

Salmonella enteritidis Suşlarında Hemaglutinasyon Etkinliği ve Fimbriyalar

Ayten KİMİRAN (**), Mine ANĞ KÜÇÜKER (***)

ÖZET

Bu çalışmada, buyyon ve fosfat tamponlu agar besiyerlerinde 22 °C ve 37 °C sıcaklıklarda üretilen 11 adet Salmonella enteritidis suşunun kobay, tavşan, tavuk, koyun, (O grubu) insan ve öküz eritrositleriyle +4 °C'de ve oda sıcaklığında oluşturdukları hemaglutinasyon tipleri, eritrosit profilleri ve ayrıca 37 °C'de sıvı besiyerinde fimbriya oluşturma özellikleri elektronmikroskopik ile incelenmiştir.

Suşlar farklı sıcaklıklarda, farklı besiyerlerinde üretildiklerinde ve hemaglutinasyon deneyleri farklı sıcaklıklarda yapıldığında, oluşan hemaglutinasyon tiplerinin ve eritrosit profillerinin farklılıklar gösterdiği saptanmıştır.

Elektron mikroskobu incelemelerinde buyyon besiyerinde 37 °C 'de üretilen 11 S.enteritidis suşunun altısının fimbriya oluşturduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Salmonella enteritidis, hemaglutinasyon yeteneği, fimbriyalar

GİRİŞ

Bakterilerin patojenite faktörleri arasında yer alan ve ancak elektron mikroskobuyla görünür kılınan fimbriyalar, bakterilerin konak organizmanın mukoza yüzeylerine yapışmalarından sorumlu organelleridir (1,2) Mukoza yüzeylerine yapışma özelliği bir bakterinin bir konak organizmada infeksiyon ve infeksiyon hastalığı oluşturabilmesinin birincil koşulu olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır (3).

Özellikle Enterobacteriaceae ailesi üyesi bakterilerde sıklıkla varolan fimbriyaların işlevsel ve yapısal özelliklerine göre birbirinden farklılıklar gösteren

(*)XXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (11-15 Nisan 1994, Antalya)'nde sunulmuştur.

(**) İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

(***) İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji vi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

SUMMARY

Hemagglutination Activity and Fimbriae in Salmonella enteritidis Strains

11 Salmonella enteritidis strains grown in broth and phosphate buffered agar at 22 °C and 37 °C were examined for their hemagglutination types and erythrocyte profiles with erythrocytes of guinea pig, rabbit, chicken, sheep, ox and human (-group-O) at +4 °C and room temperature. Moreover these 11 S.enteritidis strains grown in broth media at 37 °C were examined for the formation of fimbriae by electron microscopical methods.

It was shown that types of hemagglutinations and also the erythrocyte profiles of these 11 S.enteritidis strains are vary depending on the growth temperature of the strains and also on the temperature at which hemagglutination tests were done.

In electronmicroscopic examinations, six of the 11 S.enteritidis strains grown in broth media at 37 °C were found to produce fimbriae.

Key Words: Salmonella enteritidis, hemagglutination activity, fimbriae.

tipleri bulunmaktadır. Değişik bakteri cinsleri veya aynı cinsin değişik türleri farklı fimbriya tiplerine sahip olabildikleri gibi bakterilerin fimbriya oluşturma özellikleri ortam koşullarına da bağlı olarak değişebilmektedir (3,4).

Bakteri fimbriyaları, farklı hücre tipleri arasında eritrositlere de yapışabilme ve böylelikle aglutine etme (hemaglutinasyon) yetenekleriyle bakteri hemaglutininleri (fimbriyal hemaglutininler) arasında yer almaktadırlar (3,5). Bu bağlamda, fimbriyaların varlıklarını ve yapışmada oynadıkları rolü göstermeye yönelik in vitro araştırmalarda kullanılan yöntemlerden biri de bakterilerin hemaglutinasyon yeteneklerinin gösterilmesine dayanır (3,5,6). Duguid, Tip I, II, III, IV, V, VI ve F olmak üzere yedi tip fimbriya tanımlamıştır. Salmonella bakterilerinde mannoza duyarlı hemaglutinasyon yapan tip I fimbriyalar, man-

noza dirençli Klebsiella benzeri hemaglutinasyon yapan tip III fimbriyalar ve mannoza dirençli non-fimbriyal hemaglutininler olmak üzere üç tip adherens faktörü bildirilmiştir (7).

Bakterilerde fimbriya oluşumu, fimbriyal ve non-fimbriyal hemaglutinasyon özellikleri, hemaglutinasyon tipleri, eritrosit profilleri gibi özelliklerin araştırılmasında, bir yandan bilimsel bir merak, bir yandan da bakterilere ait epidemiyolojik bilgilerin genişletilmesiyle sağlık sorunlarıyla ilişkili pratik yaklaşımlara olanak sağlanması gibi amaçlardan söz edilebilir.

Bu çalışmada, gastroenterit etkeni olarak insanlardan izole edilmiş ve faj tipleri, plazmid profilleri gibi bazı epidemiyolojik özellikleri önceden bilinen 11 adet S.enteritidis suşunun kobay, tavşan, tavuk, koyun, sığır, öküz ve insan gibi farklı eritrosit tiplerini aglutine etme yetenekleri, oluşturdukları hemaglutinasyon tipleriyle fimbriya oluşturma özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Onbir S. enteritidis i) buyyon besiyerinde, üçer gün aralıklarla sekiz kez pasajları yapılarak 37°C'de ve ii) yedişer gün aralıklarla altı kez pasajları yapılarak 22°C'de, ayrıca iii) fosfat tamponlu agar (FTA) besiyerinde 24 saat 37°C'de iv) aynı besiyerinde 48 saat 22°C'de üretilerek +4°C ve oda sıcaklığında hemaglutinasyon deneyleri yapılmıştır (8,9).

Hemaglutinasyon deneylerinde kobay, tavşan, koyun, tavuk, sığır ve insan kanlarının 1500 r.p.m'de 10 dakika santrifüj edilmesiyle elde edilen eritrositlerin steril fizyolojik tuzlu suda ve ayrıca mannoza dirençli hemaglutinasyonu saptamak amacıyla %2 mannoz içeren steril fizyolojik tuzlu suda %3'lük süspansiyonları kullanılmıştır (8,10,11,12,13). Mannoza dirençli Klebsiella benzeri hemaglutinasyonu saptamak amacıyla tannik asitle kaplanmış öküz eritrositleri kullanılmıştır.

Bir suşun hem mannoz içeren ve hem de mannoz içermeyen ortamda oluşturduğu hemaglutinasyon mannoza dirençli hemaglutinasyon (MR-HA), yalnızca mannoz içermeyen ortamda hemaglutinasyon reaksiyonunun gözlenmesi fakat mannoz içeren ortamda hemaglutinasyon reaksiyonu gözlenmemesi,

mannoza duyarlı hemaglutinasyon (MS-HA) reaksiyonu olarak değerlendirilmiştir. Her iki tüpte reaksiyon olmaması da suşun hemaglutinasyon yapma özelliğinde olmadığı şeklinde yorumlanmıştır (6,9,10,11). Tannik asitle kaplanmış öküz eritrositlerinin mannoz içeren ortamda aglutine edilmesi mannoza dirençli Klebsiella benzeri hemaglutinasyon (MR/K-HA) olarak yorumlanmıştır (9,11).

Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde negatif boyama yönteminden yararlanılarak bakterilere ait elektronmikrograflar ZEISS 9 M elektron mikroskobu ile çekilmiştir(14).

BULGULAR

Fosfat tamponlu agar ve buyyon besiyerinde 22°C ve 37°C sıcaklıklarda üretilen 11 adet S.enteritidis suşunun; kobay, tavşan, tavuk, koyun, sığır, öküz ve insana ait olmak üzere yedi çeşit eritrositle +4°C ve oda sıcaklığında oluşturdukları hemaglutinasyon reaksiyonları Tablo 1'de özetlenmiştir.

S.enteritidis suşları farklı sıcaklıklarda ve farklı besiyerlerinde üretildiklerinde ve hemaglutinasyon deneyleri farklı sıcaklıklarda yapıldığında oluşturdukları hemaglutinasyon tiplerinin ve hemaglutinasyon eritrosit profillerinin değişiklikler gösterdiği saptanmıştır.

Çalışmamızda, 37°C sıcaklıkta ve sıvı besiyerinde üretilerek incelenen 11 S.enteritidis suşundan altısının fimbriya oluşturduğu, beşininse bu üreme koşullarında fimbriya oluşturmadığı gözlenmiştir

Çalışmamızda, çeşitli eritrosit tipleri ile meydana getirdikleri hemaglutinasyon yetenekleri incelenen S.enteritidis suşları arasında mannoza duyarlı hemaglutinasyon gösteren suşların azlığı dikkat çekmiş olup incelenen 11 S.enteritidis suşundan yedisinin mannoza dirençli Klebsiella benzeri hemaglutinasyon oluşturduğu saptanmıştır.

TARTIŞMA

Hemaglutinasyon özellikleri ve fimbriya oluşumuyla ilgili çalışmaların pek çoğu Enterobacteriaceae ailesi üyesi bakterilerle gerçekleştirilmektedir.

Coşar (15), yaptığı bir çalışmada 130 üropatojen Escherichia coli suşundan 51'inin 0-grubu insan

Tablo 1. Buyyon ve FTA besiyerlerinde 22 °C ve 37 °C'de üretilen *S. enteritidis* suşlarının farklı eritrosit tipleriyle +4 °C'de ve oda sıcaklığında oluşturdukları hemaglutinasyon reaksiyonları

Suş No	Faj Tipi	Plazmidler	Sıcaklık	Buyyon 22 °C			Buyyon 37 °C			FTA 22 °C			FTA 37 °C		
				MR-HA	MS-HA	MR/K-HA	MR-HA	MS-HA	MR/K-HA	MR-H	MS-HA	MR/K-HA	MR-HA	MS-HA	MR/K-HA
1	(6)	VP+3	4 °C	K,S			Kb,T ₁ ,T			T	T ₁ ,K	T ₁ ,K	T ₁ ,K,S		
			O.S		T	Kb	T ₁	T ₁ ,T,K	T ₁ ,K	T ₁ ,K	T ₁ ,K	T ₁ ,K	T ₁ ,K	T ₁ ,K	T ₁ ,K
2	(6)	VP+2	4 °C	Kb,T ₁ ,K,S,I			T ₁ ,T						T,K,S		
			O.S	Kb,T ₁	T,K,S	T ₁		Kb,T ₁ ,T	T ₁ ,T	T ₁	T ₁ ,T,K	T ₁ ,T,K	T ₁ ,T,K	T ₁ ,K,S	
3	6a	VP+3	4 °C	T ₁ ,T,K,S,I			T ₁ ,T,K						T,K,S		
			O.S	T ₁	K	T ₁		Kb,T ₁ ,T,K	T ₁ ,T	T ₁	T ₁ ,K,I	T ₁ ,K,I	T ₁ ,K,I	T ₁ ,K,S	
4	6a	VP+1+3	4 °C	Kb,T ₁ ,K,S	T		T ₁			T,K			T,K,S		Ö ₁
			O.S	T ₁	T,K,S	T ₁		Kb,T ₁ ,T,K	T ₁	T ₁	T ₁ ,I	T ₁ ,I	T ₁ ,I	T ₁ ,K	K
5	6	VP+1	4 °C	Kb,T ₁ ,T,K,S			T ₁	Kb		T			S		
			O.S	S	T ₁ ,K	T ₁		T,K	T ₁	T ₁	T ₁ ,I,T ₁	T ₁ ,I,T ₁	T ₁ ,I,T ₁	T ₁ ,I,T ₁	T ₁ ,I,T ₁
6	6a	VP	4 °C	Kb,T ₁ ,T,K,S			T ₁ ,T			K					Ö ₁
			O.S	T ₁ ,I,Kb,K,S			T ₁		K	T ₁	Ö ₁	T ₁ ,K	T ₁ ,K	T ₁ ,K	T ₁ ,K
7	*	(-)	4 °C	T ₁ ,T,K			T ₁			T			K		
			O.S	T ₁ ,I			T ₁		Kb,T ₁ ,T,K	T ₁	Ö ₁	T ₁ ,K	T ₁ ,K	T ₁ ,K	T ₁ ,K
8	8	VP+3	4 °C	Kb,T ₁ ,T,K			T ₁ ,T,S	K		Kb,T ₁ ,K,S,I,T ₁			Kb,T ₁ ,T		Ö ₁
			O.S		T ₁	T ₁ ,K		T ₁ ,K,S	Ö ₁	S					
9	6	VP	4 °C	T ₁ ,T,K,S	Kb		T ₁ ,K	Kb		T			T,K,S		
			O.S	T ₁ ,I,S			T ₁	T		T	T ₁ ,I	T ₁ ,I	T ₁ ,I	T ₁ ,I	T ₁ ,I
10	4	VP	4 °C	T ₁ ,T,K	Kb	Ö ₁	Kb,T ₁			T			T,K,S		
			O.S	T ₁				T,K			T ₁ ,T,K	T ₁ ,T,K	T ₁ ,T,K	T ₁ ,T,K	T ₁ ,T,K
11	4	VP	4 °C				T ₁						Ö ₁		
			O.S	T ₁			T ₁			T ₁ ,I	T ₁ ,I	T ₁ ,I	T ₁ ,I	T ₁ ,I	

Kb:Kobay, T₁:Tavşan, T: Tavuk, K: Koyun, S: Sığır, I: İnsan eritrositi, Ö₁: Tannik asitle kaplanmış öküz eritrositi, *: Alıplık reaksiyon veren suş

eritrositleriyle hemaglutinasyon gösterdiğini, bunlardan sadece 15'inin mannoza duyarlı tip hemaglutinasyon yaptığını bildirmiştir.

Çalışmamızda incelenen 11 S.enteritidis suşundan sekizinin insan eritrositleriyle mannoza dirençli birinin mannoza duyarlı hemaglutinasyon göstermesi Coşar'ın ürogenital E.coli suşlarıyla elde ettiği bulgulara benzerlik göstermektedir.

Kantarci ve Coşar (12) yaptıkları bir çalışmada sekiz farklı tür eritrositle hemaglutinasyon yeteneği incelenen 103 Proteus suşunun mannoza duyarlı, mannoza dirençli Proteus benzeri ve mannoza dirençli Klebsiella benzeri hemaglutinin olmak üzere üç tip hemaglutinin oluşturduklarını, en kuvvetli hemaglutinasyonun kümes hayvanları ve kobay eritrositleriyle oluşturduğunu saptamışlardır.

Nolan ve ark (16) yaptıkları bir çalışmada, sıvı besiyerinde iki-üç gün aralıklarla altı kez pasajlarını yaparak ürettikleri hasta ve sağlıklı tavuklardan izole edilen 12 adet Salmonella suşundan altısının kobay ve tavuk eritrositleriyle mannoza duyarlı hemaglutinasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, incelenen S.enteritidis suşlarında koyun, tavuk ve tavşan eritrositleriyle hemaglutinasyonun daha sık olduğu gözlenmiştir.

Gerlach ve ark (17), yaptıkları bir çalışmada Luria agar'da 37°C'de 18-24 saat inkübe edilen dokuz adet S.typhimurium suşundan beşinin kobay eritrositleriyle mannoza duyarlı hemaglutinasyon gösterdiğini saptamışlardır.

Çalışmamızda ise, bakterilerin farklı sıcaklıklarla üretilmelerinin, suşların mannoza dirençli ve mannoza duyarlı hemaglutinasyon oluşturma üzerine etkisi olmadığı, ancak mannoza dirençli Klebsiella benzeri hemaglutinasyonun 22°C'de üretilen suşlarda daha sık olduğu gözlenmiştir.

İncelenen S.enteritidis suşlarında mannoza dirençli hemaglutinasyon tipinin diğer hemaglutinasyon tiplerinden çok daha sık görüldüğu saptanmış olup, ayrıca bu tipe ait eritrosit profilinin spektrumunun da diğer hemaglutinasyon tiplerinde daha geniş olduğu görülmüştür. Bu suşlarda, diğer Salmonella serovarlarına ait suşlarda olduğu gibi mannoza dirençli hemaglutinasyonun non-fimbriyal hemagluti-

ninlerce oluşturulduğu düşünölmektedir.

Elektronmikroskopik incelemelerde uygulanan yöntem uyarınca belirlenmiş koşullarda fimbriya oluşturmadiğı saptanan suşların birinin diğer suşların aksine sadece tavşan eritrositleriyle ve baskın olarak mannoza dirençli hemaglutinasyon gösterdiği saptanmıştır. Bu bağlamda hemaglutinasyon deneyleri sonucuyla elektro-mikroskopik bulgular bu suş için uyumludur. Diğer fimbriya oluşturmayan suşların hepsinin değişik eritrosit profilleri gösteren değişik tip hemaglutinasyon etkinliklerine sahip oldukları gözlenmiştir. Bu nedenle, bu suşlarda mannoza duyarlı hemaglutinasyon yapan, tip I fimbriya oluşturma yeteneklerinin var olduğu ancak ya elektronmikroskopu incelemeleri amacıyla uygulanan kültür koşullarının fimbriya oluşumuna teşvik etmediği ya da kullanılan elektron-mikroskopunun rezolüsyon gücünün düşüklüğu nedeniyle oluşan fimbriyaların görülmediği düşünölmektedir.

Çalışmamızda, incelenen suşlarının oluşturduğu hemaglutinasyon tipleri ve hemaglutinasyon eritrosit profilleri ile faj tipleri ve plazmid profilleri arasında bir ilişki saptanamamıştır.

KAYNAKLAR

- 1. Anđ-Küçüker M.:** Bakterilerin patojenite mekanizmaları, Türk Mikrobiol Cem Der 18:71 (1988).
- 2. Duguid JP:** The function of bacterial fimbriae, Archivum Immunologiae et therapiae experimentalis, 16:173 (1968).
- 3. Coşar G:** Bakteri fimbriyaları, İnfek Derg 2:429 (1988).
- 4. Old DC, Yakubu DE, Senior BW:** Characterisation of a fimbrial mannose-resistant and eluting hemagglutinin (MREHA) produced by strains of Salmonella of serotype sendai, J Med Microbiol 30 : 59 (1989).
- 5. Coşar G:** The relationship between fimbriae and hemagglutinating activity of Salmonella typhimurium strains, KÜKEM 8:21 (1985).
- 6. Erdarcan S:** Escherichia coli'nin hemaglutinasyon yapma özelliği ve hastalık tanısındaki değeri, Tıp Bilimleri Doktora Tezi, İstanbul Tıp Fak, İstanbul (1985).
- 7. Aslanzadeh J, Paulissen LJ:** Role of type 1 and type 3 fimbriae on the adherence and pathogenesis of Salmonella enteritidis in mice, Microbiol Immunol 36:351 (1992).
- 8. Old DC, Adegbola RA:** Haemagglutinins and fimbriae of Morganella, Proteus and Providencia, J Med Microbiol 15:551 (1982).
- 9. Adegbola RA, Old DC, Senior BW:** The adhesins and fimbriae of Proteus mirabilis strains associated with high

and low affinity for the urinary tract, J Med Microbiol 16:427 (1983).

10. Coşar G: Hemagglutination and fimbriae of Escherichia coli strains causing urinary tract infections and diarrhea, İnfek Derg 3:39 (1989).

11. Coşar G: Fimbriyal hemagglutinins of Klebsiella pneumoniae, İnfek Derg 3:67 (1989).

12. Kantarcı G, Coşar G: The relationship between fimbriae and haemagglutinating activity of Proteus species, İnfek Derg 2:419 (1988).

13. Old DC, Adegbola RA : Antigenic relationships among type 3 fimbriae of Enterobacteriaceae revealed by Immunoelectronmicroscopy, J Med Microbiol 20:113 (1985).

14. Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg RN, Phillips GB: Manual of methods for general bacteriology, O-914827-29-8, Washington (1981).

15. Coşar G : Üropatojen Escherichia coli suşlarının antibiyotik duyarlılıkları hemoliz ve insan O-grubu eritrositler ile hemagglutinasyon özellikleri, İnfek Derg 2:55 (1988).

16. Nolan LK, Wooley RE, Brown J, Payeur JB: Comparison of phenotypic characteristics of Salmonella spp isolated from healthy and ill (infected) chickens, Am J Wet Res 52:1512 (1991).

17. Gerlach GF, Clegg S, Ness NJ, Swenson DL, Allen BL, Nichols WD: Expression of type 1 fimbriae and mannose sensitive hemagglutinin in by recombinant plasmids, Infect Immun 57:764 (1989).