

## Yaygın *Salmonella* Serovarlarının Moleküler Tekniklerle Tiplendirilmesi

Elçin Günaydın<sup>1</sup>, Selahattin Şen<sup>2</sup>, K. Serdar Diker<sup>3</sup>, Derya Karataş Yeni<sup>4</sup>, Özlem Kardoğan<sup>5</sup>, H. Kaan Müştak<sup>3</sup>, Özlem Şahan<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Yetiştirme Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara

<sup>2</sup> Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı, Ankara

<sup>3</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>4</sup> Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Viral Aşı Üretim Laboratuvarı, Ankara

<sup>5</sup> Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Kanatlı hayvan Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara

<sup>6</sup> Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Burdur

Geliş Tarihi / Received: 10.09.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 16.10.2017

**Özet:** Bu çalışmanın amacı, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü (VKMAE), Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı sorumluluğunda 2009-2011 yılları arasında *Salmonella* Prevalans çalışması kapsamında, Kauffmann-White serotiplendirme şeması ile tiplendirmesi yapılan toplam 907 *Salmonella* izolatının, serogrup *Salmonella* multiplex-PZR, Faz 1 *Salmonella* multiplex-PZR ve Faz 2 *Salmonella* multiplex-PZR kullanarak sahada yaygın olarak sirküle olan *Salmonella* serovarları için dizayn edilen primerler ile maksimum 2-3 gün gibi kısa sürede, düşük maliyetle tiplendirmesini yapabilmektir. Bu çalışmayla, konvansiyonel yöntemle faz 1 ve faz 2 antijenlerinin eş zamanlı sergilenmemesi sonucunda ekstra laboratuvar iş yükü, olası çarpaz reaksiyonlar sebebiyle ekstra antiserum harcanması dolayısıyla yaşanan zaman kaybı ve yüksek maliyetin üstesinden gelineceği öngörüldü. Ayrıca, 2 testin (multiplex-PZR ve konvansiyel serotiplendirme) örtüşmediği durumlar bakterilerin 6.5 kb operonunu inceleyen ribotiplendirme desteğiyle çözülmesi yoluna gidilmiştir. Çalışmada kullanılacak primerler ile 907 izolatın % 29.32'sinin (266 izolat; 15 farklı serovar) üç antijenik yapısı da tam olarak tanımlanmış ve isimlendirilmiştir. İncelenen izolatların somatik, flagellar 1 ve flagellar 2 antijenlerinin sırasıyla; %54.56 (490), %90.95 (825) ve %78.94 (716)'ü tespit edilebilmiştir. İzolatların en azından % 50'sinin tam olarak isimlendirilebileceği öngörülmüştür ancak *Salmonella* Infantis (*S. Infantis*) ve *S. Mbandaka* suşlarında somatik antijeni amplifiye eden primer olmasına rağmen somatik antijen tespit edilememiştir. Bu suşlar ribotiplendirmeye alınmıştır. Konvansiyonel seroloji, multiplex-PZR ve ribotiplendirme değerlendirildiğinde; ribotiplendirme ve multiplex-PZR'ların gold standart metoda destek metodlar olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Özet olarak; çalışmada mevcut olan primerler sadece sahada yaygın olan serovarların somatik, faz 1 ve faz 2 antijenlerine spesifik oldukları için PZR tüm serovarları tanımlamada yetersiz kalmıştır. Sonuç olarak ucuz, hızlı ve duyarlı metod olan multiplex-PZR'ların belirli somatik, flagellar 1 ve 2 antijenlerinin tespitinde konvansiyonel serolojik yöntemle destek olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Salmonella* serovarları, Multiplex-PZR

### Molecular Typing of Common *Salmonella* Serovars

**Abstract:** The purpose of this study was to identify total 907 *Salmonella* isolates had been formerly identified by using Kauffmann-White serotype scheme on the scope of *Salmonella* Prevalance Study between 2009-2011 under the responsibility of Veterinary Control Central Research Institute, Bacteriological Diagnosis Laboratory; by performing serogroup *Salmonella* multiplex-PCR, phase-1 *Salmonella* multiplex-PCR, phase-2 *Salmonella* multiplex-PCR with the specific primers designed for the common *Salmonella* serovars circulating around the field, in maximum 2-3 days, relatively short time, with a low cost. With this study, extra laboratory work load due to phase 1 and phase 2 flagellar antigens not being expressed synchronously, dilution of time and high cost due to probable cross-reactions requiring extra antiserum usage are envisaged to have been overcome. Moreover, the occasions where 2 tests (multiplex-PCRs and conventional serotyping) are not overlapped was resolved with the support of ribotyping which examine the 6.5 kb operone of bacteriae. Consequently, identification by both methods, and evaluating the results comparatively is thought to be beneficial. With the primers used in the study, three antigenic structures of 29.32% (266 isolates; 15 different serovars) of the 907 isolates were fully identified. Somatic, phase 1 and phase 2 antigens were determined with a percentage of 54.56 (490 isolates), 90.95 (825 isolates) and 78.94 (716 isolates), respectively. At least 50% of the isolates were presumed to be fully identified. However, the somatic antigen of *Salmonella* Infantis (*S. Infantis*) ve *S. Mbandaka* were not detected although the primers amplifying somatic antigen were present. These two serovars were ribotyped. When conventional serology, multiplex-PCRs and ribotyping were evaluated, multiplex-PCRs and ribotyping were found to be supportive to conventional serology. In a summary, due to present primers, specific to somatic, phase 1 and phase 2 of

the only common *Salmonella* serovars in the field, PCR has deficiencies for identifying whole serovars. Consequently, the multiplex-PCRs termed cheap, sensitive, and rapid were decided to be supportive to conventional serology for defining specific somatic, phase 1 and 2 antigens.

**Key words:** *Salmonella* serovars, Multiplex-PCR

## Giriş

*Salmonella*, hayvanların ve insanların en önemli patojenlerinden biri olup, aynı zamanda zoonozdur. Günümüze kadar tiplendirilen toplam 2700' e yakın *Salmonella* serovarı mevcuttur. Bunlardan 2587 adedi *Salmonella enterica*, 23 adedi *Salmonella bongori* alt grubunda bulunmaktadır (8). *Salmonella enterica* altı alt türden oluşmaktadır; *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* ve *Salmonella enterica* subsp. *indica* veya sırasıyla *Salmonella enterica* subsp. I, II, IIIa, IIIb, IV ve VI (17). *Salmonella enterica* subsp. I genellikle insanlardan ve sıcak-kanlı hayvanlardan izole edilir. Klinik laboratuvarlarda izole edilen serotiplerin büyük çoğunluğu; 1547 adedi bu alt türe aittir (8, 17).

*Salmonella* serovarlarının isimlendirirken, Kauffmann-White serotiplendirme şeması, *Salmonella* izolatlarının tiplendirmesinde birçok laboratuvar tarafından kullanılmaktadır. Serotiplendirme, *Salmonella*'nın hücre duvarında bulunan somatik (O) ve flagellar (H) faktör antijenleri temel alınarak yapılır. H faktörü *Salmonella* suşunun serotip kimliğini belirlerken, O faktörü grubu tespit eder (8). O antijenleri, gram negatif bakterilerin önemli komponentlerinden olan lipopolisakariti (LPS) oluşturan spesifik polisakaritlerdir. O antijen sentezinden sorumlu genler, *rfb* diye isimlendirilen bir gen kümesinde, kromozom üzerinde grup halinde bulunurlar (2). *rfb* genleri nükleotid şeker biyosentez yolunu ve tekrarlayan ünitelerin bir arada bulunması için gerekli olan transferazları kodlamaktadır. Oniki potansiyel transmembran segmentini içeren proteini kodlayan ve daha önceleri *rfbX*, şimdi ise *wzx* olarak adlandırılan gen, tüm *Salmonella* O antijen gen kümelerinde bulunmaktadır. Farklı O antijen kümelerinden *wzx* proteinin yapısal homoloji gösterdiği fakat aminoasit sekans seviyesinde çok az bir benzerliğin olduğu öngörülmektedir (15). *Wzx*'in sitoplazmik membranın sitoplazmik kısmından periplazmik kısmına

O-ünitelerinin transferinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (20).

Faz 1 ve faz 2 flagellar H antijenleri alternatif olarak, sırasıyla *fliC* ve *fliB* genleri sorumluluğunda faz varyasyon mekanizması tarafından eksprese edilirler. Bu genler kromozom üzerinde farklı iki lokalizasyonda bulunurlar. *fliBA* operonu, Hin rekombinazı kodlayan hin genini içerir; *fliB* geni fase 2 flagellinlerini, *fliA* geni de *fliC* için reprösörü kodlamaktadır. Hin rekombinaz geni, *fliBA* operonu için promotör içeren kromozomun 993 bp'lık segmentinin reversible inversiyonunu katalize eder. Bir oryantasyonda, promotör *fliC* geninin represyonuna yol açarak, *fliA* ve *fliB* genlerinin transkripsiyonunu sağlar. Hin'in diğer oryantasyonunda *fliA* ve *fliB* genleri eksprese edilmez, faz 2 flagellinin üstü kapanır, bu da faz 1 flagellinin eksprese edilmesini olanaklı hale getirir. (13, 25). Bu allelerden bazıları tek bir faktörle (i, d veya r), diğerleri ise birçok alt faktörle (l,v, g,m, e,n,x) tanımlanır. *Salmonella* flagellinlerinin aminoasit sekanslarının karşılaştırması ile 8 farklı bölge tanımlanmıştır. Amino ve karboksi terminal sekansları (sırasıyla bölge I ve II ve bölge VIII) oldukça korunmuştur. Polimerizasyon ve transport için çok önemli oldukları düşünülmektedir. Bölge IV, V ve VI'dan oluşan merkez bölge ise hem sekanslarda hem de flagellar antijenler arası uzunluklarda çok fazla çeşitlilik gösterir ve genelde H antijeninin epitopunu belirlediği düşünülmektedir (16, 23).

Yukarıda *Salmonella* somatik ve flagellar antijenlerinin ekspresyonu ile ilgili açıklamalar yapılmıştır. Flagellar 1 ve flagellar 2 antijenlerinin eş zamanlı sergilenmemesi dolayısıyla konvansiyonel yöntemde, flagellar antijenlerin ayrı ayrı açığa çıkarılmasıyla *Salmonella*'nın karakterizasyonu yapılabilmektedir (17). Bu çerçevede, konvansiyonel yöntemle bu işlem, her şey yolunda giderse, minimum 5 iş günü gibi bir zaman dilimini, çapraz reaksiyonlar sebebiyle bazen tekrarları ve gerek besiyeri gerekse antiserum harcamaları dolayısıyla yüksek bir maliyeti gerektirmektedir.

Uzun yıllardır, Salmonellaların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)-tabanlı yöntemlerle karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapılmaktadır. *Salmonella* serotipleri arasında veya özel bir serotip içerisinde ayırım yapmak için tanımlanan moleküler PZR tabanlı metotlar mevcuttur (1, 7, 12). Çalışmamızda, serogruplandırma; 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), O:D1(O:9) ve O:E1(3,10) somatik antijenlerini (10, 11), faz 1'in tiplendirilmesinde; H:i, H:z10, H:b, H:e,h, H:l,v, H:r, H:G kompleks flagellar antijenlerini çoğaltan spesifik primerler kullanılacaktır (9). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (*Salmonella* *Enteritidis*)'in 2. fazı sergilenmediği için bu serovarı spesifik çoğaltan sdf1 primerlerinden faydalanılacaktır (9). Faz 2'nin tiplendirilmesinde ise; H:1,5, H:1,6, H:1,7, H:1,2, H:l,w, H:e,n,z15 flagellar antijenleri spesifik primerler ile çoğaltılacaktır (5).

Çok uzun yıllardır, Kaufmann-White *Salmonella* serotip şemasının kullanımı ile elde edilen epidemiyolojik verilerin oldukça yararlı olduğu kanıtlanmıştır (8, 17). Bu nedenle hem PZR-tabanlı moleküler tiplendirme hem de Kaufmann-White *Salmonella* serotip şemasının kullanımı ile yapılan serolojik tiplendirme paralel götürülerek, PZR-tabanlı tiplendirmenin bilinen, kabul görmüş geleneksel yöntemle örtüşür sonuçlar vermesi arzu edilmektedir.

Bu çalışmada amaçlanan, *Salmonella* serovarlarının tanısına ek, destek, alternatif olabilecek, daha hızlı, ucuz ve duyarlı olan moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ve optimizasyonudur.

## Materyal ve Metot

### A) Materyal

**1. *Salmonella* suşları:** Veteriner Kontrol Merkez araştırma Enstitüsü (VKMAE) Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı'nda 2009-2011 yılları yürütülen *Salmonella* Survey'de izole ve identifiye edilen 907 adet *Salmonella* izolatu çalışıldı.

**2. *Salmonella* Standart suşlar:** Pozitif kontrol olarak, laboratuvarın katıldığı Uluslararası Karşılaştırma Yeterlilik Testleri'nde tiplendirme amacıyla gönderilen *Salmonella* serovarları optimizasyon sırasında pozitif kontrol suş olarak kullanıldı.

**3. Primerler:** Multiplex-PZR'larda kullanılan primer çiftleri baz dizilimleri ayrıntılı olarak verilmiştir.

a) Multiplex-PZR serogruplandırma için (Herrera-Leo'n Silvia ve ark. 2007) (10)

Primer adı	Baz Dizilimi (5'-3')
F-tyvD	5'-GAGGAAGGGAAATGAAGCTTTT-3'
R-tyvD	5'-TAGCAAAGTGTCTCCACCATAC-3'
F-wzxB	5'-GGCATATATTTCTGTATTTCGCG-3'
R-wzxB	5'-GCCTTAATTAAGTAAGTTAGTGGAAGC-3'
F-wzxC1	5'-CAGTAGTCCGTAATAACAGGGTGG-3'
R-wzxC1	5'-GGGGCTATAAATACTGTGTAAATTCC-3'
F-wzxC2-C3	5'-ACTGAAGGTGGTATTTTCATGGG-3'
R-wzxC2-C3	5'-AAGACATCCCTAACTGCCCTGC-3'
F-wzxE	5'-TAAAGTATATGGTGTGATTAACC-3'
R-wzxE	5'-GTAAAAATGACAGATTGAGCAGAG-3'

b) D1 ve E1 serogruplarının ayırımı için Multiplex-PZR (Hong Y ve ark. 2008) (11)

Primer adı	Baz Dizilimi
F-D1	5'-ATGGGAGCGTTTGGGTTC-3'
R-D1	5'-CGCTCTCCACTACCAACTTC-3'
F-E1	5'-GATAGCAACGTTTCGGAAATTC-3'
R-E1	5'-CCCAATAGCAATAAACCAAGC-3'

c) Multiplex-PZR Faz-1 için (Herrera-Leon Silvia ve ark., 2004) (9)

Primer adı	Baz Dizilimi
Sense-60	5'-GCAGATCAACTCTCAGACCCTGGG-3'
Antisense-i	5'-ATAGCCATCTTTACCAGTTCC-3'
Antisense-z10	5'-CGTCGCAGCTTCTGCAACC-3'
Antisense-b	5'-CGCACCAGTCYWACCTAAGGCGG-3'
Antisense-eh	5'-AACGAAAGCGTAGCAGACAAG-3'
Antisense-lv	5'-CCTGTCACTTTCTGTGGTTAT-3'
Antisense-r	5'-AAGTGACTTTTCCATCGGCTG-3'
Forward-G	5'-GTGATCTGAAATCCAGCTTCAAG-3'
Reverse-G	5'-AAGTTTCGCACTCTCGTTTTTGG-3'
Forward-Sdf-1	5'-TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG-3'
Reverse-Sdf-1	5'-CGTCTCTGGTACTTACGATGAC-3'

d) Multiplex-PZR Faz-2 için (Echeita MA ve ark., 2002) (5)

Primer adı	Baz Dizilimi
Sense-F1	5'-CTATGCCRATAATGGTACTACTG-3'
Antisense-R5	5'-GGTTACAGVAGCCGTACCAG-3'
Antisense-R6	5'-CTCCTGTACTTCTGTTTTGGTTGTA-3'
Antisense-R7	5'-TAATCGCCATTTTGTGCGAG-3'
Antisense-R1	5'-TTGACCAAYKYMGCSCAT-3'
Sense-Fw 5	5'-GTGGGGCAACMCTCAATACTG-3'
Antisense-Rw 5	5'-CCTGCCACTTTCGTGGTTGC-3'
Sensen-Fe	5'-GGCAACCCGACAGTAACTGGCGATAC-3'
Antisense-Rx	5'-CCATCCTTAAAGGATACGGC-3'
Antisense-Rz15	5'-ATCAACGGTAACTTCATATTG-3'

**3. Taq DNA Polymerase:** Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific Taq DNA Polymerase, Cat no: EP0402) kullanıldı.

**4. DNA Ekstraksiyon Kiti:** DNA ekstraksiyonları ticari DNA ekstraksiyon kiti ile (DNeasy Blood & Tissue Kits, Qiagen, Cat No 69504) yapıldı.

### 3. Serogrup Multiplex-PZR için Reaksiyon Hacmi ve Parametreler

Reagent	Miktar
10X PCR buffer (without MgCl <sub>2</sub> )	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
dNTP (10 mM)	0.5µl
F-tyvD (5 pmol/µl)	1 µl
R-tyvD (5 pmol/µl)	1 µl
F-wzxB (5 pmol/µl)	1 µl
R-wzxB (5 pmol/µl)	1 µl
F-wzxC1 (5 pmol/µl)	1 µl
R-wzxC1 (5 pmol/µl)	1 µl
F-wzxC2-C3 (5 pmol/µl)	1 µl
R-wzxC2-C3 (5 pmol/µl)	1 µl
F-wzxE1 (5 pmol/µl)	1 µl
R-wzxE1 (5 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA Polymerase	0.5 µl
Deionize su	7.5 µl
Template	1 µl
Total hacim	25 µl

#### PARAMETRELER

Başlangıç denatürasyonu  
Primerlerin bağlanması  
(30 siklus)  
Final uzama

**5. Besiyerleri:** Dokuzyedi izolatın canlandırılması ve stoklanması için sırasıyla XLT4 agar (Oxoid;CM106), XLT4 supplement (Oxoid; SR0237) ve Brain Heart Infusion Broth (Oxoid; CM1135) kullanıldı.

**5. Ribotiplendirme kiti:** PVU II (Dupont; Riboprinter System DNA Prep Reagents, PN:D10734575) enziminin kullanıldığı ribotiplendirme kitinin prosedürüne göre tiplendirme yapıldı.

#### B) Metot

**1. İzolasyon ve canlandırma:** Dokuzyedi izolat XLT4 Agarda (Oxoid;CM106) ile yeniden izole edildi. Reizolasyon sonrası şuşlar, Brain Heart Infusion Broth'ta (Oxoid; CM1135) stokları yapıldı -20°C'de saklandı.

**2. DNA Ekstraksiyonu:** Tekrar izolasyonu yapılan izolatların ekstraksiyonu, ticari DNA ekstraksiyon kitinin (DNeasy Blood & Tissue Kits, Qiagen, Cat No 69504) prosedürüne göre yapıldı.

**4. D1 ve E1 için Serogrup Multiplex-PZR için Reaksiyon Hacmi ve Parametreler**

Reagent	Miktar	
10X PCR buffer (without MgCl <sub>2</sub> )	2.5 µl	94°C 5 dk
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl	94°C 30 sn
dNTP (10 mM)	0.5 µl	57°C 40 sn
F-D1 (5 pmol/µl)	1 µl	72°C 30 sn
R-D1 (5 pmol/µl)	1 µl	72°C 10 dk
F-E1 (5 pmol/µl)	1 µl	
R-E1 (5 pmol/µl)	1 µl	
Taq DNA Polymerase	0.5 µl	
Deionize su	13.5 µl	
Template	1 µl	
Total hacim	25 µl	

PARAMETRELER

Başlangıç denatürasyonu

Primerlerin bağlanması  
(30 siklus)

Final uzama

**5. Faz-1 Multiplex-PZR için Reaksiyon Hacmi ve Parametreler**

Reagent	Miktar	
10X PCR buffer (without MgCl <sub>2</sub> )	4 µl	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl	
dNTP (10 mM)	0.5 µl	
Sense-60 (35 pmol/µl)	1 µl	
Antisense-i (5 pmol/µl)	1 µl	
Antisense-z10 (5 pmol/µl)	1 µl	
Antisense-b (7 pmol/µl)	1 µl	
Antisense-eh (7 pmol/µl)	1 µl	
Antisense-lv (5 pmol/µl)	1 µl	94°C 5 dk
Antisense-r (5 pmol/µl)	1 µl	94°C 30 sn
Forward-G (5 pmol/µl)	1 µl	58°C 40 sn
Reverse-G (5 pmol/µl)	1 µl	72°C 30 sn
Forward-Sdf-1 (5 pmol/µl)	1 µl	72°C 10 dk
Reverse-Sdf-1 (5 pmol/µl)	1 µl	
Taq DNA Polymerase	0.5 µl	
Deionize su	5	
Template	1 µl	
Total hacim	25 µl	

PARAMETRELER

Başlangıç denatürasyonu

Primerlerin bağlanması  
(30 siklus)

Final uzama

## 6. Faz-2 Multiplex-PZR için Reaksiyon Hacmi ve Parametreler

Reagent	Miktar		
10X PCR buffer (without MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl		
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl		
dNTP (10 mM)	0.5 µl		
Sense-F1mod (20 pmol/µl)	1 µl		PARAMETRELER
Antisense-R5mod (5 pmol/µl)	1 µl		
Antisense-R6 (5 pmol/µl)	1 µl	94°C 5 dk	Başlangıç denatürasyonu
Antisense-R7 (5 pmol/µl)	1 µl	94°C 30 sn	Primerlerin bağlanması
Antisense-R1mod5 (5 pmol/µl)	1 µl	61°C 40 sn	(30 siklus)
Sense-Fw 5 (5 pmol/µl)	1 µl	72°C 30 sn	
Antisense-Rw 5 (5 pmol/µl)	1 µl	72°C 10 dk	Final uzama
Sensen-Fe (5 pmol/µl)	1 µl		
Antisense-Rz15(5 pmol/µl)	1 µl		
Deionize su	9		
Template	1 µl		
Total hacim	25 µl		

## 7. Agaroz- Jel Elektroferez

Elde edilen PZR ürünlerinden; 5'er µl alınarak, 1 µl 6X loading dye solüsyonu yüklenecek, 0.5 µl/ml ethidium bromide ile boyanan % 2'lik agaroz jelde 100 V elektrik akımında 120 dk yürütülerek elektroferez işlemi yapıldı. Agaroz jel, uv-transluminatöre transfer edilerek oluşan bantlar DNA marker ve pozitif kontroller yardımıyla UV ışığı altında değerlendirilip ve jel görüntüleme sistemi ile dökümantasyonu yapıldı. Serogrup Multiplex-PZR ile B, C1, C2-C3, D ve E grupları için beklenen DNA bantı büyüklükleri sırasıyla; 230 bp, 483 bp, 154 bp, 615 bp ve 345 bp olarak tespit edildi. D1-E1 Serogrup Multiplex-PZR için beklenen DNA bantı büyüklükleri sırasıyla; 624bp ve 281 bp'dır. Faz1 Multiplex- PZR ile H:G, H:z10, H:l,v, H:r, H:i, H:e,h, H:b antijenleri için dizayn edilen primerler ve *Salmonella* Enteritidis için spesifik olan Sdf1 primerleri ile beklenen DNA bantı büyüklükleri sırasıyla; 500 bp, 400 bp, 300 bp, 275, 250 bp, 200 bp, 150 bp ve 300 bp'dır. Faz 2 Multiplex-PZR ile H:1,2, H:1,5, H:1,6, H:1,7, H:l,w ve H:e,n,z15 antijenleri için dizayn edilen primerler ile beklenen DNA bantı büyüklükleri sırasıyla; 400 bp, 100 bp, 300 bp, 200 bp, 250bp, 150 bp'dır.

**8. Ribotiplendirme:** Ribotiplendirme, PVUII enzimi ile kit prosedürüne göre yapıldı.

## Bulgular

Daha önce gold standart bir metot olan serotiplendirme ile isimlendirilen 36 farklı serovardan oluşan toplam 907 izolat, somatik, faz1 ve faz2 antijenlerinin multiplex-PZR ile tiplendirilmesi açısından tekrar değerlendirildi. Multiplex-PZR sonuçları aşağıda ayrıntısıyla anlatılmaktadır.

*S. Heidelberg* (1 adet), *S. Richmond* (15 adet), *S. Bsilla* (1 adet), *S. Abony* (3 adet), *S. Israel* (1 adet), *S. Otmarschen* (1 adet), *S. Potsdam* (1 adet), *S. Kapemba* (1 adet), *S. Typhimurium* (10 adet), *S. Braenderup* (27 adet), *S. Breedenev* (7 adet), *S. Anatum* (14 adet), *S. Enteritidis* (132 adet), *S. Virchow* (60 adet), *S. Sandiego* (2 adet) olmak üzere 15 farklı serovardan oluşan toplam 266 izolat tam olarak tanımlenmiştir.

Toplam 392 izolatın; *S. Mbandaka* (6,7,14:z10:enz15) (68 adet) ve *S. Infantis* (6,7,14:r:1,5) (324 adet) suşlarının tam olarak tanımlenmesi bekleniyordu. Ancak iki izolatında, somatik, faz1 ve faz 2 antijenlerini kodlayan pri-

merler mevcut olmasına rağmen, O:7 somatik antijeni kodlayan primer her iki izolatta da somatik antijeni amplifiye etmemiştir. Bu nedenle mevcut *S. Mbandaka* ve *S. Infantis* suşlarının sadece faz 1 ve faz 2 antijenleri tespit edilebildi. Tiplendirilemeyen *S. Mbandaka* ve *S. Infantis* suşları ribotiplendirmeye alındığında sonuçlar şu şekildedir: Altmışsekiz adet *S. Mbandaka* ve 324 adet *S. Infantis* suşlarından; 68 adet *S. Mbandaka* tam olarak tiplendirilebilirken, 392 adet *S. Infantis* suşunun 20 adedi *S. Bareilly* (6,7,14:y:1,5) olarak tiplendirilmiştir.

Toplam 159 izolatin somatik ve faz 1 antijenleri tespit edildi. *S. Kentucky* (8,20:i:z6) (150 adet), *S. Tumadi* (1,4,12:i:z6) (1 adet), *S. Hadar* (6,8:z10:e,n,x) (8 adet), suşlarının somatik antijen ve faz 1 antijenleri tespit edilirken, z6, enx faz 2 antijenlerini kodlayan primerler mevcut olmadığı için faz 2 antijenleri tespit edilememiştir.

*S. Sao* (5 adet) serovarının multiplex-PZR ile tiplendirilmesi değerlendirildiğinde, faz 1 ve faz 2 antijenlerini kodlayan primerler ile faz 1 ve faz 2 antijenleri identifiye edildi. *S. Sao* izolatomının somatik antijeni E4 grubunda yer almaktadır. Çalışmada sadece E grubu ve E1 grubunu kodlayan primerler mevcut olduğu için, *S. Sao* suşunun ancak E grubunda olduğu belirlenebildi, E4 grubunda olduğu tespit edilemedi.

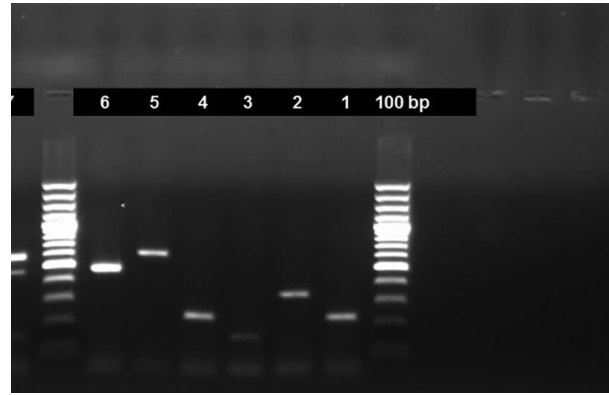
Yedi farklı serovar olmak üzere toplam 45 izolatin somatik ve faz 2 antijenleri tespit edildi. *S. Agona* (1,4,[5]: f,g,s: [1,2]) (15 adet), *S. Schwarzengrund* (1,4,12,27:d:1,7) (6 adet), *S. Coeln* (1,4,5,12:y:1,2) (5 adet), *S. Dabou* (8,20:z4,z23:l,w) (4 adet), *S. Orion* (3,10,[15], [15,34]:y: [1,5]) (9 adet), *S. Bareilly* (6,7,14:y: 1,5) (1 adet), *S. Livingstone* (6,7,14:d:l,w) (5 adet) suşlarının somatik ve faz 2 antijenleri tam olarak identifiye edilmiştir. Ancak faz 1 antijenini kodlayan primerler mevcut olmadığı için multiplex-PZR ile tespit edilememiştir.

Toplam 9 serovar olmak üzere 32 adet izolatta üç antijenden sadece biri tespit edildi. Tek bir antijenik yapısı tespit edilen serovarlar şunlardır: *S. Bispebjerg* (1,4:a:e,n,x) (3 adet), *S. Oranienburg* (6,7,14:m,t:z57) (1 adet), *S. Hvitvingfoss* (16, b, e,n,x) (1 adet), *S. Amoutive* (28:d:1,5) (1 adet), *S. Derby* 1,4, [5],12:f,g: [1,2] (1 adet), *S. Liverpool* (1,3,19:d:enz15) (3 adet), *S. Oakey* (6,7:m,t:z64) (1 adet) *S. Duisburg* (1,4, 12,27:d: enz15) (4 adet), *S.*

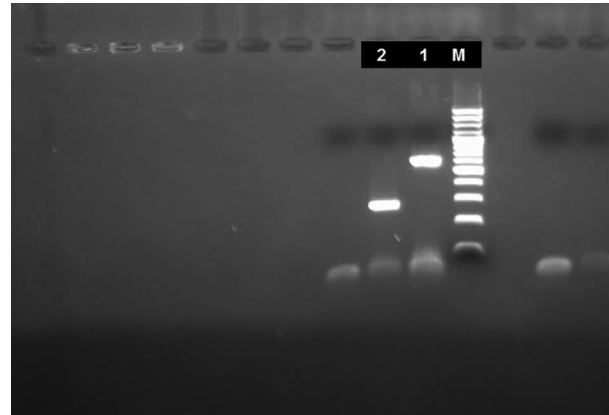
*Montevideo* (6,7,14:g,m,[p],s:[1,2,7]) (5 adet), *S. Molade* (8,20:z10:z6) (2 adet).

İncelenen örneklerde, herhangi bir antijenik yapının tespit edilemediği 2 serovar toplam 8 izolat; *S. Kingston* (1,4, [5],12,27:g,s,t:[1,2]) (1 adet) ve *S. Senftenberg* (1,3,19:g,[s],t:-) (7 adet)'dir.

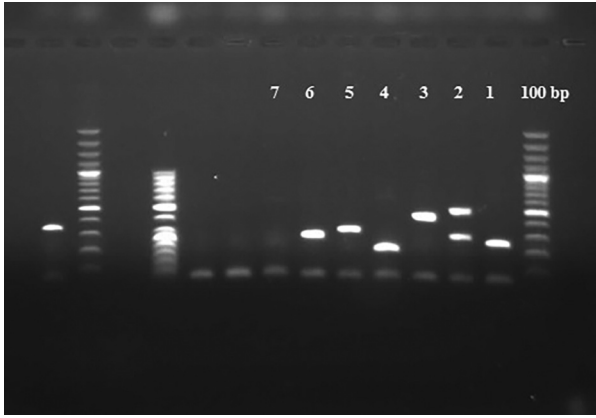
Projenin başında H:d flagellar 1 ve H:e,n,x flagellar 2 antijenlerini amplifiye eden primerler faz 1 ve faz 2 multiplex-PCR'larda öngörülmüştü. Ancak bu primerlerin ilgili antijenleri amplifiye etmediği tespit edilince reaksiyon dışı bırakıldılar.



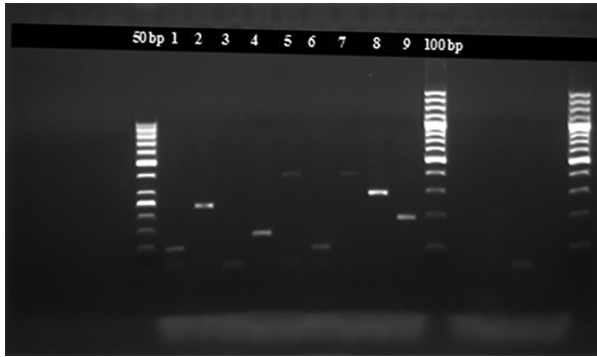
**Resim 1. Serogrup mPZR jel görüntüsü :** 100 bp marker (Fermentas; 100bp), **1 nolu kuyucuk:** *S. Typhimurium* [O:B (O:4)]= 230 bp, **2 nolu kuyucuk:** *S. Liverpool* [O:E (O:3,10, O:3,19)]=345 bp, **3 nolu kuyucuk:** *S. Hadar* [O:C2-C3(O:8)]=154 bp, **4 nolu kuyucuk:** *S. Typhimurium* [O:B (O:4)]= 230 bp, **5 nolu kuyucuk:** *S. Enteritidis* [O:D (O:9, O:9,46, O:9,46,27)]=615 bp, **6 nolu kuyucuk:** *S. Braenderup* [O:C1(O:7)]= 483bp



**Resim 2. D1-E1 Serogrup mPZR jel görüntüsü:** Marker (Fermentas; 100bp), **1 nolu kuyucuk:** *S. Enteritidis* [O:D (O:9)]=624 bp, **2 nolu kuyucuk:** *S. Anatum* O:E1(3,10)=281 bp



**Resim 3. Faz 1 mPCR jel görüntüsü:** Marker (Fermentas; 100 bp), **1 nolu kuyucuk:** *S. Typhimurium* (H:i)=250 bp, **2 nolu kuyucuk:** *S. Enteritidis* (g,m ve sdf)=500 bp ve 300 bp, **3 nolu kuyucuk:** *S. Hadar* (H:z10)= 400 bp, **4 nolu kuyucuk:** *S. Typhimurium* (H:i)=250 bp, **5 nolu kuyucuk:** (H:l,v)=300 bp, **6 nolu kuyucuk:** *S. Infantis* (H:r)=275 bp,



**Resim 4. Faz 2 mPCR jel görüntüsü:** Marker (Fermentas; 50bp), **1 nolu kuyucuk:** *S. Infantis* (H:1,5)=100bp, **2 nolu kuyucuk:** *S. Livingstone* (H:l,w)=250 bp, **3 nolu kutu:** deionized water (negative control), **4 nolu kutu:** *S. Liverpool* (H:e,n,z15): 150 bp, **5 ve 7 nolu kuyucuk:** *S. Typhimurium* (H:1,2)=400 bp, **6 nolu kuyucuk:** *S. Bariely* (H:1,5), **8 nolu kuyucuk:** *S. Schwarzengrund* (H:1,7)= 300bp

## Tartışma

Son çeyrek yüzyıl içerisinde; *Salmonella*ların PZR-tabanlı yöntemlerle tiplendirmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. *Salmonella* serotipleri arasında veya özel bir serotip içerisinde ayırım yapmak için tanımlanan PZR-tabanlı metotlar optimize edilmiştir. (1, 7, 12, 18, 19, 24). PCR-tabanlı metotlar ile direk somatik antijenlerin (10, 11, 14, 21), ve/veya flagellar antijenlerin (4, 5, 9) tespit edilmesine yönelik çalışmalar da mevcuttur.

Çalışmada, gold standart bir metot olan konvansiyonel serotiplendirmeye optimize edilen multiplex-PZR'larının doğru tiplendirme açısından geçerliliği sorgulandığında toplam 907 izolatin, 490'unda (%54.56) (28 farklı serovar) somatik antijen tam olarak tespit edilmiştir. Benzer bir şekilde, Herrera-Leon ve ark. (10), yaptıkları çalışmada, multiplex-PZR ile 500 *Salmonella* izolatinın 423'nü serogruplandırabildiklerini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, özellikle O-antijenini kaybedip rough suşa dönüşen veya flagellar antijenlerini eksprese etmeyen ve monofazik veya hareketsiz duruma geçen *Salmonella*ların konvansiyonel yöntemle tanısına gidemezken, multiplex-PZR ile tespit edebildiklerini bildirmişlerdir. Konvansiyonel serotiplendirme ile karakterize edemedikleri 1 otoaglutinasyon veren, 4 tane de hareketsiz *Salmonella* *Enteritidis* suşunu tiplendirdiklerini ortaya koymuşlardır. Geleneksel tiplendirme metodu ve moleküler serotiplendirme arasında korelasyon % 99.2 olarak bildirmiştir (10). Bu çalışmada benzer örnekleri çalışma olanağımız olmasa da, mukoid bir *Salmonella* suşunun konvansiyonel yöntemlerle tiplendirmesinin yapılamadığı bir olguda multiplex-PZR ile tiplendirdiğimiz ve *S. Enteritidis* olarak isimlendirdiğimiz izolatla Leon ve ark. (2007)'nin (10) yaptıkları çalışmayı destekler sonuçlar elde edilmiştir (3).

Faz1 multiplex-PZR'nun tiplendirmede randımanı değerlendirildiğinde, 825 (%54.56) izolatin faz 1 antijenlerinin tam olarak belirlenebildiği saptandı. Çalışmamızla örtüşür şekilde; Herrera-Leon ve ark. (9), optimize ettikleri Faz 1 multiplex-PZR'nda İspanya'daki *Salmonella* izolatlarının % 80'ninin faz 1 antijenini doğru olarak tespit edebildiklerini ortaya koymuşlardır. Ancak, çalışmada faz-1 multiplex-PZR'nda reaksiyonda yer alan primer çiftlerinden H:d primer çiftinin amplifiye olmadığı tespit edildiğinden reaksiyon dışı bırakılmıştır. 82 izolatta flagellar 1 antijeninin tespit edilememesi, ya flagellar 1 antijeninin H:d olması veya H:G, H:z10, H:l,v, H:r, H:i, H:e,h, H:b antijenleri dışındaki flagellar 1 antijenine sahip olması kaynaklıdır. Çünkü mevcut primer çiftleri ancak 7 adet faz 1 antijenini tiplendirebilmektedir.

İncelenen izolatlardan 716'sının (%78.94) faz 2 antijenleri belirlenebilirken, faz2-multiplex-PZR'da H:e,n,x faz 2 antijenini kodlayan primer çifti amplifiye olmadığı için reaksiyon dışı bırakıldı.



dı. Çalışmamıza benzer şekilde, Echeita ve ark. (5), 10 primer çifti ile 49 farklı serotipe ait toplam 140 *Salmonella* izolatu ile yaptıkları çalışmada, multiplex-PZR ile % 100 sensitivite ve spesifite ile Faz 2 antijenlerini belirlediklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada tiplendirilemeyen 191 izolatu flagellar 2 antijenleri ise ya H:e,n,x ya da H:1,2, H:1,5, H:1,6, H:1,7, H:l,w ve H:e,n,z15 faz2 antijenleri dışındaki flagellar 2 antijenlerine sahip olması kaynaklıdır. Çünkü mevcut primer çiftleri ancak 6 faz 2 antijeni ni tiplendirebilmektedir.

*S. Infantis* ve *S. Mbandaka* suşlarında ise faz 1 ve faz 2 antijenleri tam olarak tespit edilebilmiştir. Ancak, O:7 somatik antijeni amplifiye eden primer mevcut olmasına rağmen, somatik antijenin bu iki izolatta tiplendirilememesi nedeniyle, bu iki serovarın tam ismi verilememiştir. Tiplendirilemeyen bu iki izolat, ribotiplendirmeye alındığında, 68 adet *S. Mbandaka* izolatu doğru olarak belirlenirken, 324 adet *S. Infantis* izolatu 12 adedi (% 4) *S. Bareilly* olarak isimlendirilmiştir. Bu çalışmadaki amaçlardan biri de multiplex-PZR ile tiplendirilemeyen suşları, serotiplendirme dışındaki başka bir metotla tiplendirmektir. Hem Multiplex-PZR'ların hem de ribotiplendirmenin doğruluğu gold standart metot olan Kauffman- White şemasına göre antiserumlarla yapılan serotiplendirme sonuçlarına göre değerlendirildi. Oniki izolatu *S. Bareilly* olarak bulunması konvansiyonel serotiplendirme metodu ile örtüşmemektedir. Benzer duruma Şahan ve ark. (22), 140 *Salmonella* izolatu klasik serotiplendirme ve pvuII enzimi kullanarak ribotiplendirme protokolü uyguladıkları çalışmalarında, *S. Infantis* suşlarını her iki metotla karşılaştırmıştır. Araştırmacılar, 119 izolatu konvansiyonel serotiplendirme metodu ile uyumlu bulduklarını, 16 suşun *S. Infantis*'e % 85'in altında benzerlik gösterdiğini ancak en yakın

tür olarak *S. Infantis*'e dahil ettiklerini, ilk denemede *S. Infantis* olarak belirlenemeyen 5 izolatu ikinci denemede 3'ünün *S. Infantis* olarak tespit edildiğini, geriye kalan 2 izolatu ise *S. Mbandaka* olarak tanımladığını bildirmişlerdir. 324 izolatu %96.3'ü seroloji ile uyumlu bulunurken, %3.70'lik farkın ise istatistiki olarak anlamlı bulunmadığını raporlamışlardır.

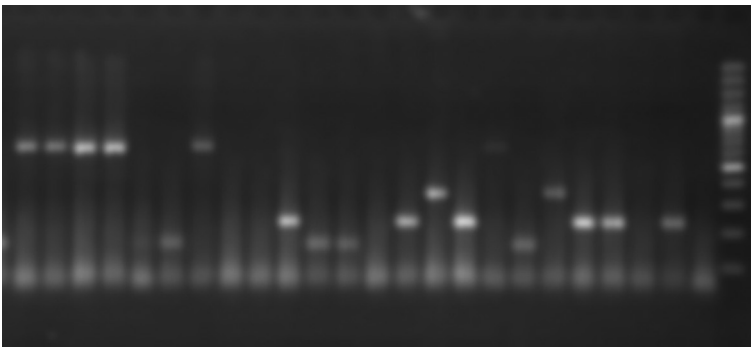
Tüm izolatu % 29.32'sinin (266 izolat; 15 farklı serovar) üç antijenik yapısı da tam olarak tanımlanmış, isimlendirilebilmiştir. İncelenen izolatu somatik, flagellar 1 ve flagellar 2 antijenlerinin sırasıyla; %54.56 (490), %90.95 (825) ve %78.94 (716)'ü tespit edilebilmiştir. Multiplex-PZR ve ribotiplendirme sonuçları değerlendirildiğinde, gold standart serolojik metoda alternatif değil, ancak destek bir metot olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

## Sonuç

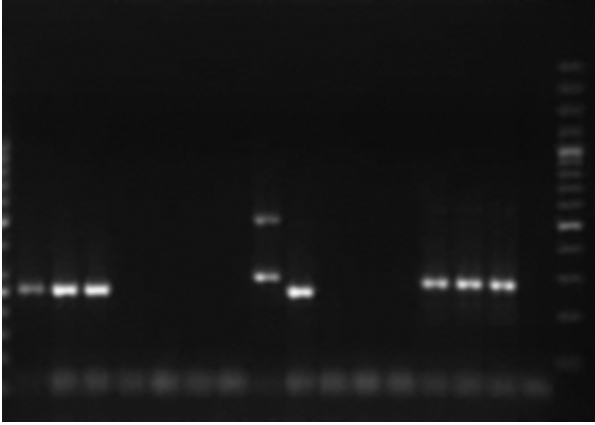
Bu çalışmayla daha düşük maliyetle, daha kısa sürede, duyarlılığı ve özgünlüğü yüksek destekleyici bir metotla *Salmonella* tiplendirmesi yapılabilmektedir. Gönderilen izolatu birden fazla *Salmonella* serovarı taşıdığı durumlar ya da serovarlar arası çapraz reaksiyonlar gibi olumsuzlukların önüne geçilmesi sağlanmış olacağı görülmektedir. Özellikle O-antijenini kaybedip rough suşa dönüşen veya flagellar antijenlerini eksprese etmeyen ve monofazik veya hareketsiz duruma geçen *Salmonella* tiplendirmesinde seroloji ile yaşanan aksaklıkların ortadan kaldırılabilmesine olanak sağlanmaktadır.

## Teşekkür

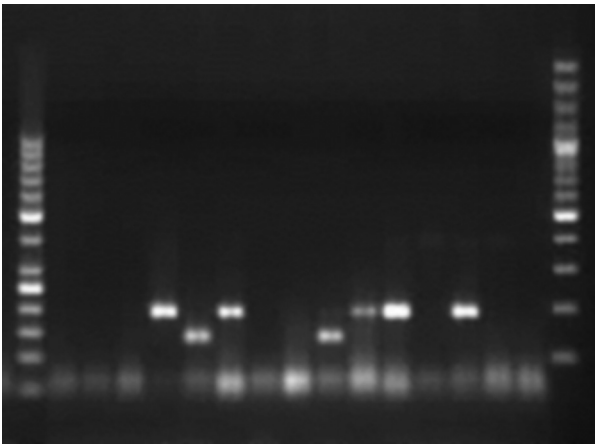
Bu çalışma, TAGEM/ HSGYAD/13/A07/P02/26 nolu proje ile desteklenmiştir.



**Resim 5.** Numunelerin Serogrup mPCR jel görüntüsü



**Resim 6.** Numunelerin Faz 1 mPCR jel görüntüsü



**Resim 7.** Numunelerin Faz 2 mPCR jel görüntüsü

## Kaynaklar

- Aarts HJ, LA Van Lith, J. Keijer, (1998). *High resolution genotyping of Salmonella strains by AFLP-fingerprinting*. Lett Appl Microbiol, 26, 131-135.
- Bastin DA, Reeves PR, (1995). *Sequence and Analysis of the O antigen gene (rfb) cluster of Escherichia coli O111*. Gene, 16, 17-23.
- Bayindir Bilman F, Gunaydin E, Turhanoglu M, Akkoc A, (2014). *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*. Mikrobiol Bul, 48(1), 151-159.
- Echeita MA and Usera MA, (1998). *Rapid Identification of Salmonella spp. phase 2 antigens of the H1 antigenic complex using 'multiplex PCR'*. Res Microbiol, 149, 757-761.
- Echeita MA, Herrera S, Garazier J and Usera MA, (2002). *Multiplex PCR- based detection and identification of the most common Salmonella-second-phase flagellar antigens*. Research in Microbiol, 153, 107-113.
- Fitzgerald C, Sherwood R, Gheesling LL, Brenner FW, Fields PI, (2003). *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, 69(10), 6099-105.
- Grazier J, Lopez-Molina N, Laconcha I, Bagessen DL, Rementeria A, Vivanco A, Audicana I, Perales A, (2000). *Suitable 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, 66, 5273-5281.
- Guibourdenche M, Roggentin, P Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont PA.D, Weill François-Xavier, (2010). *Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme*. Res Microbiol, 161(1), 26-9.
- Herrera-Leon S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garazier J and Echeita MA, (2004). *Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of Salmonella spp.* J Clin Microbiol, 42(6), 2581-2586.
- Herrera-Leon S, Ramiro R, Arroyo M, Diez R, Usera MA, Echeita MA, (2007). *Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of Salmonella serotypes*. Research in Microbiology, 158, 122-127.
- Hong Y, Liu T, Lee MD, Hofacre CL, Maier M, White DG, Ayers S, Wang L, Berghaus R, Maurer JJ, (2008). *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, 8, 178.
- Lindstedt BA, Heir E, Vardund T, Kapperud G, (2000). *Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of Salmonella enterica subsp. enterica serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing*. J Clin Microbiol, 38, 1623-1627.
- Lino T, (1997). *Genetics of structure and function of bacterial flagella*. Anu Rev Genet, 11, 161-182.
- Luk JM, Kongmuang U, Reeves PR, Lindberg AA, (1993). *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, 31, 2118-2123.
- Marolda CL, Vicarioli J, Valvano MA, (2004). *Wzx proteins involved in biosynthesis of O antigen function in association with the first sugar of O specific lipopolisaccharide subunit*. Microbiology, 150, 4095-4105.
- Newton S, MRD Wasley, A Wilson, LT Rosenberg, JF Miller, and BA Stocker, (1991). *Segment IV of a Salmonella flagellin gene specifies flagellar antigen epitopes*. Mol Microbiol, 5, 419-425.
- Patrick AD Grimont & François-Xavier Weill, (2007). *Kauffmann-White Scheme Antigenic formulae of the Salmonella serovars*, 9<sup>th</sup> edition, Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

18. Ranjbar R, Mortazavi SM, Mehrabi Tavana A, Sarshar M, Najafi A, Soruri Zanjani R, (2017), Simultaneous Molecular Detec-tion of Salmonella enterica Serovars Typhi, Enteritidis, Infantis, and Typhimurium. Iran J Public Health, 46(1),103-111.
19. Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ, (1989). *Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of S. bongori comb. J Clin Microbiol*, 35, 2786-2790.
20. Samuel G, Reeves PR, (2003). *Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly*, Carbohydr Res, 338, 2503-2519.
21. Shah DH, Park JH, Cho MR, Kim MC, Chae JS, (2005). *Allele-specific PCR method based on rfbS sequence for distinguishing Salmonella gallinarum from Salmonella pullorum: serotype-specific rfbS sequence polymorphism*. J Clin Microbiol, Methods, 60, 169-177.
22. Şahan Ö, Müştak K, Torun E, Akan M, Diker S. *Salmonella Infantis tanısında ribtiplendirme ve serotiplendirme yöntemlerinin karşılaştırması*. 10. Uluslararası Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, 24-27 Eylül 2012, Kuşadası, AYDIN
23. Wei LN, and TM Joys, (1995). *Covalent structure of three phase-1 flagellae filament proteins of Salmonella spp. J Mol Biol*, 186, 791-803.
24. Zappellini L, Martone-Rocha S, Dropa M, Matté MH, Tiba MR, Breternitz BS, Razzolini MT, (2017). *Effective characterization of Salmonella Enteritidis by most probable number (MPN) followed by multiplex polymerase chain reaction (PCR) methods*, Environ Sci Pollut Res Int, 24(5), 4828-4834.
25. Zieg J, Silverman M, Hilmen M and Simon M, (1977). *Recombinational switch for gene expression*. Science, 196, 170-172.