

***Salmonella* Serotiplerinin Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi**

Determination of *Salmonella* Serotypes by Conventional and Molecular Methods

Burcu DALYAN CİLO¹, Faruk KARAKEÇİLİ², Revasiye GÜLEŞEN³, Belkıs LEVENT³, Cüneyt ÖZAKIN¹, Suna GEDİKOĞLU¹

¹ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

¹ Uludağ University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Bursa, Turkey.

² Erzincan Üniversitesi Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü, Erzincan.

² Erzincan University Mengucek Gazi Educational and Research Hospital, Department of Infectious Diseases, Erzincan, Turkey.

³ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara.

³ Turkish Public Health Agency, National Microbiology Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 13.03.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 16.07.2013

ÖZET

Salmonella enterica serotiplerinin belirlenmesi epidemiyolojik çalışmalar açısından önem taşımaktadır. *Salmonella* serotipleri, hücre duvarında yer alan somatik (O) ve flajel (H) antijenleri temel alınarak belirlenir. Bu çalışmanın amacı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (mPCR) yöntemi ile belirlenen moleküler serotiplendirme sonuçlarının konvansiyonel serotiplendirme sonuçları ile karşılaştırılmasıdır. Konvansiyonel serotiplendirme Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA) kapsamında Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'nda yapılmıştır. Referans laboratuvarı tarafından 14 farklı serotipte tanımlanmış toplam 100 *Salmonella* suşu, *Salmonella* serogrupları (A, B, C1, D, E) ve Vi antijen gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak mPCR yöntemi ile moleküler olarak serogruplandırılmıştır. H antijenleri (H: a, -b, -d, -g,m, -i, -r, -z₁₀) ve iki antijen kompleksinde yer alan (H: 1,2, -1,5, -1,6, -1,7 ve H: en_x, en_z) antijenleri kodlayan *fliC* ve *fliB* genlerine yönelik ardışık dört mPCR yöntemi uygulanarak serotipler belirlenmiştir. Multipleks PCR sonuçları, konvansiyonel yöntem ile belirlenen serogruplar ile %100 uyum göstermiş; serogruplara yönelik mPCR'nin duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. Moleküler yöntemle elde edilen antijenik formüle göre belirlenen serotiplendirmede; 2 (%2) izolatta kesin sonuç, 91 (%91) izolatta muhtemel sonuç, 7 (%7) izolatta ise tamamlanamayan formül elde edilmiştir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık izole edilen *Salmonella* serotipleri olan *S.Enteritidis*, *S.Typhimurium* ve *S.Paratyphi* için moleküler serotiplendirme sonuçları muhtemel sonuç olarak de-

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Burcu Dalyan Cilo, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Görükle, 16059 Bursa, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 224 295 4142, **E-posta (E-mail):** bdalyan@yahoo.com

ğ erlendirilmiştir. Bu serotipler için mPCR ile elde edilen antijenik formüle göre belirlenen muhtemel sonuçlar epidemiyolojik veriler göz önünde bulundurularak yorumlandığında elde edilen sonuçların konvansiyonel serotiplendirme sonuçları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Moleküler yöntem ile kesin sonuç elde edilen *S.Typhi*'nin serogruplandırma ve serotiplendirilmesi açısından mPCR'nin duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur. Multipleks PCR klinik laboratuvarlarda izole edilen suşların tanımlanmasında konvansiyonel serotiplendirmeye göre daha ucuz ve daha hızlı bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Moleküler tiplendirme ile bütün serotiplerin kesin olarak belirlenmesi mümkün olmadığından, bugün için moleküler tiplendirme konvansiyonel serotiplendirmenin alternatifi değildir. Ancak konvansiyonel serotiplendirme sonuçları alınıncaya kadar veri sunması bakımından yararlı görünmektedir.

Anahtar sözcükler: *Salmonella*; serotiplendirme; multipleks polimeraz zincir reaksiyonu.

ABSTRACT

Determination of *Salmonella enterica* serotypes is crucial for epidemiological studies. *Salmonella* serotypes are defined on the basis of somatic (O) and flagellar (H) antigens, both of which are present in the cell wall of *Salmonella*. The aim of this study was to compare the results of molecular serotyping obtained by multiplex polymerase chain reaction (mPCR) with conventional serotyping results. Conventional serotyping has been performed in Ministry of Health Refik Saydam Hygiene Center as part of the National Laboratory of Enteric Pathogenes Surveillance Network (UEPLA). A total of 100 *Salmonella* strains, they comprise 14 different serotypes by the reference laboratory have been investigated by using specific primers for *Salmonella* serogroups (A, B, C1, D and E) and Vi antigen gene clusters via mPCR method. Serotypes have been determined by applying four sequential mPCR targeting the *fliC* and *fliB* genes encoding the H1 antigens (H1: a, -b, -d, -g,m, -i, -r, -z₁₀) and H2 antigen complexes (H2: 1,2, -1,5, -1,6, -1,7 and H: enx, enz₁₃). The results of mPCR showed 100% consistency with the serogroups determined by the conventional method. Both sensitivity and specificity of mPCR according to each serogroups were found to be 100%. Results of serotyping that have been determined with the molecular antigenic formula showed accurate results for 2 (2%), probable results for 91 (91%) and incomplete formula for 7 (7%) isolates. Molecular serotyping results of the most common isolated *Salmonella* serotypes of which *S.Enteritidis*, *S.Typhimurium* and *S.Paratyphi* from clinical microbiology laboratories have been determined as probable results. Antigenic formula of these serotypes that detected using mPCR were considered to be consistent with the results of conventional serotyping when interpreted with epidemiologic data. The sensitivity of mPCR to identify *S.Typhi* which have been determined as accurate result with molecular serotyping was 100% for serogrouping and serotyping. Multiplex PCR is cheaper and faster for the serotyping of strains isolated in clinical laboratories, compared to the conventional methods. However since it is not possible to detect all serotypes by using molecular typing, this technique can not be currently considered as an alternative for conventional serotyping. Nevertheless molecular typing could be beneficial in providing the preliminary results earlier.

Key words: *Salmonella*; serotyping; multiplex polymerase chain reaction.

GİRİŞ

Salmonella enfeksiyonları, tüm dünyada önemini koruyan halk sağlığı sorunlarından-
dır. *Salmonella* serotiplerinin belirlenmesi, ulusal süveyansın yönelimi, suşların epidemi-
yolojik olarak sınıflandırılması, salgınların incelenmesi ve uluslararası bir dil oluşması aç-
ısından önem taşır^{1,2}.

Salmonella izolatları, Kauffmann-White şeması kullanılarak, hücre duvarında bulunan;
somatik (O) antijeni ve flajel (H) antijenlerine göre serotiplendirilir. Özgül *Salmonella* an-

tiserumları ile lam veya tüp aglütinasyon tekniği kullanılarak mikroorganizmanın önce "O" somatik antijenine göre serogrubu, daha sonra "H" kirpik antijeninin tanımlanması ile serotipi belirlenir¹.

Konvansiyonel serotiplendirme; zaman alan, yorumlanması subjektif olabilen ve bu nedenle iyi eğitimli kişilerce çalışılması gereken, yüksek kaliteli çok sayıda antiserum gerektiren, pahalı bir yöntemdir^{2,3}. Kaynakları sınırlı olan laboratuvarlarda bu koşulların sağlanması zor olduğundan, serotiplendirmenin referans laboratuvarlarında yapılması önerilmektedir⁴. Ancak özellikle salgın durumlarında serotiplerin hızlı bir şekilde belirlenmesi gereklidir. Bu nedenle, son yıllarda serotiplerin belirlenmesinde moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır⁵⁻¹⁴. Bu çalışmada; *Salmonella* serotiplerinin multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (mPCR) ile belirlenmesi, referans laboratuvarı serotiplendirme sonuçları ile uyumunun değerlendirilmesi ve mPCR yöntemi ile *Salmonella* tiplendirmesinin laboratuvar hizmetinde uygulanabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriyel İzolatlar

Çalışmaya, 2005-2010 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarında izole edilen 100 *Salmonella* suşu dahil edildi. Çalışma, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu onayı (Karar No: 2010-3/3) ile gerçekleştirildi.

Hasta örneklerinden izole edilen, Phoenix (BD Diagnostics, ABD) otomatize sisteminde BD PHOENIX™ NMIC/ID-55 paneli ile *Salmonella* spp. olarak tanımlanan suşlar, mikrobank (Mast Diagnostics, UK) içerisinde -20°C'de saklandı. Çalışma için seçilen suşların, 69'u dışkı, 22'si kan, 6'sı idrar, 3'ü balgam örneklerinden izole edilmişti.

Konvansiyonel Serotiplendirme

Serotiplendirme Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA) kapsamında, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarında yapıldı.

Moleküler Çalışma

Seçilen ve mikrobankta saklanan suşlar %5 koyun kanlı Colombia Agar (BD, Almanya) plağında canlandırıldı. Saf olarak üretilen *Salmonella* kolonileri distile su ile McFarland 5 bulanıklığında süspansiyon edildi. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan 500 µl ependorf tüpe alınarak -80°C'de 24 saat bekletildi. Süspansiyon iyice çözülene kadar oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 99°C'de, 15 dakika kuru ısı bloğunda (Wealtec Corp. HB-1) tutuldu. 11.000xg'de 3 dakika, 4°C'de santrifüj edildi. 200 µl süpernatant alınarak yeni bir ependorfa aktarıldı. Spektrofotometrede (THERMO NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer) DNA kantitasyonu yapıldı.

"O" antijenlerini belirlemek için yapılan mPCR için; primerler A, B, C1, D ve E serogruplarına özgül *rfb* gen bölgeleri ve Vi pozitif izolatları tespit etmek için *viaB* geni hedef

alınarak seçildi^{2,7,9,10}. H antijenlerini belirlemek için *Salmonella* H antijenlerine yönelik primerler; faz 1 H antijenleri H: a, -b, -d, -i, -g,m, -r, -z₁₀ ve faz 2 H antijenleri H: -1,2, -1,5, -1,6, -1,7, -e,n,x, -e,n,z₁₅'e yönelik olarak seçildi^{9,11}. Yanlış negatif sonuçları önlemek için internal kontrol olarak *oriC* bölgesine yönelik P1-P2 primerleri kullanıldı². "O" antijenlerine yönelik mPCR yöntemi, H1 antijenlerine yönelik üç farklı mPCR yöntemi ve H2 antijenlerine yönelik mPCR yöntemi ardışık olarak uygulandı. Elektroforez 100 V akımda, 50 dakika olarak gerçekleştirildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 100 *Salmonella* izolatu, serotiplendirme sonucu bilinmeden, ardışık beş farklı mPCR ile değerlendirilmiştir. Serogruplara özgül mPCR ile suşların 14'ünde serogrup B'ye, 17'sinde serogrup C1'e, 65'inde serogrup D'ye özgül bantlar görülmüştür. Konvansiyonel serotiplendirme sonuçlarıyla karşılaştırıldığında "O" grup mPCR'nin serogrup B, C1 ve D'deki izolatları saptamadaki duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur. Serogrupların belirlenmesinde mPCR'nin özgüllüğü %100 olarak değerlendirilmiştir. Çalışılan suşlar arasında grup A ve E'de yer alan suşa rastlanmazken, 4 izolatta serogruba özgül bant elde edilememiştir. Konvansiyonel serotiplendirme sonucunda, bu suşların çalışmamızda hedef primeri olmayan C2-C3 grubundan olduğu görülmüştür.

P1-P2 primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri, tüm *Salmonella* suşlarında saptanmıştır. H1-1 mPCR ile iki izolatta "d" antijeni saptanmış, bu izolatlar serolojik tiplendirme ile *S.Typhi* olarak, "b" antijeni saptanan iki izolat da *S.Paratyphi B* olarak belirlenmiştir. H1-2 mPCR ile 69 izolatta "g,m" antijenleri saptanmış, bu izolatların 63'ü konvansiyonel yöntemle *S.Enteritidis*, 2'si *S.Montevideo*, 1'i *S.Othmarchen*, 3'ü *S.Agona* olarak; "i" antijeni saptanan 11 izolatın ise 9'u *S.Typhimurium*, 2'si *S.Kentucky* olarak serotiplendirilmiştir.

H1-3 mPCR ile 10 izolatta "r" antijeni saptanmış, konvansiyonel olarak bu suşların 8'i *S.Infantis*, 2'si *S.Virchow* olarak; "z₁₀" antijeni saptanan bir suş ise *S.Mbandaka* olarak serotiplendirilmiştir. H2 mPCR ile "1,2,-1,5,-1,6,-1,7" antijenleri saptanan 22 suşun konvansiyonel yöntemle 9'u *S.Enteritidis*, 8'i *S.Infantis*, 2'si *S.Virchow*, 2'si *S.Paratyphi B*, 1'i *S.Blockey* olarak; "e,n,x,-e,n,z₁₅" antijenleri saptanan bir suş ise *S.Mbandaka* olarak serotiplendirilmiştir (Tablo I).

Ardışık beş mPCR ile antijenik formülleri belirlenen suşların, Kauffmann-White şemasına göre serotipleri belirlenmeye çalışılmıştır. 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 I'de sunulmuştur. Buna göre izolatların 2'si (%2) kesin sonuç, 91 (%91)'i muhtemel sonuç, 7 (%7)'si ise tamamlanamayan formül olarak değerlendirilmiştir.

mPCR ile 2 izolatta, serogrup D, H1:d ve Vi antijenleri saptanmıştır. Bu bulgular bir araya getirildiğinde ortaya çıkan antijenik formülün yalnızca *S.Typhi* serotipi ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Konvansiyonel serotiplendirmeye karşılaştırıldığında mPCR yönteminin *S.Typhi*'yi saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir.

Tablo 1. Konvansiyonel ve Moleküler Tiplendirme Sonuçlarının Karşılaştırmalı Değerlendirmesi

Suş sayısı	Moleküler olarak saptanan antijenler			Moleküler tiplendirme sonucu	Konvansiyonel serotiplendirme sonucu	Sonuç
	Grup	H1	H2			
63	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 (9,12: g,q: -) S.Antartica (9,12: g,z ₆₃ : -) S.Rosenberg (9,12: g,z ₈₅ : -) S.Typhimurium (1,4,[5],12: i: 1,2) S.Lagos (1,4,[5],12: i: 1,5) S.Infantis (6,7,14 r: 1,5) S.Virchow (6,7,14: r: 1,2) S.Nigeria (6,7, r: 1,6) S.Colindale (6,7: r: 1,7) S.Virchow (6,7,14: r: 1,2) S.Infantis (6,7,14: r: 1,5) S.Nigeria (6,7: r: 1,6) S.Colindale (6,7: r: 1,7)	S.Enteritidis (9,12: g,m: -) S.Paratyphi B (4,5,12: b: 1,2) S.Limete (1,4,12,ZZ: b: 1,5) S.Canada (4,12,ZZ: b: 1,6) S.Uppsala (1,4,12,ZZ: b: 1,7) S.Typhi 9,12[vij: d: -) S.Mbandaka (6,7,14: z ₁₀ : e,n,z ₁₃) S.Djugu (6,7: z ₁₀ : e,n,x)	MS
9	B	i	1,2;1,5;1,6;1,7	S.Typhimurium (1,4,[5],12: i: 1,2)	S.Typhimurium (1,4,5,12: i: 1,2)	MS
8	C1	r	1,2;1,5;1,6;1,7	S.Virchow (6,7,14: r: 1,2)	S.Infantis (6,7: r: 1,5)	MS
2	C1	r	1,2;1,5;1,6;1,7	S.Virchow (6,7,14: r: 1,2)	S.Virchow (6,7: r: 1,2)	MS
2	B	b	1,2;1,5;1,6;1,7	S.Paratyphi B (1,4,[5],12: b: 1,2)	S.Paratyphi B (4,5,12: b: 1,2)	MS
2	D + Vi	d		S.Typhi 9,12[vij: d: -)	S.TyphiVI+ (9,12: d: -)	KS
1	C1	z ₁₀	e,n,x; e,n,z ₁₅	S.Mbandaka (6,7,14: z ₁₀ : e,n,z ₁₃)	S.Mbandaka (6,7: z ₁₀ : e,n,z ₁₃)	MS

Suş sayısı		Moleküler olarak saptanan antijenler			Moleküler tiplendirme sonucu	Konvansiyonel serotiplendirme sonucu	Sonuç	
		Grup	H1	H2				
2	C1	g,m	S.Monteideo (6,7,14: g,m, [p],s: [1,2,7])				S.Monteideo (6,7: g,m,s: -)	MS
			S.Othmarschen (6,7,14: g,m, [t]: -)					
			S.Rumaugat (6,7: g,s,q: -)					
			S.Riggil (6,7: g, (t): -)					
			S.Larose (6,7: g,z ₅₁ : -)					
			S.Haelsingborg (6,7: m,p,t[u]: -)					
			S.Oakey (6,7: m,t: -)					
			S.Oranienburg (6,7,14: m,t,[z ₅₇])					
			S.Othmarschen (6,7: 14: g,m [t]: -)					
			S.Monteideo (6,7,14: g,m[p], s: [1,2,7])					
1	C1	g,m	S.Rumaugat (6,7: g,s,q: -)				S.Othmarschen (6,7: g,m,t: -)	MS
			S.Riggil (6,7: g,(t): -)					
			S.Larose (6,7: g, z ₅₁ : -)					
			S.Haelsingborg (6,7: m,p,t, [u]: -)					
			S.Oakey (6,7: m,t: -)					
			S.Oranienburg (6,7,14: m,t: [z ₅₇])					
			S.Agona (1,4, [5], 12: f,g,s: [1,2])					
			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: -)					
3	B	g,m	S.Kingston (1,4,[5],12,2Z: g,s,t: [1,2])				S.Agona (4,12: f,g,s:-)	MS
			S.Budapest (1,4,12,2Z: g,t: -)					
			S.Banana (1,4,[5],12: m,t: [1,5])					
			S.Corvalis (8,20: z _{4'} , z ₂₃ : -)					
			S.Albany (8,20: z _{4'} , z ₂₄ : -)					
1			1,2;1,5;1,6;1,7		S.Blockley (6,8: k: 1,5)	TF		
2		i			S.Kentucky (8,20: i: z ₆)	TF		

MS: Muhtemel sonuç; KS: Kesin sonuç; TF: Tamamlanmayan formül.

Muhtemel sonuç olarak değerlendirilen suşlarla uyumlu serotiplerin, ülkemizde ve laboratuvarımızda görülme sıklığı dikkate alındığında, serogrup D, H1:g,m antijenleri saptanan 63 suş *S.Enteritidis*, serogrup B, H1:i, H2:1,2,-1,5,-1,6,-1,7 antijenleri saptanan 9 izolat *S.Typhimurium*, serogrup B, H1:b, H2:1,2,-1,5,-1,6,-1,7 antijenleri saptanan 2 izolat ise *S.Paratyphi B* olarak yorumlanmıştır. Konvansiyonel serotiplendirme sonuçlarının da bununla uyumlu olduğu izlenmiştir.

TARTIŞMA

Salmonella türlerinin serolojik tiplendirmesi zaman alıcı, zahmetli ve pahalı bir yöntemdir. Bu nedenle, son yıllarda serotiplendirmede moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır⁵⁻¹⁴. Serogrupların belirlenmesine yönelik çalışmalarda, mPCR yönteminin *Salmonella*'ların serogruplandırılması açısından duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir yöntem olduğu saptanmıştır^{2,6,7,9,11,15}. Çalışmamızda mPCR'nin serogrup B, C1 ve D grubundaki izolatları saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğü diğer çalışmalardakine benzer şekilde %100 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda iki izolatta O:D, H1:d ve Vi antijenleri saptanarak, serotipinin *S.Typhi* olduğu belirlenmiştir. mPCR yönteminin *S.Typhi* serotipini saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. Lim ve arkadaşları² mPCR'nin *S.Typhi*'yi saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğünü benzer şekilde %100 olarak saptamışlardır.

Multipleks PCR ile O:B, H1:b, H2:1,2,-1,5,-1,6,-1,7 antijenleri saptanan iki izolat *S.Paratyphi B*, *S.Limete*, *S.Canada*, *S.Uppsala*'yla uyumlu bulunmuştur. Ancak diğer serotiplerin epidemiyolojik verilere göre ülkemizde görülme olasılığı zayıf olduğundan bu suşlar *S.Paratyphi B* olarak değerlendirilmiş, konvansiyonel serotiplendirmenin de aynı sonucu verdiği gözlenmiştir. Lim ve arkadaşları² O:B, H1:b primerleriyle *S.Paratyphi B*'nin, bu antijenleri taşıyan çok sayıda serotipten ayırt edilemeyeceğini saptamışlardır. Çalışmamızda, H2 mPCR ile muhtemel serotip sayısı azaltılmakla beraber, antijen kompleksindeki antijenlerin ayrı ayrı belirlenememesi, *S.Paratyphi B*'nin kesin olarak serotiplendirilmesi için yeterli olmamaktadır.

Çalışmamızda mPCR ile 63 izolatin O:D, H1:g,m antijenlerini taşıdığı saptanmıştır. Dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalarda¹⁶⁻¹⁸ en sık izole edilen serotip olması nedeniyle bu izolatlar *S.Enteritidis* olarak yorumlanmıştır. Serolojik tiplendirme sonuçları, bu suşların *S.Enteritidis* olduğunu doğrulamıştır. Ancak kullandığımız fliC(g,m) primeriyle; "g,m" antijenleri, yalnız "g" ya da "m" antijeni ya da "g,m" antijenlerini içeren antijen kombinasyonlarının varlığında aynı büyüklükte PCR ürünleri oluşmuştur. Epidemiyolojik verilere dayanılarak, bu antijenleri taşıyan diğer serotipler dışlanabilmekle birlikte, nadiren izole edilebilme olasılığından dolayı, yöntemin *S.Enteritidis*'in serotiplendirilmesinde tek başına yeterli olmadığı, konvansiyonel serotiplendirme veya farklı primerlerle yapılacak mPCR testleriyle desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür. Agron ve arkadaşları¹⁹, *S.Enteritidis*'e özgül *SdfI* lokusuna yönelik primeri kullanarak *S.Enteritidis* suşlarını konvansiyonel yöntemle %100 korele olarak saptamışlardır.

Sekiz suшта mPCR ile O:B, H1:i, H2:1,2,-1,5,-1,6,-1,7 antijenleri saptanarak *S.Typhimurium* ve *S.Lagos*'la uyumlu olduğu belirlenmiştir. Epidemiyolojik veriler doğrultusunda

da bu izolatlar *S.Typhimurium* olarak yorumlanmış ve serotiplendirme sonuçları, görüşümüzü desteklemiştir. Ancak kullandığımız H2 mPCR ile antijen komplekslerindeki antijenler ayrı ayrı belirlenemediğinden, aynı O ve H1 antijen yapısındaki serotipler kesin olarak ayırt edilememiştir. Echeita ve arkadaşları²⁰ çalışmalarında, H2:1,2, H2:1,5, H2:1,7, H2:e,n,z₁₅, H2:e,n,x antijenlerinin her birine özgül PCR ürünleri oluşturmuşlardır. Çalışmamızda, mPCR ile 10 izolatta O:C1, H1:r, H2:1,2,-1,5,-1,6,-1,7 antijenleri saptanarak elde edilen formülün, ülkemizde sık izole edilen *S.Infantis* ve *S.Virchow*'la ayrıca *S.Nigeria* ve *S.Colindale* ile uyumlu olduğu belirlenmiş; ancak yöntemin bu suşların serotiplendirilmesinde yeterli özgüllüğe sahip olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda serotiplendirilen izolatların %2'si kesin, %91'i muhtemel sonuç olarak değerlendirilmiştir. Herrera-Leon ve arkadaşları⁷ ardışık üç mPCR yöntemiyle suşların %84.6'sını kesin, %13.2'sini muhtemel sonuç olarak serotiplendirmişlerdir. Bu durum farklı primer kombinasyonları kullanılarak kesin olarak saptanabilecek suş sayısının artırılabilirliğini göstermektedir.

Moleküler yöntemlerin uygulandığı çeşitli çalışmalarda, konvansiyonel yöntemin zaman alıcı ve pahalı bir yöntem olduğu vurgulanmaktadır^{3,12,13}. Ülkemizde serotiplendirme için gerekli süre referans laboratuvarı tarafından 10-12 gün olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda, bakteriyolojik olarak tanımlanmış ve saklanmış suşların, canlandırılmasından sonra 48 saatte serotiplerinin belirlenebildiği saptanmıştır. 2010 Bütçe Uygulama Talimatı'na göre *Salmonella* serotiplendirmesi 61 TL olarak ücretlendirilmektedir. Çalışmamızda 100 suşun serotiplendirilmesi için gerekli maliyet 550 TL olarak hesaplanmış ve konvansiyonel serotiplendirmeye göre oldukça ucuz olduğu belirlenmiştir. Aynı serogrupta yer alan ve minör antijenik farklılıklarla birbirinden ayrılan suşların değerlendirilmesinde, mPCR yönteminin tarama testi olarak kullanılmasıyla çok sayıda antiserumla yapılması gereken aglütinasyon testlerine gereksinim azalacağından, zaman ve maliyet açısından kazanç sağlanabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, *Salmonella*'ların serogruplandırılmasında mPCR, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir yöntemdir. Moleküler tiplendirmeye bütün serotiplerin belirlenmesi mümkün olmadığından, mPCR yöntemi konvansiyonel serotiplendirmenin alternatifi değildir. Ancak farklı primerlerle alternatif kombinasyonlar oluşturularak belirlenebilecek serotiplerin sayısı artırılabilir. Temel PCR ekipmanlarıyla uygulanabilecek bu yöntem, pahalı ve yorucu olan konvansiyonel serotiplendirmeye olan ihtiyacımızı azaltacaktır.

KAYNAKLAR

1. Munoz N, Diaz-Osorio M, Moreno J, Sanchez-Jimenez M, Cardona-Castro N. Development and evaluation of a multiplex real-time polymerase chain reaction procedure to clinically type prevalent *Salmonella enterica* serovars. *J Mol Diag* 2010; 12(2): 220-5.
2. Lim BK, Thong KL. Application of PCR-based serogrouping of selected *Salmonella* serotypes in Malaysia. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3(6): 420-8.
3. Braun SD, Ziegler A, Methner U, et al. Fast DNA serotyping and antimicrobial resistance gene determination of *Salmonella enterica* with an oligonucleotide microarray-based assay. *PLoS One* 2012; 7(10): e46489.

4. Levent B, Güleşen RK. Gıda ve Su Kaynaklı Enfeksiyon Etkenleri. 2008, 1. baskı. Refik Saydan Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara.
5. 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(10): 3608-15.
6. Lavalett L, Sanchez MM, Munoz N, Moreno J, Cardona-Castro N. Development and validation of a multiplex polymerase chain reaction for molecular identification of *Salmonella enterica* serogroups B, C2, D and E. Biomedica 2009; 29(2): 244-52.
7. 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(2): 122-7.
8. Fitzgerald C, Ghesling 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(12): 7949-53.
9. 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(5): 1861-6.
10. 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(2): 633-6.
11. 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 Microbiol 2008; 8: 178.
12. 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; 49(2): 565-73.
13. 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(5): 1290-9.
14. Barco L, Lettini AA, Ramon E, et al. A rapid and sensitive method to identify and differentiate *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- by combining traditional serotyping and multiplex polymerase chain reaction. Foodborne Pahog Dis 2011; 8(6): 741-3.
15. Luk JM, 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; 31(8): 2118-23.
16. Centers for Disease Control and Prevention. National *Salmonella* Surveillance Annual Summary, 2006. US Department of Health and Human Services, CDC, 2008. Atlanta, Georgia.
17. Erdem B, Ercis S, Haşçelik G. Antimicrobial resistance patterns and serotype distribution among *Salmonella enterica* strains in Turkey, 2000-2002. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24(3): 220-5.
18. Levent B, Sezen F, Güleşen RK. Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA): 2007-2008 Yıllarına Ait Suşların Değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg 2009; 66(2): 25-7.
19. Argon PG, Walker RL, Kinde H, et al. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Appl Environ Microbiol 2001; 67(11): 4984-91.
20. 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(2):107-13.