Nefrolitiazisli Asemptomatik Bir Olgunun İdrar Kültüründen İzole Edilen Mukoid *Salmonella* sp. Suşunun Tür Düzeyinde Tanımlanmasında PCR Yönteminin Değeri

The Value of PCR Method in the Species-Level Identification of a Mucoïd *Salmonella* sp. Strain Isolated from the Urine Culture of a Case with Asymptomatic Nephrolithiasis

Fulya BAYINDIR BİLMAN¹, Elçin GÜNAYDIN², Mine TURHANOĞLU¹, Ali AKKOÇ³

¹ Diyarbakır Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Diyarbakır.

¹ Diyarbakır Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Diyarbakır, Turkey.

² Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı, Ankara.

² Etlik Veterinary Control Center Institute, Bacteriology Laboratory, Ankara, Turkey.

³ Diyarbakır Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, Diyarbakır.

³ Diyarbakır Training and Research Hospital, Urology Department, Diyarbakır, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 01.04.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 18.06.2013

ÖZET

Salmonella cinsinin üyesi olan bakterilerin koloni yapıları genellikle düzgün (smooth, S) özellik göstermektedir. Bu nedenle literatürde mukoid görünümde koloni oluşturan *Salmonella* suşlarına çok nadiren rastlanmaktadır. Mukoid yapıya sahip olan suşların tür düzeyinde tanımlanması konvansiyonel yöntemlerle zor olmaktadır; zira mukus tabakası bakterinin antijenik reaksiyonlara tepki vermesini engellemektedir. Bu çalışmanın amacı, kaba (rough, R) veya mukoid (M) formda *Salmonella* izolatları ile karşılaşılan durumlarda polimeraz zincir reaksiyonu ile serotiplendirmenin hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu vurgulamaktır. Hastanemizde nefrolitiazis tanısı ile takip edilen 17 yaşındaki bir kadın hastanın idrar kültüründe 100.000 cfu/ml mukoid koloni oluşturan gram-negatif basil üremiştir. İzolat, biyokimyasal testler ve Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile *Salmonella* sp. olarak tanımlanmış, bilinen antiserumlarla yapılan aglütinasyon testlerinde negatif sonuç alınmıştır. İzolatın mukoid olmasından dolayı aglütinasyonun oluşmadığı düşünülmüştür. Tanı, Vitek MS MALDI-TOF (bioMérieux, Fransa) analiz yöntemi ile de *Salmonella* sp. olarak doğrulanmış, ancak yine tür düzeyinde tanımlama yapılamamıştır. Mukoid koloninin *Salmonella* sp. olduğu, *invA* primerleri ile yapılan cinse özgül PCR yönteminde yaklaşık

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Fulya Bayındır Bilman, Diyarbakır Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Dağkapı Kampüsü, Diyarbakır, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 505 279 8330, **E-posta (E-mail):** f_bilman@hotmail.com

284 baz çifti (bç) büyüklüğünde PCR ampikonunun oluşması sonucu doğrulanmıştır. Ardından, O:B (O:4), O:C1 (O:7), O:C2-C3 (O:8), O:D (O:9, O:9,46, O:9,46,27), O:E (O:3,10, O:3,19) somatik antijenlerinin tespit edilebildiği bir multipleks PCR (mPCR) ile serogruplandırma yapılmıştır. Mukoid *Salmonella* türünün yaklaşık 615 bç büyüklüğünde bant oluşturduğu ve D grubu içinde yer aldığı tespit edilmiştir. Bu suşun, insanlardan sıklıkla izole edilen D1 grubunda yer alıp almadığını tespit etmek için, O:D1(O:9) ve O:E1(3,10) somatik antijenlerinin belirlenebildiği bir diğer mPCR uygulanmış ve yaklaşık 624 bç büyüklüğünde oluşturduğu bant ile izolatın D1 grubunda yer aldığı belirlenmiştir. D1 grubunda yer alan mukoid *Salmonella* türünün faz-1 flajellar antijenlerinin belirlenmesi için uygulanan mPCR sonucu, izolat *Salmonella* Enteritidis (1,9,12:g,m:-) olarak tiplendirilmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile CLSI'nın önerilerine uygun olarak yapılan antibiyotik duyarlılık testinde izolatın ampisilin, siprofloksasin, seftriakson, trimetoprim-sülfametoksazol ve kloramfenikole duyarlı olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, somatik, flajellar antijenlerin eksprese edilmediği, kaba veya mukoid formda *Salmonella* izolatları ile karşılaşılan durumlarda, PCR yönteminin hızlı ve güvenilir bir alternatif yöntem olarak, konvansiyonel serotiplendirmeye yardımcı olabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: Mukoid *Salmonella*; *Salmonella* Enteritidis; polimeraz zincir reaksiyonu.

ABSTRACT

Colonies of the *Salmonella* strains usually show a smooth (S) character. Therefore, *Salmonella* strains producing mucoid colony are very rarely encountered in the literature. Identification of the mucoid *Salmonella* strains to the species level is difficult via conventional methods, since the mucus layer does not allow the bacterium to respond to the antigenic reactions. In this study we aimed to emphasize the identification of *Salmonella* serotypes by the polymerase chain reaction (PCR) when rough (R) or mucoid (M) *Salmonella* isolates are encountered in the laboratory. The urine culture of a 17-year-old female patient revealed growth of 100.000 cfu/mL gram-negative bacilli in mucoid colony morphology. The isolate was identified as *Salmonella* sp. by biochemical tests and Vitek 2 (bioMérieux, France) automated identification system. Agglutination tests showed negative reaction with the known antisera. Absence of agglutination was attributed to the mucoid character of the isolate. Identification of the *Salmonella* sp. was confirmed by Vitek MS MALDI-TOF (bioMérieux, France) analysis method, however, the serotype of the strain could not be identified. In order to verify that the mucoid colony was *Salmonella* spp., species-specific PCR was performed using invA primers, and *Salmonella* sp. identification was verified by observing a 284 base-pair (bp) PCR amplicon. Subsequently, serogrouping was done by multiplex-PCR (mPCR), which could identify the O:B (O:4), O:C1 (O:7), O:C2-C3 (O:8), O:D (O:9, O:9,46, O:9,46,27), and O:E (O:3,10, O:3,19) somatic antigens. It was detected that the mucoid *Salmonella* sp. formed a band of approximately 615 bp in size and took place in group D. Another mPCR directed towards O:D1(O:9) and O:E1(3,10) somatic antigens to detect subgroups of group D mucoid *Salmonella* spp., revealed that the isolate formed a DNA band of approximately 624 bp in size and took place in group D1 which is usually isolated from human. Modified version of another mPCR was used to determine phase-1 flagellar antigen of common *Salmonella* serovars, as well as to determine the phase-1 flagellar antigen of mucoid *Salmonella* spp. in group D1. Thus, the isolate was serotyped as *Salmonella* Enteritidis (1,9,12:g,m:-). Antibiotic susceptibility test performed by disc diffusion method in line with the recommendations of CLSI, revealed that the isolate was susceptible to ampicillin, ciprofloxacin, ceftriaxone, trimethoprim-sulfamethoxazole and chloramphenicol. In conclusion, PCR is a reliable and rapid alternative method that contributes to the conventional serotyping of *Salmonella* when rough or mucoid strains that lack somatic and flagellar antigens, are isolated.

Key words: Mucoid *Salmonella*; *Salmonella* Enteritidis; polymerase chain reaction.

GİRİŞ

Salmonella türleri, halen dünyada gelişmekte olan/az gelişmiş ülkelerde hemen her mevsimde su ve besin kaynaklı enfeksiyonlara ve salgınlara yol açmaktadır. Tifo ve enterik ateş gibi ciddi klinik tabloların yanı sıra, bu bakterilerle enfekte kişilerin %3'ünde kronik taşıyıcılık da ortaya çıkmaktadır. Klinik şüpheli olguların kesin tanısı, kültür, biyokimyasal testler ve serolojik tiplendirme testleri ile yapılmaktadır. EMB (Eosin-Methylene-Blue) agarda tipik olarak laktoz negatif düzgün kenarlı (smooth, S) koloniler oluşturan *Salmonella* türlerinin, literatürde çok az sıklıkta karşılaşılabilen mukoid bir formunun varlığına da değinilmektedir^{1,2}. Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) referans laboratuvarına gönderilen idrar izolatları arasında zaman zaman düzgün olmayan kenarlı (rough, R), mukoid (M) ve/veya hareketsiz *Salmonella* suşlarının saptanabildiği bildirilmektedir². R tipi suşlar polivalan O grup antiserumları ile zayıf aglütinasyon verirken, M tipi suşlar herhangi bir O antiserumu ile aglütinasyon vermemekte; hareketsiz olan suşlar ise herhangi bir flajellar antijen içermemektedir¹. Bu çalışmanın amacı, nefrolitiazisli bir hastadan izole edilen ve konvansiyonel ve otomatize yöntemlerle tür düzeyinde tanımlanamayan mukoid bir *Salmonella* suşunun tür düzeyinde tanımlanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin değerini vurgulamaktır.

OLGU SUNUMU

Hastanemizde nefrolitiazis tanısı ile izlenen 17 yaşında bir kadın hastadan alınan idrar kültüründe EMB (Merck, Almanya) ve kanlı agarda (Merck, Almanya) 100.000 cfu/ml yoğun mukoid özellikte bir bakteri üremiş ve yapılan Gram boyamada negatif basiller görülmüştür. Bakteri, TSI (Triple-sugar-iron) agarda H₂S ve gaz üretimi; sitrat agarda pozitif ve üreli agarda negatif reaksiyonuna göre *Salmonella* sp. olarak tanımlanmıştır. İzolat, Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile de cins düzeyinde tanımlanmış, ancak tür düzeyinde tanımlama yapılamamıştır. *Salmonella* serogrup O antijenleri için polivalan antiserumla ve O ve H antijenlerine özgül antiserumlarla yapılan aglütinasyon reaksiyonları negatif sonuç vermiştir. Bu durumun bakteri kolonilerinin aşırı mukoid özellikte olması ile ilişkili olduğu ve aglütinasyonun engellendiği kanısına varılmıştır. Bunun üzerine tanımlama için Vitek MS MALDI-TOF yöntemi (bioMérieux, Fransa) kullanılmış; sonuç *Salmonella* sp. olarak alınmış ve tür adı yine belirlenememiştir. Mukoid koloni, ancak PCR yöntemi ile tür düzeyinde tanımlanabilmiştir.

PCR Yöntemi

Mukoid koloninin *Salmonella* sp. olduğunun doğrulanması için öncelikle *invA* primerleri kullanılarak cinse özgül PCR gerçekleştirildi³ (Tablo I). Reaksiyon karışımı; 2.5 µl 10X PCR tamponu (MgCl₂ içermeyen), 1.5 µl MgCl₂ (25 mM), 0.2 µl dNTP (25 mM), her bir primerden (10 pmol/µl) 0.5'er µl, 0.25 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl, Fermentas; EP402), 18.55 µl deionize su ve 1 µl kalıp (template) olmak üzere toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon protokolü; 94°C'de 2 dk ön denatürasyon, 30

Tablo 1. PCR ve Multipleks PCR’de Kullanılan Primerler

Primer adı	Baz dizilimi	Ürün Büyüklüğü	Kaynak
<i>Salmonella</i> cinsine özgül PCR			
invA1	5’-GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA-3’	284 bç	Rahn ve ark. ³
invA2	5’-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3’		
<i>Salmonella</i> serogrup multipleks PCR			
F-tyvD	5’-GAGGAAGGGAAATGAAGCTTTT-3’	615 bç	Herrera-Leon ve ark. ⁴
R-tyvD	5’-TAGCAAAGTGTCTCCCACCATAC-3’		
F-wzxB	5’-GGCATATATTTCTGTATTCGCG-3’	230 bç	
R-wzxB	5’-GCCTTAATTAAGTAAGTTAGTGGAAGC-3’		
F-wzxC1	5’-CAGTAGTCCGTAAAATACAGGGTGG-3’	483 bç	
R-wzxC1	5’-GGGGCTATAAATACTGTGTTAAATTCC-3’		
F-wzxC2-C3	5’-ACTGAAGGTGGTATTTTCATGGG-3’	154 bç	
R-wzxC2-C3	5’-AAGACATCCCTAACTGCCCTGC-3’		
F-wzxE	5’-TAAAGTATATGGTGCTGATTTAACC-3’	345 bç	
R-wzxE	5’-GTTAAAATGACAGATTGAGCAGAG-3’		
<i>Salmonella</i> D1-E1 gruba özgül multipleks PCR			
F-D1	5’-ATGGGAGCGTTTGGGTTC-3’	624 bç	Hong ve ark.
R-D1	5’-CGCCTCTCCACTACCAACTTC-3’		
F-E1	5’-GATAGCAACGTTCTGGAAATTC-3’	281 bç	
R-E1	5’-CCCAATAGCAATAAACCAAGC-3’		
<i>Salmonella</i> Faz-1 multipleks PCR			
F-Sense-60	5’-GCAGATCAACTCTCAGACCCTGGG-3’		Herrera-Leon ve ark. ⁶
Antisense-i	5’-ATAGCCATCTTTACCAGTTCC-3’	250 bç	
Antisense-z10	5’-CGTCGCAGCTTCTGCAACC-3’	400 bç	
Antisense-l,v	5’-CCTGTCACTTTCTGTTAT-3’	300 bç	
Antisense-r	5’-AAGTGACTTTTCCATCGGCTG-3’	275 bç	
F-G	5’-GTGATCTGAAATCCAGCTTCAAG-3’	500 bç	
R-G	5’-AAGTTTCGCACTCTCGTTTTTGG-3’		
F-Sdf-I	5’-TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG-3’	300 bç	
R-Sdf-I	5’-CGTTCTTCTGGTACTTACGATGAC-3’		

F: Forward; R: Reverse; bç: baz çifti.

döngü 94°C’de 30 sn, 57°C’de 40 sn, 72°C’de 30 sn birleşme, 72°C’de 5 dk son uzama şeklinde uygulandı. Mukoid koloninin, yaklaşık 284 baz çifti (bç) büyüklüğünde PCR ampikonu oluşturduğu ve *Salmonella* sp. olduğu doğrulandı (Şekil 1).

Ardından, O:B (O:4), O:C1 (O:7), O:C2-C3 (O:8), O:D (O:9, O:9,46, O:9,46,27), O:E (O:3,10, O:3,19) somatik antijenlerinin tespit edilebildiği bir multipleks PCR ile

Şekil 1. *Salmonella* cinsine özgül PCR görüntüsü [Hat 1: 100 bç DNA belirteci (Fermentas, SM0241); Hat 2: *Salmonella* Typhimurium; Hat 3: Mukoid *Salmonella* izolati; Hat 4: Negatif kontrol (ddH₂O)].

serogruplandırma yapıldı⁴ (Tablo I). Reaksiyon karışımı; 2.5 µl 10X PCR tamponu (MgCl₂ içermeyen), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 0.2 µl dNTP (25 mM), her bir primerden (5 pmol/µl) 0.5'er µl, 0.25 µl Taq DNA polymerase (5 U/µl, Fermentas; EP402), 13.05 µl deionize su, 1 µl kalıp olmak üzere toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon protokolü; 94°C'de 2 dk ön denatürasyon, 30 döngü 94°C'de 30 sn, 58°C'de 40 sn, 72°C'de 30 sn birleşme, 72°C'de 5 dk son uzama şeklinde uygulandı. Buna göre mukoid *Salmonella* izolatının yaklaşık 615 bç büyüklüğünde bant oluşturduğu ve D grubu içinde yer aldığı tespit edildi (Şekil 2).

D grubunda yer alan mukoid *Salmonella* suşunun, insandan sıklıkla izole edilen D1 grubunda yer alıp almadığını tespit etmek için, O:D1(O:9) ve O:E1(3,10) somatik antijenlerinin belirlenebildiği bir multipleks PCR uygulandı⁵ (Tablo I). Reaksiyon karışımı; 2.5

Şekil 2. *Salmonella* serogrup multipleks PCR görüntüsü [Hat 1 ve 9: 100 bç DNA belirteci (Fermentas, SM0241); Hat 2: *Salmonella* Enteritidis (D grubu; O:9, O:9,46, O:9,46,27); Hat 3: *Salmonella* Anatum (E grubu; O:3,10, O:3,19); Hat 4: *Salmonella* Infantis (C1 grubu; O:7); Hat 5: *Salmonella* Kentucky (C2-C3; O:8); Hat 6: *Salmonella* Typhimurium (O:4); Hat 7: Mukoid *Salmonella* izolati; Hat 8: Negatif kontrol (ddH₂O)].

µl 10X PCR tamponu (MgCl₂ içermeyen), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 0.2 µl dNTP (25 mM), her bir primerden (5 pmol/µl) 0.5'er µl, 0.25 µl Taq DNA polymerase (5 U/µl, Fermentas; EP402), 16.05 µl deionize su, 1 µl kalıp olmak üzere toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon protokolü; 94°C'de 2 dk ön denatürasyon, 30 döngü 94°C'de 30 sn, 57°C'de 40 sn, 72°C'de 30 sn birleşme, 72°C'de 5 dk son uzama şeklinde gerçekleştirildi. Buna göre mukoid *Salmonella* türünün, yaklaşık 624 bç büyüklüğünde DNA bandı oluşturduğu ve D1 grubunda yer aldığı belirlendi (Şekil 3).

D1 grubunda olduğu saptanan izolatin, faz-1 flajellar antijenlerinin belirlenmesi için diğer bir multipleks PCR yöntemi kullanıldı⁶. Bu yöntem ile H:i, H:z10, H:l,v, H:r ve H:G (g,m) kompleks flajellar antijenlerini çoğaltan özgül primerler ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis)'in 2. fazı sergilenmediği için bu serovarı özgül olarak çoğaltan sdf1 primerlerinden yararlanıldı (Tablo I). Reaksiyon karışımı; 4 µl 10X PCR tamponu (MgCl₂ içermeyen), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 0.2 µl dNTP (25 mM), 0.5 µl Sense-60 (20 pmol/µl), 0.5 µl Antisense-i (5 pmol/µl), 0.5 µl Antisense-z10 (5 pmol/µl), 0.5 µl Antisense-lv (5 pmol/µl), 0.5 µl Antisense-r (5 pmol/µl), 0.5 µl Gcomplex-F (5 pmol/µl), 0.5 µl Gcomplex-R (5 pmol/µl), 0.5 µl Sdf1-F (5 pmol/µl), 0.5 µl Sdf1-R (5 pmol/µl), 0.25 µl Taq DNA polymerase (5 U/µl, Fermentas; EP402), 11.05 µl deionize su, 1 µl kalıp olmak üzere toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon protokolü; 94°C'de 5 dk ön denatürasyon, 30 döngü 94°C'de 30 sn, 59°C'de 40 sn, 72°C'de 30 sn birleşme, 72°C'de 5 dk son uzama şeklinde gerçekleştirildi. Buna göre mukoid *Salmonella* izolatinın, 500 bç büyüklüğünde DNA bandı oluşturmasıyla H:G kompleks (g,m) pozitif olduğu tespit edilirken, sdf1 primerleri ile de 300 bç'lik amplifikasyon vermesi sonucu *Salmonella* Enteritidis (1,9,12: g,m: -) olarak tiplendirildi (Şekil 4).

Tüm PCR döngüleri, ısı döngü cihazında (Arktik, Thermoscientific) gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinden 5 µl alınarak, 1 µl 6X "loading dye" solüsyonu yüklendi;

Şekil 3. *Salmonella* D1-E1 gruba özgül multipleks PCR görüntüsü [Hat 1: 100 bç DNA belirteci (Fermentas, SM0241); Hat 2: *Salmonella* Enteritidis (D1 grubu; O:9); Hat 3: *Salmonella* Anatum (E1 grubu; 3:10); Hat 4: Mukoid *Salmonella* izolati; Hat 5: Negatif kontrol (ddH₂O)].

Şekil 4. *Salmonella* Faz-1 flajellar antijenlerinin multipleks PCR görüntüsü [Hat 1 ve 11: 50 bç DNA belirteci (Fermentas, SM0371); Hat 2: 100 bç DNA belirteci (Fermentas, SM0241); Hat 3: *Salmonella* Enteritidis (H:g,m); Hat 4: *Salmonella* Typhimurium (H:i); Hat 5: *Salmonella* Infantis (H:r); Hat 6: *Salmonella* Hadar (H:z10); Hat 7: *Salmonella* Brandenburg (H:l,v); Hat 8: Negatif kontrol (ddH₂O); Hat 9: Mukoid *Salmonella* izolati; Hat 10: Boş].

0.5 µl/ml etidyum bromür ile boyanan %2'lik agaroz jelde 100 V elektrik akımında 45 dk yürütülerek elektroforez işlemi yapıldı. Agaroz jel UV translüminatöre transfer edilerek, oluşan bantlar DNA belirteci ve pozitif kontroller yardımıyla UV ışığı altında görüntülendi ve değerlendirildi.

Tür düzeyinde tanımlanan suşun antibiyotik duyarlılık testi CLSI⁷ önerilerine uygun olarak, disk difüzyon yöntemiyle yapıldı ve izolatin ampicilin, kloramfenikol, seftriakson, siprofloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazole (Bioanalyse, Türkiye) duyarlı olduğu saptandı.

TARTIŞMA

İnsan ve hayvanlarda yaygın enfeksiyon etkeni olan *Salmonella* serotiplerinden, özellikle *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis)'in görülme sıklığı dünya genelinde giderek artmış ve ülkemizde de yıllardan beri insan enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan serotip olmuştur⁸. *S.Enteritidis*'in hem gastroenterit olgularından hem de bağırsak dışı enfeksiyonlardan sıklıkla izole edildiği bilinmektedir⁸. Genellikle gıda kaynaklı salgınlara yol açan, ancak sporadik olarak da saptanan *S.Enteritidis*'in, Batı Avrupa'da "Enterik Enfeksiyonların Ulusal Sürveyans Ağı (Enter-net)"na ait ulusal referans laboratuvarlarında en sık tanımlanan serotip olduğu bildirilmektedir⁹.

Literatürde, mukoid *Salmonella* izolatlarıyla ilgili bildirim pek rastlanmamaktadır. Almanya'dan bildirilen, idrar kültüründen izole edilen mukoid formda bir *Salmonella* suşunun tanımlanmasında yaşanan benzer zorluklar nedeniyle, araştırmacılar, bakterinin M formdan N ya da T1 forma transformasyonunu gerçekleştirerek antiserumlarla aglütinasyonu sağlayabildiklerini bildirmişlerdir². Bu çalışmada, transformasyon bakterinin oda ısısında bekletilmesi veya U tüpte besiyerine pasaj yapılması yöntemiyle sağlanmıştır². Bu yöntemi örnek alarak, izolatomuzu antiserumlarla yeniden karşılaştırdığımızda da aglütinasyonun yine negatif olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızla benzer olarak; Herrera-Leon ve arkadaşları⁴ özellikle O (somatik) antijenini kaybedip kaba (rough) suşa dönüşen veya flajellar antijenlerini eksprese etmeyen ve monofazik veya hareketsiz duruma geçen *Salmonella*'ları konvansiyonel yöntemlerle tanımlayamamış, ancak multipleks PCR (mPCR) ile tespit edebildiklerini bildirmişlerdir. Yaklaşık 20 yıldır *Salmonella* izolatlarının PCR tabanlı yöntemlerle karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapılmaktadır¹⁰⁻¹². Bu yöntemler bazı çalışmalarda direkt somatik antijenlerin^{4,5,13} bazılarında ise flajellar antijenlerin^{6,14,15} tespit edilmesine yöneliktir. Herrera-Leon ve arkadaşlarının⁴ çalışmasında, mPCR ile 500 *Salmonella* izolatının 423'ü serogruplandırılabilmiş; ayrıca konvansiyonel yöntemlerle serotiplendirilemeyen beş (biri otoaglutinasyon veren, dördü hareketsiz olan) *S. Enteritidis* suşunun tiplendirilmesi mümkün olmuştur. Bu araştırmacılar, klasik ve moleküler serotiplendirme yöntemleri arasındaki korelasyonu %99.2 olarak bildirmişlerdir⁴. Herrera-Leon ve arkadaşları⁶ bir başka çalışmalarında da, optimize ettikleri faz-1 mPCR ile *Salmonella* izolatlarının %80'ini doğru olarak tespit edebildiklerini rapor etmişlerdir. Echeita ve arkadaşları¹⁵ ise, 10 primer çifti ile 49 farklı serotipe ait toplam 140 *Salmonella* izolatı ile yaptıkları çalışmada, faz-2 antijenlerinin saptanmasında mPCR yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünü %100 olarak bildirmişlerdir. Gerek *S. Enteritidis*'in faz-2 flajellar antijenini eksprese etmemesi, gerekse *S. Enteritidis*'e özgül sdf1 primerleri faz-1 mPCR yönteminde kullanmış olmamız nedeniyle, çalışmamızda faz 2 antijenlerine bakmaya gerek kalmamıştır⁶.

Çalışmamızda, nefrolitiazisli bir olgunun idrar örneğinden izole edilen mukoid *Salmonella* sp. suşu, mPCR ile *S. Enteritidis* (1,9,12:g,m:-) olarak tiplendirilmiş ve bu izolatın konvansiyonel serotiplendirme ile tiplendirilmesinin oldukça zor, hatta olanaksız olduğu düşünülmüştür. Dolayısıyla PCR, somatik, flajellar antijenlerin eksprese edilmediği, kaba veya mukoid formda *Salmonella* izolatları ile karşılaşılan durumlarda hızlı ve güvenilir alternatif bir yöntem olarak, konvansiyonel serotiplendirmeye destek olacaktır. Sonuç olarak moleküler tiplendirmenin, *Salmonella* sürveyansının duyarlılık ve özgüllüğünü artırmakta ve geleneksel tanımlama yöntemleriyle saptanamayacak ve salgınları tetikleyebilecek olguların zamanında doğru tespit edilmesinde büyük rol oynayacağı akılda tutulmalıdır.

TEŞEKKÜR

İzole ettiğimiz suşun Vitek MS MALDI-TOF sistemi (bioMérieux, Fransa) ile çalışılmasındaki katkılarından dolayı bioMérieux Firması'ndan Dr. Ahmet Süel'e teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Nataro JP. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*, pp: 682-3. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 2009, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
2. Wuthe HH, Aleksic S, Podschun R, et al. Urinary tract infection due to a mucoid (M) form of *Salmonella*. A new transformation from M form into T1 form. *Zbl Bakt* 1992; 277(1): 74-9.

3. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, et al. Amplification of *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as specific method of detection of *Salmonella*. Mol Cell Probes 1992; 6(4): 271-9.
4. 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.
5. 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.
6. Herrera-Leon S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garazier J, Echeita MA. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. J Clin Microbiol 2004; 42(6): 2581-6.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları. Yirmi ikinci Bilgi Eki, M100-S22, 2012. Gür D (Çeviri ed), Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, İstanbul.
8. Erdem B, Haşcelik G, Gedikoğlu S, et al. *Salmonella enterica* serotypes and *Salmonella* infections: a multi-center study covering ten provinces in Turkey. Mikrobiyol Bul 2004; 38(3): 173-86.
9. Fisher IS. Enter-net participants. Dramatic shift in the epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types in western Europe, 1998-2003 results from the Enter-net international salmonella database. Euro Surveill 2004; 9(11): 43-5.
10. Aarts HJ, Van Lith LA, Keijer J. High resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. Lett Appl Microbiol 1998; 26(2): 131-5.
11. Garaizar J, Lopez-Molina N, Laconcha I, et al. Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Appl Environ Microbiol 2000; 66(12): 5273-81.
12. Lindstedt BA, Heir E, Vardund T, Kapperud G. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. J Clin Microbiol 2000; 38(4): 1623-7.
13. 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.
14. Echeita MA, Usera MA. Rapid identification of *Salmonella* spp. phase 2 antigens of the H1 antigenic complex using "multiplex PCR". Res Microbiol 1998; 149(10): 757-61.
15. 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.