

KLİNİK ÖRNEKLERDEN ÜRETİLEN *SHIGELLA* SUŞLARININ ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ VE "DEĞİŞKEN ALANLI JEL ELEKTROFOREZİ" GENOTİPİK PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gül GÜNER SOYLU¹, Alper KARAGÖZ², Mustafa ULUKANLIGİL³, Rıza DURMAZ²

¹Gazi Mustafa Kemal Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA

²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, ANKARA

³Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

İnfeziyöz ishalin başta gelen etiyolojik ajanlarından birisi olan *Shigella* spp. infeksiyonları major bir küresel halk sağlığı problemi olarak görülmektedir. Bu çalışmada 2005-2006 yıllarında Ankara ilinde dışkı örneklerinden izole edilmiş olan *Shigella* suşlarının fenotipik (antimikrobiyal direnç profillerinin belirlenmesi) ve genotipik (PFGE-Değişken alanlı jel elektroforezi) yöntemlerle tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Bu sonuçlardan hareketle Ankara iline ait *Shigella* spp. suşları için ampirik tedaviye yön verebilecek bir antibiyotik duyarlılık bilgisine ulaşılması ve antimikrobiyal duyarlılık yanında PFGE analizi ile suşlar arasında muhtemel klonal ilişkiyi ortaya koyarak bulaş derecelerinin belirlenmesi ve ileriyeye dönük infeksiyon kontrol önlemlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmaya 2005 ve 2006 yıllarında izole edilmiş iki *Shigella dysenteriae* 27'si *Shigella sonnei* olmak üzere toplam 29 *Shigella* suşu dahil edilmiştir. Suşlar 17 farklı antibiyotige duyarlılıkları açısından değerlendirilmiştir. Suşların antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre beş farklı profil elde edilmiştir. Çalışılan suşların tümü siprofloksasin, amikasin, imipenem, tobramisin, gentamisin, kloramfenikol ve aztreonama duyarlı bulunmuştur. Ampisiline beş (% 17.2), ampisilin-sulbaktama bir (% 3.4), piperasiline beş (% 17.2), tetrasikline 18 (% 62), trimetoprim-sülfametoksazol'e 21 (% 72.4) suş dirençli olarak saptanmıştır. Suşlar arasında dört tane genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz (ESBL) pozitif *S. sonnei* suşu tespit edilmiştir. XbaI enzimiyile elde edilen genomik DNA'ların PFGE analizleri sonucunda *S. sonnei* suşları için beş majör, *S. dysenteriae* suşları için ise bir PFGE profili elde edilmiştir.

PFGE ile elde edilen bulgulara göre; 2005 ve 2006 yılları *Shigella* suşları arasında yapılan kıyaslamalarda genotipik homojenitenin büyük ölçüde korunduğu gözlenmiştir. Suşlar arasında ayırtılamaz ya da yakın ilişkili pek çok suşun olması bu dönemde gerçekleşen vaka kümelenmelerinin aynı bakteriyel kökenden olabileceğini ve devam eden bir klonun varlığını düşündürmektedir. Antimikrobiyal direnç profilleri farklı iken PFGE profilleri identik ya da yakın ilişkili çıkan pek çok suşun varlığı, PFGE'nin epidemiyolojik tiplendirmede antimikrobiyal direnç profillerine göre daha duyarlı sonuçlar verdiğini düşündürmektedir. Ancak *Shigella* spp. suşlarının antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarının yapılmasının ampirik tedavi için her zaman yol gösterici olduğu akıldan çıkarılmamalıdır.

Ülkemizde sporadik ya da salgın şeklinde vakalara neden olan *Shigella* spp. suşlarının bölgelere göre dağılımlarını değerlendirmek ve doğrulamak için daha çok sayıda ve uzun dönemleri kapsayan çalışmaların yapılması gerektiğine inanılmaktadır.

Bu çalışmalara ek olarak, bildirilen suşların klonal ilişkilerinin genotipik tiplendirme yöntemleriyle ortaya konulması; salgınların doğrulanmasında güvenilir bilgiler sunacak, bulaş yolları ve kaynaklarının bu şekilde tespiti, infeksiyon kontrol ve tedavilerinde etkin yöntemler geliştirilmesine önemli katkı sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: antibiyotik duyarlılığı, değişken alanlı jel elektroforezi, epidemiyoloji, PFGE, *Shigella* spp.

SUMMARY

Investigation of Antibiotic Susceptibilities and Pulsed Field Gel Electrophoresis Genotypic Profiles of *Shigella* Strains Produced from Clinical Specimens

Shigella spp. are among the major etiological agents of infectious diarrhea, and their infections are regarded as a major global public health problem. The aim of this study was to characterize *Shigella* strains isolated from stool samples between 2005-2006 in Ankara, using phenotypic (determining the antimicrobial resistance profiles) and genotypic (pulsed-field gel electrophoresis; PFGE) methods. By employing these results, we aim to acquire a knowledge about the antibiotic sensitivity of the *Shigella* spp. strains in Ankara that could guide empirical treatment; in addition, we aim to reveal the possible clonal relationship between the isolates by PFGE analysis, to determine the degree of infections, and to develop preventive measures against infections. A total of 29 *Shigella* strains (two *Shigella dysenteriae* and 27 were *Shigella sonnei*) isolated in 2005 and 2006 were included in the study. The isolates were evaluated for their sensitivities against 17 different antibiotics. Five different profiles were determined according to the isolates' sensitivity. All isolated were sensitive to ciprofloxacin, amikacin, imipenem, tobramycin, gentamicin, chloramphenicol and aztreonam. Five isolates (17.2 %) were resistant to ampicillin, one isolate (3.4 %) was resistant to ampicillin sulbactam, five isolates (17.2 %) were resistant to piperacillin, 18 isolates (62 %) were resistant to tetracycline, and 21 isolates (72.4 %) were resistant to trimetoprim-sulfamethoxazole. Four extended spectrum beta-lactamase (ESBL) positive *S. sonnei* strains were detected among the isolates. PFGE analysis of XbaI-digested genomic DNAs revealed five major isolates of *S. sonnei* and one PFGE profile for *S. dysenteriae* isolates.

According to PFGE findings; the genotypic homogeneity was substantially conserved between the *Shigella* strains isolated in 2005 and 2006. Considering that various strains were either indistinguishable or closely related, we suspect that the case clusters could share a common bacterial origin, and at least one clone continues to persist. Many isolates were distinct from each other in terms of their antimicrobial resistance profiles; yet, their PFGE profiles were identical or closely-related. This finding suggests that PFGE provides more accurate results in epidemiological typing compared to antimicrobial resistance profiles. However, it should be noted that the antimicrobial sensitivity studies using *Shigella* spp. isolates is always instructive for the empirical treatment.

We believe that there is a need for additional studies that cover longer terms to evaluate and confirm the geographical distribution of *Shigella* spp. strains which cause sporadic cases or epidemics in our country.

In addition to the forementioned studies, determining the clonal relationships between the isolates by genotyping will provide accurate information to confirm epidemics, and detecting the route and the source(s) of infection will aid to develop more effective methods to control and treat these infections.

Keywords: antibiotic sensitivity, epidemiology, PFGE, pulsed field gel electrophoresis, *Shigella* spp.

İletişim adresi: Gül Güner Soylu, Gazi Mustafa Kemal Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA

Tel: (0312) 212 66 66/247

e-posta: drgulsoylu@hotmail.com

Alındığı tarih: 14.01.2013, Yayına kabul: 22.08.2013

GİRİŞ

İnfeksiyona bağlı ishaller başta çocuklar olmak üzere yaşlı, debil ve immün süpresif hasta gruplarını ve düşük sosyoekonomik seviyedeki popülasyonları etkilemekte ve yaşamı tehdit edici sonuçlar doğurabilmektedirler. İnfeksiyöz ishalin başta gelen etiyolojik ajanlarından birisi olan *Shigella* spp. infeksiyonları major bir küresel halk sağlığı problemi olarak görülmektedir. *Shigella sonnei* gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde ishallerin önemli bir sebebi olup Türkiye için yakın dönemlerin en sık bildirilen *Shigella* serogrubu haline gelmiştir⁽¹⁹⁾.

Akut diyareden ciddi dizanteriye kadar değişen hastalık tabloları oluşturan şigeloz vakalarında uygun antimikrobiyal tedavi ile hastalık süresi kısalabilmekte ve hayatı tehdit eden ciddi komplikasyonlar önlenmektedir. Ne yazık ki *Shigella* spp. suşları sıklıkla kullanılan antimikrobiyallere dirençli hale gelmiştir. Antimikrobiyal tedaviye direnç geliştiren suşlar bölgeden bölgeye farklılıklar gösterdiklerinden lokal epidemiyolojik bilgiler şigeloz tedavisinde ampirik tedavinin doğru yapılması açısından önemli olmaktadır⁽²¹⁾.

İnfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde olgulardan izole edilen mikroorganizmalar arasındaki epidemiyolojik ilişkinin gösterilmesi büyük önem taşımaktadır. Genellikle salgınlara yol açan etiyolojik ajanlar eş ya da yakın ilişkili klonlardan köken almaktadır. İnfeksiyon etkenlerinin alt tiplerine göre sınıflandırılması, toplumsal ya da hastane kaynaklı salgınlardan ve infeksiyon kaynağının belirlenmesi ile yayılımının takibini, virülan suşların saptanmasını, infeksiyon sebebiyle tedavi edilen hastalarda reinfeksiyon veya relapsın değerlendirilmesini ve aşılama programlarının izlenebilmesini mümkün kılmaktadır⁽²⁴⁾.

Tiplendirme amacı ile 1980'lerin başlarına kadar kullanılmış olan fenotipik yöntemler ayrıştırma güçlerinin düşüklüğü, değişkenliklerin fazla olması, sonuçların geç elde edilmesi, özel ve yoğun laboratuvar çalışmalarını gerektirmesi gibi nedenlerle yerlerini genotipik tiplendirme yöntemlerine bırakmaktadır. Genotipik tiplendirme yöntemlerinden "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE), ayrıştırma

gücünün ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması nedeniyle birçok etiyolojik ajan için altın standart olarak kabul edilmektedir⁽²⁷⁾.

Bu çalışmada 2005-2006 yıllarında gaita örneklerinden izole edilmiş olan *Shigella* suşlarının fenotipik (antimikrobiyal direnç profillerinin belirlenmesi) ve genotipik (PFGE analizi) yöntemlerle tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Bu sonuçlardan hareketle Ankara iline ait *Shigella* spp. suşları için ampirik tedaviye yön verebilecek bir antibiyotik duyarlılık bilgisine ulaşılması ve antimikrobiyal duyarlılık yanında PFGE analizi ile suşlar arasında muhtemel klonal ilişkiyi ortaya koyarak bulaş derecelerinin belirlenmesi ve ileriye dönük infeksiyon kontrol önerilerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan suşlar ve epidemiyolojik özellikleri

Çalışmamızda 2005 ve 2006 yılları boyunca toplanarak stoklanmış olan 27 adet *S. sonnei* ve iki adet *S. dysenteriae* suşu kullanılmıştır.

Stok suşların canlandırılması ve biyokimyasal doğrulama işlemleri

-80°C'de saklanmış olan stok suşlarının Eosin-metylene-blue (EMB-Salubris) ve *Salmonella-Shigella* (SS-Salubris) agarlara yapılan pasajları 36°C'de bir gecelik inkübasyona bırakıldıktan sonra besiyeri plaklarında laktoz negatif koloniler ileri identifikasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Sitrat, Kligler iron agar, üre, arginin ve lizin besiyerlerinde tipik *Shigella* reaksiyonu gösteren suşlar, *Shigella* antiserumları (RSHM) ile lam aglütinasyonla doğrulanmıştır.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testi Clinical and Laboratory Standards Institute standartlarına göre disk difüzyon yöntemi ile çalışılmıştır⁽⁸⁾. Antibiyotik olarak Beckton Dickinson tarafından üretilmiş BBL markalı seftriakson (30 µg), sefazolin (30 µg), cefalotin (30 µg), sefuroksim (5 µg), ampicilin (10 µg), ampicilin-sulbaktam (10 µg), amoksisilin-klavulanat (30µg), imipenem (10 µg), piperasilin (100 µg), trimetoprim-

sülfametoksazol (SXT, 23.75/1.25 µg), kloramfenikol (30 µg), siprofloksasin (5 µg), amikasin (30 µg), tobramisin (10 µg), gentamisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg), aztreonam (30 µg) kullanılmıştır. Kalite kontrolü *E.coli* ATTC 25922 suşu ile yapılmıştır. Suşlar duyarlılık farklarına göre gruplandırılmıştır.

Suşların genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) açısından pozitif olup olmadığı sefotaksim, seftazidim ve amoksisilin-klavulonat disklerinin senkronize kullanıldığı çift-disk sinerji yöntemiyle tespit edilmiştir⁽¹⁵⁾.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Antibiyoqram tiplendirmesi gerçekleştirilen 29 *Shigella* suşu 2005-1 [1-10 no'lu suşlar], 2005-2 [11-20 no'lu suşlar], 2006 [21-29 no'lu suşlar] şeklinde üç gruba ayrılmıştır.

PFGE uygulamasında Durmaz ve ark.⁽¹⁰⁾'nın Gram negatif *Enterobacteriaceae* için optimize ettikleri protokol izlenmiştir. Suşlar öncelikle *FastDigestXbaI* enzimi ile kesilmiş, bu enzim ile suşlar arasında yeteri kadar heterojenite sağlanmadığı gözlenince, ikinci bir enzim olan *FastDigestNotI* ile seçilmiş suşlar üzerinde denemeler yapılmıştır. *FastDigestNotI* ile kesilen suş DNA'larına uygulanan elektroforez işleminde ise diğer koşullar sabit kalmak kaydı ile "switch" zamanı 5-33 sn. ve işlem süresi 22 saat olarak değiştirilmiştir.

Sonuçların gözlemlenmesi ve analizi

Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınmıştır. Yirmi dakika boyunca boyanmaya bırakılmıştır. Boyanan jel "Gel logic 2200 imaging system" (ayrım gücü: 1780x1280 pixel, Kodak Company, NY, ABD) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilmiştir. Resimler "TIFF" formatında kayıt edilmiştir.

Tablo 2. Antimikrobiyal direnç profilleri ve sıklıkları.

Direnç fenotipi	Direnç profili	Suş No.	%
S	Tüm antibiyotiklere duyarlı	1,8,12,13,14,18,19,20,27	27.5
RI	SXT, TET	2,3,5,6,10,11,17,21,22,23,24,28,29	44.8
RII*	CRO, CZ, CF, CFM, AMP, PIP, SXT, TET	4,7,9,15	13.7
RIII	AMP, SAM, PIP, SXT, TET	16	3.4
RIV	SXT	18,25,26	10.3

CRO: seftriakson, CZ: sefazolin, CF: sefalotin, CFM: sefuroksim, AMP: ampisilin, SAM: ampisillin-sulbaktam PIP: piperasilin, SXT: trimetoprim-sülfametoksazol, TET: tetrasiklin *ESBL pozitif

"GelCompare II" yazılım sistemi (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belçika) kullanılarak bant profilleri analiz edilmiştir. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart (1,7,15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapılmıştır. "Unweighted pair group method with mathematical averaging" (UPMA) kullanılarak PFGE profillerinin dendogramı oluşturulmuş ve kümeleşme analizleri yapılmıştır. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlenmiştir. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, % 1-1.5 olarak alınmıştır. Tenover ve ark.⁽³²⁾ tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak suşlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

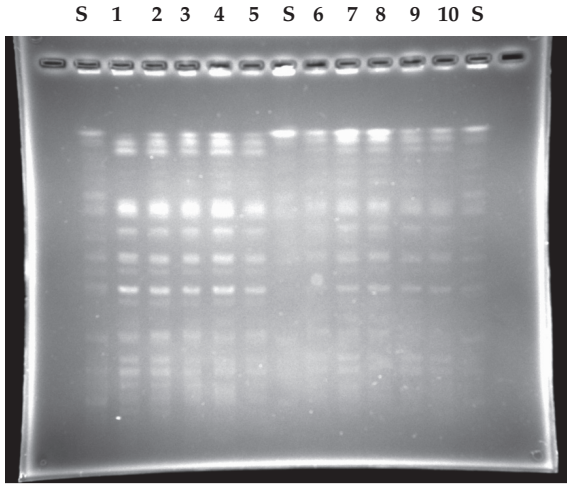
Çalışmaya alınan 29 *Shigella* suşunun yer ve tarih dağılımları Tablo 1'de verilmiştir. Suşların 27'sinin (% 93.1) *S.sonnei*, ikisinin (% 6.8) *S.dysenteriae* olduğu belirlenmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan suşların dağılımı.

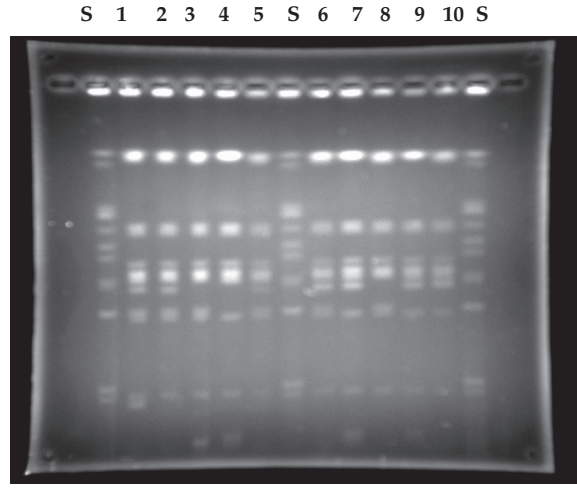
İzolasyon yeri, yılı	Sayı
Ankara, Eylül, 2005	6
Ankara, Ekim, 2005	9
Ankara, Kasım, 2005*	4
Ankara, Temmuz, 2005*	1
Ankara, Ağustos, 2006	1
Ankara, Eylül, 2006	6
Ankara, Ekim, 2006	2

*Bu tarihlerde birer adet *S.dysenteriae* suşu izole edilmiştir.

Çalışılan suşların tümü siprofloksasin, amikasin, imipenem, tobramisin, gentamisin, kloramfenikol ve aztreonama duyarlı bulun-



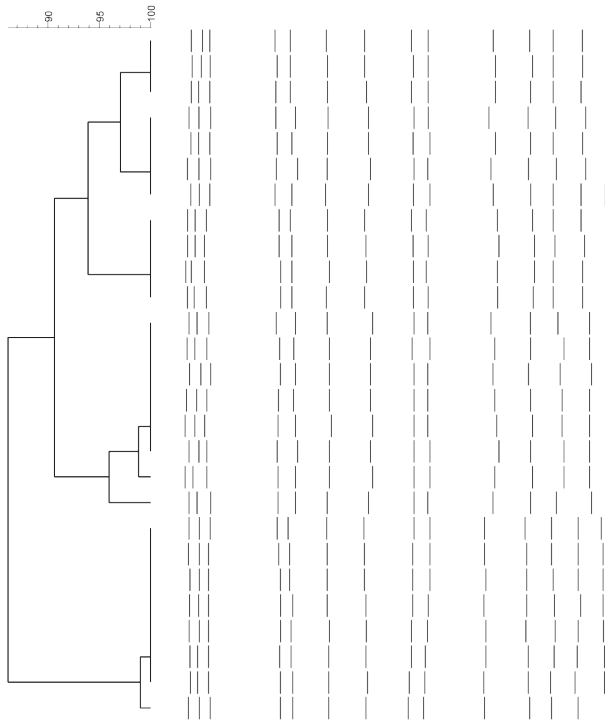
Şekil 1. FastDigest XbaI PFGE görüntüsü, 2005-1.grup [1-10]
S:Standart suş.



Şekil 2. FastDigest NotI PFGE görüntüsü, 2005-1.grup [1-10]
S:Standart suş.

GGs

GGs



Şekil 3. S.sonnei FastDigest XbaI PFGE profili.

PFGE paterni	Suş No
A	12
A	13
A	14
B	15
B	17
B	18
B	16
C	11
C	27
C	28
C	29
D	22
D	23
D	24
D	25
D	26
D	21
D1	7
D2	10
E	2
E	3
E	4
E	5
E	6
E	8
E	9
E1	1

muştur. Ampisiline beş (% 17.2), ampisilin-sulbaktama bir (% 3.4), piperasiline beş (% 17.2), tetrasikline 18 (% 62), SXT'ye 21 (% 72.4) suşun dirençli olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal duyarlılıkları gruplandırıldığında beş farklı profil elde edilmiştir (Tablo 2).

İki farklı enzimle kesilen bant profilleri

karşılaştırıldığında ortak profil olan suşların enzimlere göre farklılık göstermediği görülmüştür (Şekil 1 ve 2). Bu nedenle dendrogram analizlerinin yalnızca FastDigestXbaI ile elde edilen jeller üzerinden yapılmasına karar verilmiştir.

PFGE profil tiplendirmesi yapılan 2005 ve 2006 yıllarına ait 29 Shigella suşundan S.sonnei

GGS

GGS



Şekil 4. *S.dysenteriae* FastDigest XbaI PFGE profili.

Tablo 3. Suşların direnç fenotipleri ve PFGE profilleri.

İzolasyon yeri, tarihi	Suş No	Direnç fenotipi*	PFGE profili
Ankara, Eylül, 2005	1	S	E1
Ankara, Eylül, 2005	2	RI	E
Ankara, Eylül, 2005	3	RI	E
Ankara, Eylül, 2005**	4	RII	E
Ankara, Eylül, 2005	5	RI	E
Ankara, Eylül, 2005	6	RI	E
Ankara, Ekim, 2005**	7	RII	D1
Ankara, Ekim, 2005	8	S	E
Ankara, Ekim, 2005**	9	RII	E
Ankara, Ekim, 2005	10	RI	D2
Ankara, Ekim, 2005	11	RI	C
Ankara, Ekim, 2005	12	S	A
Ankara, Ekim, 2005	13	S	A
Ankara, Ekim, 2005	14	S	A
Ankara, Ekim, 2005**	15	RII	B
Ankara, Kasım, 2005	16	RIII	B
Ankara, Kasım, 2005	17	RI	B
Ankara, Kasım, 2005	18	RIV	B
Ankara, Temmuz, 2005	19	S	F
Ankara, Kasım, 2005	20	S	F
Ankara, Ağustos, 2006	21	RI	D
Ankara, Eylül, 2006	22	RI	D
Ankara, Eylül, 2006 ^k	23	RI	D
Ankara, Eylül, 2006 ^k	24	RI	D
Ankara, Eylül, 2006	25	RIV	D
Ankara, Eylül, 2006	26	RIV	D
Ankara, Eylül, 2006	27	RI	C
Ankara, Ekim, 2006	28	RI	C
Ankara, Ekim, 2006	29	RI	C

*bkz. Tablo 2, ** ESBL pozitif, k: kardeş suş

için beş major küme saptanmıştır. Ayrıca küme D ile yakın ilişkili iki suş (D1-D2) ve küme E ile yakın ilişkili bir suş (E1) belirlenmiştir (Şekil 3). *S.dysenteriae* suşlarının her ikisi de aynı küme içerisinde yer almış (F) ve bu küme ile *S.sonnei* suşları arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (Şekil 4). Major PFGE profillerinin kendi içlerinde alt tiplere ayrılmasıyla *S.sonnei* için sekiz PFGE profili elde edilmiştir.

Çalışılan suşların epidemiyolojik bilgileri, antimikrobiyal direnç profilleri ve PFGE tipleri Tablo 3'te görülmektedir.

Çalışmaya dahil edilen 27 *S.sonnei* suşundan elde edilen sekiz PFGE tipinden en sık görülen iki tanesi eşit suş sayısına sahip olan D

ve E profilleridir. D profilinin üyeleri RI (n=4) ve RIV (n=2) antibiyotik direnç profili (ADP) göstermektedir. Bu profille yakın ilişkili olduğu belirlenen D1 tipli suş RII ADP sergilerken D2 tipinde RI ADP görülmüştür. E profilinde RI (n=4) ve RII (n=2) ADP gösteren suşlarla birlikte bir adet tüm antibiyotiklere duyarlı suş bulunmaktadır (8 no'lu suş). E profili ile yakın ilişkili olan E1 tipli bir numaralı suşun da tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu görülmüştür. C profilindeki dört suşun da ADP'lerinin aynı olduğu gözlemlenmiştir (RI). Benzer şekilde A kümesinin de ADP açısından homojen bir grup olduğu tespit edilmiştir (S). B profilinin üyeleri olan dört suşun ise ADP yönüyle en heterojen kümeyi oluşturdukları belirlenmiştir (RI, RII, RIII, RIV).

Çalışmaya alınan *S.dysenteriae* suşları için belirlenmiş olan F profilindeki iki suşun da çalışmada kullanılan tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Şigellozlar infeksiyöz dozlarının düşük olması nedeni ile kişiden kişiye bulaşın kolay ve sekonder atak hızının yüksek olduğu, zaman zaman büyük epidemilere yol açan infeksiyonlar olup, özellikle beş yaş altı çocuklarda ve dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olarak güncelliğini korumaktadırlar^(19,21).

İnfeksiyon hastalıkları etkenlerinin alt tiplere sınıflandırılması; toplumsal veya nozokomial salgınların ve infeksiyon kaynağının saptanması ile yayılımının takibi, organizmaların virülen suşlarının belirlenmesi, bir infeksiyon nedeniyle tedavi edilen hastalarda reinfeksiyon veya relapsın değerlendirilmesi ve aşılama programlarının izlenebilmesini mümkün kılmaktadır⁽²⁴⁾.

Fenotipik tiplendirme yöntemleri; ayrış-

tırma güçlerinin zayıf olması ve farklı zamanlarda uygulandıklarında değişik sonuçlar elde edilmesinden dolayı tekrarlanabilirliklerinin düşük olması, ayrıca değişkenliklerinin fazla ve sonuçlarının geç elde edilmesi gibi nedenlerle, 1980'li yıllardan itibaren yerlerini genotipik yöntemlere bırakmaktadırlar⁽²⁷⁾.

İlk kez 1984 yılında Schwartz ve Cantor⁽³⁰⁾ tarafından tanımlanmış olan PFGE, genotipik yöntemler içinde ayrıştırma gücü ve tekrarlanabilirliği yüksek olduğu için günümüzde pek çok etiyolojik ajan için altın standart olarak kabul edilmektedir^(12,16,24). *Shigella* türlerinin PFGE ile tiplendirilebildiğini ise ilk kez Soldati ve Piffaretti⁽³¹⁾ 1991'de bildirmişlerdir.

Ülkemizde görülen ishallerin insidansı kesin olarak bilinmemekle birlikte, her yıl 1 ile 1.5 milyon kişinin ishale yakalandığı ve büyük çoğunluğunu çocukların oluşturduğu 30,000 kadar ishale bağlı ölüm olduğu tahmin edilmektedir⁽¹⁶⁾. Çeşitli çalışmalarda ishal şikayetiyle başvuranların dışkılarından *Shigella* spp. izolasyon sıklığının % 2 ile % 11.4 arasında ve *Salmonella* izolasyon sıklığının ortalama dört katı kadar olduğu bildirilmiştir^(20,35). Türkiye genelini kapsayan ayrıntılı epidemiyolojik veriler mevcut değildir. Ankara bölgesinde 80'li yılların sonundan başlayarak *S.sonnei* izolasyon sıklığında artış gözlenmiştir⁽⁷⁾. Aysev ve ark.⁽⁶⁾'nın çalışmasında Ankara bölgesinde artık *S.sonnei*'nin en sık izole edilen tür olduğu bildirilmektedir. Daha sonraki yıllarda da *S.sonnei* hakimiyetinin devam ettiğini gösteren yayınlar mevcuttur^(4,5,17,18,25,33). Pullukçu ve ark.⁽²⁸⁾'nin çalışmasında geniş bir *Shigella* koleksiyonu incelenmiş ve *S.sonnei* türünün baskın olduğu gözlemlenmiştir. Saran ve ark.⁽²⁹⁾'nin yakın dönem kapsayan çalışmalarında da Ankara için baskın kökenin *S.sonnei* olduğu doğrulanmıştır.

Çalışmamızda 2005 yılı Eylül, Ekim ve Kasım aylarında izole edilmiş 18 *Shigella sonnei* suşu ile Temmuz ve Kasım aylarında izole edilmiş iki *S.dysenteriae* suşu; 2006 yılı Ağustos, Eylül ve Ekim aylarına ait dokuz *S.sonnei* suşunu içeren vaka kümelenmeleri değerlendirilip birbirleriyle kıyaslanması yapılmıştır. Suşlar 17 farklı antibiyotige duyarlılıkları açısından değerlendirilmiştir. Suşların antibiyotik duyarlılık tablolarına göre beş farklı antimikrobiyal direnç

profili elde edilmiştir. *FastdigestXbaI* enzimiyle gerçekleştirilen restriksiyon işlemi sonrasında yapılan PFGE analizi sonucunda 2005 ve 2006 yıllarına ait 27 *S.sonnei* suşu için beş major, iki adet *S.dysenteriae* suşu için bir PFGE profili elde edilmiştir.

Ankara bölgesinde yapılan çalışmalarda; Ceyhan ve ark.⁽⁷⁾ 1994 yılında izole ettikleri 150 *S.sonnei* suşunun % 58'inde SXT direnci, % 10'unda ampisilin direnci bildirmişlerdir. Aysev ve Giriz⁽⁶⁾ 1993-1996 döneminde izole edilen 217 *S.sonnei* suşunda SXT direncini % 55.3, ampisilin direncini % 11.5 olarak tespit etmişlerdir. Kuzucu ve ark.⁽²⁰⁾ 1998-1999 yılları arasında izole ettikleri 28 *S.sonnei* suşunda SXT direncini % 69.4 ve ampisilin direncini % 8.3 rapor etmişlerdir. Akçalı ve ark.⁽⁵⁾ 1997-2000 ve 2001 yıllarında Ankara'da izole ettikleri 17 *S.sonnei* suşunda SXT'ye direnç oranını % 70.5 bulurken, ampisiline % 23.5 direnç tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, suşların tümü gentamisin, seftriakson, imipenem, nalidiksik asit ve siprofloksasine duyarlı bulunmuş, kloramfenikole karşı % 3.3 direnç tespit edilmiş olup bu direnç Adapazarı'nda izole edilen suşlarda görülmüştür. Karacan ve ark.⁽¹⁷⁾'nin 2002 Haziran ve Kasım ayları arasında Dr. Sami Ulus Çocuk Hastanesi'ne başvuran 198 şigellozlu hastayı kapsayan çalışmalarında 165 hastada *S.sonnei* izole edilmiş, ampisilin direnci % 13.6 iken, SXT direnci % 86.4 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada siprofloksasin duyarlılığı % 100 bulunurken sefotaksim ya da seftriaksona duyarlılık % 98 olarak hesaplanmıştır. Özmert ve ark.⁽²⁵⁾'nin 1987-1994 ve 1995-2002 yıllarını içeren periyotları kıyaslayan çalışmasında her iki periyotta da *S.sonnei* hakimiyeti saptanmış, suşların SXT direncinin % 39'dan % 70'e çıktığı ampisilin direnç oranlarının da arttığı tespit edilmiştir. 1995-2000 yılları arasındaki suşlarda SXT'ye % 71.1, ampisiline % 22.6, ampisilin-sulbaktama % 16.8, kloramfenikole % 20.6, gentamisine % 1.9, seftriaksona % 1.4 direnç belirlenmiştir. Bu çalışmada direnç oranlarını yükselten suşların genel olarak *S.flexneri* suşları olduğu göze çarpmaktadır. Ülkemizde bu bulguyu destekleyen farklı çalışmalar da mevcuttur^(7,9,34). Özmert ve ark.⁽²⁵⁾ aynı çalışmada siprofloksasine karşı dirençli suş saptamamış, kloramfenikol direnci açısından da iki zaman periyodu

arasında fark olmadığını tespit etmişlerdir.

Bahsedilen çalışmalarda sonuçlarla benzer şekilde bizim çalışmamızda da *S.sonnei* hakimiyeti gözlenmiştir (n=27 % 93.1). Mevcut iki *S.dysenteriae* suşu kullanılan tüm antibiyotikler açısından duyarlı tespit edilmiştir. 27 *S.sonnei* suşunun % 72.4'ü SXT'ye dirençli iken ampisiline % 17.2'si dirençli bulunmuştur. SXT direncindeki bu yüksek oranlar Ankara çevresinde artmış direncin kanıtları olabilir. Ampisiline karşı dirençli suşların tespiti de şigelozun ampirik tedavisinde bu antimikrobiyal tedavinin başarısız olabileceğini göstermektedir. Ampisilinle tedavinin başarısız olduğu durumlarda sefalosporinler tedavi seçeneği olabilir⁽²⁵⁾.

Çalışmadaki tüm *Shigella* suşları siprofloksasine duyarlı bulunmuştur. Bu sonuç siprofloksasinin şigeloz tedavisinde hali hazırda iyi bir seçenek olduğunun bir göstergesi olabilir.

Üstün ve ark.⁽³³⁾ Ankara ilindeki özel bir hastanede 2001 yazında *S.sonnei* izolasyon sıklığının arttığını, 54 suşun tamamının ampisilin, kloramfenikol, siprofloksasine duyarlı ve SXT'ye dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamıza dahil edilen üç suş bahsi geçen bu antimikrobiyal direnç profili ile uyumluluk sergilemektedir. Ancak bu suşların genotipik yapıları hakkında bilgi sahibi olmadığımız için devam eden bir klonun varlığı hakkında fikir yürütememekteyiz.

ESBL, sefamisin ve karbapenemler dışında hemen tüm beta laktam antibiyotikleri inaktive ederek ciddi terapotik problemler oluşturmaktadır⁽¹⁾. 1999 yılında Hindistan'dan ESBL üreten *S.dysenteriae* suşları rapor edilene kadar henüz ESBL pozitif *Shigella* suşlarının olduğu bilinmemekteydi⁽³⁾. Bu yayını takiben Fransa, Kore, Arjantin, Tayvan, Bangladeş, İsrail, İzlanda gibi pek çok ülkeden ESBL üreten suşların raporları yayınlanmıştır⁽²⁾. Açıkgöz ve ark.⁽¹⁾ 2003 yılında Türkiye'den ilk ESBL pozitif *Shigella sonnei* raporunu yayınlamışlardır. Beş sene sonra Açıkgöz ve ark.⁽²⁾ 163 *Shigella* suşunu içeren çalışmalarında 122 (% 79.7) *Shigella sonnei* suşu arasından beş ESBL pozitif suş tespit etmişlerdir. Çalışmamızda 2005 yılı *Shigella sonnei* suşları içinde dört tane ESBL pozitif suş tanımlanmıştır. Bu suşların tespiti sefotaksim, seftazidim ve amoksisilin klavulanat disklerini kullanarak

çift-disk sinerji testi ile tespit edilmiştir⁽¹⁵⁾.

Houang ve ark.⁽¹⁴⁾, 1986-1987 ve 1994-1995 yılı *Shigella flexneri* ve *Shigella sonnei* suşlarını içeren iki zaman periyodunu karşılaştıran çalışmalarında *S.flexneri* için ampisilin, amoksisilin-klavulanat, kloramfenikol, tetrasiklin ve SXT direnç oranlarında artış tespit ederken, dört ve daha fazla antimikrobiyal ajana dirençli *S.sonnei* suşlarının direnç oranları açısından iki yıl grubu arasında istatistiksel fark bulunmamışlardır. *XbaI* enzimi kullanılarak yapılan restriksiyon işlemi sonrası gerçekleştirdikleri PFGE analiz çalışmalarında on yıl sonra genetik yapının oldukça değiştiği kanısına varmışlardır. *S.sonnei* için ilk zaman periyodunda tespit edilmiş olan yedi pulsotipin ikinci periyotta ortadan kalktığını ve bu periyotta önceki periyotta olmayan üç yeni pulsotipin ortaya çıktığını ve bir pulsotipte de artış olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ardışık iki yıl boyunca toplanan suşlarda genotipik homojenitenin çok büyük ölçüde korunduğu gözlenmiştir. Bahsi geçen çalışmada gözlenen genotipik heterojenite aradan geçen zaman periyodunun uzunluğundan kaynaklanmış olabilir.

Liu ve ark.⁽²³⁾, 1987-1994 yılları arasında altı farklı infeksiyon vakasından izole ettikleri 20 *S.sonnei* suşuyla yaptıkları çalışmada *XbaI* enzimini kullanarak birisi kullanılan standart suşa ait olmak üzere yedi adet makrorestriksiyon profili elde etmişlerdir. Altı vaka grubunu epidemiyolojik ilişkilerine göre başarı ile ayırmışlardır. İzolasyon sıklığının arttığı üç aylık bir dönemde toplanmış sekiz sporadik suşun hepsinin tüm yöntemlerde aynı tipi gösterdiğini saptamışlar ve bu suşların toplulukta o dönemde dolaşan tek bir bakteriyel kökene ait olabileceğini düşünmüşlerdir. Çalışmamızda da ayırt edilemez ya da yakın ilişkili pek çok suşun olması bu dönemde gerçekleşen vaka kümelenmelerinin aynı bakteriyel kökenden olabileceğini düşündürmektedir.

Lin ve ark.⁽²²⁾, 1996-1997 yıllarını kapsayan dönemdeki yedi *Shigella* salgınından izole edilmiş 22 *S.flexneri* 3a suşu üzerinde yaptıkları PFGE çalışmasında *XbaI*, *SfiI* ve *NotI* enzimlerinin üçünü de kullanmışlardır. *XbaI* ve *SfiI* tüm suşlar için aynı PFGE profillerini ortaya çıkarırken *NotI*'da farklılıklar gözlemlenmiştir. Her üç

enzimle kesim işlemleri sonucu aynı vaka gruplarında aynı profiller elde edilmiştir. Üç enzim kombinasyonu ile yedi vakada yedi karşılaştırmalı profil elde etmişlerdir. Sonuçta kapalı coğrafik alanlardan aynı zaman periyodunda izole edilmiş bazı suşların aynı kaynaktan orjin aldığı kanaatine varmışlardır. Bizim çalışmamızda da *XbaI* ve *NotI* ile, aynı vaka gruplarında aynı genotipik profiller ortaya çıkmıştır. Lin ve ark.⁽²²⁾'nin çalışmasında aynı vaka gruplarında farklı enzimlerle DNA restriksiyonu yapılmasına rağmen aynı genotipik profillerin elde edilmesi, *XbaI* enziminin ayırım gücünde bir sorun olmadığının bir göstergesi gibi görünmektedir.

Malezya'nın endemik şigeloz görülen değişik kesimlerindeki sporadik vakalardan elde edilen 1997-2000 yıllarına ait 62 *S.sonnei* suşuyla yapılan bir çalışmada suşların yaklaşık % 29'u kullanılan tüm antimikrobiyallere duyarlı bulunmuş, streptomisine % 62.9, SXT'ye % 37.1, tetrasikline % 35.5, ampisiline % 6.5 ve kloramfenikole % 4.8 direnç saptanmıştır. Çalışmada elde edilen direnç yüzdeleri bizim çalışmamıza kıyasla düşük oranlarda gözükmektedir. Ancak bu çalışmada saptanan kloramfenikol direncine karşılık bizim çalışmamızda kloramfenikol direnci gözlemlenmemiştir. Bu çalışmanın moleküler tiplendirme ayağı için *NotI* ve *XbaI* enzimleri ile restriksiyon yapılarak genomik DNA'lar elde edilmiş, PFGE sonuçlarına göre her iki küme analizinde ortak pek çok bulgu elde edilmesine karşın, *XbaI* enzimiyle restriksiyonun, çalışmanın diskriminatif gücünü hafifçe arttırdığı kanaatine varılmıştır⁽¹³⁾. Çalışmamızda da *XbaI* enzimiyle suşlar arasında yeteri kadar heterojenite sağlanmadığı kanaatiyle *NotI* ile denemeler yapılmış, *NotI*'nin seçilen suşlar için *XbaI* enziminden daha ayırt edici bir profil oluşturmadığı görülmüştür.

Hindistan'ın değişik bölgelerindeki salgınlardan ve hopitalize edilmiş sporadik vakalardan izole edilen 60 *Shigella* suşu (20 *S.dysenteriae*, 16 *S.flexneri*, 7 *Shigella boydii*, 17 *S.sonnei*) ile yapılan başka bir çalışmada 16 *S.sonnei* suşunun SXT, tetrasiklin, nalidiksik asit ve streptomisine dirençli olduğu, bir *S.sonnei* suşunun da bu antibiyotiklere ilaveten ampisiline de dirençli olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal direnç sıklığının ve determinantlarının geniş yayılım alanı

bulan spesifik klonların varlığına bağlı olup olmadığının cevabını bulmak amacıyla yapılan *XbaI* PFGE sonuçlarının analizinde bizim bulgularımızla benzer şekilde 11 *S.sonnei* suşu arasında yüksek oranda genotipik homojenite olduğu tespit edilmiştir⁽²⁶⁾.

Japonya'da 2004 yılı Ağustos ayında Hawai'den gelen yolcularda şigeloz saptanmıştır. Tüm vakalardan *S.sonnei* izole edilmiştir. 15 suşun *XbaI* restriksiyon enzimi ile elde edilen genomik DNA'larının PFGE sonrası analizlerinde ikisi tek bantla ayrılan üçüncüsü de diğer ikisinden iki bant farkı gösteren üç PFGE profilini gözlemlenmişlerdir⁽¹¹⁾.

Akçalı ve ark.⁽⁵⁾'nin 1999 Marmara bölgesi depremi sonrası izlemde İzmit, Adapazarı ve Yalova'da izole edilen 13; 1997, 2000 ve 2001 yıllarında Ankara'da izole edilen 17 *S.sonnei* suşu ile yaptıkları çalışmada *XbaI* enzimiyle restriksiyonu yapılarak elde edilen genomik DNA'ların PFGE analiz sonuçlarında A (n=24) ve B (n=6) olmak üzere iki ana grup ve ana gruba yakın ve ya olası ilişkili alt tiplerinin oluşturduğu 15 PFGE profili elde edilmiştir. Ankara'da A ve A alt tipleri görülürken, B ana PFGE profilinin Marmara bölgesinde yoğunlaştığını tespit etmişlerdir. Bu sonuca göre farklı şehirlerde farklı dönemlerde farklı *S.sonnei* alt tiplerinin dolaştığı kanaatine varmışlardır. Aynı çalışmada iki kardeşten izole edilen iki suş arasında tek bant farklılığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda *Shigella* infeksiyonu geçirmekte olan iki kardeşin dışkılarından izole edilen iki *S.sonnei* suşu için aynı antibiyotik direnç profili ve PFGE profili elde edilmiştir. Bu sonuç infeksiyon etkeni olan klonun aile içi bulaşımını düşündürmektedir. Ankara ili ya da Türkiye'nin diğer illerinde dolaşan *Shigella* spp. suşlarının PFGE tiplerinin bölgelere göre dağılımını değerlendirmek ve doğrulamak için daha çok sayıda ve uzun süreli çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Saran ve ark.⁽²⁹⁾ çalışmalarında mevcut çalışmamızdaki bulgulara benzer şekilde *S.sonnei* suşlarında en yüksek direncin SXT'ye karşı (% 97.9) görüldüğünü ve en sık görülen direnç modelinin TET ve SXT (% 16.3) olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada 2001 yılı *S.sonnei* suşları arasında AMP direnci görülmezken bizim

çalışmamızda 2005-2006 yıllarında AMP direnci % 17.2 tespit edilmiş Saran ve ark.⁽²⁹⁾ 2008 ve 2009 yıllarında bu oranın % 22.2'ye çıktığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada 2008 ve 2009 suşlarının 2001 yılında izole edilmiş olan *S.sonnei* salgın suşlarıyla aynı PFGE profili gösterdiği saptanmış, Ankara'da aynı kökenin uzun zamandan beri dolaşımında olduğu kanaatine varılmıştır.

Ülkemizde salgınlarının saptanması ve bu infeksiyonlara neden olan etiyolojik ajanlar için güncel bir epidemiyolojik veri ağına sürekli eklenebilecek bilginin toplanması ve bu verilerin ışığında gerekli kontrol önlemlerinin alınması için laboratuvara dayalı ajan bildirim sisteminin geliştirilmesinin çok önemli olacağı kanaatindeyiz. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından yapılandırılmış PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet>) sürveyans ağına benzer bir sistem olan UEPLA (Ulusal Enterik Patojenler Sürveyans Ağı)'nın yaygınlığı arttıkça salgın hastalıklar açısından güncel ve güvenilir bir epidemiyolojik veri tabanı sağlanacağına inanmaktayız.

Çalışmamızda yalnızca iki suş olması nedeniyle, *S.dysenteriae* suşları arasındaki klonal ilişki hakkında herhangi bir tartışma yapmamızın doğru olmadığını düşünmekteyiz. *S.dysenteriae* türünü de içine alan çok sayıda suşların incelendiği yeni klonal ilişkilerinin ortaya konulması; olası salgınların doğrulanması, *Shigella* spp. gibi önemli bir enterik patojenin bulaş yolları ve kaynağının tanımlanması ve bu bilgilere bağlı olarak daha etkili kontrol önerilerinin geliştirilmesi açısından yararlı olacaktır.

Bilgilendirme

Bu çalışma, Fatih Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından P53011001 proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Acikgoz ZC, Gulay Z, Bicmen M, Gocer S, Gamberzade S. CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase in a *Shigella sonnei* clinical isolate: first report from Turkey, *Scand J Infect Dis* 2003;35(8):503-5.
2. Acikgoz ZC, Koseoglu Eser O, Kocagoz S. CTX-M type beta-lactamase producing *Shigella sonnei* from pediatric bacillary dysentery cases, *Jpn J Infect Dis* 2008;61(2):135-7. PMID:18362404
3. Ahamed J, Kundu M. Molecular characterization of the SHV-11 beta-lactamase of *Shigella dysenteriae*, *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(8):2081-3. PMID:10428943 PMCID:PMC89421
4. Alıcı O, Açıkgöz Z, Gamberzade S, Göçer S, Karahocagil MK. Antibiotic resistance rates of *Shigella* species isolated from stool cultures in the years 1999-2003, *Mikrobiyol Bul* 2006;40(1-2):9-14. PMID:16775951
5. Akçalı A, Levent B, Akbaş E, Esen B. Türkiye'nin bazı illerinde izole edilen *Shigella sonnei* suşlarının antimikrobiyal direnç ve "Pulsed Field" jel elektroforezi yöntemleri ile tiplendirilmesi, *Mikrobiyol Bul* 2008;42:563-72. PMID:19149077
6. Aysev AD, Giriz H. Drug resistance of *Shigella* strains isolated in Ankara, Turkey, 1993-1996, *Scand J Infect Dis* 1998;30(4):351-3. <http://dx.doi.org/10.1080/00365549850160620> PMID:9817513
7. Ceyhan M, Akan O, Kanra G, Ecevit Z, Secmeer G, Berkman E. Changing patterns of the prevalence of different *Shigella* species and their antibiotic susceptibilities in Ankara, Turkey, *J Diarrhoeal Dis Res* 1996;14(3):187-9. PMID:9019012
8. Clinical and Laboratory Standarts Institute. Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing; 18th Informational supplement, M1000-S18, CLSI, Wayne, PA (2008).
9. Doğancı L, Baylan O, Albay A, Gün H. Bacterial pathogens in childhood diarrhea in Turkey, *Ped Infect Dis J* 1997;16(11):1096-7. <http://dx.doi.org/10.1097/00006454-199711000-00023> PMID:9384352
10. Durmaz R, Otlu B, Çalışkan A, Gürsoy N. *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinin moleküler tiplendirmesinde kullanılabilir kısa süreli Pulsed-Field Gel Elektrofrez (PFGE) protokolü, *ANKEM Derg* 2007;21(2):113-7.
11. Gaynor K, Park SY, Kanenaka R et al. International foodborne outbreak of *Shigella sonnei* infection in airline passengers, *Epidemiol Infect* 2009;137(3):335-41. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268807000064> PMID:18177516

12. Goering RV. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis, *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993;14(10): 595-600.
<http://dx.doi.org/10.1086/646645>
PMid:7901269
13. Hoe CH, Yasin RM, Koh YT, Thong KL. Antimicrobial susceptibility and pulsed-field gel electrophoresis of *Shigella sonnei* strains in Malaysia (1997-2000), *J Appl Microbiol* 2005; 99(1):133-40.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02581.x>
PMid:15960673
14. Houang ET, Chu Y, Ng T, Cheng AF. Study of the relatedness of isolates of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* obtained in 1986 and 1987 and in 1994 and 1995 from Hong Kong, *J Clin Microbiol* 1998;36(9):2404-7.
PMid:9705363 PMCid:PMC105133
15. Jarlier V, Nicolas M H, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns, *Rev Infect Disease* 1988;10(4):867-78.
<http://dx.doi.org/10.1093/clinids/10.4.867>
PMid:3263690
16. Kanra G, Akalın HE. Akut gastrointestinal infeksiyonlar, "Kanra G (ed). İnfeksiyon Hastalıkları", 2. Baskı, s.127-51, Güneş Kitabevi, Ankara (1993).
17. Karacan C, Tavıl B, Topal Y, Zorlu P, Tayman C. Evaluation of shigellosis in a Turkish children's hospital, *Pediatr Int* 2007;49(5):589-92.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1442-200X.2007.02425.x>
PMid:17875081
18. Kılıç D, Tülek N, Tuncer G, Doganci L, Willke A. Antimicrobial susceptibilities and ESBL production rates of *Salmonella* and *Shigella* strains in Turkey, *Clin Microbiol Infect* 2001;7(6):341-2.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00261.x>
PMid:11442570
19. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies, *Bull World Health Organ* 1999;77(8): 651-66.
PMid:10516787 PMCid:PMC2557719
20. Kuzucu Ç, Baktır E, Acar N. 1998-1999 yılları arasında izole edilen *Salmonella* ve *Shigella* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, *Türk Hij Den Biyol Derg* 2001;58(1):11-4.
21. Levine MM. Shigellosis, "Hunter W, Strickland G, Kersey R (eds). Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases, 8.baskı" kitabında s: 319-323, W.B Saunders Company, Philadelphia (2000).
22. Lin CS, Wang TK, Tsai JL, Ho SI, Lee CL, Lu CH. Molecular subtyping of *Shigella flexneri* 3a isolates by plasmid profile analysis and pulsed-field gel electrophoresis, *J Microbiol Immunol Infect* 2001;34(2):103-8.
PMid:11456354
23. Liu PY, Lau YJ, Hu BS et al. Analysis of clonal relationship among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods, *J Clin Microbiol* 1995;33(7):1779-83.
PMid:7545179 PMCid:PMC228268
24. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-Based typing of microbial organisms, *J Clin Microbiol* 1999;37(6):1661-9.
PMid:10325304 PMCid:PMC84917
25. Özmert EN, Göktürk B, Yurdakök K, Yalçın SS, Gür D. *Shigella* antibiotic resistance in central Turkey: comparison of the years 1987-1994 and 1995-2002, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40(3): 359-62.
<http://dx.doi.org/10.1097/01.MPG.0000153006.38363.7E>
PMid:15735493
26. Pazhani GP, Niyogi SK, Singh AK et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* species isolated from epidemic and endemic cases of shigellosis in India, *J Med Microbiol* 2008;57(Pt 7):856-63.
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.2008/000521-0>
PMid:18566144
27. Pfaller M. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs, *Emerg Infect Dis* 2001;7(2):312-8.
<http://dx.doi.org/10.3201/eid0702.010234>
PMid:11294731 PMCid:PMC2631730
28. Pullukçu H, Aydemir Ş, Sipahi OR, Yamazhan T, Tünger A. 1999-2006 yılları arasında dışkı kültürlerinden izole edilen 439 *Shigella* kökeninin tür dağılımı ve antibakteriyel direnç durumları, *ANKEM Derg* 2007;21(3):137-41.
29. Saran B, Erdem B, Tekeli FA, Sahin F, Aysev AD. Ankara'da izole edilen *Shigella* kökenlerinin antibiyotik direnç modelleri, plazmid profil analizi ve değişken alanlı jel elektroforezi ile incelenmesi, *Mikrobiyol Bul* 2013;47(1):35-48.
<http://dx.doi.org/10.5578/mb.4438>
PMid:23390901
30. Schwartz D, Cantor C. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell* 1984;37(1):67-75.

- [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90301-5](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(84)90301-5)
31. Soldati L, Piffaretti JC. Molecular typing of *Shigella* strains using pulsed field gel electrophoresis and genome hybridization with insertion sequences, *Res Microbiol* 1991;142(5):489-98.
[http://dx.doi.org/10.1016/0923-2508\(91\)90182-A](http://dx.doi.org/10.1016/0923-2508(91)90182-A)
32. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists, *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18(6):426-39.
<http://dx.doi.org/10.1086/647644>
33. Üstün C, Arslantürk A, Karademir A. The antimicrobial susceptibility test among clinical isolates of *Shigella sonnei* in Ankara, summer 2001, *Clin Microbiol Infect* 2002;8(S1):125.
34. Wilke A, Arman D, Cokca F et al. Resistance of *Salmonella* and *Shigella* in Turkey, *Clin Microbiol Infect Dis* 1999;5(9):588-90.
35. Yurdakök K, Şahin N, Özmert E, Berkman E. *Shigella* gastroenteritis: clinical and epidemiological aspects, and antibiotic susceptibility, *Acta Paediatr Jpn* 1997;39(6):681-4.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1442-200X.1997.tb03667.x>
PMid:9447757