

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

**ŞANLIURFA İLİNDEKİ SALMONELLA ENTERİCA
SPP. ENTERİCA SÜRVEYANS ÇALIŞMASI**

UZMANLIK TEZ

Dr. İlhan ÜNER

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK

ŞANLIURFA

2013

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA İLİNDEKİ SALMONELLA ENTERİCA
SPP. ENTERİCA SÜRVEYANS ÇALIŞMASI**

UZMANLIK TEZ

Dr. İlhan ÜNER

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17.04.2012 tarih ve 12036 proje numarası ile desteklenmiştir

ŞANLIURFA

2013

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesinden, çalışmaların yürütülmesine kadar her aşamada bilgi ve desteğinden yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK'e, en içten duygularıyla teşekkür ederim. Mikrobiyoloji Anabilim Dalın'da çalıştığım süre içerisinde sürekli desteklerini gördüğüm ve bize her zaman örnek olan hocam Sayın Prof. Dr. Sami TAŞCI'ya, yine eğitimimde büyük katkısı olan Sayın Prof.Dr. Mehmet Bayraktar'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda katkısı olan ve her türlü yardımını esirgemeyen Sayın Yard. Doç. Dr. Yeşim Soyer'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte uyumlu bir çalışma ortamı sağlayarak her konuda bana destek olan asistan arkadaşlarım Dr. Seray Tümer'e, Dr. Firuzan İdemen'e, Dr. Özge Alkan'a, Dr. Ayşenur Varışlı'ya ve Dr. Hatice Özçınar'a ve tüm Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına, Tez çalışmam süresince yardımlarını gördüğüm Necmettin Yıldıztekin'e, Dilek Esen'e ve Ali Küçük'e teşekkür ederim. ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümündeki kıymetli arkadaşlarımdan Bora Durul'a, Ece Bulut'a ve Sinem Yavaş'a teşekkür ederim.

Dr.İlhan ÜNER

İÇİNDEKİLER	SAYFA NO
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
TABLolar DİZİNİ	V
KISALTMALAR	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Salmonella'nın genel özellikleri	2
2.2. Salmonella insidansı	2
2.3. Salmonella etkenin türleri ve bulaşma yolları	4
2.4. Salmonella enfeksiyonlar	6
2.4.1. Tifo – Paratifo:	7
2.4.2. Gastroenteritis	8
2.4.3. Lokal organ enfeksiyonları ve sepsisemi	8
2.5. Mikroorganizmaların identifikasyonu	9
2.6. Tanı yöntemleri	11
2.6.1. Kültür	12
2.6.2 Salmonella tespiti için kullanılan Serolojik Testler	13
2.7. Salmonella etkenin tiplendirilmesi	13
2.7.1. Fenotipik tiplendirme	14
2.7.2. Genetik tiplendirme	16
2.7.2.1. PCR (Polymerase chain reaction)	18
2.7.2.2. MLST (Multi-Locus Sequence Typing - Çoklu	22
Lokus Dizilim Tiplendirmesi)	
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	28
3.1. Salmonella Kökenleri	28
3.2. Salmonella etkeninin izolasyonu ve identifikasyonu	28
3.3. Salmonella PCR	30
3.4. Salmonella izolatlarının MLST yöntemi ile genotiplendirilmesi	32
4. BULGULAR	38

5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ	54
KAYNAKLAR	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Salmonella Typhimurium (kırmızı hücreler) türü bakteriler insan dokusu kültürüne saldırırken (4)	2
Şekil 2: Türkiye’de 1964-1989 yılları arasında Salmonella Typhi ve Paratyphi sıklığı (14)	4
Şekil 3: PCR tekniği (55)	20
Şekil 4: MLST ve bakteriyel patojen tespiti (55,59)	23
Şekil 5: The AccuGENX-ST™ yöntemi MLST sekans analizi akış şeması	25
Şekil 6: 4257 S. Enterica subspecies enterica izolatları kullanılarak, MLST verilerine göre oluşturulmuş Salmonella genotipik haritası. Her bir daire 1095 serotipten birisini ifade etmektedir ve dairenin büyüklüğü izolat sayısının oranını göstermektedir. MLST verilerinden logaritmik olarak oluşturulan grafik burada yansıtılmıştır. Serotipler arasındaki mesafe genetik yakınlığı göstermektedir (58).	27
Şekil 7: Salmonella izolatlarından elde edilmiş DNA bantları (M:1000 bp marker; 1-18: 678 bp bölgedeki Salmonella pozitif bant tespiti; 19: negative kontrol)	32
Şekil 8. İzole edilen Salmonella serotip ve sekans tiplerinin şematik gösterimi	40
Şekil 9. AroC housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir)	41
Şekil 10. purE housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir).	42
Şekil 11. hisD housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir)	43
Şekil 12. dnaN housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir, filogenetik ağaç SeqMan NGen yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur)	44
Şekil 13. hemD housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir).	45
Şekil 14. sucA housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir)	46
Şekil 15. thrA housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir)	47
Şekil 16. S. Enteritidis’in sekans tiplerinin filogenetik sınıflandırılması	53

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Salmonellaların sınıflandırılması	5
Tablo 2: Salmonella tür, alt tür ve serotiplerin buldukları habitatlar (2)	6
Tablo 3: İdentifikasyon kriterleri ve mikrobiyal klasifikasyon için özellikler (30)	11
Tablo 4: Kauffman and White sınıflandırması	15
Tablo 5: Günümüzde Kullanılan Moleküler Tiplendirme Yöntemleri (38)	18
Tablo 6: PCR metotları (56)	21
Tablo 7: PCR Mastır Karışımı ve invA primer dizini (64)	31
Tablo 8: PCR Mastır Karışımı	33
Tablo 9: MLST 7 gen primer sekansları	34
Tablo 10: Salmonella serotiplerinin cinsiyete göre dağılımı	38
Tablo 11: Salmonella serotiplerinin hastaların yaşadığı yerleşim yerine göre dağılımı	39
Tablo 12: Salmonella izolatlarının serolojik tiplendirilmesi	39
Tablo 13: Salmonella izolatlarının serotip ve sekans tipleri	40
Tablo 14: Salmonella izolatlarının MLST sekans sonuçları	48
Tablo 15: Salmonella serogrup ve serotiplerinin dağılımı (10)	52

KISALTMALAR

AFLP	: Amplified fragment length polymorphism
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CDC	: Center for Disease Control
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EMB	: Eosin Methylene Blue Agar
MKTTn	: Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novabiocin
MLST	: Multi-Locus Sequence Typing
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PFGE	: Pulsed field gel electrophoresis
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
RNA	: Ribonükleik Asit
RVS	: Rappaport Vassiliadis
SS	: Salmonella Shigella Agar
TPS	: Tamponlanmış Peptonlu Su
TSI	: Agar Triple Sugar Iron Agar
UEPLA	: Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı
XLD	: Xylose Lysine Deoxycholate

ÖZET

Şanlıurfa İlindeki Salmonella enterica Subsp.enterica Sürveyans Çalışması

Dr. İlhan ÜNER

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

Bu çalışmanın amacı, Salmonella etkeninin Şanlıurfa bölgesinde genotipik ve fenotipik olarak serotiplendirilmesidir. Şanlıurfa ilinde, 3 yıl içerisinde klinik vakalardan toplanmış, 50 adet izolat serotiplendirme ve Multilocus Sequence Typing (MLST) yöntemi ile tanımlanmıştır. Konvansiyonel metodlarla Salmonella olduğu düşünülen izolatlar, Salmonella için spesifik olan invA geni hedef alınarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile doğrulanmıştır. invA geni tespit edilerek Salmonella olduğu doğrulanan izolatlar fenotipik (serotiplendirme) ve genotipik (MLST) yöntemler kullanılarak tanımlanmışlardır.

Çalışmada kullanılan MLST metodu için 7 gen bölgesi (aroC, dnaN, hemD, hisD, purE, sucA ve thrA) hedeflenmiştir. Biyoinformatik araçlar, sekans sonuçlarının filogenetik analizi için kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 50 Salmonella izolatının toplam altı serotipten oluştuğu, % 61.1 ile en çok S. Paratyphi olduğu görülmüştür. Tespit edilen diğer serotipler ise sırasıyla şunlardır: S. Typhimurium (% 11.1), S. Kentucky (% 9.3), S. Enteritidis (% 3.7), S. Othmarschen (% 3.7) ve S. Typhi (% 3.7).

Sonuç olarak, Şanlıurfa ilinde gastroenterit ve tifo tanısı alan hastalarda etken olarak izole edilen Salmonella türlerinin serotiplendirilmesi ilk olarak yapılmıştır. Ve daha önce rapor edilmemiş yeni bir Salmonella subserotipi Şanlıurfa ilinde tespit edilememiştir. MLST yönteminin Salmonella serotiplendirilme ve subtiplendirilmesi için duyarlı ve ayırıcı bir yöntem olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Multilocus Sequence Typing, Salmonella, Şanlıurfa, aroC, dnaN, hemD, hisD, purE, sucA ve thrA

ABSTRACT

Salmonella enterica subsp. enterica Sürveyans Study in Sanliurfa City

İlhan ÜNER, MD

Specialty Thesis, Department of Medical Microbiology

The objective of this research is to utilize genotypic and phenotypic methods to serotyping Salmonella in Sanliurfa region. A collection of 50 human clinical Salmonella isolates obtained from across Sanliurfa City over the course of 3 year was characterized using serotyping and a multilocus sequence typing (MLST). *Salmonella* suspected colonies from conventional methods was confirmed by using polymerase chain reaction (PCR) of Salmonella specific gene, *invA*. In the cases of presented of *invA*, isolates was assigned as Salmonella. Confirmed Salmonella isolates was characterized using phenotypic (serotyping) and genotypic (MLST) methods.

For MLST, seven genes MLST (*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* and *thrA*) method was used. A Bioinformatics tool was used in phylogenetic analysis of sequence results. The 50 isolates were differentiated into 6 serotypes. In the present study, the most common serotype was *S. Paratyphi* (61.1%). The other serotypes and detection rates were *S. Enteritidis* (3.7%), *S. Kentucky* (9.3%), *S. Othmarschen* (3.7%), *S. Typhi* (3.7%) and *S. Typhimurium* (11.1%).

Previously unreported Salmonella subtype have not been detected in Sanliurfa region, but MLST is sensitive and distinctive method for serotyping and subtyping of Salmonella.

Key words: Multilocus Sequence Typing, seven genes (*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* and *thrA*), Salmonella, Sanliurfa

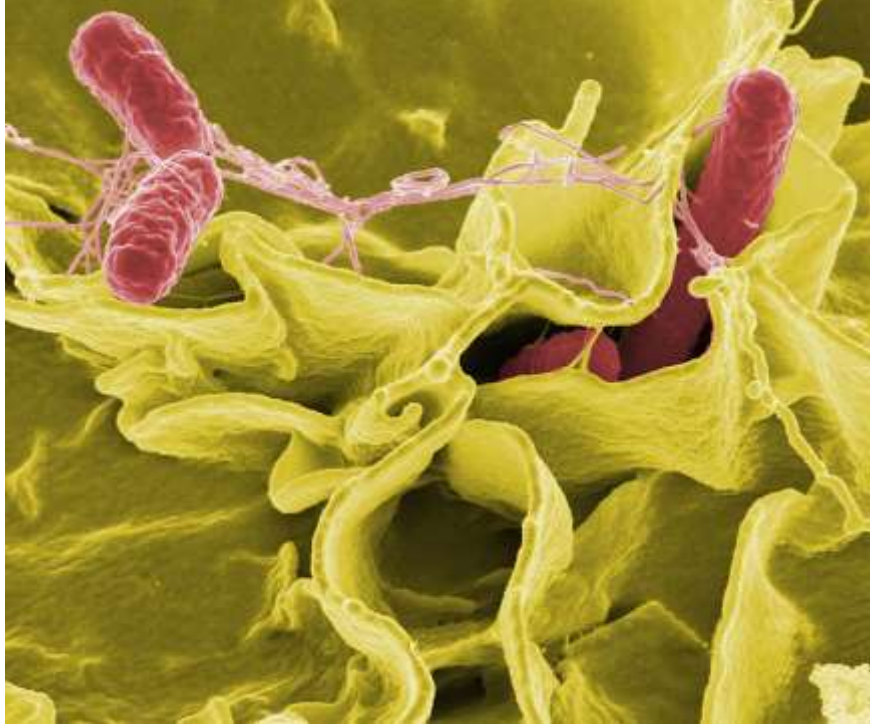
1. GİRİŞ

Doğada yaygın biçimde bulunan ve gram-negatif bir bakteri olan Salmonella, Enterobacteriaceae familyası üyesi olup fakültatif anaerob, çubuk şeklinde, S. Gallinarum ve S. Pullorum hariç olmak üzere hareketli bir bakteridir. Salmonella üç büyük antijene sahiptir. Bunlar H veya flegellar antijen, O veya hücresel ve Vi antijeni dir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda 2400'ün üzerinde serotipi belirlenmiştir. Salmonella serotipleri içerisinde yalnızca insanlarda ve hayvanlarda hastalık yapanı olduğu gibi, hem insanda hem de hayvanda hastalık yapan türleri de olan bir mikroorganizmadır. Ayrıca Salmonella hayvanlardan insanlara bulaşması nedeniyle zoonotik bir önem taşımaktadır. Salmonella enfeksiyonlarının insanlara bulaşmasında, kontamine yumurta, süt, et gibi hayvansal kaynaklı gıdalar önemli rol oynadığı belirtilmektedir. Salmonella etkenine genellikle gıdalarda rastlanır ve en yaygın gıda enfeksiyonuna yol açtığı bilinmektedir. Salmonella etkeninin neden olduğu gastroenterit sonucu ölümler yaşanabilmektedir. Her yıl ABD'de 76 milyon insanın gıda kaynaklı hastalıklardan etkilendiğini ve gıda kaynaklı enfeksiyonlar arasında Salmonellozis ve Campylobakteriozis gibi enfeksiyonların büyük rol oynadığı belirtilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde salmonellosis kaynaklı gıda zehirlenmelerde yılda 1,4 milyon kadar vakaya neden olduğu ve hastalık sayısının giderek arttığı tahmin edilmektedir (1). Türkiye'de önemli halk sağlığı sorunlarından birini oluşturan Salmonella'nın en çok enterica subsp. enterica serotipi olduğu bilinmekle birlikte Salmonella Typhimurium, Salmonella Paratyphi ve Salmonella Typhi yaygın biçimde tespit edilmektedir. Salmonella etkenin yaygınlığı, bulaşma riskinin yüksek olması ve özellikle hijyen şartlarının tam olarak olmadığı bölgeleri olan ülkemizde, etkenin serotiplerinin ve alt tiplerinin ayırt edilmesi ve genotiplendirme yapılması, enfeksiyonla mücadelede büyük katkı sağlayabilir. Sunulan çalışma ile; Salmonella alt tiplerinin belirlenmesi, mikroorganizmanın biyolojisinin daha anlaşılır kılmakla birlikte, hasta-spesifik etken tanımlaması ile daha yerel olarak etkenin nereden yayıldığı ve hangi bölgelerde görülme riskinin artacağı konusunda önemli bilgiler elde edilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Salmonella'nın genel özellikleri

Gram-negatif ve kısa çomakçık şeklinde olan Salmonella, ismini Daniel Elmer Salmon'dan almıştır. Salmonella Choleraesuis ilk olarak Amerikalı bir araştırmacı tarafından 1884 yılında domuzlardan izole edilmiştir. *Salmonella* genomu iki türü (*enterica* ve *bongori*) mevcut olup, *Salmonella enterica* kendi içinde altı alt türe bölünmektedir. Bu alt türlerden en önemlisi memelilerde hastalık yapabilen *Salmonella enterica* subsp. *enterica*'dır (2). *Salmonella*'nın günümüzde 2400'in üzerinde serotipi mevcuttur, bu serotiplerin çoğunu *Salmonella enterica* subsp. *enterica* alt türünü içermektedir (2, 3).



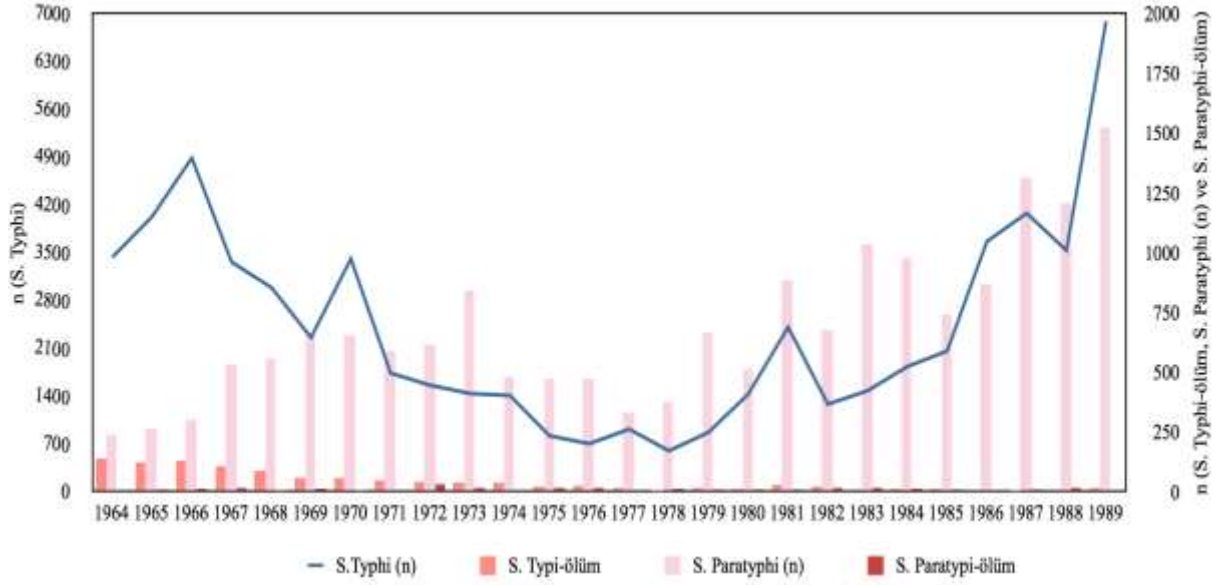
Şekil 1: Salmonella Typhimurium (kırmızı hücreler) türü bakteriler insan dokusu kültürüne saldırırken (4)

2.2. Salmonella insidansı

Salmonellozis'in insidansı 1990'dan itibaren Avrupa Birliği ülkelerinde istikrarlı biçimde düştüğü bilinse de, 2007'de yaklaşık 152.000 vaka sayısı kayıt edildiği, ancak gerçek rakamın bunun 10 ile 100 katı arasında değiştiği belirtilmektedir. Amerika Birleşik

Devletleri'nde (ABD) Hastalık Kontrol Merkezi'nin (Center for Disease Control, CDC) yürüttüğü Foodnet programı, besinle bulaşan hastalıkların insidansın da son yıllarda belirgin bir azalma olmadığını göstermiştir (5). Ancak, yine de görülen vakaların sayısının 15/100.000'i geçmediği tespit edilmiştir. Salmonella vakalarında azalmanın birinci sebebi yumurta üretiminde görülen S. Enteritidis'in kontrolünün iyileştirilmesi ile olduğu düşünülmektedir. Özellikle gelişen hijyen koşulları, temiz ve yeterli kanalizasyon alt yapısının olduğu ülkelerde hayvan konakçısı olmayan S. Typhi'nin görülme oranlarında azalma olmuştur (6, 7). Tüm önleyici tedbirlere rağmen gıda kaynaklı Salmonellozis salgınları hala yaygın biçimde görülmektedir. Salgınlarda; yumurta, meyve suyu, taze gıda ürünleri, yeşillik, çikolata, mısır gevrekleri, pişirilmiş veya terbiyelenmiş et ürünlerinin rolü büyüktür. Örnek olarak ABD'de fıstık ezmesinden kaynaklanan ve S. Typhimurium'un sebep olduğu yaygın gıda zehirlenmesinde 700 kişi etkilenmiştir (8).

Ülkemizde de bildirim zorunlu hastalıklar sınıfına giren Salmonella, Sağlık Bakanlığı tarafından tespit edildiğinde kayıt altında alınmaktadır. Salmonella, Shigella ve Campylobacter türleri, yetkili makamlara bildirilmesi zorunlu olan D grubu bildirim zorunlu hastalıklar grubuna girmektedirler (9). Bildirim sistemine ek olarak, Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA) kapsamında, seçilmiş merkezlerde farklı klinik örneklerden üretilen Salmonella, Shigella ve Campylobacter suşları Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı'na gönderilmekte ve burada ayrıntılı tiplendirmeleri yapılmaktadır. Bu sayede ülkemizde bu üç önemli patojene ilişkin veri birikimi oluşturulması planlanmıştır (10). Türkiye'de Salmonella enterica subsp. enterica serotip Typhimurium'a bağlı gıda kaynaklı infeksiyonlar yaygın biçimde gözlenmektedir. Tüm dünyada, antibiyotiklere dirençli Salmonella suşlarının insidansındaki artış önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Türkiye'den de çoklu dirençli S. Typhimurium suşları bildirilmektedir. Özellikle ampisilin kloramfenikol, streptomisin, sulfisokzasol ve tetrasiklin'e dirençli olan S. Typhimurium suşlarının Türkiye'de pek çok şehirde izole edildiği bildirilmiştir (11, 12, 13). Erdem ve ark. (6) yaptığı bir çalışmada, en sık gözlenen Salmonella türlerinin; S. Enteritidis (%47.7) Salmonella Typhimurium (%34.7) ve S. Typhi (%2.9) olarak tespit etmiştir. Gulmez ve ark. (10) ise yaptığı bir taramada en sık olarak %61,4 ile S. Enteritidis'i tespit etmiştir.



Şekil 2. Türkiye’de 1964-1989 yılları arasında Salmonella Typhi ve Paratyphi sıklığı (14)

2.3. Salmonella etkenin türleri ve bulaşma yolları

Genomu *enterica* ve *bongori* olarak ikiye ayrılan Salmonella, serotipleri hastalık yapabilme kabiliyetlerine göre de sınıflandırılırlar (15). Bunlar;

- 1- Konakçı sınırlı serotipler; Belli konakçılarda septisemiye neden olan serotiplerdir. Örnek olarak *Salmonella* Typhi, sadece insanlarda yüksek ateşe neden olan enfeksiyonuna yol açmaktadır.
- 2- Konakçıya adapte olmuş serotipler; belli konakçılarda sistemik hastalıklara neden olurken, sınırlı olarak diğer memelilerde bağırsak enfeksiyonuna sebep olan serotiplerdir. *Salmonella* Dublin sığırlarda septisemiye neden olurken, nadir olarak insanlarda gastroenterik hastalıklara yol açmaktadır.
- 3- Çoklu konakçılı serotipler; yaygın olarak insan ve bir çok hayvanda gastroenteritise yol açan serotiplerdir. Örneğin *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Newport (16, 17, 18)

Tablo 1: Salmonellaların sınıflandırılması

Alem	Bakteri
Bölüm	Proteobacteria
Sınıf	Gamma Proteobacteria
Takım	Enterobacteriales
Familya	Enterobacteriaceae
Cins	"Salmonella"
Tür	""S. enterica""

Salmonella canlıların sindirim sisteminde fakültatif olarak bulunurlar ve bu yüzden dışkıda mevcuttur. *Salmonella*'ların primer kaynağı insan ve hayvanlardır. İnsan taşıyıcı olarak enfeksiyonların potansiyel kaynağını meydana getirmektedir. Taşıyıcı insan ve hayvanların dışkısı enfeksiyonun yayılmasında önemli rol oynamaktadır (19). Salmonella geniş bir konakçı çeşitliliğine sahiptir ve yetiştiriciliği yaygın olan bütün çiftlik hayvanlarında (kanatlı, sığır ve domuz) bulunur (7). Özellikle su kaynaklarının kanalizasyon ile kirlenmesi, mikroorganizmaların gıda üretim ve tüketim zincirini rahatlıkla etkilemesine yol açar. Tavuk ve domuz yetiştiriciliği bu kirlenmeden öncelikle etkilenecek, Salmonellozis'in ana kaynağını oluştururlar (8).

Salmonella enfeksiyonunun yayılmasında tavukçuluk ürünlerinden yumurta başta gelmektedir. Ancak Salmonella çok farklı yollarla da bulaşabilir ve enfeksiyona yol açar. Tavukçuluk ürünlerinin yanı sıra, kırmızı et ürünleri, taze meyve-sebze, su, fast-food ürünler de Salmonella salgınlarında rol alırlar. Özellikle uygun olmayan hijyen şartlarında faaliyet gösteren restoranlarda; et, yumurta ürünlerine uygulanan pişirme işlemlerinin yetersiz olduğu durumlarda, Salmonella enfeksiyonunun bulaşma riski yüksektir. Pastörizasyonun başlaması ile gıda kaynaklı enfeksiyonlarda azalma olsa da, özellikle taze süt ve çiğ süttten yapılmış peynir enfeksiyonunun yayılmasında önemli unsur olarak kalmıştır. Süt ve süt ürünlerine; dışkıda var olan patojen etkenler süt üretim sürecinde bulaşır ve bu süt ürünlerini tüketenleri enfekte eder. Yine taze meyve ve sebzeler üretim sürecinde, kontamine olmuş su ve hayvan dışkıları ile enfekte olabilirler. Uygun şartlarda tam hijyen yapılmadan tüketilmesi ile enfeksiyona yakalanılabilmektedir. Özellikle taze, işlenmiş meyve suları birçok Salmonella salgınına yol açmıştır. Son olarakta enfeksiyonunun yayılmasında kontamine olmuş şebeke suları ve hijyen bilinci gelişmemiş çocuklarda oral-fekal bulaşma sıklıkla rastlanmaktadır.

Tablo 2 . Salmonella tür, alt tür ve serotiplerin buldukları habitatlar (2)

Salmonella tür ve alttürleri	Alt türlerinde bulunan serotip sayıları	Yaşadığı habitatlar
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1,454	Sıcak kanlı hayvanlar
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489	Soğuk kanlı hayvanlar ve habitatları
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94	Soğuk kanlı hayvanlar ve habitatları
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324	Soğuk kanlı hayvanlar ve habitatları
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70	Soğuk kanlı hayvanlar ve habitatları
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12	Soğuk kanlı hayvanlar ve habitatları
<i>S. bongori</i> (V)	20	Soğuk kanlı hayvanlar ve habitatları
Toplam	2,463	

1980'lerde Salmonellozis'in gelişmiş ülkelerde de arttığı tespit edilmiştir. Bu artışta *S. Enteritidis* faz tip (PT) 4'ün rol oynadığı ve etkenin yayılmasında tavukçuluk, özellikle yumurta üretiminden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar Salmonellanın tavukların üreme organlarında adaptasyon göstererek oraya yerleştiği ve ovaryum ile ovudakta kalıcı olan etkenin, yumurtaya geçerek orada yaşamını devam ettirdiği tespit edilmiştir (20). *Salmonella* etkeni sıcağa dirençli değildir ve düşük sıcaklıkta çoğalamazlar. Ancak çok düşük sıcaklıklarda bile ölmezler. Ayrıca asitli gıdalarda bile yaşamını sürdürebilirler. Bu gıdalar çok sayıda proseten geçse de, eğer gıda kontamine olmuşsa etkenin eradikasyonu çok güçtür. Örnek olarak yağlı ürünler mikroorganizmayı, pastörizasyon işlemi olsada, sıcaklık etkisinden koruyarak hayatta kalmalarını sağlayabilirler (8). 1980'lerde görülen salgınlarda etkili olan *S. Enteritidis* PT4'e karşı yapılan hijyen çalışmaları ve aşılama ile 1990'larda AB ülkelerinde enfeksiyonun görülme oranların azalma olmuştur. Ancak 2000'lerden sonra bu kezde *S. Enteritidis*in diğer serotiplerinden PT1, PT14B ve PT21'den kaynaklanan enfeksiyonlar saptanmaya başlanmıştır. Vaka kayıtları ve geniş laboratuvar çalışmaları, enfeksiyonun kaynağının yine yumurta üretim sürecinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (7).

2.4. Salmonella enfeksiyonları

Salmonella etkeni kontamine su ve gıdalar yolu ile sağlıklı kişilere bulaşabilirler. Mide asidine duyarlıdır ancak, bol su ve gıdalarla birlikte alındığında mide asidinden

etkilenmeden, ince bağırsağa ulaşırlar. İnfeksiyon için $10^5 - 10^8$ canlı bakterinin alınması yeterlidir. Yüksek penetrasyon yeteneği olan Salmonella, fagositik hücrelerde ve epitelyal hücrelerde çoğalabilir. Ayrıca insanların ve birçok hayvan türünün fakültatif barsak organizmasıdır. Salmonella Typhi ve Salmonella Paratyphi insanlarda tifo ve paratifoye neden olurlar. İnce bağırsağa yerleşen etken, epitel dokudan geçerek lenf dokusuna ulaşır ve kan sistemine geçerek (septisemi) vücudun; karaciğer, dalak, safra kesesi, böbrek, kemik iliği, kalp, akciğer ve gastrointestinal sistemdeki lenf sistemi gibi değişik bölgelerine yerleşebilir. Enfeksiyonda, vücut sıcaklığı artışı, pembe lekeler ve baş ağrısı gözlenir. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde kabızlık ve bunu takip eden kanlı ishal ile karşılaşa bilinir. Kusma ve karın ağrısı diğer belirtilere eşlik edebilir. S. paratyphi serotiplerin neden olduğu paratifo hastalığı tifoya benzemekle birlikte daha az tehlikeli olup hastalarda septisemi, ateş, baş ağrısı ve karın ağrısına yol açar. Salmonellanın virulansı; konakcının immun yetmezliğine sebep olan faktörlerin etkisi (AIDS, organ transplantasyonları), mide asit salgısındaki bozukluklar, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı ve ağız yolu ile alınan canlı bakterilerin miktarına bağlıdır (21, 22).

Salmonella insanlarda; akut ve spontane *gastro-enteritler*, *tifo-paratifo*, *septisemi* ve *lokal organ enfeksiyonlarına* yol açar (21).

2.4.1. Tifo – Paratifo

Her Salmonella serotipi insanlarda gastroenterite sebep olabilir. Ancak tifo ve paratifo gibi klinik infeksiyon tablosunun ise belirli serotipler neden olur. S. Enteritidis ve S. Typhimurium başta olmak üzere Salmonella serotipleri invaziv Salmonella infeksiyonlarında da sıklıkla karşımıza çıkmakta ve hastaların dışkı örneği dışındaki klinik örneklerinden (kan, kemik iliği, idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve plevra sıvısı gibi) de sıklıkla izole edilebilmektedir (23). Tifo ve paratifo, Salmonella Typhi, Salmonella Paratyphi A, Salmonella Paratyphi B ve Salmonella Paratyphi C serotipleri tarafından oluşturulurlar. Salmonella Typhi dışındaki serotipler bu tip infeksiyonlarda daha seyrek izole edilmektedirler (21). Kuluçka süresi genellikle 10 – 14 gündür, fakat bu süre alınan Salmonella serotipine ve bakteri sayısına bağlı olarak 7 ile 21 gün arasında değişebilir. Gizli bir seyir izleye bilen hastalık, hastada kabızlık ve sonra orta dereceli ishale yol açabilir. Tifo-paratifo tipik dört dönem içinde seyreden bir enfeksiyondur. Hastalık birinci haftasında yavaş yükselen bir ateş,

ikinci haftasında 40 – 41 °C arasında gözlenen ateş, üçüncü haftasında gittikçe düşmeye başlar ve dördüncü haftanın sonlarına doğru normale iner (24). Kan kültürleri birinci ve ikinci haftada pozitifdir. Hastalığın teşhisinde dikkat edilmesi gerek noktalar vardır. Hastalık erken dönemde, dışkı kültüründe negatif, ikinci haftadan itibaren ise pozitif olarak tespit edilebilir. En sağlıklı tanı ise kan ve kemik iliği kültürü ile konabilir (21).

2.4.2. Gastroenteritis

Gastroenteritler, dünyada sık olup, özellikle gelişmekte olan ülkelerde sorun olmaya devam etmektedir. Etken olan bakteri, virus ya da parazitler, sıklıkla oral yol ile bulaştıklarından hijyen koşulları ve sanitasyon uygulamalarındaki eksiklik enfeksiyonun gelişimine neden olmaktadır. Bakteriyel patojenlerden olan Salmonella ve Shigella türleri, özellikle gelişmekte olan ülkelerin kırsal kesimlerinde en sık izole edilen bakterilerdir. Salmonella enfeksiyonu dünyada yaygın bir zoonozdur. Tifo tipi olmayan salmonellozun en yaygın formu, kısa süren ve kendi kendini sınırlayabilen gastroenterit tablosudur ve hastaların yaklaşık %5-10'unda ciddi komplikasyonlar gelişebilmektedir (25). Gastroenterit vakalarında Salmonella sıklıkla karşılaşılan etkidir. İnsanlar da daha çok Salmonella Enteritidis ve Salmonella Typhimurium serotipleri hastalığa neden olur. Ayrıca diğer Salmonella serotiplerinin de gastroenteritise yol açabileceği bilinmektedir. (26). Genellikle kuluçka süresi kısa olan (2 – 48 saat) gastroenterit vakaları, akut bir seyri vardır. Genellikle yüksek ateş gözlenmezken bulantı, kusma ve diyare şeklinde klinik belirtiler gözlenir. Gastroenteritler genellikle 2-5 gün gibi bir sürede kendiliğinden düzelirler. Etken dışkı kültürlerinde, hastalığın başlangıcından itibaren pozitif, kan kültürleri ise negatif gözlenir (21).

2.4.3. Lokal organ enfeksiyonları ve sepsisemi

Septisemi ve lokal organ enfeksiyonlarında, genel olarak Salmonella Choleraesuis, Salmonella Paratyphi C, Salmonella Typhimurium ve Salmonella Enteritidis serotipleri rol oynar (27). Hastalığın kliniği ani başlayan ve hızla yükselen ateş biçimindedir. Bakterilerin yerleştiği organ ve sistemlere göre klinik bulgular değişir. Yüksek ateş sırasında etkenler kan kültüründe pozitifdir, dışkı kültüründe ise nadiren pozitifdir (26).

Hastalığın tedavisinde klinik tablonun semptomatik tedavisi ve antibiyotik uygulanır. Ancak basit vakalarda antibiyotik tedavisi gereksizdir. İyileşmenin gözlenmediği vakalarda, yüksek ateş ve ağır ishale seyreden olgularda antibiyotik tedavisi gerekebilir (24). Salmonella etkeni ampisiline ve kloramfenikole yüksek oranda direnç geliştirmiştir. Bu sebepler enfeksiyonların tedavisinde kinolonların ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımını yaygınlaştırmıştır (28). Tifo ve para tifo tedavisinde bakteri izolasyonu için örnekler alındıktan sonra tedaviye başlanır. 1-Standart tedavi: Kloramfenikol 50 mg/kg/gün, 6 saat ara ile 4 e bölünerek ağızdan (PO) tedaviye başlanır veya trimetoprim- sulfametoksazol fort tableten 2x1 /gün PO 14 gün süre ile verilir. 1970 li yıllardan sonra antibiyotiklere çoklu direnç gösteren salmonella bakterilerinin belirlenmesi nedeni ile tedavilerinde seftriakson 1 gr x 2/gün damardan (İV) çocuklar için 75 mg/kg/gün veya sefaperazon 4x2-4gr/gün İV, 14 gün süre verilir. Yetişkinler için siprofloksazin 2x500-750 mg/gün PO veya 200-400 mg x 2/gün İV yoldan yine 14 gün süre ile verilir. Hastalıktan bir yıl sonrasına kadar dışkıında tifo basili bulunduranlar taşıyıcılardır. Tedavisinde bu ilaçlardan birisi ile 6 hafta süre ile uyulama yapılır (29).

2.5. Mikroorganizmaların identifikasyonu

Mikrobiyal sınıflandırma, mikroorganizmanın önemli özelliklerinin tespit edildiği bir işlemler dizisidir. Mikroorganizma tespitinde çok sayıda metot kullanılmaktadır. Ancak genel olarak iki gruba ayrılır. Bunlar fenotipik ve genotipik tabanlı identifikasyondur. Genetipik tabanlı teşhislerde organizmanın gen ve nükleik asit yapısı kullanılır. Fenotipik karakterler ise teşhis edilebilir spesifik özelliklerin tespitine dayanır ancak çok sayıda prosedür gerektirir (30).

Özellikle genotipik sınıflandırma ile bakterilerin alt tiplerinin teşhisi mümkün olmuştur. Alt tiplere ile yalnızca gıda ile bulaşan enfeksiyonları tespit ve takibini yapmaya yardımcı olmakla kalmayıp, aynı zamanda gıda üretim sürecinde enfeksiyonun kaynağını bulmaya yardımcı olur. Alt tiplere metodunun kullanılması, popülasyon genetiği, epidemiyolojisi ve farklı gıda kaynaklı enfeksiyonların etiyolojisinin belirlenmesini sağlar. Son yıllarda mikroorganizmaların alt tiplerinin tespitinde önemli gelişmeler yaşanmıştır (31).

Günümüzde, bir takım üstünlükleri göz önünde bulundurularak klasik kültürel yöntemler halen daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak buna karşılık, Salmonella'ların izolasyonu ve tanımlanmasında yararlanılan klasik kültürel yöntemlerin uygulanması ile gerçek ve doğru sonuçlar alınmasında bazı güçlükler ve olumsuzluklarla da karşılaşmaktadır. Klasik kültürel yöntemlerin en önemli dezavantajı sonuçların çok uzun sürede alınmasıdır (32). Ayrıca klasik yöntemler ile sadece bakterinin türü tespit edilebilmektedir. Alt grup tespiti gelişmiş yöntemler ile yapılabilmektedir.

Salmonella'nın klasik yöntemle tayininde ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme, selektif katı besiyerine ekim, biyokimyasal testler ve serolojik doğrulama aşamaları vardır ve bu analizler 7 gün sürmektedir. Bu yöntemde uygulamada görülen farklılıklar çeşitli kuruluşlar tarafından farklı besiyerleri ve farklı inkübasyon sıcaklıkları önerilmesinden kaynaklanmaktadır. Salmonella aranmasında geleneksel kültürel metodun ilk adımı selektif olmayan bir sıvı besiyerinde önzenginleştirmedir. İkinci aşama selektif zenginleştirmedir. Selektif zenginleştirme besiyerlerinde refakatçi bakteri türlerinin çoğalması sınırlanırken Salmonella hücrelerinin artışına izin verilir. Zenginleştirme işleminden sonra Salmonella'yı saf olarak izole etmek için değişik seçici, ayırt edici besiyerleri kullanılmaktadır. Zenginleştirme ortamlarında olduğu gibi selektif katı besiyerleri de pek çok modifikasyonlar ile kullanılmaktadır (33).

Tablo 3. İdentifikasyon kriterleri ve mikrobiyal klasifikasyon için özellikler (30).

Fenotipik kriterler	
Makroskopik morfoloji	Besi yerlerinde karakteristik üreme
Mikroskopik morfoloji	Çap, şekil, intrasellüler uzantı
Boyama karakterleri	Mikroorganizmaların farklı renklerde boyanması
Yaşam alını gereksinimleri	Mikroorganizmaların üreme sıcaklıkları, oksijen ve diğer gazlara gereksinimleri, besi yeri pH'sı.
Beslenme gereksinimleri	Organizmaların değişik karbon ve nitrojen kaynaklarına spesifik beslenme gereksinimleri olması
Direnç profili	Antibiyotiklere, ağır metallere ve toksinlere karşı spesifik cevap vermesi
Antijenik özellikler	Mikroorganizmanın serolojik ve immünolojik özelliklerinin sahip olması
Subsellüler özellikler	Mikroorganizmaları hücre duvarı gibi özelliklerinin farklı olması ve bunları tespiti
Genotipik kriterler	
Temel DNA kompozisyon oranı	DNA dört temel azot bazından oluşmaktadır (guanin, sitosin, adenin ve timin). Bu bazların organizmadaki yüzdesi ayırıcı sonuç verir
Nükleik asit (DNA ve RNA) tabanlı sekans analizi	DNA oluşumunda en önemlisi bazların karşılıklı olarak eşleşmesidir. Buradaki kural Adenin ile Timin`nin ve Guanin ile de Sitosin`nin baz çiftleri oluşturmasıdır. Bu bazların sıralanması değişik yöntemler ile tespit edilerek mikroorganizmaların ayırıcı tanısı yapılır.

2.6. Tanı yöntemleri

Salmonella etkeninin hastalarda tanısında enfeksiyonun serotipine göre değişiklik gösterebilir. Tifo ve paratifoda kan, kemik iliği, dışkı, idrar ve safra örnekleri incelenirken (34), septisemi ve lokal enfeksiyonlar da kan kültürü ve bakterinin yerleştiği organa göre uygun örnekler (BOS, idrar, eklem, plevra ve periton sıvıları gibi) incelenir. Gastroenteritli vakalarda ise dışkı örnekleri kullanılır (26).

2.6.1. Kültür

Salmonella'ların dışkı örneklerinden izolasyonu için MacConkey ve EMB (Eosin Metilen Mavis) seçici özelliğine sahip katı besiyerleri kullanılabilir (35). Az miktarda bakteri içerdiği düşünülen dışkı örneklerinden çoğaltıcı veya zenginleştirme besiyerlerinin kullanılmasıyla etken izole edilebilir (36).

Kullanılan Bazı Besi Yerleri ve Kullanım Amacı

Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS): Salmonella, Cronobacter sakazakii olmak üzere patojenik Enterobacteriaceae için selektif olmayan öz zenginleştirme için kullanılır.

Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin (MKTTn) Broth: In vitro ortamda yapılan analizlerde Salmonella için selektif besi yeridir.

Rappaport Vassiliadis (RVS) Broth: In vitro ortamda yapılan analizlerde Salmonella için selektif sıvı besi yeridir.

Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar: In vitro ortamda yapılan analizlerde Salmonella ve Shigella için selektif katı besi yeridir.

Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose (BPLS) Agar: In vitro ortamda yapılan analizlerde Salmonella Typhosa hariç, Salmonella için selektif katı besi yeridir.

Salmonella Shigella (SS) Agar: In vitro ortamda yapılan analizlerde Salmonella ve Shigella için selektif katı besi yeridir.

RAMBACH Agar: In vitro ortamda yapılan analizlerde Salmonella Typhi hariç, Salmonella için selektif katı besi yeridir.

XLT4 Agar: In vitro ortamda yapılan analizlerde patojenik Enterobacteriaceae ve özellikle Salmonella için selektif katı besi yeridir.

Triple Sugar Iron Agar: In vitro ortamda yapılan analizlerde Salmonella için selektif katı besi yeridir (37).

Selektif katı besiyerinde üretilen etkenler eğer Salmonella şüphesi taşıyorsa elde edilen verilerin doğrulanarak izole edilen bakterinin Salmonella olup olmadığı biyokimyasal ve serolojik testler ile kontrol edilir. Bu amaçla çok sayıda test uygulanmakta olup bunlar arasında en yaygın kullanılanı biyokimyasal testlerdir. Triple Sugar Iron Agar (besiyerinde glikozdan asit ve gaz oluşumu, laktoz ve/veya sakkarozun kullanımı), H₂S oluşumu testleri ile

Urea Broth besiyerinde üre testi ile tespitini biyokimyasal testlere örnek olarak verebiliriz. Gıdaların rutin mikrobiyolojik kontrolünde Salmonella sadece aranır ve yukarıda verilen analiz ile 25 gram (veya 25 ml) gıdada "Salmonella var" ya da "Salmonella yok" şeklinde sonuç verilir. Özel çalışmalar çerçevesinde Salmonella sayılması gerekiyor ise EMS yöntemi kullanılarak sayım yapılabilir (33).

2.6.2 Seroloji

Salmonelloz tanısında kültür ve biyokimyasal testlere ek olarak serolojik tanı yöntemlerinden de yararlanır. Tifo ve paratifo tanısında en eski serolojik testlerden olan Gruber-Widal testi yaygın olarak laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Gruber-Widal testi serumunda S. Typhi'nin O (somatik) ve H (flajeller) antijenlerine karşı antikorları gösteren bir aglütinasyon testidir (34). S. Typhi tanısında kullanılan diğer bir test ise dot EIA (dot enzyme immunoassay) dir. dot EIA testinde, Salmonella Typhi'nin dış membran proteinine (OMP) karşı oluşan IgM antikorlarını saptamaya yarayan bir testtir (34). Ayrıca GLISA-Rapid Test (Gold Labelled ImmunoSorbent) kullanılarak, farklı gıda çeşitlerinde ve hayvan yemlerinde Salmonella tespit edilir. Bu test, altın kaplanmış antikor esaslı bir immuno kromatografik hızlı test kitidir (37).

2.7. Salmonella tiplendirilmesi

Epidemiyolojik tiplendirme sistemleri salgın araştırmalarında, bir veya daha fazla epidemik suşun yayılım şeklini anlamak ve doğrulamak için kullanılabilir. Bunun yanı sıra, bu suşların şüphelenilen kaynaklarının ve yayılımına katkıda bulunan etkenlerin doğrulanması ve epidemik organizmaların rezervuarlarının izleminde de kullanılmaktadırlar. Tiplendirme, zaman içinde enfekte topluluktaki epidemik suşların sıklığı ve dolaşımı hakkında bilgi sağlayarak epidemiyolojik sürveyansa ve kontrol önlemlerinin değerlendirilmesine de katkıda bulunur. Salgınlar geniş bir topluluğun etiyolojik ajana maruz kalmasıyla ortaya çıkmaktadır. Genellikle salgına yol açan etiyolojik ajan, kaynak organizmayla genetik olarak eş veya çok yakın ilişkili bir hücreden köken alır. Farklı zamanlarda, farklı coğrafik alanlarda, farklı kaynaklardan köken alan ve tür seviyesinde aynı olan organizmalar, ancak tiplendirme yöntemleri ile birbirlerinden ayrılabilir, alttiplere veya suşlara sınıflandırılabilirler (38).

2.7.1. Fenotipik tiplendirme

Salmonella mikroorganizmasının tiplendirilmesinde; serotiplendirme, faj tiplendirme, biyotiplendirme, kolisin tipi, antibiyotik duyarlık testi, dış membran protein profili, lipopolisakkarid analizi ve siderofor sentezi farklı fenotipik yöntemler kullanılmaktadır (39). Fenotipik serotipleme, yaygın ve klinik önemi olan serotipler hakkında yeterli epidemiyolojik bilgi edinmek için kullanılır (40).

Serotiplendirme, Salmonella infeksiyonlarında, Salmonella'ların incelendiği epidemiyolojik araştırmalarda ve klinik örneklerden Salmonella'ların izole edildiği rutin uygulamalarda identifikasyon için ya da tiplendirme için uygulanması gereken bir yöntemdir (41).

Antibiyotik Duyarlılık Testi, epidemiyolojik çalışmalarda serotiplendirmeye ek olarak kullanılmaktadır. Ancak benzer antibiyotik direnci gösteren serotiplerin ayırımında antibiyotik duyarlılık testi yetersizdir. Biyotiplendirme, salmonella serotipleri için çeşitli biyokimyasal özelliklere ve hemaglutinin fimbria varlığı gibi özelliklere dayanır (42). Kolisin tiplendirilme de, mikroorganizmalar tarafından üretilen protein yapıda olan bakteriyosinler veya kolisinlerin baktosid maddeye duyarlılık veya dayanıklılığa bağlı olarak sınıflandırmadır. Bu yöntemde bakteriyosin üreten kökenler kendi bakteriyosinlerine karşı dirençlidirler (43). Salmonella'larda kolisin tiplerinin az sayıda olması ve kolisin üretimini kodlayan plazmitlerin konjugatif yapısı nedeniyle kolisin tiplendirme, köken ayırımı için tek başına yetersizdir. Kolisin tipi ancak diğer yöntemleri desteklemek amacıyla kullanılmalıdır (42). Dış Membran Protein ve Lipopolisakkarid Profilleri dikkate alınarak yapılan serotipleme her bakteri için uygun değildir. Çalışmalar, dış membran protein profillerinin her bir Salmonella serotipi için aynı bulunması nedeniyle epidemiyolojik çalışmalarda kullanımının etkili olmayacağını göstermiştir (44). Faj Tiplendirme, mikroorganizmaların bakteriyofajlara ve fajlara duyarlılık testi içerir. Salmonella'lar çeşitli kaynaklardan izole edilen bakteriyofajlara veya fajlara duyarlıdır. Salmonella'ların bu özeliğinden yararlanılarak; S.Typhi, S.Paratyphi B, S.Typhimurium, S.Enteritidis, S.Hadar ve S.Virchow gibi serotipler için faj tiplendirme şemaları oluşturulmuştur (42).

Salmonella etkeni iki türden oluşur. Bunlardan *S. enterica*, 6 alt türe ayrılır (*S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, and *S. enterica* subsp. *Indica*) ve *S. bongori* dir. Bu nomenklatörler Salmonella soy ağacını temsil eder (45).

Genetik olarak Salmonellanın tür ve alt türler arasındaki filogenetik ilişkiyi tespit etmek için genel olarak 7 adet housekeeping geninden yararlanılır. *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* ve *thrA* Salmonellaya ait temel genlerdir (46). Alt türlerin biyolojik sınıflandırılmasına ek olarak, Salmonella etkeni yüzey antijenlerine göre alt türlere ayrılırlar. Kauffman and White sınıflandırma şeması; Salmonella'nın hücre yüzeyinde bulunan antijen yapılarına göre genetik olarak serotiplenilmesini gösterir. Salmonella da ilk 'O' antijeni tespit edilmiştir. Daha sonra 'H' ve patojenik Samonella typhi de bulunan 'Vi' antijeni tespit edilmiştir (45).

Tablo 4. Kauffman and White sınıflandırması

"O"-group	Serovar	"O" antigens	Phase 1 (motile) "H" antigens	Phase 2 (non-motile) "H" antigens
A	<i>S. Paratyphi A</i>	1,2,12	a	no phase 2 antigen
	<i>S. Paratyphi A</i> var. <i>durazzo</i>	2,12	a	no phase 2 antigen
B	<i>S. Paratyphi B</i>	1,4,5,12	b	1,2
	<i>S. Paratyphi B</i> var. <i>odense</i>	1,4,12	b	1,2
	<i>S. Java</i>	1,4,5,12	b	(1,2)
	<i>S. Limete</i>	1,4,12,27	b	1,5
	<i>S. Typhimurium</i>	1,4,5,12	i	1,2
	<i>S. Typhimurium</i> var. <i>copenhagen</i>	1,4,12	i	1,2
	<i>S. Agama</i>	4,12	i	1,6
	<i>S. Abortus-equi</i>	4,12	no phase 1 antigen	e,n,x
	<i>S. Abortus-ovis</i>	4,12	c	1,6
	<i>S. Agona</i>	4,12	f,g,s	no phase 2 antigen
	<i>S. Brandenburg</i>	4,12	l,v	e,n,z ₁₅
	<i>S. Bredeney</i>	1,4,12,27	l,v	1,7
	<i>S. Derby</i>	1,4,5,12	f,g	no phase 2 antigen
	<i>S. Heidelberg</i>	1,4,5,12	r	1,2
	<i>S. Saint-paul</i>	1,4,5,12	e,h	1,2
	<i>S. Salinatis</i>	4,12	d,e,h	d,e,n,z ₁₅
<i>S. Stanley</i>	4,5,12	d	1,2	
C ₁	<i>S. Pratyphi C</i>	6,7,	c	1,5
	<i>S. Colerae-suis</i>	6,7	c	1,5
	<i>S. Colerae-suis</i> var. <i>kuunzendorf</i>	6,7	(c)	1,5

	<i>S. Dcatur</i>	6,7	c	1,5
	<i>S. Typhi-suis</i>	6,7	c	1,5
	<i>S. Bareilly</i>	6,7	y	1,5
	<i>S. Infantis</i>	6,7	r	1,5
	<i>S. Menston</i>	6,7	g,s,t	no phase 2 antigen
	<i>S. Montevideo</i>	6,7	g,m,s	no phase 2 antigen
	<i>S. oranienburg</i>	6,7	m,t	no phase 2 antigen
	<i>S. Thompson</i>	6,7	k	1,5
C ₂	<i>S. Bovis-morbificans</i>	6,8	r	1,5
	<i>S. Newport</i>	6,8	e,h	1,2
D	<i>S. Typhi</i>	9,12,Vi	d	no phase 2 antigen
	<i>S. Ndolo</i>	9,12	d	1,5
	<i>S. Dublin</i>	1,9,12	g,p	no phase 2 antigen
	<i>S. Enteritidis</i>	1,9,12	g,m	no phase 2 antigen
	<i>S. Gallinarum</i>	1,9,12	no phase 1 antigen	no phase 2 antigen
	<i>S. Pullorum</i>	(1),9,12	no phase 1 antigen	no phase 2 antigen
	<i>S. Panama</i>	1,9,12	l,v	1,5
	<i>S. Miami</i>	1,9,12	a	1,5
	<i>S. Sendai</i>	1,9,12	a	1,5
E ₁	<i>S. Anatum</i>	3,10	e,h	1,6
	<i>S. Give</i>	3,10	l,v	1,7
	<i>S. London</i>	3,10	l,v	1,6
	<i>S. Meleagridis</i>	3,10	e,h	1,w
E ₂	<i>S. Cambridge</i>	3,15	e,h	1,w
	<i>S. Newington</i>	3,15	e,h	1,6
E ₃	<i>S. Minneapolis</i>	(3),(15),34	e,h	1,6
E ₄	<i>S. Senftenberg</i>	1,3,19	g,s,t	no phase 2 antigen
	<i>S. Simsbury</i>	1,3,19	no phase 1 antigen	Z ₂₇
F	<i>S. Aberdeen</i>	11	i	1,2
G	<i>S. Cubana</i>	1,13,23	Z ₂₉	no phase 2 antigen
	<i>S. Poona</i>	13,22	z	1,6
H	<i>S. Heves</i>	6,14,24	d	1,5
	<i>S. Onderstepoort</i>	1,6,14,25	e,h	1,5
I	<i>S. Brazil</i>	16	a	1,5
	<i>S. Hvitvingfoss</i>	16	b	e,n,x
Others	<i>S. Kirkee</i>	17	b	1,2
	<i>S. Adelaide</i>	35	f,g	no phase 2 antigen
	<i>S. Locarno</i>	57	Z ₂₉	Z ₄₂

2.7.2. Genotipik tiplendirme

Moleküler tanımlama yöntemleri, gelişmekte olan teknolojinin mikrobiyoloji alanında bulunduğu en önemli yeniliklerden biridir. Moleküler tanımlama tekniklerine her geçen gün bir yenisinin eklenmesi, farklı amaçlarla yürütülen bilimsel çalışmalara büyük yarar sağlamaktadır (47). Moleküler tiplendirme; incelenen izolatlar ayırt edilemez karakteristiklere (örneğin aynı genetik parmak izi) sahip olduklarında; klonal olarak ilişkili (aynı suş [strain]) kabul edilirler veya izolatlar farklı karakteristiklere sahip iseler farklı suşlar olarak kabul

edilir. Ancak tiplendirme yöntemlerinin sonuçları tek başına sürveyansta çok anlam ifade etmeyebilir, incelenmekte olan enfeksiyon hastalığı ile ilişkili elde olan tüm epidemiyolojik, klinik ve demografik verilerin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (38).

Bu yöntemlerin yaygın olarak kullanımını etkileyen en önemli faktörler maliyet ve deneyimli personel ihtiyacı olsa da, kendisine özgü avantajlara ve dezavantajlara sahip olan bu yöntemlerden tüm dünyada yaygın olarak yararlanılmaktadır (47). Salmonella etkeninin tespitinde geleneksel olarak besi yerleri ve immünolojik test yöntemlerinin yanı sıra genetik tiplendirme teknikleri de kullanılmaktadır. Salmonella'nın tespitinde PCR (Polymerase chain reaction) ya da polimeraz zincir reaksiyonu, hızlı ve kesin sonuçlar vermektedir. Ancak sadece PCR yöntemi kullanmak, ortamda bulunan ölü ve de canlı mikroorganizmaların ayırıcı tespiti yapılamadığından yeterli olmaya bilir. Günümüzde mikroorganizmaların genotipik tespitinde ve sınıflandırılmasında DNA amplifikasyonu temelli yöntemler den MLST (çoklu alan sekans tiplendirme), MLVA (Çoklu Alan Değişken Sayıdaki Tandem Tekrarları- Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats) ve PFGE (vuruşlu alan jel elektroforezi) yaygın biçimde kullanılmaktadır (48). Ancak izolatların bu yöntemlerle incelenmesi için önce polimeraz zincir reaksiyonundan faydalanılır. PCR sonucu elde edilen ürünleri serotiplemede kullanılır (49).

Tablo 5. Günümüzde Kullanılan Moleküler Tiplendirme Yöntemleri (38)

Mekanizma	Yöntem
Nükleik asit temelli	<ul style="list-style-type: none">• Plazmid profilleri• RFLP (Restriction fragment length polymorphism)• PFGE (Pulsed field gel electrophoresis)• Parçalı (segmented) RNA jel elektroforezi• Ribozomal RNA jel elektroforezi• Bir veya daha fazla bölgenin direk olarak dzenilmesi (gen dizi analizi)• MLST (Multilocus sequence typing)
PCR temelli	<ul style="list-style-type: none">• Bir patojenin özgül hedefine yönelik çoğaltma• Bilinen tekrarlayan dizilerin (repetitive sequences) hedeflendiği yöntemler: ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences), REP (repetitive extragenic palindromic sequences), DRE (double repetitive element), BOX, IS (insertional sequences), PGRS (polymorphic guanine/cytosine-rich repetitive sequences)• Multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA)• RAPD (randomly amplified polymorphic DNA),• AP-PCR (arbitrary primed PCR) Tek bir çoğaltılmış bölgenin restriksiyon endonükleazlarla kesilmesi• AFLP (Amplified fragment length polymorphism)
Gen ekspresyon temelli	<ul style="list-style-type: none">• T (Reverse transcriptase)-PZR• Microarray teknolojileri
Hibridizasyon temelli	<ul style="list-style-type: none">• Ribotiplendirme

2.7.2.1. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)

Özellikle kültürü zor ve zaman alan etkenler ile kültürü mümkün olmayan çoğunlukla viral ajanlar gibi enfeksiyöz ajanların saptanması amacıyla son yıllarda PCR mikrobiyolojide en çok tercih edilen moleküler yöntem olmuştur. Bu yöntemin geliştirilmesiyle gelecekte de oldukça geniş kullanım alanı bulacaktır. Burada bulaşıcı hastalıkların sürveyansında moleküler yöntemlerin, etkenin saptanmasından öte epidemiyolojik tiplendirilmesi amaçlı kullanımının yeri ve önemi üzerinde durulacaktır (38).

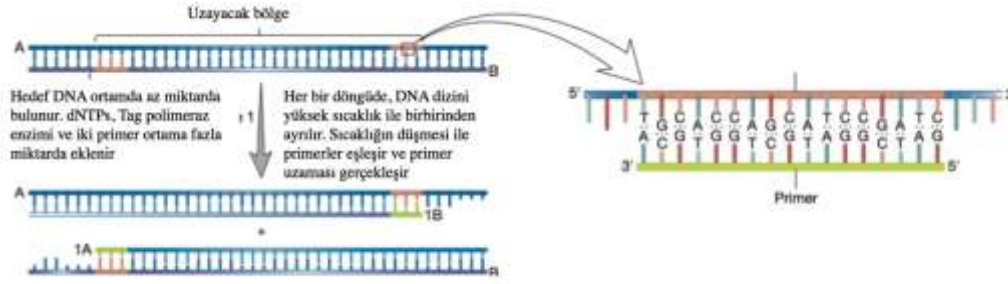
PCR; bakteri ve virüs gibi etkenlerine ait nükleik asit zincirlerinin, primerler ile ısıya dayanıklı enzimleri kullanarak laboratuvar ortamında çoğaltılmasını sağlayan özgün ve güvenilir bir yöntemdir. Genetik materyal, çok az sayıda olsa da çoğaltılabilir ve kolayca tanımlanabilir (50). PCR ya da Türkçesi ile polimeraz zincir reaksiyonu, moleküler biyolojide uygulanan bir teknik olup, basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması olarak tanımlanabilir. PCR, bir çeşit "in vitro klonlama"dır. PCR tekniği Kary Mullis tarafından 1985' te bulunmuş ve 1993 yılında bu çalışma ile Nobel ödülü kazanmıştır. PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir in vitro DNA sentezi yöntemidir. PCR; DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bir tekniktir.

Her bir PCR döngüsü denatürasyon, primer eşleme ve primer uzama aşamalarından oluşur. Çift sarmal DNA yapısının yüksek sıcaklıkta ayrılarak tek sarmal yapıya dönüşmesine *denatürasyon* denir. Tek sarmal yapının ortam ısısının düşmesi ile primer olarak kullanılan iki oligonükleotidin hedef DNA'ya bağlanması primer eşleme olarak ifade edilir. Son aşama ise katolizör olan DNA polimeraz ile primerlere nükleotid eklenmesi ve DNA zincirinin uzaması *primer uzama* olarak adlandırılır (51).

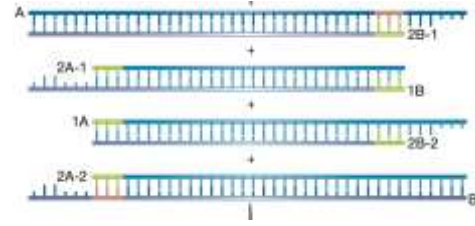
PCR, reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon); daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyonu); sonra zincirin uzamasını (polimerizasyonu) (çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) bir PCR siklusunu oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir. (Sırasıyla 94°C-98°C; 37°C-65°C; 72°C). PCR tekniği tek veya çift iplikçikli DNA'yı; RNA'ya hedef olarak kullanılabilir. Bu teknikle; bir DNA hedefini 106-1012 arasında çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak; bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR tekniği, çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. PCR tekniği ile laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanılmış; birçok durumda radyoaktivite kullanımını gereksiz hale gelmiştir ve serotiplemede kullanılacak örneklerin PCR sonucu elde edilmesi sebebi serotipleme çalışmalarında önemli yer tutar (49, 52, 53, 54).

Serotipleme işlemi için veya kullanılacak örneklerin elde edilmesi için, öncelikle polimeraz zincir reaksiyonundan faydalanılır. PCR sonucu elde edilen ürünler ancak serotiplemede kullanılır (49).

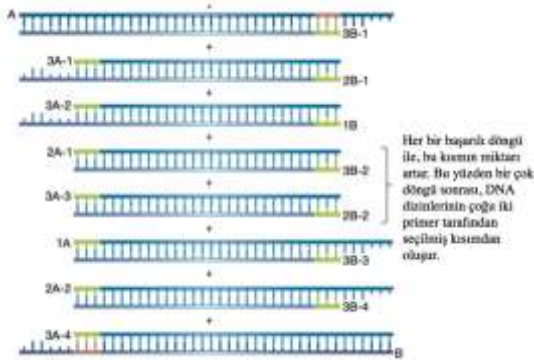
1. Döngü (Her döngü; denatürasyon, primer eşleme ve primer uzamadan oluşur)



2. döngü



3. Döngü



Şekil 3: PCR tekniği (55)

Tablo 6. PCR metotları (56)

Kullanım amacı	Teknikler
Çoğaltılması istenen DNA Dizisinin Bilindiği Durumlarda	<ul style="list-style-type: none">• Standart PCR (Standart PCR)• Ters Transkriptaz PCR (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR)• Katlı PCR (Multiplex PCR)• Antiserumla Sabitleme PCR (Immunocapture PCR)• İç içe PCR (Nested PCR)• Renkli PCR (Colorimetric PCR)• Damlatma PCR (Spot PCR)• Kademeli Sıcaklık Düşürme PCR (Touchdown PCR)• Canlı Hücre Belirleyen PCR (Bio PCR)
Çoğaltılması istenen DNA Dizilerinin Bilinmediği Durumlarda	<ul style="list-style-type: none">• Değişken DNA Dizilerinin Tesadüfen Çoğaltılması (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD- PCR)• Ters PCR (Inverse-PCR)• Kanca PCR (Anchored PCR)• Asymetric PCR
PCR'ın Diğer Tekniklerle Birlikte Kullanıldığı durumlarda	<ul style="list-style-type: none">• Çoğaltılan Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP)• PCR Ürününün Enzimle Kesilmesi (PCR-RFLP)• Çoğaltılmış DNA Dizilerinin Enzimle Kesilmesi (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence; CAPS)• RAPD Bantlarının Spesifik Primere Dönüştürülmesi (Sequence Characterized Amplified Region; SCAR)

Moleküler epidemiyoloji, enfeksiyon hastalıkları araştırmasının salgın incelemesi, sürveyans ve klinisyenler, mikrobiyologlar, immünologlar, laboratuvar teknisyenleri ve sağlık çalışanlarının dahil olduğu önlem stratejilerinin belirlenmesi gibi tüm seviyelerinde direk etkisi olan yeni bir alandır. Ana temel hedefi morbidite ve mortalitenin önlenmesidir. Fenotipik yöntemlerin sınırlamalarını ortadan kaldıran, tiplendirebilirlikleri, tekrarlanabilirlikleri ve ayırıştırma güçleri yüksek olan ve nispeten daha hızlı sonuç veren DNA temelli genotipik yöntemler, epidemiyolojik tiplendirmede tercih edilmeye başlanmıştır.

Bu yöntemlerin çoğunda, organizmaların DNA fragmanlarını, tüm kromozomunu veya plazmidlerini elektrik alanları içinde ayrıştırarak, özel boyalar veya nükleik asit problrarı yardımıyla gözle görülür hale getirerek özgül paternler veya bir nevi parmak izi çıkarılır. Epidemiyolojik ilişkili izolatlar aynı DNA profili veya parmak izine sahipken, sporadik veya epidemiyolojik ilişkisiz izolatlar farklı paternlere ayrışırlar (38).

Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında DNA temelli yöntemlerden MLST (çoklu alan sekans tiplleme), MLVA (Çoklu Alan Değişken Sayıdaki Tandem Tekrarları- Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats) ve PFGE (vuruşlu alan jel elektroforezi) ve 16 S mRNA'nın sekansı yaygın biçimde kullanılmaktadır (48, 57). Subtyping serotiplleme işlemleri ile alt tiplerin sınıflandırılmasında yaygın biçimde kullanılsa da, ayırıcı gücünün az olması, standardize edilmesindeki güçlükler, zaman alıcı prosedür içermesi ve türler arasındaki genetik ilişkiyi gösterememesi gibi eksiklikleri vardır. DNA tabanlı Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) yöntemi ise, serotiplleme de yüksek ayırıcı gücüne rağmen pahalı, zaman alıcı ve iyi bir deneyim gerektirmesi gibi istenmeyen özelliklere sahiptir. Ancak, DNA tabanlı bir yöntem olan multi-locus sequence typing (MLST); öğrenmesi kolay, tekrarlanabilir sonuçlar vermesi, elde edilen verilerin kolayca paylaşılması ve pahalı olmayan yönü ile dikkat çekmektedir.

2.7. 2. 2. MLST (Multi-Locus Sequence Typing - Çoklu Lokus Dizilim Tiplendirmesi)

MLST, "House keeping" genleri adı verilen hücrelerin rutin işlevlerinin sürdürülmesinden sorumlu temel genlerin bir kaç tanesinin dizilimine dayanan yöntemdir. Salmonella için ise, *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* ve *thrA* isimli yedi adet housekeeping geninden yararlanılarak sekanslama yapılır (46). Elde edilen veriler internet üzerinde bulunan bir veri tabanında özel bir eşleme programı ile değerlendirilip bakteri izolatlarının tanımlanması yapılır. MLST de, analizine verilmiş olan lokus için tüm benzersiz dizilimler keşif sıralarına göre bir allele atanır. Eldeki izolatın her bir MLST lokusunda var olan alleller, allelik profili oluşturur ve dizilim tiplendirilmesi tasarlanır. MLST'nin nükleotit dizilimlerini ayırma gücü çok yüksektir. İzolatlar arasındaki ilişkiler allelik profillerin karşılaştırılması ile belirginleşir. Yakın ilişkili izolatlar özdeş dizilim tiplendirmelerine veya birkaç lokusta farklılık gösteren dizilim tiplendirmelerine sahiptirler (47, 58).



- ↓ İzolat toplanması
- ↓ DNA izalasyonu
- ↓ PCR tarafından hedef genin amplifikasyonu
- ↓ Nükleotit sekans tespiti



- ↓ Nükleotit sekans verilerinin toplanması
- ↓ Sekans tip identifikasyonu ve allel sekansı için database sorgulama



- Popülasyon çalışmaları (Bakteriyel popülasyon yapısının değerlendirilmesi ve nükleotit sekans verilerinin analizi)
- Epidemiyolojik çalışmalar (Salgın hastalıkların kaynağının tespiti ve hastalıkların ulusal ve uluslararası gösterimi)

Şekil 4: MLST ve bakteriyel patojen tespiti (55, 59)

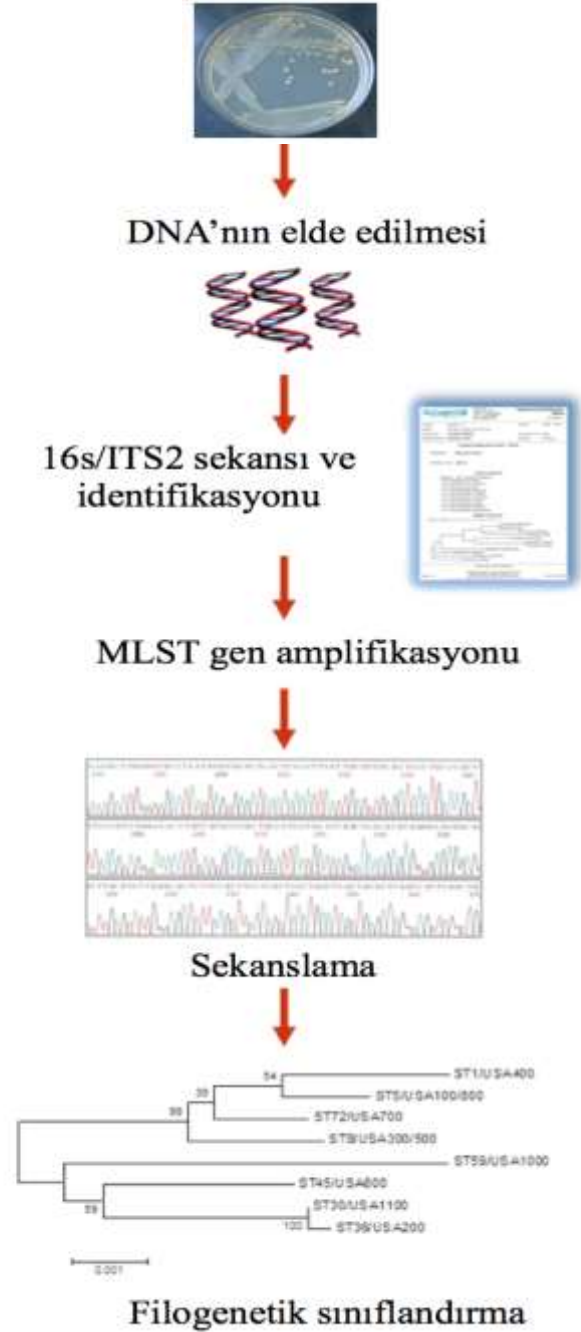
MLST ilk olarak 1998 yılında tanıtılmıştır ve günümüzde patojen mikroorganizmalarının genetik sınıflandırılması ve epidemiyoloji konusunda altın standart olmuştur. Şuan aktif durumda 79 MLST data toplama merkezi bulunmaktadır. Söz konusu databaselere internet aracılığıyla ulaşılabilen ve dünyanın her yerinden serotip çalışma sonuçlarını toplanıp değerlendirilmektedir. Özellikle yeni allel ve serotiplerin keşfi kullanıcıların database bilgi vermesine bağlı olup veri toplama merkezlerinin bir tasarrufu bulunmamaktadır. Verilerin girilmesinden kısa bir süre sonra bilgi internet üzerinde paylaşımına açılır. Bu uluslararası bilgi değişimi klasik serotipleme yönteminde bulunmamaktadır. Ancak MLST yönteminin de bazı yönleri tartışmalıdır. Bunlar tekniğin pahalı ve prosedürünün uzun olması, tüm genom sekans (WGS) gibi daha güçlü yeni nesil

teknığe göre zayıf kalması ve *S. enterica* için salgın analizi ve kısa dönemli epidemiyolojik çözümler sağlama gücünün yetersiz olduğudur. Ancak MLST için harcanan zaman ve emek PCR için harcanandan fazla değildir. Yöntemi öğrenmek PCR deneyimi olanlar için çok zor değildir. WGS sistemi tün genomu incelediğinden daha ayrıntılı bilgi sunmaktadır. Ancak tüm DNA diziliminin incelenmesi sırasında kayıplar yaşanabilir. Sonuç olarak günümüzde MLST *Salmonella* etkeninin serotiplendirilmesi için kullanışlı bir metottur (60).

ESGEM'in, çeşitli ülkelerden 154 laboratuvarla (Türkiye'den katılan laboratuvar sayısı, n=7) yaptığı bir anket çalışmasında, laboratuvarların %73'ünün en az bir moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemini kullandığı veya erişimi olduğu; %78'nin bu yöntemleri, salgın araştırması (%30), genel enfeksiyon sürveyansı (%26) ve hastalık epidemiyolojisi, patojenitesi ve virülansını gösteren moleküler determinantları saptamak (%21) için kullandıkları belirlenmiştir. Kalite kontrolü (%7), ulusal-referans-görevleri (%13) ve araştırma (%3) için kullanım daha azdır. En sık kullanılan üç yöntem, (yaklaşık oranlarla) PFGE (%32), DNA dizi analizi (MLST, vd.) (%22) ve RAPD/rep-PCR (%16) olarak belirlenmiştir. Referans laboratuvarlarında, ribotiplendirme (%10) ve MLVA (%9), diğer laboratuvarlara kıyasla iki kez daha sık kullanılmaktadır. Laboratuvarların yalnızca %19'unun, sahip oldukları bir yazılımla, standardize veri analizi, yorumlaması ve saklaması yapabildiği bildirilmiştir. Çalışılan izolat başına ortalama harcama, 56 (7-200) Euro'dur. Katılımcılarca, birçok tür için kullanılacak tek tiplendirme yöntemi beklentisinin olduğu ve daha hızlı ve yüksek çıktı sayılı yöntemlerin klinik uygulama üzerindeki etkiyi artıracığı düşüncesi belirtilmiştir. En sık tiplendirilen etkenlerin, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* olduğu saptanmıştır. Şu anki tiplendirme sıklığı, ayda ortalama yaklaşık 18 (9-24) bakteridir ve %20 daha fazla tiplendirme yapma gereksinimi olduğu belirtilmiştir. (61)

MLST sekans yöntemi ile salgınların kökeni konusunda önemli bilgiler sağladığı bilinmektedir. Lieftucht and Reacher (62) yaptığı bir sürveyans çalışması ile *Salmonella* Paratyphi B vakalarının artışının Türkiye'ye güneş turizmi için gelenlerle ilişkisini saptamıştır. Benzer bir çalışmada ise 14 Haziran- 5 Temmuz 2008 tarihleri arasında 8914 Avusturyalı lise mezuniyetini kutlayan turistlerin Antalya'daki üç oteli ziyaretleri sırasında bir *Salmonella* Enteritidis kaynaklı hastalık kümeleşmesi meydana gelmiş ve bu kümeleşmenin salgın olup olmadığı Avusturyalı bilim adamları tarafından incelenmiştir (63). Yine yapılan

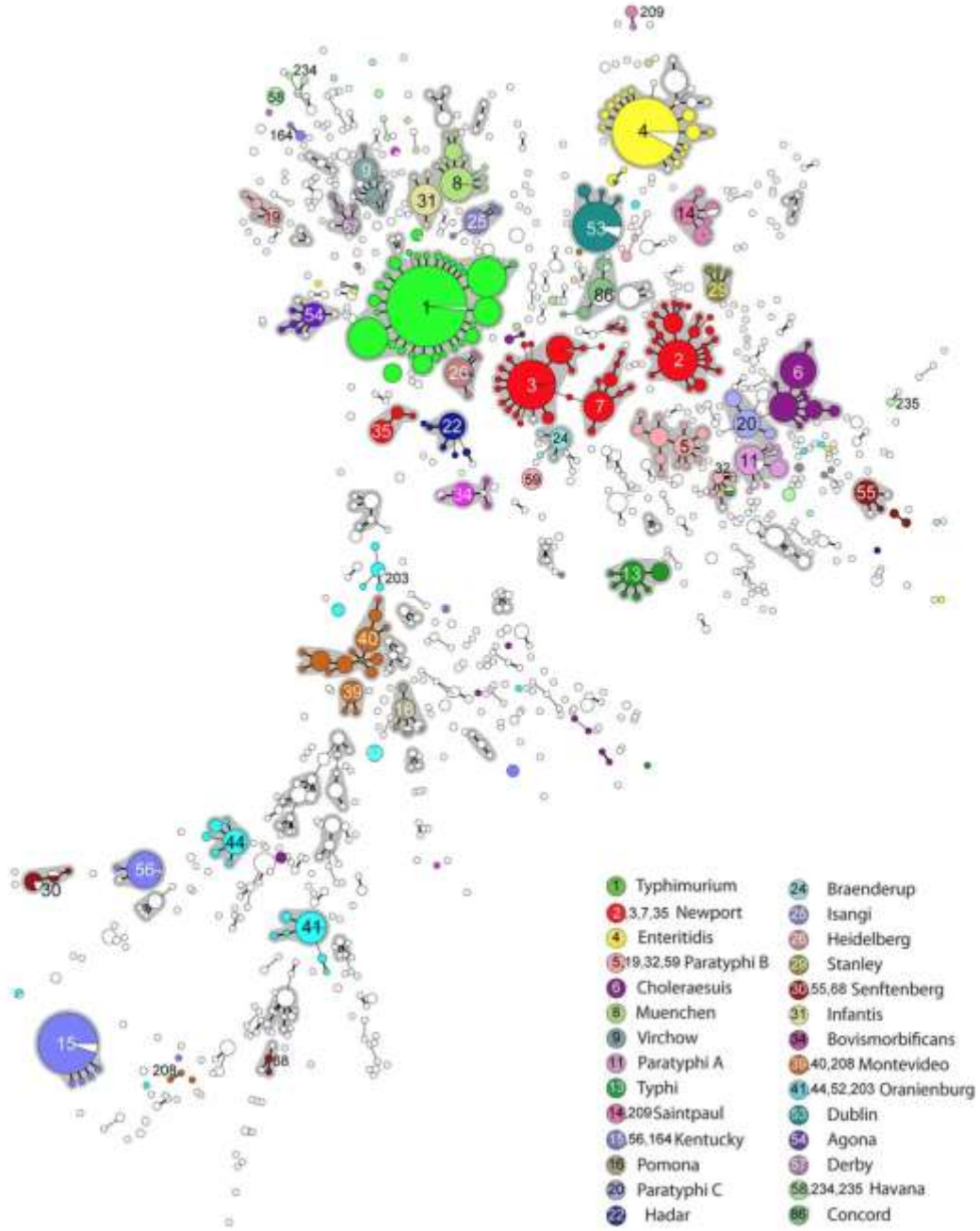
bir çalışmada, *Salmonella enterica* serotip Typhimurium'un ABD'de insan ve hayvanlardan en çok izole edilen serotip olduğu tespit edilmiştir. Bu serotip insanlardan izole edilen serotiplerin %24'ünü, hayvanlardan izole edilenlerin ise %19'unu oluşturduğu tespit edilmiştir (60).



Şekil 5: The AccuGENX-ST™ yöntemi ile MLST sekans analizi akış şeması

Moleküler testler, sadece Salmonella ile ilgili değil hemen hemen bütün bulaşıcı hastalıkların sürveyansında yaygın biçimde kullanılmaktadır. Sürveyans çalışmalarında PFGE altın standart olarak kullanılırken günümüzde yerini MLST almıştır (60). Ancak, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde Escherichia coli O157:H7, Salmonella, Shigella, Listeria ve Campylobacter izolatlarının ülke genelindeki laboratuvarlarda standardize edilmiş yöntemlerle PFGE paternleri PulseNet ağı ile 1996 yılından beri izlenmektedir. Aynı ağın Avrupa bağlantısı olarak PulseNet Europe ağına 30 ülkeden 58 enstitü katılmaktadır.

Ülkemizde Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü bu ağa üyedir ve özellikle enterik bakteriler başta olmak üzere PFGE analizlerini yürütmektedir. ABD, Avrupa, Kanada, Latin Amerika, Asya pasifik bölgesi ağlarının birleşmesiyle "PulseNet International" oluşturulmuş olup, eş zamanlı bilgi paylaşımı ile birden çok ülkeyi ilgilendiren ortak gıda kaynaklı salgınların erken saptanması hedeflenmiştir. Söz konusu yöntem ile, ABD'de 1997-2001 yıllarında gözlenen kızamık vakalarında yapılan epidemiyolojik bir çalışmada; 55 klinik izolatin moleküler tiplendirmesinde 11 genotip saptanmıştır. İlginç olarak bunların çoğunluğunu D6 (Avrupa), D5 (Japonya), D4 (Hindistan yarımadası) ve G2 (bilinmeyen) genotiplerinin oluşturduğu saptanmıştır. Diğer bir çalışmada, 2001 yılında Bulgaristan'da üç çocukta görülen poliyomyelit olgularından izole edilen virusların dizi analizinde, tek bir kaynaktan köken aldıkları, Avrupa izolatları ile %90 uyumlu olmalarına karşın, Hindistan'da 2000 yılında izole edilen bir poliovirusu ile %98.3 benzerlik taşıdıkları saptanmıştır. Türkiye'de polio sürveyansı sırasında 1998 yılında izole edilen poliovirusların kendi içlerinde kümelenmediği, ancak çevre ülkelerdekilerden farklı olduğu belirlenmiştir (38).



Şekil 6: 4257 *S. Enterica subspecies enterica* izolatları kullanılarak, MLST verilerine göre oluşturulmuş *Salmonella* genotipik haritası. Her bir daire 1095 serotipten birisini ifade etmektedir ve dairenin büyüklüğü izolat sayısının oranını göstermektedir. MLST verilerinden logaritmik olarak oluşturulan grafik burada yansıtılmıştır. Serotipler arasındaki mesafe genetik yakınlığı göstermektedir (60).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Salmonella Kökenleri

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakterioloji laboratuvarına gelen toplam 64 adet kan ve dışkı örneğine Salmonella izolasyonu için nonselektif ve selektif zenginleştirme yöntemleri uygulanmıştır.

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2010-2013 yılları arasında Salmonella şüphesi ile gelen örnekler Salmonella izolasyonu için kanlı besiyeri ve Eosin Methylene Blue Agar (EMB) besiyerine ekilerek, non-selektif zenginleştirme yapılmıştır. Selektif zenginleştirme amacıyla, Salmonella Shigella (SS) agara yapılan kültürlerde siyah renkte üreme gösteren, H₂S pozitif kolonilerden TSI (Triple Sugar Iron), Üre, Sitrat, İndol, Lizin, MRVP ve Hareket besiyerlerine ekimler yapılarak, konvansiyonal yöntemlerle Salmonella tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Salmonella olarak tanımlanmış izolatlardan eküvyonlu çubukla alınan 1-2 koloni Tryptic Soy Broth (TSB) içine inoküle edilerek -80 °C saklanmıştır. Tüm örnekler daha sonra soğuk zincirde, ODTÜ Gıda Mühendisliği laboratuvarına götürülmüştür. Laboratuvara getirilen 64 örnek Brain Heart Infusion (BHI) agar besiyerine pasajı yapıldıktan sonra inv-A geni hedef alınarak PCR uygulanmış ve 50 örnek Salmonella pozitif olarak tespit edilmiştir. Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsünde serolojik olarak da serotiplendirilmesi yapılan 50 örnek daha sonra ODTÜ Gıda Mühendisliği laboratuvarında MLST yöntemi ile genotiplendirilmiştir.

3.2. Salmonella izolasyonu ve identifikasyonu

Gerekli Ekipmanlar

- Steril erlenmayer şişe (500 ml)
- Steril tek kullanımlık öze (1 µl ve 10 µl)
- Plastik petri kabı (9 cm çap)
- Hassas terazi
- İnkübatör (37°C ve 41.5 °C'lik)
- Çeker ocak

- Pipet
- Cam tüp
- Manyetik karıştırıcı
- Steril şişe
- Eldiven
- Steril distile su
- Stomacher bag

Besi Yerleri

- Kanlı Agar
- Çikolata Agar
- Eosin Methylene Blue Agar (EMB)
- Salmonella Shigella Agar (SS)
- Triple Sugar Iron (TSI) Agar
- Üre Broth Besi Yeri
- MR-VP Agar
- Sitrat Besi Yeri
- Lizin Besi Yeri
- Brain Heart Infusion Agar (BHI)

Non-selektif zenginleştirme prosedürü: Salmonella şüphesiyle gelen kan örnekleri kültürü yapılmak üzere BAC-TEC cihazına konulmuş, üreme gösteren örnekler kanlı, çikolata ve EMB besi yerlerine ekimleri yapılarak 16-24 saat inkubasyon sonrasında EMB besiyerinde üreyen kolonilerden selektif zenginleştirme yapılmıştır.

Laboratuvarımıza gelen dışkı örnekleri de aynı şekilde Salmonella izolasyonu için, kanlı, EMB ve SS besi yerlerine ekilerek 16-24 saat 37 °C'de inkübasyon sonrası, SS agarda üreyen siyah renkli Salmonella şüpheli koloniler selektif besi yerlerine ekilmişlerdir

Selektif zenginleştirme prosedürü: Selektif zenginleştirme için TSI, Üre, Sitrat, İndol, Lizin, MRVP ve Hareket besi yerleri kullanılmıştır. Non-selektif besi yerinde üreyen kolonilerden iğne uçlu öze ile selektif besi yerlerine ekim yapılmış, 37 °C'de 16-24 saat

etüvde inkubasyona tabi tutulmuştur. İnkubasyon sonrası TSI besisi yerinde H₂S üreten, laktoz negatif, üre negatif, sitrat pozitif, indol negatif, lizin pozitif ve hareket pozitif olan koloniler Salmonella olarak tanımlanmış, enterik API yöntemi ile de ikinci kez doğrulanmıştır. Konvansiyonel yöntemler ile Salmonella olarak tanımlanan izolatlara, PCR yöntemi ile genetik doğrulama uygulanmıştır.

3.3. Salmonella PCR

Materyal

1. Steril distile su
2. 10X PCR Buffer (MgCl₂ yok)
3. MgCl₂ (25mM)
4. 10mM of each dATP, dCTP, dTTP, dGTP içeren Deoxynucleotide Mix (10mM)
5. Primer invA-F [12.5 µM] (5' - GAA TCC TCA GTT TTC AGT TTC - 3')
Primer invA-R [12.5 µM] (5'- TAG CCG TAA CAA CCA ATA CAA ATG - 3')
6. Taq Gold (5 unite/µl)
7. Steril 1.5 ml santrifüj tüp
8. Steril 0.2 ml PCR tüp
9. 5xTBE tampon, 1 lt stok solüsyon konsantrasyonu (54 g Tris base, 27.5 g boric acid, 20ml 0.5 M EDTA [pH:8])
10. Agaroz
11. 6 X Loading buffer (30% (v/v) glycerol, 0.25% (w/v) bromophenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol in distilled water)
12. Ethidium bromide (10 mg/µl)
13. Elektroforez ünitesi

Tablo 7. PCR Mastır Karışımı ve *invA* primer dizini (64).

Master Mix Reagents [Konsantrasyon]	Primer Sekans 5' – 3'	1 X 50 µl reaksiyon için gerekli volüm (µl)
Distile su	---	31
5X Go Taq Flexi Buffer	---	10.0
MgCl ₂ [25mM]	---	3.0
dNTPs [10mM]	---	1.0
<i>invA</i> - F [12.5 mM]	GAA TCC TCA GTT TTT CAA	2.0
<i>invA</i> – R [12.5 mM]	TAG CCG TAA CAA CCA ATA	2.0
Go Taq DNA Polymerase	---	0,25
Toplam		49

BHI katı besiyerinde geliştirilen saf kültürden bir koloni steril kürdan yardımı ile alınarak, 95 µL steril su içeren PCR tüpüne aktarılmış ve hücrelerin parçalanması için, mikrodalga fırında 30 saniye bırakılmıştır. Daha sonra bu solüsyondan 1 µL alınıp 49µL PCR mastır karışımı içeren PCR tüpüne aktararak PCR analizlerinde kalıp DNA olarak kullanılmıştır. PCR mastır karışımı ve kullanılan *invA* primer dizinleri Tablo 7’de verilmiştir (61).

Aşağıdaki amplifikasyon koşulları uygulanarak 678 bp’lik *invA* gen bölgesi Thermal Cycler (iCycler, Bio-Rad Laboratories Inc.)’da amplifiye edildi.

Amplifikasyon koşulları:

94°C’de 8 dakika [1X]

94°C’de 30 saniye

60°C’de 30 saniye [35X]

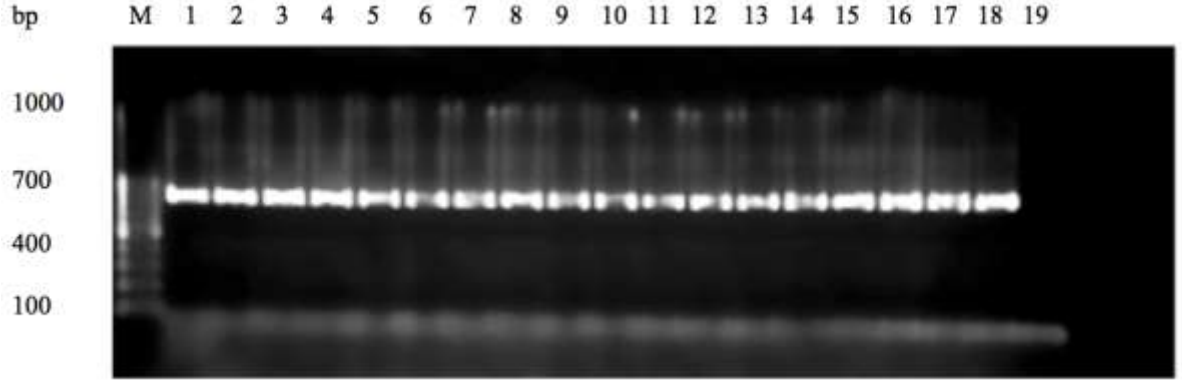
72°C’de 30 saniye

72°C’de 5 dakika

4 °C ∞ [1X]

PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen üründen 5 µl alınarak moleküler ağırlığı bilenen markırlar ile birlikte %1.5’lik agaroz jelde 110 V’da yaklaşık yarım saat yürütüldükten sonra, jeldeki DNA bantları etidyum bromide ile boyanarak görüntülenmiştir. *invA* geninin varlığını

gösteren 678 bp büyüklüğündeki bantların pozitif olduğu izolatlar Salmonella olarak tanımlanmışlardır. Salmonella olarak tanımlanan izolatlar BHI broth besiyerine ekilerek 37 °C’de bir gece inkübe edilerek çoğaltılmış ve sonrasında etiketlendirme yapılarak, %15 oranında gliserol içinde -80⁰ C’de genotiplendirme yapılana kadar saklanmıştır(65).



Şekil 7: Salmonella izolatlarından elde edilmiş DNA bantları (M:1000 bp marker; 1-18: 678 bp bölgedeki Salmonella pozitif bant tespiti; 19: negative kontrol)

3.4. Salmonella izolatlarının MLST yöntemi ile genotiplendirilmesi

MLST uygulamasının aşamaları;

- Gen seçimi ve primer dizaynı
- Genomik DNA izolasyonu
- Gen Amplifikasyonu
- Agaroz jel ile DNA fragmentlerinin elde edilmesi
- Agaroz jelden DNA'nın elde edilmesi
- DNA'ların sekanlanması
- MLST veri analizi

Gerekli Materyaller

1. 10X PCR Buffer (MgCl₂ yok)
2. MgCl₂ (25mM)
3. Deoxynucleotide Mix (10mM): dATP, dCTP, dTTP, dGTP her birinden 10mM içeriyor.
4. Taq Gold (5 units/μl)

5. Steril 1.5 ml santrifuj tüp
6. Steril 0.2 ml PCR tüp
7. 5xTBE buffer, stok solüsyon (54 g Tris base, 27.5 g boric acid, 20ml 0.5 M EDTA [pH:8])
8. Agaroz
9. 6 X yükleme tamponu (30% (v/v) glycerol, 0.25% (w/v) bromophenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol in distilled water)
10. Ethidium bromide (10 mg/µl)
11. Size markerları
12. Elektroforez ünitesi
13. Steril kürdan
14. 7 housekeeping geni, her biri için 12.5 mM forward ve reverse primer solüsyon
15. NanoBiz Bacterial Genomic DNA izolasyon kiti (tampon solüsyon, spin kolon)

Tablo 8: PCR Mastır Karışımı

PCR Reaksiyon Solusyonu [Konsantrasyon]	Hacim (µl)
Distile su	71,5
10X Go Taq Flexi Buffer	10.0
MgCl ₂ [25mM]	6.0
dNTPs [10mM]	2.0
Primer- F* [12.5 mM]	4.0
Primer – R* [12.5 mM]	4.0
Go Taq DNA Polymerase	0,5
Toplam	98

*primer sekansları Tablo 9’de verilmiştir

Tablo 9. MLST 7 gen primer sekansları

Gen	Primer sequence 5' –3'	Amplifiye edilen bölge, bp
aroC-F	GGCACCAGTATTGGCCTGCT	826
aroC-R	CATATGCGCCACAATGTGTTG	
thrA-F	GTCACGGTGATCGATCCGGT	852
thrA-R	CACGATATTGATATTAGCCCG	
purE-F	ATGTCTTCCCGCAATAATCC	510
purE-R	TCATAGCGTCCCCCGCGGATC	
sucA-F	AGCACCGAAGAGAAACGCTG	643
sucA-R	GGTTGTTGATAACGATACGTAC	
hisD-F	GAAACGTTCCATTCCGCGCAGAC	894
hisD-R	CTGAACGGTCATCCGTTTCTG	
hemD-F	ATGAGTATTCTGATCACCCG	666
hemD-R	ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA	
dnaN-F	ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA	833
dnaN-R	AATTTCTCATTCGAGAGGATTGC	

Genomik DNA izolasyonu

Salmonella genomik DNA'nın saflaştırılması: Salmonella stoğu BHI katı besiyerine ekilerek 37 °C'de bir gece inkübasyondan sonra canlandırılmış ve buradan tek koloni alınarak BHI brothda 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Hazırlanan bu bakteri süspansiyonundan ticari kit (DNA 4U Bacterial Genomic DNA izolasyon kiti, Nanobiz) yardımı ile DNA izolasyonu yapılmıştır (16, 18).

Genomik DNA İzolasyon Aşamaları;

- 1.5 ml mikrosantrifüj tüpleri içerisinde sıvı hücre kültürünü 1-2 dakika boyunca 10000 rpm hızda santrifüj ile çöktürüldü
- Santrifüj sonrası elde edilen pelet üzerine 600 µL tampon-bg1 eklendi
- Tüpler 65 °C'de 10 dk inkübe edildi
- Tüplere 300 µL tampon-bg2 eklendi ve ters-düz yaparak iyice karıştırıldı
- Tüpler buz üzerinde 5 dk bekletildi

- 13000 rpm hızda 10 dk santrifüj işlemi uygulandı
- Elde edilen süpernatant yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı
- Süpernatant üzerine 1.5 hacimde tampon-bg3 eklendi ve ters-düz yaparak iyi karıştırıldı
- Karışımdan 600 µL alarak spin kolonuna aktarıldı ve 1 dk boyunca 10000 rpm hızda santrifüj edildi. Dipte toplanan sıvı döküldü.
- Spin kolon üzerine 500 µL tampon-bg4 ekleyip ve 10000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı
- Tampon-bg4'ten geride kalabilecek etanolü uzaklaştırmak için 13000 rpm hızda 2 dk boyunca santrifüj edildi
- Spin kolon steril 1.5 ml mikrosantrifüj içerisine yerleştirildi
- Spin kolona 30-50 µL 65 °C'de H₂O eklendi ve oda sıcaklığında iki dakika bekletildi
- Genomik DNA'yı elde etmek için 1 dk 6000 rpm'de santrifüj yapıldı

Housekeeping Gen Amplifikasyonları

Amplifikasyon bölgeleri: thrA (aspartokinase+homogenize dehydrogenase, 852 nt), purE (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, 510 nt), sucA (alpha ketoglutarate dehydrogenase, 643 nt), hisD (histidinol dehydrogenase, 894 nt), hemD (uroporphyrinogen III cosynthase, 666 nt) ve dnaN (DNA polymerase III beta subunit, 833 nt) aroC (chorismate synthase, 639 nt).

aroC'nin amplifikasyonu ve sekanslanması: PCR mastır karışımı ve kullanılan aroC primer sekansları Tablo 9'de verilmiştir.

Lize olmuş hücreleri içeren solusyondan 2 µL alınıp 98 µL PCR master karışımı içeren PCR tüpüne aktarıldı

Aşağıdaki amplifikasyon koşulları uygulanarak 501 bp'lik aroC gen bölgesi Thermal Cycler (iCycler, Bio-Rad Laboratories Inc.)'da amplifiye edildi.

Amplifikasyon koşulları:

94°C'de 10 dakika [1X]

94°C'de 1 dakika

60°C 'de 1 dakika [35X]
72°C'de 1 dakika

72°C'de 7 dakika
4°C ∞ [1X]

PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürün (5 µl) ile DNA moleküler ağırlığı bilinen markerlar ile birlikte %1.5'lik agaroz jelinde 110 V'da yaklaşık yarım saat yürütüldü ve jeldeki DNA bantları etidyum bromide solüsyonunda bekletildikten sonra görüntüledi. 501 bp ağırlığındaki bantların pozitif olduğu PCR ürünleri High Pure PCR Template (Roche Applied Science, Almanya) yardımı ile saflaştırılarak, sekansı yapılmak üzere sekanslama birimine gönderilmiştir. Sekanslama analizleri sonucu elde edilen allel verileri, DNASTAR Lasergene adlı software kullanılarak edilmiş, sekans sonuçları öncelikle manuel olarak gözden geçirilip, DNASTAR Lasergene'de sıralandırılmıştır.

High Pure PCR Kiti ile saflaştırma aşamaları

- 1- 200 µl örnek material, 200 µl binding buffer ve 40 µl Proteinase K ile 1.5 ml mikrosentrifüj içerisinde karıştırılıp +70°C de,10 dakika inkübe edildi
- 2- 100 µl Isopropanol eklendi ve iyice karıştırıldı
- 3- High Pure Filter Tube ile örnek 8,000 g'de 1 dakika santrüfjüj edildi
- 4- Supernatant kısım uzaklaştırılıp, 500 µl Inhibitor Removal Buffer eklendi ve yeniden 8,000 g'de 1 dakika santrüfjüj edildi
- 5- Supernatant kısım uzaklaştırılıp, 500 µl Washer Buffer eklendi ve yeniden 8,000 g'de 1 dakika santrüfjüj edildi
- 6- Supernatant kısım uzaklaştırılıp en yüksek hızda santrifjüj edildi
- 7- 200 µl ısıtılmış Elüsyon Buffer eklendi ve 8,000 g'de 1 dakika santrüfjüj edildi
- 8- Elde edilen saf DNA sekanlama işlemi için 25°C'de saklandı.

Farklı aroC sekans tiplerinin belirlenmesi: Daha önceleri Max Planck Enstitüsünde bulunan şimdi ise University College Cork bünyesindeki data bankasında (<http://mlst.ucc.ie/mlst/mlst/dbs/Senterica/>) ve Cornell Üniversitesinin data bankası olan Pathogen Tracker'da (<http://www.pathogen tracker.net/login/login.aspx>) bulunan Salmonella

aroC alelik sekans tipleri ile sıralandırılıp (align edilip) karşılaştırıldı ve filogenetik ağaçları oluşturuldu. Diğer altı gen bölgesi olan; thrA, purE, sucA, hisD, hemD ve dnaN içinde aynı işlemler tekrarlandı.

İstatistiksel Analiz

Değişkenler, ortalama ve standart sapma değerleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Serotip-Yerleşim Yeri ve Serotip-Cinsiyet ilişkisi Ki Kare testi ile analiz edildi. Tüm testler de anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak alınmıştır. Sekanslama analizleri sonucu elde edilen allel verileri, DNASTAR Lasergene adlı yazılım program kullanılarak sekans analizleri yapılmıştır. MLST ile elde edilen sekans dizileri, University College Cork bünyesinde bulunan veri bankasında (<http://mlst.ucc.ie/mlst/mlst/dbs/Senterica/>) bulunan housekeeping gen alleller ile eşleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen örnekler, farklı klinik ve polikliniklerden Salmonella gastroenteriti, tifo veya paratifo ön tanısı ile laboratuvarımıza gönderilen hastalardan elde edilmiştir. Numunelerin 48'si (%96.3) dışkı, 2'si (%3.7) ise kandan oluşmuştur. Örnek alınan hastaların yaşları 9-82 arasında olup, yaş ortalaması 43.2 olarak tespit edilmiştir. Çalışma grubunu oluşturan toplam 50 hastanın 28'i kadın (%57.4), 22'si (%42.6) ise erkek olarak bulunmuştur. Hastaların 32 (%66.7)'i şehir merkezinde ikamet ederken, 18 (%33.3)'i ilçelerde ikamet etmektedir. Cinsiyet ve kullanılan izolatların kaynağının şehir veya taşra olması ile serotip arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$).

Ancak en sık görülen S. Paratyphi B'nin kadınlarda daha sık görüldüğü gözlemlenmiştir (Tablo 10). S. Kentucky (%80) ve S. Paratyphi B (%61) erkeklere oranla kadınlarda daha çok tespit edilmiştir. S. Typhimurium (%67) ve S. Enteritidis (%100) ise en çok erkeklerde tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Tablo 10).

Tablo 10. Salmonella serotiplerinin cinsiyete göre dağılımı.

Cinsiyet	Serotip						
	Enteritidis	Kentucky	Othmarschen	Paratyphi B	Typhi	Typhimurium	Toplam
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Kadın	0 (0)	4 (80)	1 (50)	20 (61)	1 (50)	2 (33)	28 (56)
Erkek	2 (100)	1 (20)	1 (50)	13 (39)	1 (50)	4 (67)	22 (44)
Toplam	2	5	2	33	2	6	50 (100)

Şanlıurfa ilçelerinden gelen hastalarda sadece S. Paratyphi B'nin tespit edilmesi dikkate değerdir. Şehir merkezinde ise çok sayıda serotip tespit edilmiştir (Tablo 11). Şehir merkezi ve taşra arasında serotiplerin görülme oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). S. Typhimurium, S. Enteritidis, S. Othmarschen, S. Typhi ve S. Kentucky %100 oranında şehir merkezlerinde görülmesine rağmen örnek sayısının azlığına bağlı bir istatistiksel bir fark oluşmadığı düşünülmektedir.

Tablo 11. Salmonella serotiplerinin hastaların yaşadığı yerleşim yerine göre dağılımı.

Yerleşim bölgesi	Serotipler						Toplam n (%)
	Enteritidis n (%)	Kentucky n (%)	Othmarschen n (%)	Paratyphi B n (%)	Typhi n (%)	Typhimurium n (%)	
Şehir Merkezi	2 (100)	5 (100)	2 (100)	15 (45)	2 (100)	6 (100)	32 (64)
İlçeler	0 (0)	0 (0)	0 (0)	18 (55)	0 (0)	0 (0)	18 (36)
Toplam	2	5	2	33	2	6	50 (100)
p*	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

*Aynı sütundaki grup ortalamaları arasındaki fark anlamlı değil

Tablo 12. Salmonella izolatlarının serolojik tiplendirilmesi

Serotipler	n (%)	Antijenik formül	Serogrup
S. Enteritidis	2 (4)	9,12;g,m;-	D1
S. Typhi	2 (4)	9,12 (Vi);d;-	D1
S. Paratyphi B	30 (60)	4,12 ; b ; 1,2	B
S. Paratyphi B	3 (6)	1,4,12 ; b ; 1,2	B
S. Typhimurium	6 (12)	4,5,12 ; i ; 1,2	B
S. Kentucky	5 (10)	8,20;i;z6	C3
S. Othmarschen	2 (4)	6,7;g,m,t;-	C1

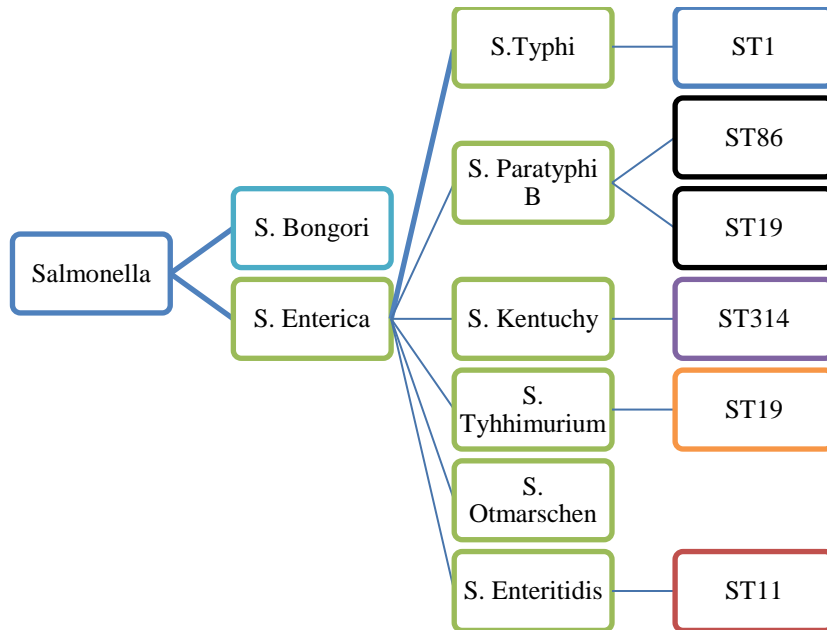
Salmonella izolatlarının serolojik tiplendirilmesinde toplam altı serotip tespit edilmiştir. Serotiplerin antijenik formülleri aynı olup sadece S. Paratyphi B’de iki farklı antijenik formül tespit edilmiştir. Toplam 33 S. Paratyphi B izolatının 30 tanesi 4,12 ; b ; 1,2 antijenik formüle sahip iken 3 izolatın 1,4,12 ; b ; 1,2 formülüne sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 12). Benzer biçimde MLST yöntemi ile yapılan genetik sınıflandırmada da sadece S. Paratyphi B’de iki farklı sekans tipi tespit edilmiştir (Tablo 13).

Tablo 13. Salmonella izolatlarının serotip ve sekans tipleri

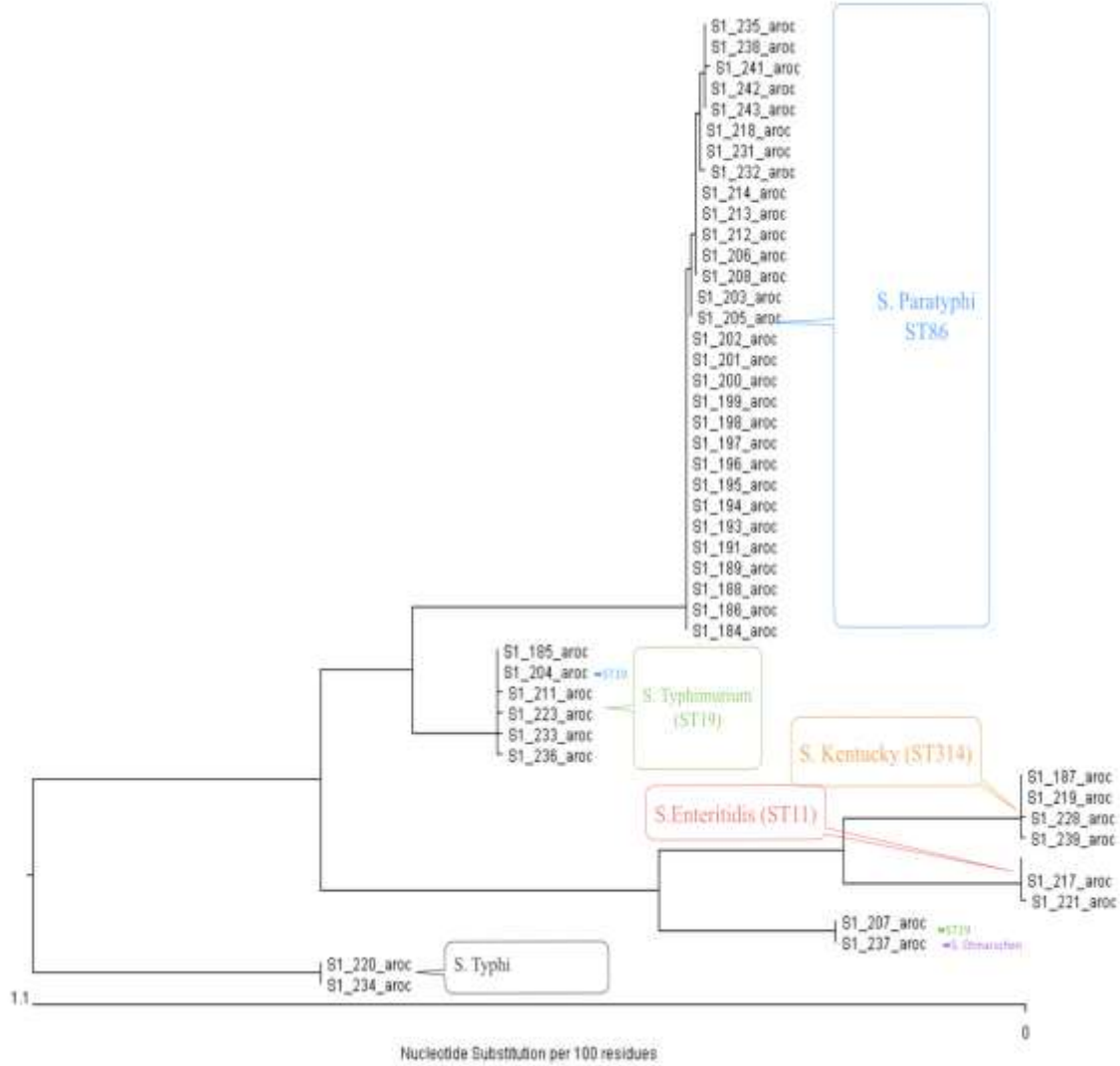
Salmonella Serotipleri (n)	Salmonella Sekans Tipleri n (%)	
S. Enteritidis (2)	ST11	2 (100)
S. Kentucky (5)	ST314	5 (100)
S. Othmarschen (2)*	-	-
S. Paratyphi B (33)	ST86	32 (96.9)
	ST19	1 (3.1)
S. Typhi (2)	ST1	2 (100)
S. Typhimurium (6)	ST19	6 (100)

* University College Cork bünyesindeki veri bankasında bulunan alleller ile eşleşmemiştir

Genotipik sınıflandırmada genel olarak tek sekans tipine rastlanmıştır. Sadece S. Paratyphi B’de ST86 ve ST19 olmak üzere iki sekans tipine rastlanmıştır. ST19 Siverek ilçesinden alınan dışkı örneğinde saptanmıştır. S. Paratyphi B’nin ST19 sekans tipi serolojik olarak ST86 ile aynı antijenik formüle sahip (4, 12; b;1,2) olmasına rağmen sekans tipi olarak farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 13). S. Othmarschen’in MLST ile elde edilen sekans dizisi, University College Cork bünyesinde bulunan veri bankasında bulunan housekeeping gen allelleri ile eşleştirilme yapıldığında, eşleşme olmadığı görülmüştür (Tablo 13; Şekil 8).

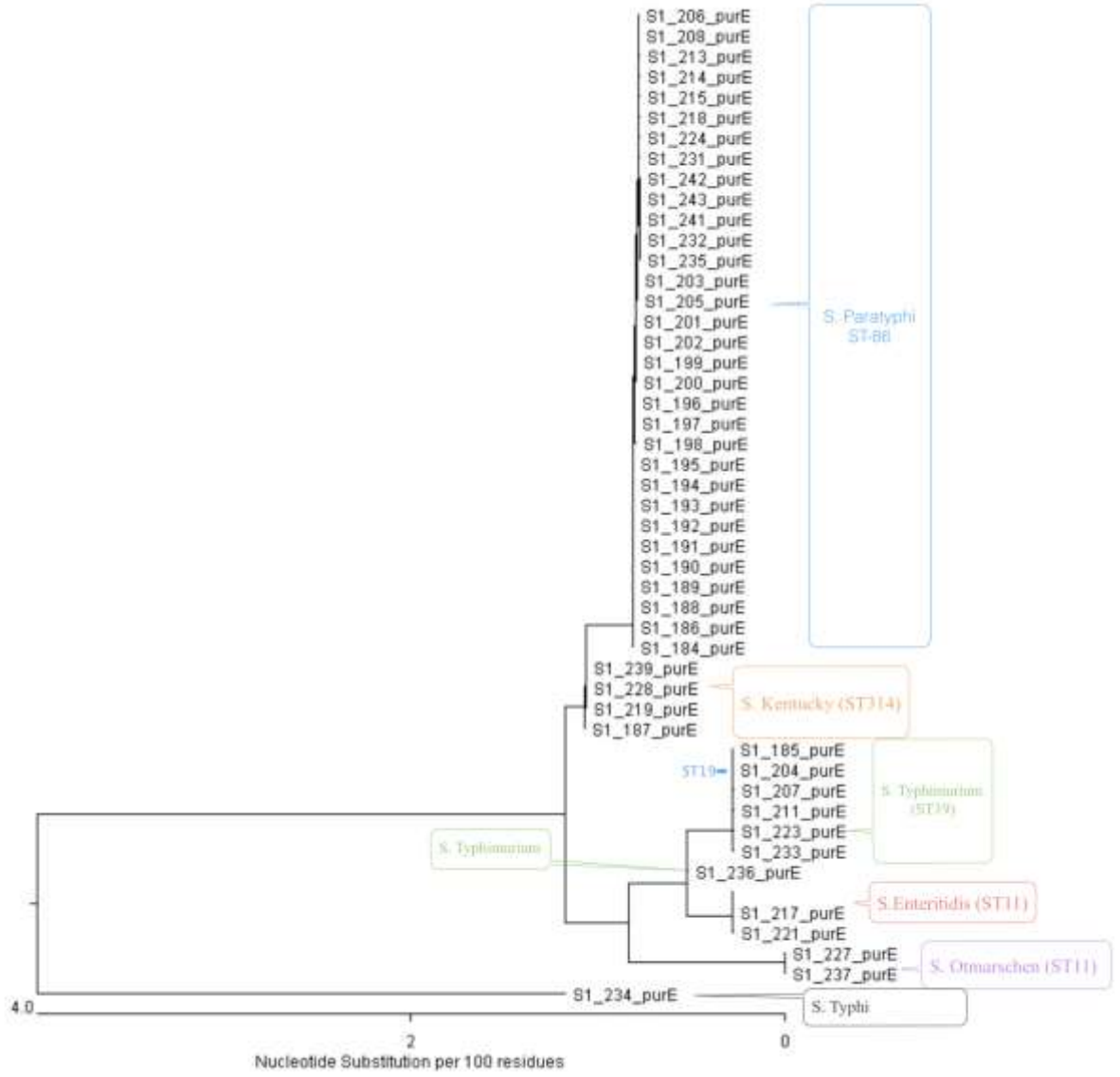
**Şekil 8.** İzole edilen Salmonella serotip ve sekans tiplerinin şematik gösterimi

aroC housekeeping geni kullanılarak oluşturulan filogenetik sınıflandırmada, S. Kentucky ve S. Enteritidis'e ait sekans tipleri olan ST11 ve ST314'ün birbirlerine genetik olarak yakın oldukları, S. Paratyphi B ST19'un ise S. Typhimurium ST19'a genetik olarak yakın olduğu görülmektedir. S. Typhimurium ve S. Otmarschen'in birbirlerine genetik olarak yakın oldukları tespit edilmiştir. Genetik olarak en uzak serotip ise S. Typhi olmuştur.(Şekil 9).

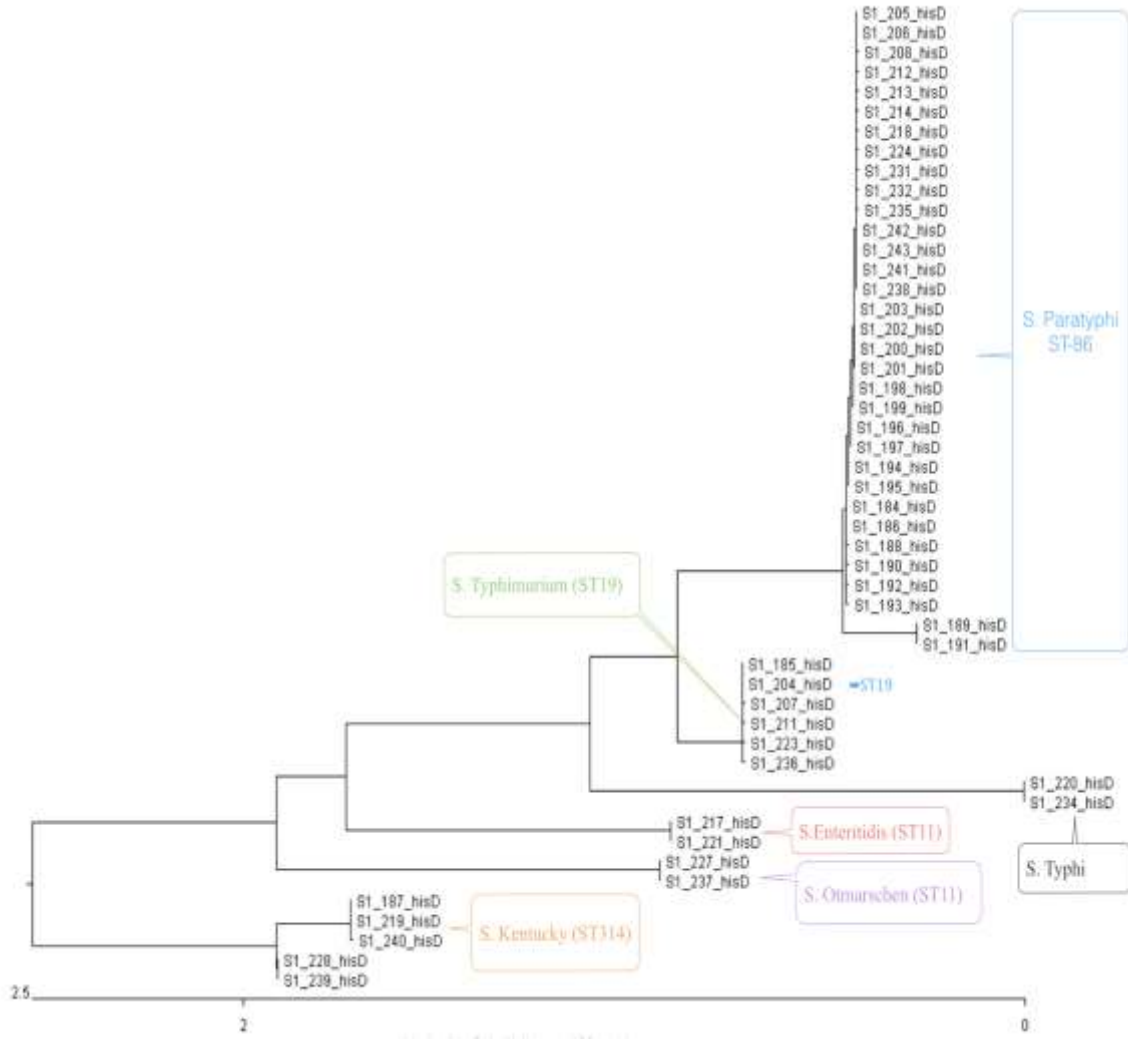


Şekil 9. AroC housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir).

purE housekeeping geni kullanılarak oluşturulan filogenetik sınıflandırmada; aroC ile oluşturulan filogenetik sınıflandırma arasında küçük farklılıklar gözlenmiştir. aroC ile yapılan sınıflandırmada gözlenen S. Kentucky ile S. Enteritidis arasında yakınlık bu sınıflandırmada oluşmamıştır. S. Paratyphi B ile S. Kentuck arasında yakın ilişki dikkat çekicidir (Şekil 10).

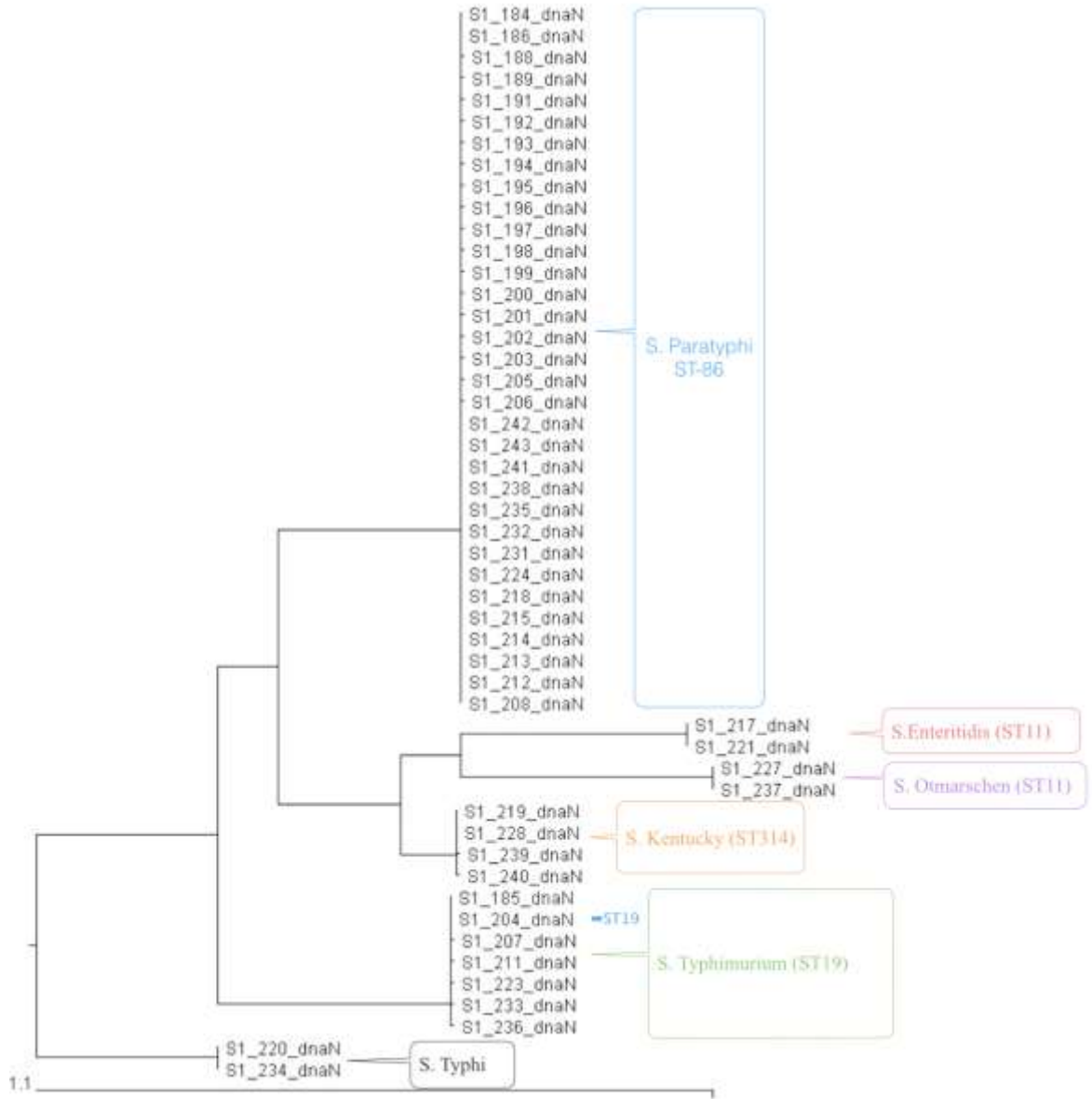


Şekil 10. purE housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir)



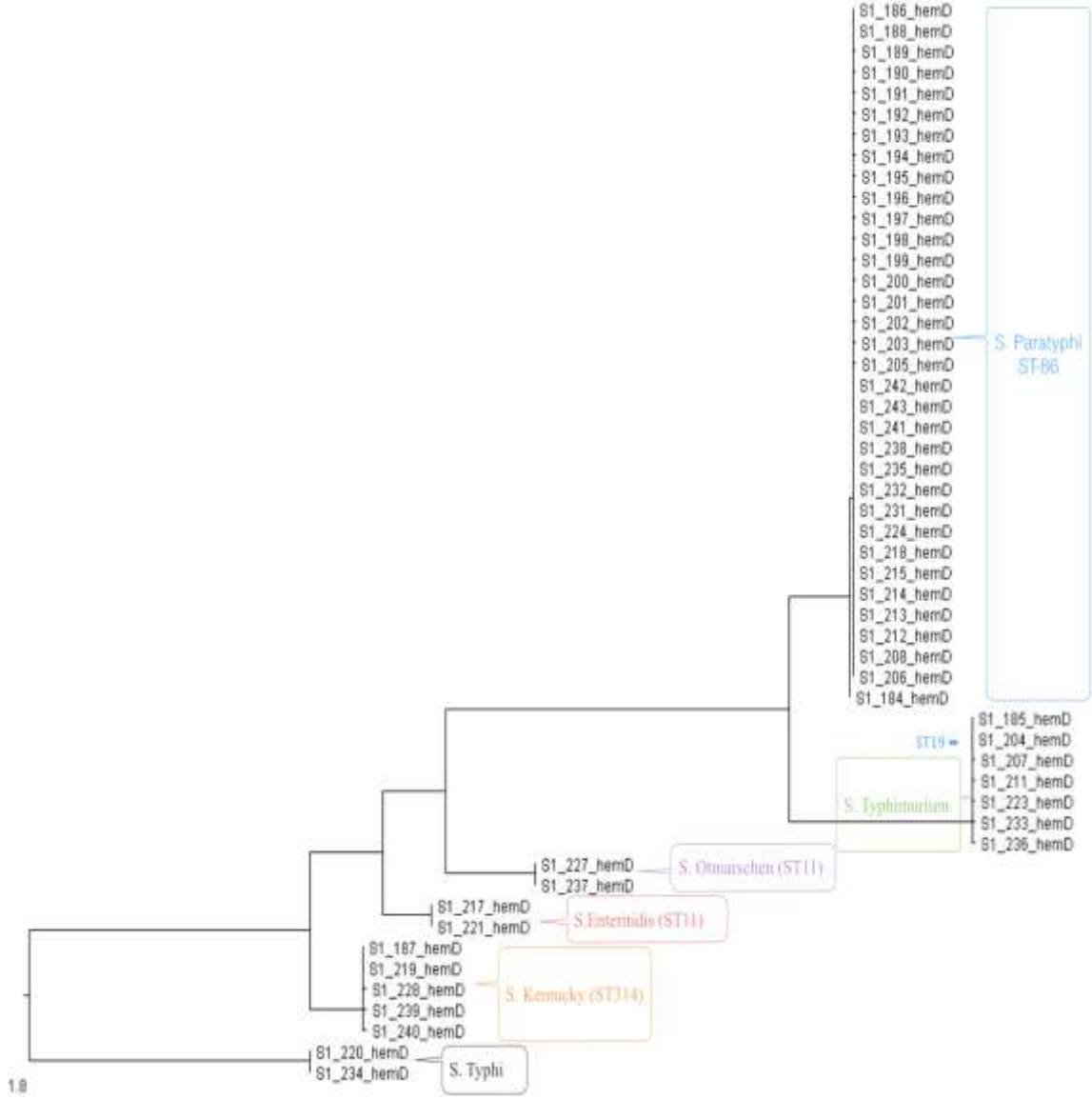
Şekil 11. *hisD* housekeeping geni baz alınarak oluşturulan *Salmonella* etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir)

hisD housekeeping geni kullanılarak oluşturulan filogenetik sınıflandırmada; *aroC*'de gözlenen genetik olarak en uzak serotip olan *S. Typhi*'nin aksine bu sınıflandırmada *S. Kentucky* olduğu görülmektedir. *S. Typhimurium* ve *S. Paratyphi B* arasında yakın genetik ilişki gözlemlenmiştir (Şekil 11).



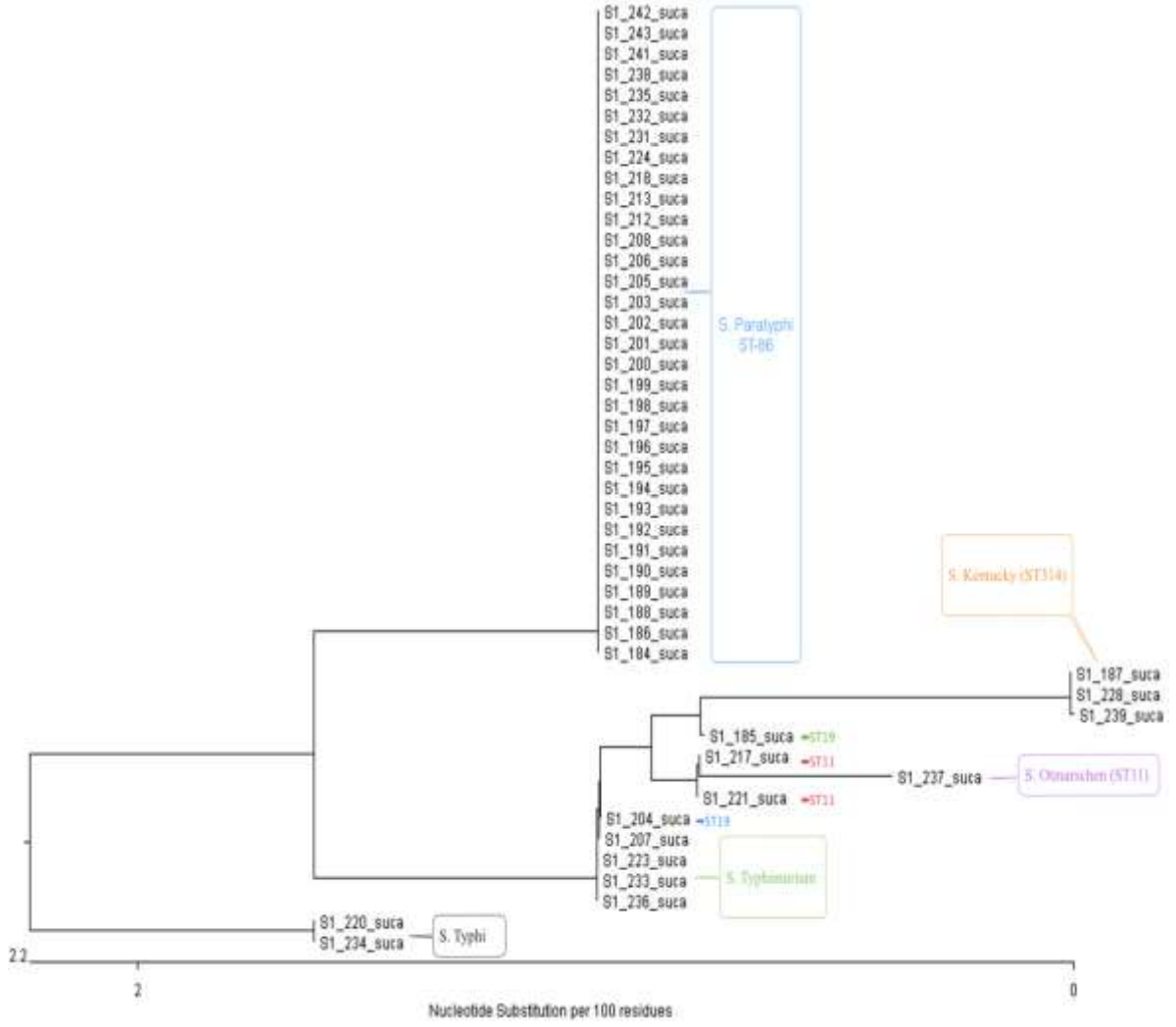
Şekil 12. *dnaN* housekeeping geni baz alınarak oluşturulan *Salmonella* etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir)

dnaN housekeeping geni kullanılarak oluşturulan filogenetik sınıflandırmada; *S. Typhi* en uzak genetik yakınlığa sahip oluken, *S. Enteritidis* ve *S. Otmarschen* arasında yakın genetik ilişki görülmektedir. *S. Paratyphi* B'nin ST19 sekans tipi yine *S. Typhimurium*la yakın genetik ilişkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 12).



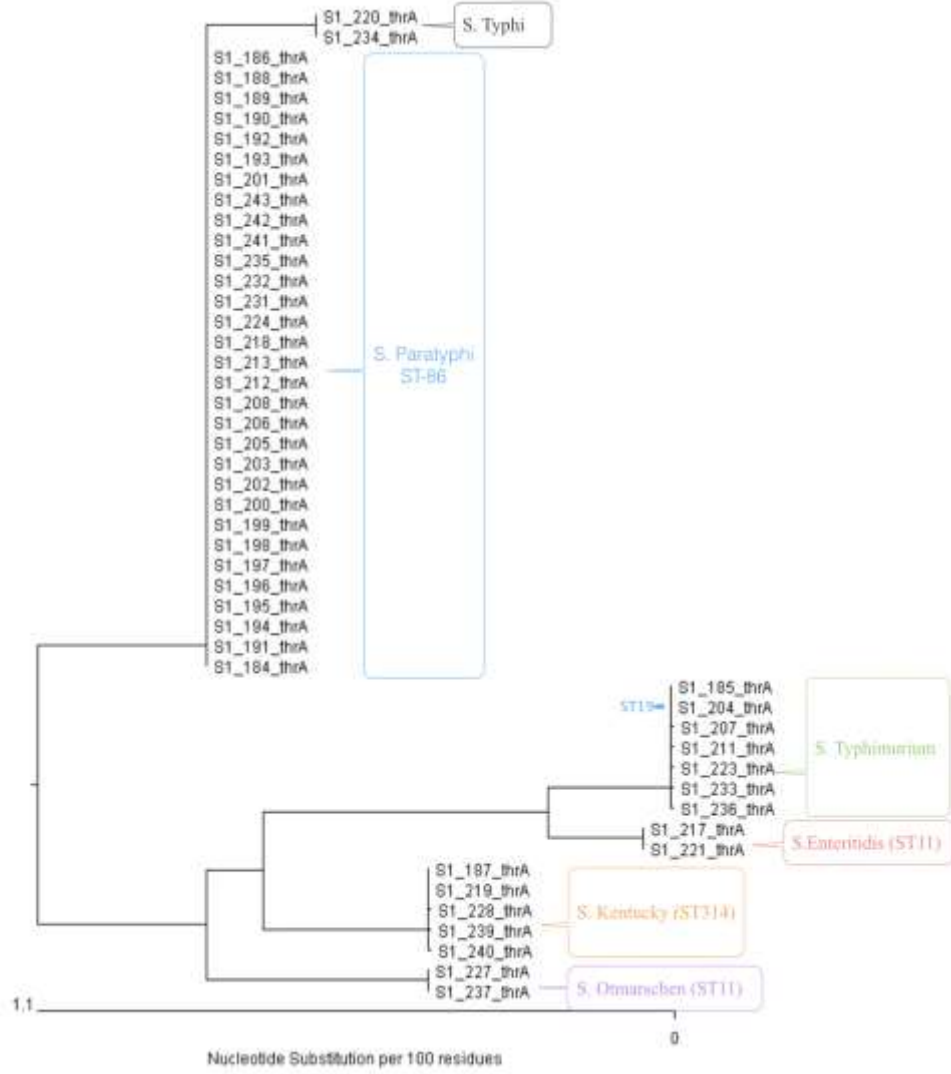
Şekil 13. hemD housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir)

hemD housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması S. Typhimurium, hisD ve dnaN’de olduğu gibi S. Paratyphi B izolatı olan S1-204 ile yakın genetik ilişkiye sahip olduğu görülmektedir (Şekil 13).



Şekil 14. sucA housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir)

sucA housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırmasında; diğer housekeeping geni kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçta rastlanan S. Enteritidis ve S. Otmarschen'in aynı kökenden kaynaklanan yakınlık bu sınıflandırmada değişerek S. Otmarschen'in S. Enteritidis'den köken aldığı gözlemlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 15. thrA housekeeping geni baz alınarak oluşturulan Salmonella etkeninin filogenetik sınıflandırılması (değişik renkler farklı serotipleri göstermektedir)

thrA housekeeping geni kullanılarak oluşturulan filogenetik sınıflandırmada; S. Typhi ile S. Paratyphi B genetik yakınlığa sahip oluken, S. Typhimurium ve S. Enteritidis arasında yakın genetik ilişki görülmektedir. S. Paratyphi B'nin ST19 sekans tipi yine S. Typhimurium'la yakın genetik ilişkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 15).

Genel olarak 7 housekeeping geni baz alınarak oluşturulan ve genetik ilişkiyi gösteren filogenetik sınıflandırmada önemli farklılıklara sahip olduğu söylenebilir. Ayrıca her bir housekeeping geni baz alınarak oluşturulan sınıflandırmada serotiplere ait numune sayısının değiştiği ve yine serotipler arası genetik yakınlığın da değiştiği gözlemlenmiştir.

Tablo 14. Salmonella izolatlarının MLST sonuçları

Kod No	MLST ile Genetik Sekans Tiplendirme								
	Sekans Tipleri		Allel Profil						
			aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	SucA	thrA
S1-184	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-185	ST19	Typhimurium	10	7	12	9	5	9	2
S1-186	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-187	ST314	Kentucky	115	-	8	-	-	116	110
S1-188	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-189	ST86	Paratyphi B	2	14	24	-	37	19	8
S1-190	ST86	Paratyphi B	-	-	24	-	37	19	8
S1-191	ST86	Paratyphi B	2	14	24	-	37	19	8
S1-192	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-193	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-194	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-195	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-196	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-197	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-198	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-199	ST86	Paratyphi B	2	-	24	14	37	19	8
S1-200	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-201	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-202	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14		19	8
S1-203	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-204	ST19	Paratyphi B	10	7	12	9	5	9	2
S1-205	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-206	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-207	ST19	Typhimurium	10	7	12	9	5	9	2
S1-208	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-211	ST19	Typhimurium	10	7	12	9	5	-	2
S1-212	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	-	19	8
S1-213	ST86	Paratyphi B	2	14	-	14	37	19	8
S1-217	ST11	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
S1-218	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-219	ST314	Kentucky	115	75	8	-	2	-	110
S1-220	-	Typhi	1	1	2	1	-	1	5
S1-221	ST11	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
S1-223	ST19	Typhimurium	10	7	12	9	5	9	2
S1-224	ST86	Paratyphi B	-	14	24	14	37	19	8
S1-227	-	Otmarschen	-	41	25	42	12	-	23
S1-228	ST314	Kentucky	115	75	8	115	2	116	110
S1-231	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-232	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-233	ST19	Typhimurium	10	7	12	-	5	9	2
S1-234	-	Typhi	1	1	2	1	1	1	5
S1-235	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-236	ST19	Typhimurium	10	7	12	9	8	9	2
S1-237	-	Otmarschen	43	41	25	42	12	13	23
S1-238	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	-	19	-
S1-239	ST314	Kentucky	115	75	8	115	2	116	110
S1-240	ST314	Kentucky	-	75	8	-	-	-	110
S1-241	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8
S1-242	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	-	19	8
S1-243	ST86	Paratyphi B	2	14	24	14	37	19	8

5. TARTIŞMA

Sürveyans, verilerin sistematik olarak toplanması, biriktirilmesi ve özellikle elde edilen sonuçlara göre harekete geçecek kişiler başta olmak üzere bu sonuçlara ihtiyacı olan birimlere hızla geri bildirimini sağlayacak şekilde verilerin değerlendirilmesi sürecidir. Epidemiyolojik tiplendirme sistemleri salgın araştırmalarında, bir veya daha fazla epidemik suşun yayılım şeklini anlamak ve doğrulamak için kullanılabilir. Bunun yanı sıra, bu suşların şüphelenilen kaynaklarının ve yayılımına katkıda bulunan etkenlerin doğrulanması ve epidemik organizmaların rezervuarlarının izleminde de kullanılmaktadırlar. Tiplendirme, zaman içinde enfekte topluluktaki epidemik suşların sıklığı ve dolaşımı hakkında bilgi sağlayarak epidemiyolojik sürveyansa ve kontrol önlemlerinin değerlendirilmesine de katkıda bulunur. Salgınlar geniş bir topluluğun etyolojik ajana maruz kalmasıyla ortaya çıkmaktadır. Genellikle salgına yol açan etyolojik ajan, kaynak organizmayla genetik olarak eş veya çok yakın ilişkili bir hücreden köken alır. Farklı zamanlarda, farklı coğrafik alanlarda, farklı kaynaklardan köken alan ve tür seviyesinde aynı olan organizmalar, ancak tiplendirme yöntemleri ile birbirlerinden ayrılabilir, alttiplere veya suşlara sınıflandırılabilirler (38).

Salmonella Paratyphi A, B ve C, Salmonella Typhi kadar şiddetli olmasada gastro-enteritise sebep olur. Bakteriler zayıf hijyen ve toplumsal sağlık önlemlerinin yetersiz olduğu durumlarda, enfeksiyonun yayılması bazen dışkı ile beslenen sinekler, bazen ise gıdalar ile uğraşan insanlar aracılığı ile olur. Tifi ve paratifi bakterileri enfekte insanın dışkı ve idrar yoluna geçer ve yayılır. İnsanların enfekte olması ise, enfekte dışkı ve idrar ile kontamine olmuş gıda ve suların tüketilmesi yoluyla olur. Sindirim yolu ile vücuda alınan bakteriler önce bağırsağa yayılırlar sonra kana geçerler. Enfekte olan insanlar kısa sürede iyileşse de uzun süren bir portörlük görevi görürler. Az gelişmiş bölgelerde enfeksiyonun yayılması, hijyenin azalması ile daha yaygındır (66). Sunulan araştırmada ilçelerde sadece S. Paratyphi'nin görülmesi dikkat çekicidir. Bunun sebebi; ilçelerin şehir merkezine göre insan sirkülasyonunun az olması sebebi ile Salmonella'nın diğer serotiplerinin bulaşma riskinin uzak olması, ancak hijyen şartlarının az, hayvancılıkla iç içe yaşam dolayısı ile S. Paratyphi B'nin daha çok görülmesine sebep olmuş olabilir. Şehir merkezinde görülen; S. Enteritidis, S. Kentucky, S. Othmarschen, S. Paratyphi B, S. Typhi ve S. Typhimurium serotiplerinin ise şehire gelen kontamine dış kaynaklı gıda veya enfekte insanlardan kaynaklanmış olabilir.

S. Enteritidis ve S. Typhimurium dünya çapında ve Türkiye’de (67) en sık karşılaşılan serotipler olmasına rağmen farklı serotiplerde sıklıkla görüldüğü bölgelerin dışında saptanmaya başlamıştır. Türkiye’de görülen gıda kaynaklı enfeksiyonlar hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. TÜİK’in 2004 yılına ait en son verilerinde 4135 kişinin tifoid olmayan Salmonella nedeniyle hastanede tedavi gördüğü ve 35 kişinin hayatını kaybettiği bildirilmektedir. Dünyada, insan Salmonellosis olgularında S. Enteritidis (%45) ve S. Typhimurium’un (%22.4) en sık izole edilen serotipler olarak saptanmakla birlikte, saptanan diğer serotipler arasında S. Infantis, S. Newport, S. Kentucky ve S. Virchow yer almaktadır. Ayrıca rapor edilen sonuçlarda S. Typhimurium’un diğer serotiplere göre görülme oranının artarak, ilk onda yer almaya başladığı da bildirilmektedir. Salmonella vakalarından sorumlu olarakta, ilk sırada yumurta ve yumurtacılık ürünlerinin bulunduğu belirtilmektedir (68). Şanlıurfa’da yapılan bu çalışmada en sık % 61.1 ile S. Paratyphi B tespit edilmiştir. Diğer serotiplerin tespit oranı ise sırası ile; S. Typhimurium (%11.1) S. Kentucky (%9.3), S. Othmarschen (%3.7), S. Typhi (%3.7) ve S. Enteritidis (%3.7), olarak bulunmuştur. Aysev ve ark. (12) yaptığı bir çalışmada; Ankara Üniversitesi pediatri kliniğinde bulunan 160 çocuktan elde edilen izolatlarda; en çok S. Enteritidis (% 41.9) tespit edilirken, bunu %10 ile S. Typhimurium izlemiştir. Diğer serotiplerin toplamda oranı ancak %10 olmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar ile Aysev ve ark. (12) bildirdiği sonuçlar dikkate değer biçimde farklılık göstermesi, izolatların temin edildiği insanların yaşlarından ve yerleşim yerlerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Gülmez ve ark. (10) yaptığı bir sürveyans çalışmasında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında 2008-2011 tarihleri arasında izole edilen Salmonella numunelerinde en çok tespit edilen ilk üç serotip; S. Enteritidis (%63.3), S. Typhimurium (%6.6) ve S. Infantis olmuştur. Sunulan çalışma ile kıyaslandığında, serotiplerin görülme oranı bakımından oldukça farklı olduğu gözlenmektedir. Yine Anđ ve ark. (14) 1964-1989 yılları arasında Türkiye de tespit edilen toplam S. Typhi ve S. Paratyphi vakalarının 62961 ve 17725 olduğunu, bu etkenlere bağlı ölümlerin ise 1029 ve 228 olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada saptanan serotiplerin görülme oranının diğer çalışmalardan ve Türkiye ortalamasından oldukça farklılık göstermektedir.

Tablo 15. Salmonella serogrup ve serotiplerinin dağılımı (10)

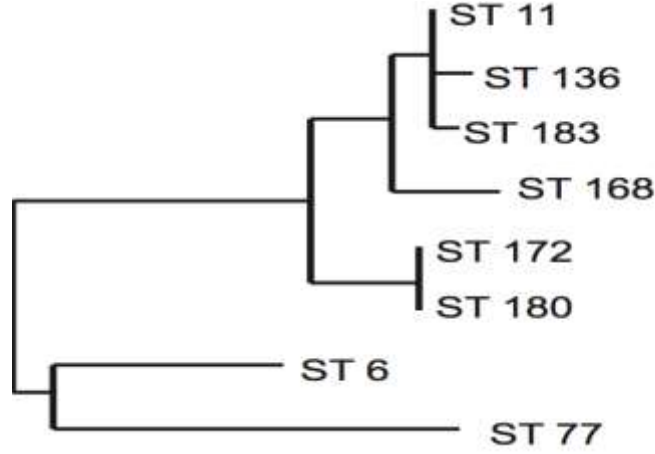
Serogrup	Tip	Sayı (%)
A	Paratyphi A	1,2
B	Typhimurium	6,6
	Paratyphi B	5,4
	Agona	1,8
	Schwarzengrund	0,6
	Saintpaul	0,6
C	Infantis	6,6
	Corvalis	2,4
	Kentucky	2,4
	Othmarschen	2,4
	Mikawasima	1,8
	Hadar	1,2
	Muenchen	0,6
	Montevideo	0,6
	Newport	0,6
	Charity	0,6
D	Enteritidis	63,3
	Typhi	0,6
M	Telaviv	0,6

Salmonella etkeninin serotiplerinin oluşturduğu enfeksiyonlar konusunda Dünyada ve Türkiyede yeterli çalışmaya ulaşılabilmekle birlikte, altserotipler konusunda çok az çalışmaya ulaşılabilmektedir. Ayrıca etkenlerin sekans tiplerine ayırırken kullanılan metotlarda da hala tam bir konsensus oluştuğuda söylenemez. Örnek olarak halen dünyada PFGE, MLST ve RAPD/rep-PCR teknikleri sırasıyla; %32, %22 ve %16 oranlarında kullanılmaktadır. Sürveyans çalışmalarında PFGE altın standart olarak kullanılırken günümüzde bunun yerini MLST almıştır (60). Ben-Darif ve ark. (69) MLST ve rep-PCR sistemleri kullanarak Salmonella enterica izolatlarını genotiplendirdiği araştırmada; moleküler identifikasyon bakımından benzer güce sahip iken rep-PCR sisteminin daha kısa sürede sonuç verdiğini bildirmişlerdir. 71 izolatta MLST ile 31 sekans tipi tespit edilirken, rep-PCR ile 38 diversilab tipi (DTs) tespit edilmiştir. MLST yönteminde değişik housekeeping genler kullanılabilir. Sunulan araştırmada yedi gen bölgesi kullanılmıştır. Ancak gyrB ve atpD housekeeping gen bölgesi ve flicC, fljB flagel genleri kullanılarak MLST yöntemi ile daha güçlü ayırıcı sekans analizi yapılabildiği de bildirilmiştir (70). Sekans tiplerede kullanılan yöntemlerin çokluğu sınıflandırmada da bir karışıklığa da sebep olmaktadır. Elektronik ortamda taranan makalelerin büyük kısmında hala metot karşılaştırılması yapıldığı

görülmüştür. Salmonella ve diğer patolojik organizmaların serotiplendirmesinde, sürveyans çalışmalarının yetersiz olması sebebi ile doğru ve etkin bir karşılaştırma malesef yapılamamaktadır. Sunulan çalışmada en çok %66 oranında S. Paratyphi B tespit edilmiştir. S. Paratyphi B olan toplam 33 izolatin 32'si ST86, bir izolatta ise ST19'a rastlanmıştır. Elde edilen veriler, Dahiya ve ark. (71) da bildirdiği gibi, altserotiplerin sınırlı bir bölgede çok değişiklik göstermediği yönündedir.

Enterik Ateş, S. Typhi tarafından oluşturulan ve birden fazla sistemi etkileyen bir hastalık olup, uzun süreli ateş ile karakterizedir. Konakçısı insandır ve insan dışkı ile enfekte olmuş içecek ve pişmemiş gıda ile yayılır. S. Typhi'ye bağlı hastalıklar hala önemini korumaktadır. Özellikle hijyenin yeterli olmadığı, gelişmekte olan ve gelişmemiş toplumlarda yaygındır (66). S. Typhi izolatları 20 yılı aşkın süredir toplanmaktadır. Çalışmalarda; ST2 Avrupa, Güney Amerika ve Afrikada; ST1 Hindistan; ST1, ST2, ST3 ve ST8 Afrikada tespit edildiği bildirilmiştir (71). Türkiye'deki Salmonella altserotipleri konusunda ise yeterli bilgi bulunmamaktadır. Dahiya ve ark. (71); S. Typhi'nin Hindistan'da çeşitli zamanlarda salgınlara yol açtığını ve Ülkenin diğer yerlerinde de görülmeye başladığını bildirmişlerdir. Ayrıca etken üzerine yapılan MLST yöntemi ile altserotiplendirme çalışmasında iki ayrı altserotip (ST1 ve ST2) tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Sunulan araştırmada şehir merkezinden oturan hastalarda ST1 tespit edilmiştir.

Salmonella enterica subsp. enterica serotipi olan Enteritidis (S. Enteritidis), 1980 ve 1990 arasında meydana gelen pandemik salgına sebep olmuştur. Ancak o yıllardan sonra serotipte meydana gelen değişimler tam olarak izlenememiştir. Serolojik olarak yapılan gruplandırmalar ise bakterinin tam olarak geçirdiği aşamaları ve yayılışı açıklamada yetersiz kalmıştır. Bu nedenle MLST analizi, bakterinin geçirdiği değişimleri tam olarak tanımlamada önemli rol oynayabilir (59, 72). Şuana kadar S. Enteritidis'in 142 farklı sekans tipi tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise S. Enteritidis'in ST11 altserotipi tespit edilmiştir. Benzer biçimde Noda ve ark. (72) da yaptıkları bir çalışmada da 30 adet S. Enteritidisli izolat kullanmışlar ve sadece ST11'e rastladıklarını bildirmişlerdir. İki çalışmada S. Enteritidis'in aynı bölgede birden fazla altserotip olarak rastlanmadığını göstermiştir. Oysaki Harbottle ve ark. (73) MLST yöntemi ile yaptığı bir araştırmada S. Newport'un aynı bölgede birden fazla altserotipine rastladığını bildirmişlerdir.



Şekil 16. *S. Enteritidis*'in sekans tiplerinin filogenetik sınıflandırması (72).

Çalışmada kullanılan 50 izolattan ikisi (*S. Otmarschen* serotipi), University College Cork bünyesindeki veri bankasında, housekeeping allel eşleşmesi oluşmamıştır. *S. Otmarschen*'in allel profili; *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *his D*, *purE*, *SucA* ve *thrA* housekeeping genleri için sırası ile 43, 41, 25, 42, 12, 13 ve 23 olarak tespit edilmiştir. Ulaşılabilen veri bankası bilgilerimize göre bu allel tipinin daha önce başka bir bölgede bulunmadığı sadece bizim çalışma bölgemize ait olduğu düşünülmüştür. Yapılan MLST çalışmaları ile sekans tipi sayısı artmakta olup yine Zankari ve ark (74) yaptığı bir çalışmada 197 izolattan 43 tanesinin bilinmeyen sekans tipi olduğunu bildirmişlerdir.

Mikroorganizmaların altserotiplere ayrılması antibiyotik kullanımı içinde yararlı olabilir. Aynı serotiplere ait farklı sekans tipi, farklı antibiyotik direnci gösterebilirler. Yapılan bir çalışmada *S. Typhimurium*'un ST34 sekansının, ST19'a göre daha fazla direnç gösterdiği tespit edilmiş ve aynı çalışmada *S. Typhimurium*'un ST19, ST34 ve ST376 altserotipleri tespit edildiği bildirilmiştir. Sunulan çalışmada da iki izolatta *S. Typhimurium* ST19 tespit edilmiştir. Yapılan elektronik taramalarda *Salmonella*'nın altserotipleri ve bunlara karşı oluşan antibiyotik direnci konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bölgesel olarak bu tür flogenetik çalışmaların daha kapsamlı biçimde yapılarak, salgınların takibi yanında antibiyotik duyarlılığının ortaya konması ve böylece yanlış antibiyotik kullanımını azaltılarak bakterilerin antibiyotiğe karşı direnç oluşturması geciktirilebilir.

6.SONUÇ

Sonuç olarak, çalışmada tespit edilen serotiplerin Türkiye’de tespit edilenlerden farklı bir serotipin olmadığı ancak serotiplerin görülme oranları bakımından ciddi farklılıklar olduğu saptanmıştır. Özellikle S. Paratyphi B’nin bölgemizde yüksek oranda bulunması dikkat çekici olup, dünya ve Türkiye verilerine bakıldığında en sık S. Enteritidis ve S. Typhimurium'un bildirildiği görülmüştür. Bilindiği gibi serotipleme çalışmalarının birincil amacı etkenin kökenlerinin tespitidir. Sunulan çalışma ile de Şanlıurfa’ da, Dünya ve Türkiye’de bulunan serotiplerin görülme oranının farklı olduğu tespit edilmiştir. 7 adet housekeeping geni kullanılarak oluşturulan filogenetik sınıflandırmanın her bir housekeeping geni için değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca serotiplerin sekans tipinin çok değişiklik göstermediği tespit edilmiştir. Yapılan taramalarda bakterilerin sekanslarının belirlenmesi konusunda çok az çalışma olduğu gözlemlenmiştir. Türkiyede gıda kaynaklı salgınların takibi, engellenmesi ve bakterilerin antibiyotiklere karşı direncin kontrol altında tutulması için, sunulan çalışmanın kapsamının genişletilerek hem serotipler arasında ve hemde serotiplerin sekans tipleri arasındaki antibiyotik direnç özelliklerinin tespitinin büyük yarar olacaktır.

Enfeksiyöz hastalıklarla mücadelede, enfeksiyonun kaynağının ve yaygınlığının tespiti önemlidir. Özellikle gıda kaynaklı enfeksiyonun en önemli sebebi olan Salmonella etkeninin bölgesel çapta hem serotiplerinin ve hemde sekans tiplerinin tespiti ve antibiyotik dirençlerinin tespiti, gerek enfeksiyonla mücadele ve gerekse antibiyotik kullanımının daha etkin olması bakımından önemli fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5: 607–25.
2. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. Salmonella nomenclature - Guest commentary. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38(7): 2465-7.
3. Grimont P, Weil F. Antigenic Formulae of the Salmonella Servovars. Paris: World Health Organization Centre for Reference and Research on Salmonella, Pasteur Institute. 2007; 9th Edition, 3-20.
4. Wikipedia. Erişim: 2013 http://tr.wikipedia.org/wiki/Salmonella_enterica.
5. Matyas B, Cronquist A, Cartter M, Tobin-D'Angelo DM, Blythe D, Smith K, Lathrop S, Morse D, Cieslak P, Dunn J, Holt KG, Heno OL, Fullerton KE, Mahon BE, Hoekstra RM, Griffin PM, Tauxe RV, Achuyt Bhattacharai M. Preliminary Food Net Data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 States. *MMWR* 2010; 59:418-22.
6. Erdem B, Hascelik G, Gedikoglu S, Gur D, Ercis S, Sumerkan B, Aysev AD, Tuncer I, Tugrul M, Tatman Otkun M, Tunger A, Akgun Y, Acar N, Koksall I, Gultekin M, Soyletir G, Elhan A. Salmonella enterica serotypes and Salmonella infections: a multicenter study covering ten provinces in Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38(3):173-86.
7. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M, Threfall J, Scheutz F, van der Giessen J, Kruse H. Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol* 2010; 139(Suppl 1):3-15.
8. RMB (Rapidmicrobiology). Erişim: 2013 <http://www.rapidmicrobiology.com/test-methods/Salmonella.php>.
9. Akdur R, Aktaş F, Altıntaş K. Bulaşıcı hastalıkların ihbarı ve bildirim sistemi standart tanı, sörveyans ve laboratuvar rehberi. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Erişim: 2004.<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/bh/bhibs/BulHastBilSistStanSurveLabReh.pdf>
10. Gülmez D, Gür D, Haşcelik G, Gülesen R, Levent B. Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sörveyans Ağına (UEPLA) dâhil olan bir üniversite hastanesinin deneyimleri: dört yıllık salmonella, shigella ve campylobacter verileri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2012; 42(3):85-92.

11. Erdem B, Ercis S, Haşçelik G, Gur D, Gedikoglu S, Aysev AD, Sumerkan B, Tatman Otkun M, Tuncer I. Antimicrobial resistance patterns and serotype distribution among *Salmonella enterica* strains in Turkey, 2000-2002. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005; 24: 220-5.
12. Aysev AD, Güriz H, Erdem B. Drug resistance of *Salmonella* strains from community infections in Ankara, Turkey, 1993-99. *Scand J Infect Dis* 2001; 33: 420-2.
13. Erdem B, Tekeli A, Şahin F, Koyuncu E, Bayramova M, Karasartova D. Türkiye’de izole edilen *salmonella enterica* serotip typhimurium suşlarının plazmit profilleri ve randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analizi. *Turkish Journal of Infection* 2007; 21 (3): 105-15.
14. Anđ Ö, Töreci K, Küçükler MA. *Salmonellae* and Salmonellosis in Turkey. *Biology of Salmonella*. 1993; 245: 25-33.
15. Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesus J, Platt DJ, Olsen JE. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection*, 2000; 125(2): 229-55.
16. Alcaine, SD, Soyer Y, Warnick LD, Su WL, Sukhnanand S, Richards J, Fortes ED, McDonough P, Root TP, Dumas NB, Grohn Y, Wiedmann M. Multilocus sequence typing supports the hypothesis that cow- and human-associated salmonella isolates represent distinct and overlapping populations. *Appl. Environ. Microbiol*. 2006; 72 (12): 7575-85.
17. Rabsch W, Andrews HL, Kingsley RA, Prager R, Tschape H, Adams LG, Baumler AJ. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect.Immun*. 2002; 70(5): 2249-55.
18. Soyer Y, Alcaine SD, Schoonmaker-Bopp DJ, Root TP, Warnick LD, McDonough PL, Dumas NB, Grohn YT, Wiedmann M. Pulsed-field gel electrophoresis diversity of human and bovine clinical *Salmonella* isolates. *Foodborne Pathog Dis*. 2010; 7(6): 707-17.
19. Eley AR. *Microbiological Food Poisoning*, Champmann & Hall, London. First Edition, 1992: 161-72.
20. Gantois, R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck, F. Van Immerseel. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis genes induced during oviduct colonization and egg contamination in laying hens. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008; 74: 6616–22.
21. Janda JM, Abbott SL. *The Salmonellae*. In: *The Enterobacteria*, Ed.: Janda JM, Abbott SL. Philadelphia PA: Lippincott – Raven, 1998; 80-109.

22. Finlay BB, Falkow S. Salmonella as an intracellular parasite. Mol Microbiol. 1989; 3: 1833-41.
23. Erdem B. 1998-2000 yıllarında serotiplendirilen Salmonella'lar. İnfeks Derg. 2001; 15: 137-40.
24. Forsyth RL. Typhoid and paratyphoid. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Ed: Collier L, Balows A, Susman M. 9nd Ed, Oxford University Press, London, 1998; 459-78.
25. Güneş H, Gökalp AA, Gülen D, Kaya AD. Gastroenteritis olgularda salmonella - shigella cinsi bakterilerin izolasyon sikliği ve antibiyotik direnç paternlerinin değerlendirilmesi. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2012; 13(2): 21-4.
26. Erdem B. Salmonella Türleri. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji, Etkenlere göre infeksiyonlar, Ed.: Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M. Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, 2002; 1586-97.
27. Kurt H, Erdem B, Memikoğlu KO, Gerçeker D, Yağci S, Bumin O. Salmonella enterica subsp enterica ser Typhimurium'un neden olduğu dalak absesi. Mikrobiyol Bült. 1999; 33: 22-3.
28. Threlfall EJ, Ward LR, Rowe B. Resistance to ciprofloxacin in non-typhoidal Salmonellas from humans in England and Wales-the current situation. Clin Microbiol Infect. 1999; 5:130-4.
29. Buke M. Salmonella enfeksiyonları (salmonellozlar). Erişim: 2013 <http://infek.med.ege.edu.tr/dersnotlari/salmonella.pdf>.
30. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Trevino EA. 2007. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. 12th Edition. Missouri, USA. 2007; 300-80.
31. Wiedman M. Special Article: Methods in Nutrition Science. Nutrition Reviews. 2002; 60:7, 201-2.
32. Vazgeçer B, Temiz A. Salmonella İzalasyonu ve Tanımlanması. Orlab On -Line Mikrobiyoloji Dergisi. 2005; 3(4): 1-27.
33. MCR (Mikrobiyoloji.org). 2013. Salmonella. Erişim: <http://www.mikrobiyoloji.org/tr/yonlendir.aspx>
34. Willke A. Salmonella enfeksiyonlarının serolojik tanısında yenilikler var mı? Klimik XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Özet Kitabı, 2003;12-3.

35. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. The Enterobacteriaceae. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Ed.: Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Williams & Wilkins, Lippincott, Philadelphia, 2006; 251-8.
36. Bopp CA, Brenner FW, Fields PI, Wells YG, Strockbine NA. Escherichia, Shigella and Salmonella. In: Manual of Clinical Microbiology, Ed.: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. ASM Press, Washington, 2003; 654-71.
37. Halkman AK, Sağdaş ÖE. Mikrobiyoloji El Kitabı (Hızlı Erişim). Ankara. 2011. II. Baskı, 12-35.
38. Akçalı A. Bulaşıcı hastalıkların sürveyansında moleküler yöntemler neden gerekli?Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. Bilkent Otel ve Konferans Merkezi, Ankara. Haziran 2008; 24-8.
39. Pang JC, Chiu TH, Chiou CS, Schroeter A, Guerra B, Helmuth R, Tsen HY. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of Salmonella enterica serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. J Appl Microbiol. 2005; 99: 1472-83.
40. Palmer SR, Rowe B. Trends in Salmonella infections. PHLS Microbiol Dig. 1986;3: 18-22.
41. Erdem B, Erler F, Gerçek D, Gökçen S, Aysev D, Yavuz Demir Değişik kaynaklı Salmonella suşlarında fenolat ve hidroksamat tipi senterofor sentezi. İnfek Derg. 1995; 9:75-8.
42. Old DC, Threlfall EJ. Salmonella. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Ed.: Collier, L., Balows, A., Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, 9nd Ed., Oxford University Press, London, 1998; 969-97.
43. Erdem B. Enterobacteriaceae. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ed.: Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. 1. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 1999; 471-515.
44. Helmuth R, Stephan R, Bunge C, Hoog B, Steinbeck A, Bulling E. Epidemiology of virulence - associated plasmids and outer membrane protein patterns with seven common Salmonella serovars. Infect Immun. 1985;48: 175-82.
45. Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. Res. Microbiol. 2004; 155:568-70.
46. McQuiston JR, Herrera-Leon S, Wertheim BC, Doyle J, Fields PI, Tauxe RV, Logsdon JM. Jr. Molecular Phylogeny of the Salmonellae: Relationships among Salmonella Species

- and Subspecies Determined from Four Housekeeping Genes and Evidence of Lateral Gene Transfer Events. *J. Bacteriol.* 2008; 190(21): 7060–7.
47. Çetinkaya E, Ayhan K. Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2012; 2 (1): 53-62.
48. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fusing, Green VJ, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13 Suppl 3:1-46.
49. Baldwin A, Loughlin M, Caubilla Barron J, Kucerova E, Manning G, Dowson C, Forsythe S. Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. *BioMed Central Microbiol*, 2009; 9: 223_4.
50. Arda M. *Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler)*, Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara, 1995. Birinci Baskı, 5-10.
51. Somma M, Querci M. Gıda örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri. 6. Bölüm. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR). JRC European Commition Pub. (Turkish Translation) 2010. 3-21.
52. Avaz S. PCR yöntemi nedir? Kullanım alanları nerelerdir? Erişim: http://biltek.tubitak.gov.tr/merak_ettikleriniz/yazici_dostu.php?kategori_id=2&soru_id=4949.
53. Arı Ş. Moleküler biyolojide kullanılan, “DNA’ nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması” Ed. Temizkan, G., Arda N. Nobel Kitabevi, 1999; 57-67.
54. Uysal M. PCR ve Real time PCR. 2013. Erişim: www.uysalm.klinikbiyokimya.com.
55. Willey, Joanne M. Prescott, Harley, and Klein’s microbiology / Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, Christopher J. Woolverton. 2008; 7th ed. 247-315.
56. Yılmaz S, Devram Z. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve bitki biyoteknolojisinde yaygın uygulamaları. Erişim: <http://batem.gov.tr/yayinlar/derim/2003/31-42.pdf>.
57. Leekitcharoenphon P, Lukjancenko O, Friis C, Aarestrup FM and Ussery DW. Genomic variation in *Salmonella enterica* core genes for epidemiological typing. *BMC Genomics*, 2012; 13: 88-9.
58. Chan MS, Maiden MC, Spratt BG. Database-driven Multi Locus Sequence Typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics* 2001; 17: 1077-83.
59. Urwin R, Maiden MCJ. Multi Locus Sequence Typing: a tool of global epidemiology. *Trend Microbiol.* 2003; 10(11): 479-87.

60. Achtman M, Wain J, Weill F-X, Nair S, Zhou Z. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in salmonella enterica. *PLoS Pathog.* 2012;8(6): 1-19.
61. Acuner İÇ. Moleküler tiplendirme yöntemlerinin hastane enfeksiyonlarının kontrolündeki yere: güncel bilgiler ışığında genel bir bakış. *Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi.* 24-28 Haziran 2008. Bilkent Otel ve Konferans Merkezi, Ankara. 2004; 38(3): 173-86.
62. Liefucht A, Reacher M. *Eurosurveillance*, <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=1999>; 3 (44). 1307-8.
63. Kasper SS, Fretz R, Kornschober C, Allerberger F, Schmid D. Imported Salmonella Enteritidis cases: a multiphage outbreak among Austrian vacationers in Turkey, 2008. *Wien Klin Wochenschr* 2009; 121(3-4): 144-8.
64. Kim JS, Lee GG, Park JS, Jung YH, Kwak HS, Kim SB, Nam YS and Kwon ST. A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot.* 2007; 70(7): 1656-62.
65. Soyer Y, Moreno Switt A, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, Dumas NB, Root T, Warnick LD, Grohn YT and Wiedmann M. *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i: an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(11): 3546-56.
66. World Health Organization (WHO). Prepared for World Water Day 2001. Reviewed by staff and expert from the cluster on Communicable Disease (CDS) and the Water, Sanitation and Health unit (WHS), World Health Organization (WHO), 2008. 17-29.
67. Tibet M, Cicioğlu B, Gerçeker D, Erdem B, Yavuzdemir Ş. *Salmonella Typhimurium* ve *Salmonella Enteritidis* Suşlarının Çeşitli Antimikrobiklere Direnci. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 1996; 53:1-5.
68. Todd B. The increasing risk of *Salmonella* infections. Erişim: 2006 <http://www.ggd.org.tr/icerik.php?id=462>.
69. Ben-Darif E, De Pinna E, Threlfall EJ, Bolton FJ, Upton M, Fox AJ. Comparison of a semi-automated rep-PCR system and multilocus sequence typing for differentiation of *Salmonella enterica* isolates. *J Microbiol Methods.* 2010; 81(1):11-6.
70. Tankouo-Sandjong B, Sessitsch A, Liebana E, Kornschober C, Allerberger F, Hächler H, Bodrossy L. MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for molecular

typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars. *J Microbiol Methods*. 2007; 69(1):23-36.

71. Dahiya S, Kapil A, Kumar R, Das BK, Sood S, Chaudhry R, Kabra SK, Lodha RK. Multiple locus sequence typing of *Salmonella Typhi*, isolated in north India - a preliminary study. *Indian J Med Res*. 2013;137(5):957-62.

72. Noda T, Murakami K, Asai T, Etoh Y, Ishihara T, Kuroki T, Horikawa K and Fujimoto S. Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* strains in Japan between 1973 and 2004 *Acta Veterinaria Scandinavica* 2011; 53:38.

73. Harbottle H, White DG, McDermott PF, Walker RD, Zhao S. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:2449-57.

74. Zankari E, Hasman H, Kaas RS, Seyfarth AM, Agers Y, Lund O, Larsen MV and Aarestrup FM. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob Chemother* 2013; 68 (4): 771-7.