmesi ile ilgili olarak yapılan çalışmada, Echeita ve ark. (70) H:1,2, H:1,5, H:1,7, H:e,n,z<sub>15</sub>, H:e,n,x antijenlerinin her birini saptamaya yönelik primerleri sentezleyerek, 49 farklı serotipten 140 *Salmonella* suşunda 50-400 bp arasında değişen özgül PCR ürünleri oluşturmayı başarmışlardır. Bu primerler kullanılarak yapılacak çalışmalarda farklı serotiplerin kesin olarak belirlenmesi mümkün olacaktır.

Çalışmamızda multipleks PCR ile 93 (%93) izolatta var olan tüm antijen bölgelerine yönelik özgül bantlar elde edildi. Bu izolatların 2 (%2)'sinde elde edilen formül kesin olarak bir suşu işaret etmekte iken, 91 (%91)'inde birden fazla serotipe uyum gösteren antijenik formül görüldü ve bu suşlar muhtemel sonuç olarak değerlendirilerek tablo 6'da sunuldu. İzolatların 7(%7) tanesinde var olan tüm antijenik yapılar, bu bölgeleri hedefleyen özgül primerler çalışmada bulunmadığından saptanamadı ve tamamlanmamış formül olarak belirtildi. Konvansiyonel yöntemle bu suşların 3'ü S. Corvallis, 1'i S. Albany, 1'i S. Blockley, 2'si S. Kentucky olarak serotiplendirildi.

Herrera-Leon ve ark.'nın (11) yaptıkları çalışmada serogruba ve H2 antijenlerine yönelik üç ayrı multipleks PCR yöntemi ile 500 *Salmonella* suşununun 423 (%84.6)'ü tamamen serotiplendirilmiş, 66 (%13.2)'sında

muhtemel sonuç elde edilmiş, 11 (%2.2)'inde ise var olan antijenik yapılar tam olarak saptanamamıştır. Bu çalışmada *S. Enteritidis* için özgül *Sdfl* bölgesini, ayrıca EN kompleks ve 1 kompleks içinde yer alan antijenleri ayrı ayrı tespit etmeye yönelik farklı primerlerin kullanılması ile elde edilen kesin sonuç oranınının, çalışmamızda elde ettiğimiz orana göre çok daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum farklı primer kombinasyonları kullanılarak kesin olarak saptanabilecek suş sayısının arttırılabileceğini göstermektedir.

*Salmonella*'ların serolojik tiplendirmesi güvenilir bir yöntem olmakla birlikte, aglütinasyon testleri oldukça pahalı 167 farklı antiserum gerektiren, iyi eğitilmiş kişilerce çalışılması gereken ve hazırlıkları zaman alan bir yöntemdir (68). Konvansiyonel serotiplendirme metodu ile 2550'den fazla serotipin belirlenmesi için gerekli olan antiserumların üretim ve kalite kontrolü de oldukça zordur (47).

Ülkemizde *Salmonella* serotiplendirmesi için referans laboratuvar olarak hizmet veren Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, *Salmonella* serotiplendirme sonuçlarının raporlanması için gerekli çalışma süresini 10-12 gün olarak belirlemiştir. Çalışmamızda, bakteriyolojik identifikasyon yapılarak saklanmış olan suşların canlandırılmasından sonra DNA ekstraksiyonu ve multipleks PCR işlemlerinin gerçekleştirilmesi ile 48 saat gibi kısa bir sürede serotiplerin tanımlanabildiği belirlenmiştir. 2010 Mali Yılı Bütçe Uygulama Talimatı'na göre referans laboratuvarında *Salmonella* serotiplendirmesi 61 TL olarak ücretlendirilmektedir. Çalışmamızda yüz *Salmonella* suşunun serotiplendirilmesi için gerekli maliyet 550 TL (suş başına 5,5 TL) olarak hesaplandı ve konvansiyonel serotiplendirmenin maliyetine göre oldukça düşük olduğu saptandı.

Sonuç olarak; *Salmonella*'ların serogruplara ayrılmasında multipleks PCR farklı gruplara özgül hedef primerlerle genişletilerek kullanılabilecek, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir yöntemdir.

Çalışmamızda ülkemizde ve laboratuvarımızda en sık izole edilen serotipler olan *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhi* ve *S. Paratyphi*'nin serotiplendirmesinde multipleks PCR ile elde edilen serotiplendirme sonuçları konvansiyonel serotiplendirme sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Bununla

beraber çalışmamızda kullanılan primerler ile bazı antijenlerin varlığı ayrı ayrı değerlendirilememiş, nadir de olsa karşımıza çıkabilecek farklı serotiplerin tam olarak dışlanması mümkün olmamıştır.

Aynı serogrupta yer alan ve yalnızca minör antijenik farklılıklarla birbirinden ayrılan suşların değerlendirilmesinde, multipleks PCR yönteminin tarama testi olarak kullanılmasının, çok sayıda antiserumla yapılması gereken aglütinasyon testlerine gereksinimi azaltacağından zaman ve maliyet açısından önemli ölçüde kazanç sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bu yöntem H antijen kuvvetlendirmesi ya da faz varyasyonunun indüklenerek iki faza ait antijenlerin belirlenmesi gibi uzun laboratuvar uygulamalarına olan gereksinimi ortadan kaldırmaktadır.

Multipleks PCR yönteminin önemli bir avantajı da O antijenlerinin kaybı sonucu R formuna dönüşen ya da flagellar antijenlerin ekspresyonunun kaybına bağlı monofazik veya hareketsiz duruma geçen suşların tespit edilebilmesidir.

Multipleks PCR yönteminin uygulanması sırasında karşılaşılabilecek sorunlar, primer-primer etkileşimlerine bağlı değişik amplikonların oluşmasının engellenmesi ve oluşan farklı amplikonların amplifikasyonun verimliliğini azaltabilmesidir. Yöntemin optimize edilmesi zordur ancak optimize edildiğinde, elde edilen sonuçlar güvenilir ve tekrarlanabilir. Sonuçların yorumlanması da subjektif değildir. Bu yöntem çok sayıda örneğin hızlı ve maliyet etkin olarak analizinin yapılması açısından uygundur.

Moleküler tiplendirme ile bütün serotiplerin belirlenmesi mümkün olmadığından bugün için multipleks PCR yöntemi konvansiyonel serotiplendirmenin alternatifi değildir. Ancak farklı antijenlere yönelik primer setleriyle alternatif kombinasyonlar oluşturularak multipleks PCR ile belirlenebilecek serotiplerin sayısı artırılabilir. Temel PCR ekipmanları ile uygulanabilecek bu yöntem pahalı ve yorucu olan konvansiyonel serotiplendirmeye olan ihtiyacımızı azaltacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Töreci K, Anđ Ö. Türkiye’de saptanmış olan *Salmonella* serovarları ve Salmonellozların genel değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1991; 21:1-18.
2. Aksoycan N. Türkiye’de besin zehirlenmesi olgularında izole edilen *Salmonella*’lar. İnfeksiyon Dergisi 1989;3:209-11.
3. Aksoycan N, Erdem B, Sađanak İ. *Salmonella* Enteritidis ile oluşan besin zehirlenmesi. İnfeksiyon Dergisi 1991;5:65-6.
4. Canpolat S. Çeşitli Hayvan Dışkılarında *Salmonella* Etkenlerinin Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Saptanması (Doktora Tezi). Ankara: Ankara Üniversitesi; 2007.
5. Lim BK, Thong KL. Application of PCR-based serogrouping of selected *Salmonella* serotypes in Malaysia. J Infect Dev Ctries 2009;3:420-8.
6. Teber B. *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Paratyphi B antijenlerine karşı spesifik antiserum elde edilmesi (Uzmanlık Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi;1995.
7. Levent B, Güleşen RK. Gıda ve Su Kaynaklı Enfeksiyon Etkenleri. 1. baskı. Ankara: Refik Saydan Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı; 2008.
8. Leader BT, Frye JG, Hu J, Fedorka-Cray PJ, Boyle DS. High-Throughput Molecular Determination of *Salmonella enterica* Serovars by Use of Multiplex PCR and Capillary Electrophoresis Analysis. J Clin Microbiol 2009;47:1290-9.
9. Kim S, Frye JG, Hu J, Fedorka-Cray PJ, Gautom R, Boyle DS. Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella enterica* subsp. Enterica. J Clin Microbiol 2006; 44:3608–15.
10. Fitzgerald C, Sherwood R, Gheesling LG, Brenner FW, Fields PI. Molecular analysis of the *rfb* O antigen gene cluster of *Salmonella enterica* serogroup O:6,14 and development of a serogroup-specific PCR assay. Appl Environ Microbiol 2003;69: 6099–105.
11. Herrera-Leon S, Ramiro R, Arroyo M, Diez R, Usera MA, Echeita MA. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. Res Microbiol 2007;158:122-7.
12. Fitzgerald C, Gheesling L, Collins M, Fields PI. Sequence analysis of the *rfb* loci, encoding proteins involved in the biosynthesis of the *Salmonella enterica* O17 and O18 antigens: Serogroup-specific identification by PCR. Appl Environ Microbiol 2006;72: 7949–53.
13. Levy H, Diallo S, Tennant SM, et al. PCR method to identify *Salmonella enterica* serovars Typhi, Paratyphi A and Paratyphi B among *Salmonella* isolates from the blood of patients with clinical enteric fever. J Clin Microbiol 2008;46: 1861–6.
14. Erdem B. *Enterobacteriaceae*. Ustaçelesi Ş (editör). Temel ve klinik mikrobiyoloji. Ankara: Güneř Kitabevi; 1999. 471-517.

15. LeMinor L. *Salmonella* Lignieres. In: NR Krieg (ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins; 1984. 427-58.
16. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. J Clin Microbiol 2000;38: 2465-7.
17. Grimont PAD, Weill FX. Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars 9th edition. France: Pasteur WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*; 2007.
18. Levent B. *Escherichia*, *Shigella* ve *Salmonella*. Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M. (editörler). Klinik Mikrobiyoloji. 9. Baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009. 670-88.
19. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis 1999;5:607–25.
20. Erdem B, Haşçelik G, Gedikoğlu S. *Salmonella enterica* serotipleri ve *Salmonella* enfeksiyonları: Türkiye’de on ili kapsayan çok merkezli vir çalışma. Mikrobiyoloji Bülteni 2004; 38:173-86.
21. Hold PS, Chaubal LH. Detection of Motility and Putative Synthesis of Flagellar Proteins in *Salmonella Pullorum* Cultures. J Clin Microbiol 1997;35:1016-20.
22. Kilger G, Grimont PA. Differentiation of *Salmonella* phase 1 flagellar antigen types by restriction of the amplified *fliC* gene. J Clin Microbiol 1993;31:1108–10.
23. Old DC. *Salmonella*. In: Parker Mt, Collier LH (eds). Topley&Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. 8th edition. London: Edward Arnold; 1975. 470-89.
24. Lindberg AA. Bacterial virulence factors-with particular reference to *Salmonella* bacteria. Scand J Infect Dis Suppl 1980;24:86-99.
25. Luderitz O, Staub AM, Westphal O. Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related *Enterobacteriaceae*. Bacteriol Rev 1966;30:192-255.
26. Tsang RSW, Schlecht S, Aleksic S, Chan KH, Chau PY. Lack of the a-1,2-linked N-acetyl-D-glucosamine epitope in the outer-core structures of lipopolysaccharides from certain O serogroups and subspecies of *Salmonella enterica*. Res Microbiol 1991;142:521-4.
27. Lee SJ, Romana LK, Reeves PR. Sequences and structural analysis of the *rjb* (O antigen) gene cluster from a group C1 *Salmonella enterica* strain. J Gen Microbiol 1992;138:1843-55.
28. Luk JMC, Kongmuang U, Reeves PR, Lindberg AA. Selective Amplification of Abequose and Paratose Synthase Genes (*rfb*) by Polymerase Chain Reaction for Identification of *Salmonella* Major Serogroups A, B, C2, and D. J Clin Microbiol 1993; 2118-23.
29. <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab16/diseases/n meningitidis/u1fig10b.html>.
30. Lindberg AA, Wollin R, Bruse GW, Ekwall E, Svenson SB. Immunology and immunochemistry of synthetic and semi-synthetic *Salmonella* O-antigen-specific glycoconjugates. Am Chem Soc Symp Ser 1983;231:83-118.



31. Curd H, Liu D, Reeves PR. Relationships among the O-Antigen Gene Clusters of *Salmonella enterica* Groups B, D1, D2 and D3. *J Bacteriol* 1998;100:2-7.
32. Sanderson KE, Demerec M. The Linkage Map of *Salmonella*. *Genetics* 1965;51:897-913.
33. Wang L, Romana LK, Reeves PR. Molecular analysis of a *Salmonella enterica* group E1 *rfb* gene cluster: O antigen and the genetic basis of the major polymorphism. *Genetics* 1992;130:429-43.
34. Verma N, Reeves P. Identification and sequence of *rfbS* and *rfbE* which determine antigenic specificity of group A and group D *Salmonellae*. *J Bacteriol* 1989;171:5694-701.
35. Liu D, Verma NK, Romana LK, Reeves PR. Relationship among the *rjb* regions of *Salmonella* serovars A, B, and D. *J Bacteriol* 1991;173:4814-9.
36. Verma NK, Quigley NB, Reeves PR. O-antigen variation of *Salmonella* spp.: *rib* gene cluster of three strains. *J Bacteriol* 1988;170:103-7.
37. Liu D, Cole RA, Reeves PR. An O-antigen processing function for *Wzx* (*RfbX*): a promising candidate for O-unit flippase. *J Bacteriol* 1996;178:2102-7.
38. Marolda CL, Vicarioli J, Vavano MA. *Wzx* proteins involved in biosynthesis of O antigen function in association with the first sugar of the O-specific lipopolysaccharide subunit. *Microbiol* 2004;150:4095-105.
39. Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. *Res Microbiol* 2002;153:191-7.
40. Parish CR, Wistar R, Ada GL. Cleavage of bacterial flagellin with cyanogen bromide: antigenic properties of the protein fragments. *Bochem J* 1969;113:501-6.
41. Parish CR, Wistar R, Ada GL. Cleavage of bacterial flagellin with cyanogen bromide: antigenic properties of the protein fragments. *Bochem J* 1969;113:501-6.
42. Lederberg J, Edwards PR. Serotypic Recombination in *Salmonella* *Journal of Immunology* 1953;71:232-40.
43. Zieg J, Simon M. Analysis of the nucleotide sequence of an invertible controlling element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4196-200.
44. Lino T. Genetics of structure and function of bacterial flagella. *Annu Rev Genet* 1977;11:161-82.
45. [http://www.bmb.leeds.ac.uk/mbiology/pg/pgteach/biol5247m/front\\_pages/gi/salmonella.html](http://www.bmb.leeds.ac.uk/mbiology/pg/pgteach/biol5247m/front_pages/gi/salmonella.html)
46. McQuiston JR, Fields PI, Tauxe RV, Logsdon JM. Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends Microbiol* 2008;16:142-8.
47. McQuiston JR, Waters RJ, Dinsmore BA, Mikoleit ML, Fields PI. Molecular Determination of H Antigens of *Salmonella* by Use of a Microsphere-Based Liquid Array. *J Clin Microbiol* 2011;565-73.
48. Hirose K, Itoh K, Nakajima H, et al. Selective amplification of *tyv* (*rfbE*), *prt* (*rfbS*), *viaB* and *fliC* genes by multiplex PCR for identification of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A. *J Clin Microbiol* 2002;40:633-6.

49. Hashimoto Y, Li N, Yokoyama H, Ezaki T. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of *viaB* region encoding Vi antigen in *Salmonella* Typhi. J Bacteriol 1993;175:4456-65.
50. Bilgehan H. *Enterobacteriaceae*. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 3. baskı. İzmir: Fakülteler Kitabevi;1992. 425-55.
51. Levent B, Güleşen RK. Gıda ve Su Kaynaklı Enfeksiyon Etkenleri. 1. baskı. Ankara: Refik Saydan Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı; 2008.
52. Koneman EW, Allen DS, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC (eds). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1992.
53. Erol İ. Hayvansal gıdalardan kaynaklanan *Salmonella* infeksiyonları. İnfeksiyon Dergisi 1999;13:123-8.
54. Janda JM, Abbott SL (eds). The *Enterobacteriaceae*. Philadelphia: Lippincott- Raven; 1998.
55. <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2006/salmonellaannualsummary2006.pdf>
56. Erdem B, Ercis S, Haşçelik G. Antimicrobial resistance patterns and serotype distribution among *Salmonella enterica* strains in Turkey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005;24:220-25.
57. Erdem B, Ercis S, Haşçelik G, Gür D, Aysev AD. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* group C strains isolated from humans in Turkey, 2000-2002. Int J Antimicrob Agents 2005;26:33-7.
58. Erdem B. *Salmonella*'ların mikrobiyolojik özellikleri ve *Salmonella*'lar ile gelişen infeksiyonlar. İnfeksiyon Hastalıkları Serisi 2003;6:86-95.
59. Levent B, Sezen F, Güleşen RK. Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Surveyans Ağı (UEPLA):2007-2008 Yıllarına Ait Suşların Değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg 2009; 66:25-7.
60. Erdem B. *Salmonella* Türleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. 2152-64.
61. Gedikoğlu S, Göral G, Helvacı S. Bursa'da İzole Edilen *Salmonella* Serotipleri. İnfeksiyon Dergisi 1990; 4: 17-20.
62. Hong Y, Liu T, Lee MD, et al. Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. BMC Microbiology 2008;8:178-86.
63. Erdem B. *Salmonella*'ların Fenotipik ve Genetik Özellikleri ile Bu Özelliklerin Epidemiyolojik Değeri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1995;(25):40-5.
64. Erdem B. 1998-2000 Yılları arasında serotiplendirilen *Salmonella*' lar. İnfeksiyon Dergisi 2001;15:137-40.
65. Rowe B, Hutchinson DN, Gilbert RJ, et al. *Salmonella* Ealing infections associated with consumption of infant dried milk. Lancet 1987;2:900-3.
66. Aksoycan N, Wilke A, Erdem B, Kıyan M. *Salmonella* Haifa ile meydana gelen toplu besin zehirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1987; 17:36-40.
67. Erdem B, Kurultay N, Türker M, Eler F, Gerçek D. Türkiye'de ilk defa izole edilen *S. Corvallis* suşları. İnfeksiyon Dergisi 1995;9:211-13.

68. Herrera-Leon S, McQuistob JR, Usera MA, et al. Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of *Salmonella* spp. J Clin Microbiol 2004;25:81-86.
69. Agron, PG, Walker R L, Kinde H, et al. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Appl Environ Microbiol 2001;67:4984–91.
70. Echeita MA, Herrera S, Garaizar J, Usera MA. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. Res Microbiol 2002;153:107–13.

## TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım hocalarım Sayın Prof. Dr. Okan Töre, Sayın Prof. Dr.Güher Göral, Sayın Prof. Dr. Safiye Helvacı, Sayın Prof. Dr. Reşit Mıstık, Sayın Prof. Dr. Halis Akalın, Sayın Prof. Dr. Beyza Ener, Sayın Prof. Dr. Barbaros Oral'a, tezimin oluşumu ve yürütülmesinde büyük emek ve destekleri olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Suna Gedikoğlu ve Sayın Doç. Dr. Cüneyt Özakin'a, asistanlığım boyunca her zaman her konuda desteğini hissettiğim Sayın Doç. Dr. Melda Sınırtaş'a, yetişmemde katkıları olan Sayın Doç. Dr. Yasemin Heper, Sayın Doç. Dr. Emel Yılmaz, Sayın Doç Dr. Ferah Budak, Sayın Uzm. Dr. Oktay Alver, Sayın Uzm. Dr. Sevim Akçağlar, Sayın Uzm. Dr. Esra Kazak'a, tezimin serolojik tiplendirme aşamasında bilgi ve desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Berrin Esen, Sayın Uzm. Dr. Belkıs Levent, Sayın Uzm. Dr. Revasiye Kayalı Güleşen'e, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, tez çalışmalarım sırasındaki destek ve emeklerinden dolayı Dr. Faruk Karakeçili ve Sayın Figen Aymak'a, asistanlık eğitimim boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim ve her zaman desteklerini hissettiğim tüm teknisyen ve biyolog arkadaşlarıma ve anabilim dalımızın tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olarak beni destekleyen aileme ve eşime verdikleri sonsuz sevgi, emek ve güven için teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı :** Burcu

**Soyadı :** Dalyan Cilo

**Doğum Yeri ve Tarihi :** Bursa, 07.07.1981

**Eğitimi :**

1987-1992 Hamzabey İlkokulu- Bursa

1992-1995 Namazgah İhsan Dikmen İlköğretim Okulu- Bursa

1995-1999 Bursa Çelebi Mehmet Lisesi- Bursa

1999-2005 Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi- Eskişehir

2006-2011 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD- Bursa

**Yabancı Dili :** İngilizce