Evaluation of a CHROMagar Salmonella Medium for the Isolation of Salmonella Species

Salmonella Türlerinin İzolasyonunda CHROMagar Salmonella Besiyerinin Değerlendirilmesi

CHROMagar Salmonella Besiyerinin Değerlendirilmesi / Evaluation of a CHROMagar Salmonella Medium

Yeşim Çekin[1], Özlem Koyuncu Özyurt[2], Duygu Dağlar[3], Hafize Kılınçkaya Doğan[2], Betil Özhak Baysan[2]
Aylin Erman Daloğlu[2], Gözde Öngüt[2], Dilara Öğünç[2], Dilek Çolak[2], Belkıs Levent[4]
[1]Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Antalya, [2]Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji A.D., Antalya
[3]Serik Devlet Hastanesi, Antalya, [4]Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, Türkiye

Özet

Amaç: Salmonella enfeksiyonları gıda ile bulaşan enfeksiyonların başında gelmektedir ve tüm dünyada gasteroenterit salgınlarına neden olabilmektedir. Salmonella türleri laktozu fermente edememe, tek karbon kaynağı olarak sitratı, nitrat kaynağı olarak lizini kullanma ve TSI agarda Hidrojen Sülfür (H^2S) oluşturma yetenekleri ile tanımlanırlar. Ancak yanlış pozitif sonuçların doğrulanması zaman kaybına ve maliyet artışına neden olmaktadır. Bu çalışmada Salmonella türlerinin izolasyon ve saptanması için geliştirilmiş bir besiyeri olan CHROMagar Salmonella (CHROMagar Microbiology, Fransa) besiyerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Gereç ve Yöntem: Bu amaçla Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilerek stoklanmış 65'i Salmonella spp., 10'u Pseudomonas aeruginosa, 10'u E. coli, 10'u Acinetobacter baumannii, 10'u Klebsiella pneumoniae, 18'i Morganella morganii, 11'i Citrobacter spp, 5'i Providencia spp., 4'ü Aeromonas spp., 5'i Proteus spp. olmak üzere toplam 148 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Bulgular: CHROMagar Salmonella besiyerinde 65 Salmonella spp. izolatının tümü leylak rengi koloniler oluşturmuştur. E. coli ve Klebsiella pneumoniae suşları mavi renkli; Providencia türleri renksiz ve mavi renkli; Morganella morganii suşları renksiz ve açık leylak rengi; Pseudomonas aeruginosa suşları renksiz koloniler oluşturmuştur. Acinetobacter baumannii suşları ve Aeromonas spp. suşlarının da leylak rengi koloniler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Tartışma: CHROMagar besiyeri ile %100 duyarlılıkta Salmonella türleri saptanabilmekte, ancak biyokimyasal veya serolojik doğrulamaya gereksinim duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler

Salmonella Spp; CHROMagar; İdentifikasyon

Abstract

Aim: Salmonella infections are the leading cause of food-borne infections and can cause gastroenteritis outbreaks worldwide. Salmonella species is defined as inability to lactose fermentation, using citrate as a carbon source, using lysine as nitrate source and forming Hydrogen sulfide (H^2S) in TSI agar. However, confirmation of false positive results is time consuming and lead to increased costs. The aim of this study is to evaluate the performance of CHROMagar Salmonella (CHROMagar Microbiology, France) which is developed for isolation and detection of Salmonella species. Material and Method: For this purpose, among a total of 148 isolates which were isolated from various clinical specimens and stocked at the Central Laboratory of Akdeniz University Hospital, 65 were Salmonella spp., 10 were Pseudomonas aeruginosa, 10 were E. coli, 10 were Acinetobacter baumannii, 10 were Klebsiella pneumoniae, 18 were Morganella morganii, 11 were Citrobacter spp., 5 were Providencia spp., 4 were Aeromonas spp., 5 were Proteus spp. were included in this study. All of the 65 Salmonella spp. isolates apperared with mauve colonies at the CHROMagar Salmonella. Results: E. coli and Klebsiella pnemoniae species were seen as blue, Providencia species were seen as pale-blue; Morganella morganii species were seen as pale-pink, mauve; and Pseudomonas aeruginosa species were seen as pale. Acinebacter baumannii and Aeromonas spp. species were also seen as mauve colonies. Dicussion: CHROMagar Salmonella medium can detect Salmonella species with %100 sensitivity, however there is a need to biochemical or serological confirmation.

Keywords

Salmonella Spp; CHROMagar; Identification

DOI: 10.4328/JCAM.1708 Received: 02.03.2013 Accepted: 18.03.2013 Printed: 01.01.2015 J Clin Anal Med 2015;6(1): 29-31
Corresponding Author: Betil Ozhak Baysan, Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuarı, Tıbbi Mikrobiyoloji A.D., Antalya, Türkiye.
GSM: +905057406887 E-Mail: betilozhak@yahoo.com

Giriş

Salmonella genusu üyeleri, Enterobacteriacea ailesinden, fakültatif anaerob, gram negatif basillerdir. Salmonella gallinarum ve Salmonella pullorum serotipleri hariç olmak üzere hareketli bir bakteridir. Salmonella cinsi somatik, flagellar ve kapsüler antijen tiplendirmesine dayalı olarak belirlenen 3000'e yakın serotipten oluşmaktadır. Günümüzde Samonella'lardan kaynaklanan gıda enfeksiyonları bir çok ülkede tüm gıda enfeksiyon ve intoksikasyonları arasında ilk veya ikinci sırada yer almaktadır [1]. Salmonella'ların hızlı ve güvenilir identifikasyonları gıda kaynaklı enfeksiyonların sürveyans, korunma ve kontrolünde çok önem kazanmaktadır. Kültür ile izolasyon en güvenilir yöntem olup, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu amaç için geliştirilmiş çeşitli selektif besiyerleri kullanılmaktadır. Brillant green agar (BGA), Xylose lysine desoxycholate agar (XLD), Bismuth sulfite agar (BSA), Hektoen enteric agar (HEA) ve Salmonella-Shigella agar (SS) Salmonella aranması için önerilen klasik besiyerleridir [2-4]. Bu besiyerlerinde tanımlama H^2S üretimi, laktozu fermente edememe gibi basit biyokimyasal özelliklerin görülmesine dayanmakta ve şüpheli kolonilerin biyokimyasal ve serolojik yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir. Bu nedenle son yıllarda Salmonella'ya özgü enzimleri saptayabilecek kromojenik besiyerleri kullanıma sunulmuştur [5-7]. Bu amaçla kullanılan CHROMAgar Salmonella besiyeri esteraz aktivitesine göre ayrım sağlamakta ve bileşimindeki 5-bromo-6-chloro-3-indolyl-caprylate esteraz aktivitesi sonucu Salmonella suşları leylak renkli kolonilerin oluşmasına neden olmaktadır.

Çalışmamızda, Salmonella türlerinin izolasyon ve saptanması için geliştirilmiş bir besiyeri olan CHROMagar Salmonella (CHROMagar Microbiology, Fransa) besiyerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır .

Gereç ve Yöntem

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilerek -800C'de stoklanmış 65'i Salmonella spp., 10'u Pseudomonas aeruginosa, 10'u E. coli, 10'u Acinetobacter baumannii, 10'u Klebsiella pneumoniae, 18'i Morganella morganii, 11'i Citrobacter spp., 5'i Providencia spp., 4'ü Aeromonas spp., 5'i Proteus spp. olmak üzere toplam 148 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatların, koyun kanlı agara iki kez subkültürleri yapıldıktan sonra; kolonilerin serum fizyolojik içerisinde 0.5 Mc Farland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonları hazırlanmış, süspansiyondan 10µl CHROMagar besiyerine ekilerek 37ºC'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İzolatlar besiyerinde oluşturdukları koloni renklerine göre üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Bu çalışmada referans suş olarak Salmonella typhi NCTC 8393 kullanılmıştır.

Bulgular

CHROMagar Salmonella besiyerinde 370C'de 24 saatlik inkübasyon sonrasında 65 Salmonella kolonisi leylak rengi koloniler oluşturmuştur. E. coli ve Klebsiella pneumoniae suşları mavi renkli; Providencia türleri renksiz ve mavi renkli; Morganella morganii suşları renksiz ve leylak rengi; Pseudomonas aeruginosa suşları ise renksiz koloniler oluşturmuştur. Acinetobacter baumannii suşları ve Aeromonas spp. suşlarının leylak rengi koloniler oluşturduğu gözlemlenmiştir [Tablo 1]. Çalışmamızda CHROMagar Salmonella besiyerinin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif prediktif değeri, negatif prediktif değeri sırasıyla %100, %83, %79.3, %100 olarak saptanmıştır.

Tablo1. Mikroorganizmaların dağılımı ve CHROMagar Salmonella besiyerinde görünümleri

Organizma	İzolat sayısı	CHROMagar Salmonella	
		Renk	(sayı)
Salmonella spp.	65	Leylak	(65)
Escherichia coli	10	Mavi	(10)
Klebsiella pneumoniae	10	Mavi	(10)
Pseudomonas aeruginosa	10	Renksiz	(10)
Morganella morganii	18	Leylak	(3)
Renksiz			(15)
Citrobacter spp.	11	Mavi	(11)
Providencia spp.	5	Mavi	(2)
Renksiz			(3)
Aeromonas spp.	4	Leylak	(4)
Proteus spp.	5	Renksiz	(5)
Acinetobacter baumannii	10	Leylak	(10)

Tartışma

Gıda kaynaklı enfeksiyonlar, önemli bir halk sağlığı sorunudur. Salmonella gıda ile bulaşan hastalıklara yol açan ve tüm dünyada sporadik olgulara ve gasteroenterit salgınlarına neden olan mikroorganizmaların başında gelmektedir [1]. Bu mikroorganizmanın saptanmasında mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak seçici besiyerleri kullanılmaktadır. Ancak Proteus türleri ve bazı Citrobacter türleri, laktozu fermente edememe ve H^2S oluşturma gibi Salmonella cinsine benzer biyokimyasal özellikler göstermektedir. Bu nedenle klasik besiyerlerinde özellikle bu türlerden kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar ile sıklıkla karşılaşılmakta ve doğrulama sırasında laboratuvar iş yükünü artırmaktadır [8]. 1990'lı yıllardan günümüze Salmonella tanısında yüksek özgüllüğe sahip kromojenik besiyerleri geliştirilmiştir [8-12]. Salmonella türlerinde yağ asit esterlerini parçalayan esteraz enzimi bulunmaktadır. Enterobacteriaceae ailesinde yer alan Salmonella spp. dışı az sayıda türde bu enzim bulunabilmektedir. CHROMagar Salmonella besiyeri esteraz aktivitesinin saptanmasına yönelik geliştirilmiş bir besiyeridir. Bu besiyeri, bileşiminde esteraz enziminin kromojenik substratı olan 5-bromo-6-chloro-3-indolyl-caprylate içermekte, bakterilerdeki esteraz aktivitesi sonucu Salmonella'ların leylak renkli koloniler oluşturmasına neden olmaktadır. Diğer Enterobacteriaceae familyası üyeleri ß-D-galaktosidase aktivitesine bağlı olarak besiyerinde mavi veya renksiz koloniler oluştururlar. Rall ve ark [13] tavuk karkas örnekleri ile yaptıkları çalışmada CHROMagar Salmonella besiyerinin, Rambach agar, BGA, SS ve XLD'ye göre Salmonella pozitif örnekleri daha yüksek oranda tespit ettiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, CHROMagar Salmonella besiyeri, Salmonella suşlarını %100 duyarlılıkta ve %83 özgüllükte saptamıştır. Çalışmaların bir kısmı bizim sonuçlarımızdan farklı olarak kromojenik besiyerlerinin klasik besiyerlerine göre yüksek özgüllükte ve daha düşük duyarlılıkta olduğunu bildirmişlerdir [7, 10, 11]. Bu çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamız gaita örneklerinden gerçekleştirilmemiştir. Bizim çalışmamızda Acinetobacter baumannii suşları ile Aeromonas spp. suşlarının tümü ve Morganella morganii suşlarının bir kısmının da leylak rengi koloniler oluşturduklarını gözlemledik. Bu nedenle CHROMagar besi-

yerinin klinik örneklerin tanısında kullanılırken, biyokimyasal ve serolojik yöntemlerle doğrulanması gerektiğini düşünmekteyiz. Akyar ve ark'ları çalışmalarında Salmonella türlerinin hızlı tanısında CHROMagar Salmonella ile Mac Conkey agarı karşılaştırılmışlar ve CHROMagar Salmonella besiyerinde Salmonella kolonilerini, saflaştırma işlemine gerek duymaksızın tür tayini için kullanabildiklerini bildirmişlerdir. Mac Conkey besiyerinde laktoz negatif koloni oluşturan suşların saflaştırma ve isimlendirilmeleri için geçen sürenin CHROMagar Salmonella besiyerinde üremiş Salmonella şüpheli kolonilerin tür tayini yapılmasına kıyasla 24-48 saat daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir.

CHROMagar Salmonella besiyeri klinik örneklerden Salmonella üretebilmek için kullanılmakta ancak, klasik olarak dışkı kültürlerinde araştırılması gereken Shigella türlerini üretememektedir. Bu nedenle Shigella türleri ve diğer enterik patojenlerin üretilmesi ve tanımlanmasına yönelik besiyerlerine olan gereksinim sürmektedir. Buna bağlı olarak, CHROMagar Salmonella besiyerininin rutin laboratuvar işleyişinde Salmonella izolasyonunu hızlandırmasına rağmen, iş yükünü ve maliyeti artırabileceği düşünülebilir. Van Dijk ve ark'ları CHROMagar besiyerini değerlendirdikleri çalışmalarının sonunda rutin laboratuvar protokollerini revize etmişler ve yüksek duyarlılıkta Salmonella tanısı ve optimal Shigella izolasyonu için XLD ve CHROMagar Samonella besiyerlerini birlikte kullanmayı tercih etmişlerdir [14]. Benzeri çalışmalarla laboratuvarların kendi koşullarına uygun, maliyet etkin yöntemi seçmeleri gerekmektedir.

Salmonella enfeksiyonlarının %95'i gıda kökenlidir [15]. Yüksek duyarlılığı nedeniyle bu besiyerinin, gıda taramalarında ya da kısa sürede çok sayıda örneğin çalışılması gereken toplum kaynaklı salgın (epidemi) durumlarında kullanılması uygun gözükmektedir [16]. Salmonella enfeksiyonları hastane salgınlarına da sebep olabilmektedir. Rushdy ve ark. çalışmalarında bir hastane salgını sırasında insandan insana bulaşın olduğunu göstermişler ve bu gibi durumlar için tarama protokollerinin oluşturulması gerekliliğini vurgulamışlardır [17].

Sonuç olarak, CHROMagar Salmonella besiyerinin gaitada enfeksiyon etkeni olmayan mikroorganizmaları da üretiyor olması ve bazılarının da Salmonella kolonileri gibi leylak rengi koloniler oluştuması, bunun yanında Shigella türlerini üretemiyor olması nedeniyle, yüksek duyarlılığına rağmen, hastane ve toplum kökenli salgınlar dışında rutin laboratuvar çalışmalarına katkısının sınırlı olduğunu düşünmekteyiz. Ancak, CHROMagar besiyerinin Salmonella türlerini klinik örneklerden izolasyon ve tanımlama konusunda uygulanabilirliği, izolasyon oranları yüksek olan merkezlerde yapılacak çalışmalarla değerlendirilmelidir.

Çıkar Çakışması ve Finansman Beyanı

Bu çalışmada çıkar çakışması ve finansman destek alındığı beyan edilmemiştir.

Kaynaklar

1. Erol Ö. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. 1. Baskı. Pozitif Matbaacılık: Ankara, 2007.
2. Food and Drug Administration. Salmonella. Bacteriological Analytical Manuel, Maryland, 2006.
3. Health Protection Agency. National Standard Method F 13: Detection of Salmonella species. London, 2007.
4. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the detection of Salmonella spp. Cenevre, 2002.
5. Cassar R, Cuschieri P. Comparison of Salmonella chromogenic medium with DCLS agar for isolation of Salmonella species from stool specimens. J Clin Microbiol 2003; 41(7):3229–32.
6. Maddocks S, Olma T, Chen S. Comparison of CHROMagar Salmonella medium and xylose-lysine-desoxycholate and Salmonella-Shigella agars for isolation of Salmonella strains from stool samples. J Clin Microbiol 2002;40(8):2999–3003.
7. Perez JM, Cavalli P, RoureC, R. Renac, Gille Y, Freydiere AM. Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of Salmonella strains in human stools. J Clin Microbiol 2003;41(3):1130–4.
8. Arroyo G, Arroyo JA. Efficiency of different enrichment and isolation procedures for the detection of Salmonella serotypes in edible offal. J Appl Bacteriol 1995;79(4):360-7.
9. Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Richardson AC. A novel chromogenic ester agar medium for detection of Salmonella. Appl Environ Microbiol 1999;65(2):807-12.
10. Gaillot O, di Camillo D, Berche P, Courcol R, Savage C. Comparison of CHROMagar Salmonella Medium and Hektoen Enteric Agar for isolation of Salmonella from stool sample. J Clin Microbiol 1999;37(3):762-5.
11. Manafi M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. Int J Food Microbiol 2000;60:205-18.
12. Rambach A. New plate medium for facilities differentiation of Salmonella spp from Proteus spp and other enteric bacteria. Appl Environ Microbiol 1990;56(1):301-3.
13. Rall VLM, Rall R, Aragon LC, da Silva MG. Evaluation of three enrichment broths and five palting media for Salmonella detection in poultry. Braz J Microbiol 2005;36:147-50.
14. van Dijk S, Bruins MJ, Ruijs GJ. Evaluation and implementation of a chromogenic agar medium for salmonella detection in stool in routine laboratory diagnostics. J Clin Microbiol 2009;47(2):456-8.
15. Camara JE, Hays FA: Discrimination between wild-type and ampicillin- resistant Escherichia coli by matrix-assisted laser desorption/ionization time- of-flight mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 2007;389(5):1633-8.
16. Wilson G. Rapid and economical method for biochemical screening of stool isolates for Salmonella and Shigella species. J Clin Microbiol 2004;42(10):4821-3.
17. Rushdy AA, Wall R, Seng C, Wall PG, Stuart JM, Ridley AM, Threlfal EJ et al. Application of molecular methods to a nosocomial outbreak of Salmonella enteritidis phage type 4. J Hosp Infect 1997;36(2):123–31.