

## KLİNİK ARAŞTIRMA

## Dışkı Kültürlerinde Salmonella Cinsi Bakterilerin İzolasyonunda Uzamış İnkübasyon Süresinin Etkisi

*The Effect of Extended Incubation of Stool Cultures on the Isolation Rates of Salmonella Species*

Meral ÖNER, Burçin ÖZER, Pınar TURAN, Nermin ŞAKRU

**Amaç:** Bu çalışmada, dışkı kültürlerinde inkübasyon süresinin uzatılmasının *Salmonella* cinsi bakterilerin izolasyon oranına katkısı araştırıldı.

**Çalışma Planı:** Toplam 1207 dışkı örneği ayırtıcı, seçici ve çoğaltıcı besiyerlerine ekildi. Katı besiyerleri (*Salmonella-Shigella* agar, eosin metilen blue agar) ve sıvı besiyerinden (selenite broth) yapılan altkültürler 24 ve 48. saatlerde değerlendirilmek üzere inkübe edildi.

**Bulgular:** Dışkı örneklerinin 1150'sinde (%95.3) üreme görülmedi, 55'inde *Salmonella* (%4.6), ikisinde *Shigella* (%0.2) cinsi bakteri üredi. Üreme olmayan 1150 dışkı örneği 16-18 saat daha inkübe edildiğinde ek olarak 10 *Salmonella* cinsi bakteri izolasyonu elde edildi. Bunların selenite broth ve eosin metilen blue agar besiyerinden izole edilen bir suş dışında tamamının selenite broth besiyerinden izole edildiği görüldü. İnkübasyon süresinin 24 saatten 48 saate uzatılmasının *Salmonella* cinsi bakteri izolasyonunu %18.2 oranında artırdığı görüldü.

**Sonuç:** Bu çalışmada mikrobiyoloji laboratuvarlarındaki rutin dışkı kültürlerinde inkübasyon süresinin uzatılmasının izolasyon oranını artırdığı ve bu nedenle kullanılması gerektiği sonucuna varıldı.

**Anahtar Sözcükler:** Bakteriolojik teknikler; kültür medyası; diarre/mikrobiyoloji; dışkı/mikrobiyoloji; Salmonella/izolasyon ve purifikasyon; Shigella/izolasyon ve purifikasyon; zaman faktörü.

**Objectives:** We investigated the contribution of extended incubation period of stool cultures to the isolation rates of *Salmonella* species.

**Study Design:** A total of 1207 stool specimens were inoculated into differential, enrichment, and selective media. The solid media (*Salmonella-Shigella* agar, eosin methylene blue agar), and subcultures from liquid media (selenite broth) were incubated for 24 and 48 hours.

**Results:** No growth was observed in 1150 cultures (95.3%) of stool specimens. *Salmonella* strains were isolated in 55 specimens (4.6%) and *Shigella* (0.2%) in two specimens. Reincubation of 1150 specimens for another 16-18 hours yielded *Salmonella* growth in 10 samples, all of which were isolated in selenite broth except one which was isolated in both eosin methylene blue agar and selenite broth. It was found that extending the incubation period to 48 hours resulted in a 18.2% increase in the isolation of *Salmonella* strains.

**Conclusion:** Based on our findings, we suggest that the system of extended incubation be a routine practice for stool cultures in clinical microbiology laboratories.

**Key Words:** Bacteriological techniques; culture media; diarrhea/microbiology; feces/microbiology; Salmonella/isolation & purification; Shigella/isolation & purification; time factors.

Bilindiği gibi, ishalle seyreden hastalıklar, gelişmekte olan ülkelerde halen bebek ve küçük

çocuklar için önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bakteriyel ishal etkenlerinin başında

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, (Öner, Uzm. Dr.; Şakru, Yrd. Doç. Dr.); Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (Özer, Uzm. Dr.); Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, (Turan, Asist. Dr.).

İletişim adresi: Dr. Meral Öner, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 22030 Edirne.

Tel: 0284 - 235 76 41 / 1600 Faks: 0284 - 236 16 54 e-posta: meralner@yahoo.com

da *Salmonella* ve *Shigella* cinsi bakteriler gelmektedir.<sup>[1]</sup> Ülkemizdeki önemli halk sağlığı sorunlarından birini oluşturan *Salmonella* enfeksiyonlarında, insan klinik örneklerinden sıklık sırasıyla *S. enteritidis* (%65), *S. typhimurium* (%23), *S. paratyphi B* (%2), *S. typhi* (%2) ve *S. serogrup C* suşları izole edilmektedir.<sup>[2]</sup> Otkun ve ark.<sup>[3]</sup> da bölgemizde dışkıdan izole edilen *Salmonella* serotiplerini sıklık sırasıyla *S. enteritidis* (%58) ve *S. typhimurium* (%38) olarak saptamışlardır. *Shigella* cinsi bakteriler ise *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* ve *S. sonnei* olmak üzere dört gruba ayrılır. Ülkemizde önceki yıllarda *S. flexneri* daha sık izole edilirken, son yıllarda *S. sonnei* ilk sırada izole edilmeye başlanmıştır.<sup>[4-6]</sup>

Etkenlerin üretilmesi amacıyla alınan dışkı örnekleri, bir genel üretim besiyerinin yanında ayırtıcı, seçici ve çoğaltıcı besiyerlerine de ekilir. Yapılan ekimler bir gece 37 °C'de ve aerob koşullarda inkübe edilerek ertesi gün incelenir. Ayırtıcı ve seçici besiyerlerinde laktoz negatif koloni olup olmadığı araştırılır. Ayrıca, çoğaltıcı sıvı besiyerinden ayırtıcı ve seçici besiyerlerine pasajlar yapılarak yine laktoz negatif koloniler aranır. Laktoz negatif koloni yoksa bu kültürler atılır.<sup>[7]</sup> Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalar, inkübasyon süresinin uzatılmasının *Salmonella* ve *Shigella* cinsi bakterilerin izolasyon şansını artırdığını göstermektedir.<sup>[8,9]</sup> Çalışmamızda dışkı kültürlerinin değerlendirilmesinde inkübasyon süresinin uzatılmasının izolasyon oranını artırıp artırmadığını araştırdık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Mart 2004 ile Aralık 2004 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen 1207

adet dışkı örneği seçici besiyeri olarak *Salmonella-Shigella* agar (SSA), ayırtıcı besiyeri olarak eosinmetilen blue agar (EMB), çoğaltıcı besiyeri olarak da selenite broth (SB) besiyerlerine ekildi. Besiyerleri 37 °C'de aerob koşullarda 24 ve 48. saatlerde değerlendirilmek üzere inkübasyona bırakıldı. Altı ve sekiz saat sonra SB besiyerinden SSA ve EMB besiyerlerine altkültürler yapıldı. Ertesi gün agar besiyerlerinde üreyen laktoz negatif kolonilere hareket, Triple sugar iron (TSI) agar, indol, üre, sitrat, lizin-dekarboksilaz (LDC) testleri yapıldı. Biyokimyasal özellikleri *Salmonella* veya *Shigella*'ya uyan bakteriler standart antiserumları ile lam aglutinasyonu çalışılarak tanımlandı. İlk inkübasyon devresinde laktoz negatif koloni saptanmayan besiyerleri, 24 saat daha 37 °C'de inkübe edilerek laktoz negatif koloni varsa aynı şekilde identifiye edildi. Türlerin izolasyonunda izlenen yol Şekil 1'de gösterildi.

## BULGULAR

Çalışmanın sonunda 1207 dışkı örneğinin 1150'sinde (%95.3) üreme saptanmazken, 55'inde (%4.6) *Salmonella*, ikisinde (%0.2) *Shigella* cinsi bakterilerin ürediği görüldü (Tablo 1). Sadece SSA besiyerinden izole edilen suşların sayısı 12 iken, SB besiyerinden izole edilenlerin sayısı 32 idi. On üç suş ise hem SSA hem de SB besiyerinden izole edildi (Tablo 2). On dışkı örneğinde ilk gün üreme saptanmazken, ikinci günde *Salmonella* cinsi bakteri üremesi gözlemlendi, SB ve EMB besiyerinden izole edilen bir suş dışında tamamında izolasyonun SB besiyerinden olduğu saptandı. Inkübasyon süresinin 24 saatten 48 saate çıkarılmasının *Salmonella* cinsi bakteri izolasyon oranını %18.2 artırdığı görüldü.

**Tablo 1. İnkübasyon süresine göre izole edilen suşların (n=55) dağılımı**

Suşlar	İnkübasyon süresi				Toplam	
	24 saat		48 saat		Sayı	Yüzde
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde		
<i>Salmonella</i>	45	81.8	10	18.2	55	100
<i>S. enteritidis</i>	29	85.3	5	14.7	34	100
<i>S. typhimurium</i>	4	66.7	2	33.3	6	100
<i>Salmonella</i> spp.	12	80.0	3	20.0	15	100
<i>Shigella</i>	2	100	-	-	2	100
<i>S. flexneri</i>	2	100	-	-	2	100

**Tablo 2. Besiyerlerine göre izole edilen suşların dağılımı**

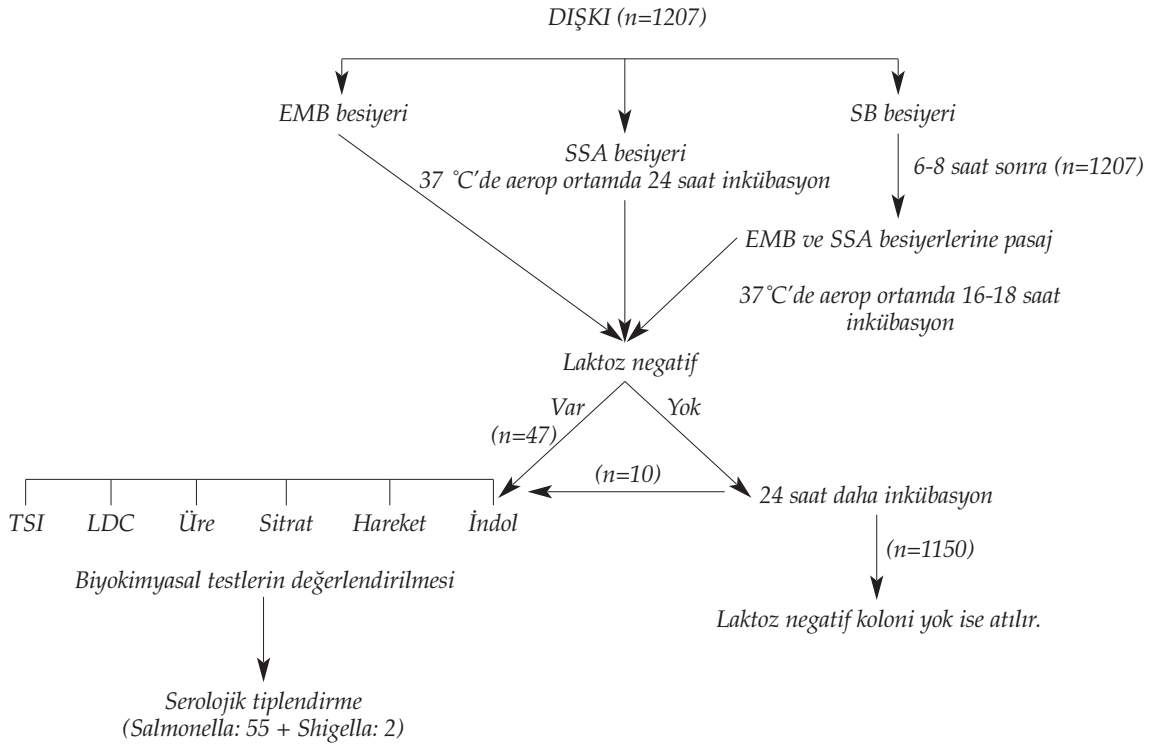
Besiyerleri	Toplam	Yüzde	Suşlar			
			<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Salmonella-Shigella</i> agar						
24 saat	23	40.3	17	1	4	1
48 saat	2	3.5	2	-	-	1
Eosin metilen blue agar						
24 saat	-	-	-	-	-	-
48 saat	1	1.75	-	1	-	-
Selenite broth altkültürleri						
24 saat	35	57.0	20	4	10	1
48 saat	10	17.54	5	2	3	-

## TARTIŞMA

Akut gastroenteritler az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Enfeksiyöz ishal en çok çocuklarda görülmekte ve gelişmekte olan ülkelerdeki beş yaşın altındaki çocuk ölümlerinin en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda akut gastroenterite yol açan pek çok etken

vardır ve bunların dışkı kültürlerinden izolasyonu büyük önem taşımaktadır.<sup>[10]</sup>

İzolasyon başarısını artırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Alam ve ark.nın<sup>[8]</sup> yaptıkları çalışmada, dışkı kültürleri 24 saatlik inkübasyondan sonra besiyerlerinde üreme olmadığı halde atılmamış, 24 saat daha inkübe edilmiştir. *Salmonella* cinsi bakterilerin



**Şekil 1.** Dışkıdan Salmonella ve Shigella serotiplerinin izolasyonunda izlenen yol (SSA: Salmonella-Shigella agar; EMB: Eosin metilene blue agar; SB: Selenite broth; TSI: Triple sugar iron; LDC: Lizin dekarboksilaz).

%1.1'inin, *Shigella* cinsi bakterilerin ise %4.85'inin ikinci 24 saatlik dönemde izole olduğu saptanmıştır. Anılan çalışmada, SB besiyeri kullanılmamış, izolasyonun büyük bölümü SSA besiyerinden olmuştur. Çalışmamızda ise, ek olarak SB besiyerinin kullanılması ve izolasyonun büyük oranda bu besiyerlerinden yapılan pasajlarda gerçekleşmesi dikkat çekmektedir; bu durum, SB besiyerinin çoğaltıcı etkisinin izolasyon şansını artırmasına bağlandı<sup>[11]</sup> ve dışkı kültürlerinde SB besiyerinin kullanılmasının önemli ve gerekli olduğu sonucuna varıldı.

Fedorko ve ark.<sup>[9]</sup> çalışmalarında SB besiyerini kullanmışlar, özellikle EMB ve diğer ayırıcı besiyerlerinin inkübasyon süresinin uzatılmasının *Shigella* cinsi bakterilerin izolasyon oranını artırdığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda EMB besiyerinden ilk 24 saatte *Salmonella* ve *Shigella* cinsi bakteri izolasyonu görülmedi; 48. saatte izole edilen bir suş ise zaten SB besiyerinden yapılan altkültürlerde ilk 24 saatte üremişti. Bu nedenle, rutin dışkı kültürlerinde önce SSA ve SB besiyerlerine ekim yapılması; EMB besiyerinin SB besiyerinden yapılan altkültürlerde kullanılmasının, maliyeti düşürdüğü için yararlı olacağı sonucuna varıldı. Ancak, çalışmamızda izole edilen *Shigella* cinsi bakteri sayısının düşük olduğu da göz önünde bulundurulmalıdır.

Laboratuvarımızda inkübasyon süresinin 24 saatten 48 saate çıkarılması rutin olarak uygulanmaya başlanmıştır. Yaklaşık bir yıldır süren bu uygulama sonucunda izolasyon oranının %18.2 oranında arttığı görülmüştür. Bu yöntem fazladan besiyeri gerektirmediği için maliyeti artırmamakta, ancak sonuçların 24 saat daha geç bildirilmesine neden olmaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında, rutin dışkı kültürle-

rinde inkübasyon süresinin uzatılmasını, izolasyon oranını artırması nedeniyle öneriyoruz.

## KAYNAKLAR

1. Rohner P, Pittet D, Pepey B, Nije-Kinge T, Auckenthaler R. Etiological agents of infectious diarrhea: implications for requests for microbial culture. J Clin Microbiol 1997;35:1427-32.
2. Erdem B. Ülkemizde Salmonella kökenlerinde antibiyotiklere direnç durumu nedir? Klimik Derg 2003; 16:14-5.
3. Otkun MT, Özkan E, Öztürk D, Dündar V, Tuğrul M. 1995-1997 yıllarında dışkıdan izole edilen Salmonella serotiplerinin dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları. İnfek Derg 1998;12:181-5.
4. Fındık D, Tuncer İ, Erdem B. 1999-2000 yıllarında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen Salmonella ve Shigella türlerinin çeşitli antimikrobiklere duyarlılıkları. Selçuk Üniv Tıp Fak Derg 2001;17:225-9.
5. Haznedaroğlu T, Baysallar M, Küçükaraaslan A, Gün H. Akut diareli olgulardan izole edilen Shigella türlerinin dağılımı ve çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 1993;4: 172-80.
6. Aysev AD, Guriz H. Drug resistance of Shigella strains isolated in Ankara, Turkey, 1993-1996. Scand J Infect Dis 1998;30:351-3.
7. Bopp CA, Brenner FW, Fields PI, Wells JG, Strockbine NA. Escherichia, Shigella, and Salmonella. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 2003. p. 654-71.
8. Alam K, Hossain MA, Islam N, Sen SK, Sur GC, Talukder KA, et al. Enhanced isolation of shigella species by extended incubation of primary isolation plates. J Health Popul Nutr 2003;21:396-7.
9. Fedorko DP, Lehman SM, Yu PK, Germer JJ, Anhalt JP. Increased efficiency of stool culture for the detection of Salmonella and Shigella. Diagn Microbiol Infect Dis 1989;12:463-6.
10. Ekşi F, Bayram A, Balcı İ. Akut ishale başvuran beş yaşın altındaki çocuklarda dışkıdan izole edilen patojenler. İnfek Derg 2003;17:159-61.
11. Chapin KC, Lauderdale TL. Reagents, strains and media: bacteriology. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 2003. p. 354-83.