

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

***SHIGELLA* KÖKENLERİNİN
ANTİBİYOTİK DİRENÇ MODELLERİ, PLAZMİD PROFİL
ANALİZİ VE PULSED-FIELD JEL ELEKTROFOREZİ
İLE İNCELENMESİ**

**Dr. N. Begüm SARAN
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Birsal Erdem**

**ANKARA
2010**

ÖNSÖZ

Shigella kökenlerinde antibiyotik direnç durumunun bilinmesi; kökenlerin epidemiyolojik araştırmasında antibiyotik direnç tiplendirimi, plazmid profil analizi ve pulsed-field jel elektroforezi yöntemlerinin değeri ve birbirine olan üstünlüklerinin bilinmesi önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların, *Shigella* kökenlerinin tedavisi için ampirik antibiyotik seçiminde ve epidemiyolojik araştırmasında tercih edilecek yöntemlerin belirlenmesinde ileriki yıllardaki araştırmalara ışık tutacağını düşünmekteyim.

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince her konuda bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, desteği ve yardımları ile her zaman arkamda olduğunu hissettiğim değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Birsal Erdem'e, eğitimim boyunca bilgisini, desteğini ve anlayışını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Aydın Karaarslan'a, tez çalışmamda deneyimleri ile bana katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Alper Tekeli'ye, Doç. Dr. Fikret Şahin'e ve Yrd. Doç. Dr. Ebru Us'a, eğitimimin her aşamasındaki katkıları nedeniyle Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli Öğretim Üyelerine,

Çalışmam süresince materyal toplamam konusunda bana yardımcı olan Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı sorumlusu Sayın Prof. Dr. Derya Aysev'e, Uzm. Dr. Haluk Güriz'e ve sorumlu biyolog ve laborantlarına, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında görevli uzman ve personellerine, istatistiksel değerlendirmede yardımlarını gördüğüm Sayın Doç. Dr. Atilla Elhan'a,

Birlikte uyum içinde çalışmaktan keyif aldığım Anabilim Dalı Asistanlarına ve Personeline,

Bu günlere gelmemde gösterdiği özveri, sabır, anlayış ve desteğinden dolayı annem Prof. Dr. Yüksel Saran'a, kardeşim Murat Saran'a ve sevgili arkadaşım Dr. Burak Gülcen'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. N. Begüm Saran

Ankara-2010

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
Önsöz	ii
İçindekiler	iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	vi
Şekiller Dizini	ix
Tablolar Dizini	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tarihçe	5
2.2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	5
2.3. Kültür Özellikleri	6
2.4. Antijenik Yapı	6
2.5. Virulans ve Patojenite Özellikleri	6
2.5.1. <i>Shigella</i> 'nın Hücresel Patogenezi	7
2.5.2. Toksinleri	8
2.5.3. <i>Shigella</i> Virulansı	8
2.5.4. <i>Shigella</i> Patogenezinin Moleküler Belirleyicileri	10
2.5.4.1. <i>Shigella</i> Virulans Plazmidi	10
2.6. Örnekler	11
2.6.1. Kültür	12
2.6.1.1. İzolasyon	12
2.6.1.2. İdentifikasyon	12
2.6.1.2.1. Biyokimyasal Testler	12
2.6.1.2.2. Serolojik Tanı	14
2.6.1.2.3. Sereny Testi	14
2.7. Yaptığı İnfeksiyonlar	15
2.8. Tedavi	16
2.9. Epidemiyoloji	16
2.10. Tiplendirme Metodları	17
2.10.1. Fenotipik Tiplendirme Yöntemleri	17
	iii

2.10.1.1. Biyotiplendirme	18
2.10.1.2. Rezistotiplendirme (Antibiyotik Duyarlılığına Göre Tiplendirme)	18
2.10.1.3. Bakteriyofaj Tiplendirimi (Faj Tiplendirimi)	18
2.10.2. Moleküler (Genotipik) Tiplendirme Yöntemleri	19
2.10.2.1. Plazmid Profil Analizleri	20
2.10.2.2. Pulsed Field Jel Elektrofözezi (PFGE)	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. <i>Shigella</i> Kökenleri	22
3.1.1. İzolatların Sayısı ve İzole Edildiği Laboratuvarlar	22
3.2. Çalışmaya Alınan Kökenlerin Tanımlanması	24
3.2.1. Serolojik Tiplendirme	24
3.2.1.1. Kullanılan Antiserumlar	25
3.2.1.2. Yöntem	25
3.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	25
3.3.1. Kullanılan Antibiyotikler	26
3.3.2. İstatistiksel Analiz	26
3.4. Kökenlerin Saklanması	26
3.5. Plazmid Profil Analizi	27
3.5.1. Gereçler	27
3.5.1.1. Saklama Tüplerindeki Kökenlerin Yeniden Üretiminde Kullanılan Besiyerleri	27
3.5.1.2. Kimyasal Malzemeler	27
3.5.1.3. Araçlar	28
3.5.1.4. Plazmid DNA Eldesi İçin Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar	28
3.5.2. Kökenlerin Üretilmesi	30
3.5.3. Plazmid DNA Eldesi ve Elektrofözezi	30
3.5.3.1. Standart Bakteriler	30
3.5.3.2. Plazmid DNA Eldesi	31
3.5.3.3. Plazmid Elektrofözezi ve Plazmidlerin Tanımlanması	31
3.5.3.4. Yöntemin Ayırım Gücünün Hesaplanması	32
3.6. Pulsed-Field Jel Elektrofözezi (PFGE)	32
3.6.1. Gereçler	32

3.6.1.1. Saklama Tüplerindeki Kökenlerin Yeniden Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri	32
3.6.1.2. Kimyasal Malzemeler	33
3.6.1.3. Araçlar	33
3.6.1.4. Pulsed-Field Jel Elektrofrez için Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar	34
3.6.2. Kökenlerin Üretilmesi	35
3.6.3. Pulsed-Field Jel Elektrofrez (PFGE) Uygulaması	36
3.6.4. Yöntemin Ayırım Gücünün Hesaplanması	38
4. BULGULAR	39
4.1. <i>Shigella</i> Türleri	39
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi ve Antibiyotik Direnç Modelleri	40
4.3. Plazmidler ve Plazmid Profilleri	47
4.4. PFGE Paternleri	59
4.5. Kökenlerin Antimikrobiyal Direnç Modelleri, Plazmid Profilleri ve PFGE Paternleri	65
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇLAR	96
ÖZET	99
SUMMARY	101
KAYNAKLAR	103

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Ampisilin
A/K	Amoksisilin/Klavulonik asit
Arp 2;3	Actin-related protein 2;3 (Aktin ilişkili protein 2;3)
C	Kloramfenikol
CDC	Centers for Disease Control
Cf	Sefalotin
CHEF-DRII	Contour-clamped homogeneous electric field-DRII
Cip	Siprofloksasin
Ct	Sefotaksim
Cz	Seftazidim
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DCA	Deoksikolat sitrat agar
DNA	Deoksiribonükleik asit
dd H₂O	deiyonize distile su
DP	Discriminative Power (Ayrım Gücü)
E	Eritromisin
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EPEC	Enteropatojenik <i>E. coli</i>
G	Gentamisin
gr	gram
HE	Hektoen Enterik Agar
IcsA	Intracellular spread A (Hücre içi yayılım A)
IL-1β	İnterlökin-1 β
IL-8	İnterlökin-8
IL-18	İnterlökin-18
İpa	İnvazyon plazmid antijeni
ipg	invazyon plazmid geni
iuc	iron uptake chelate
iut	iron uptake transport

Kb	Kilobaz
KIA	Kligler Iron Agar (Kligler Demir Agar)
LB Broth	Lurie – Bertani Broth
LIA agar	Lysine Iron Agar (Lizin Demir Agar)
LPS	Lipopolisakkarit
M	Molar
MDa	Mega Dalton
MDR	Multi Drug Resistance (Çoklu İlaç Direnci)
M hücre	Mikrofold hücre
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
ml	mililitre
mm	milimetre
mM	milimolar
<i>mxi</i>	membrane expression of <i>ipa</i> (<i>ipa</i> 'nın membran ekspresyonu)
µl	mikrolitre
µm	mikrometre
N	Nalidiksik asit
NF-κB	Nuclear factor-kappa B (nükleer faktör-kappa B)
N-WASP	Neuronal Wiskott Aldrich Syndrome Protein
PAI	Patogenicity Islands (Patojenite Adaları)
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Pulsed-Field Jel Elektroföresi)
Pic	Protein involved in colonization (Kolonizasyonda görevli protein)
PMN	Polimorfonükleer lökosit
RSHMB	Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SF	Serum fizyolojik
shET1	<i>Shigella</i> enterotoksin 1
shET2	<i>Shigella</i> enterotoksin 2
SHI	<i>Shigella</i> patojenite adaları
<i>spa</i>	Surface presentation of <i>ipa</i> (<i>ipa</i> 'nın yüzey sunumu)
SS	<i>Salmonella</i> – <i>Shigella</i> agar
St	Streptomisin

Stx	Shiga toksin
Sxt	Trimetoprim/Sülfametoksazol
T3SS	Tip 3 Sekresyon Sistemi
T	Tetrasiklin
TBE	Tris – Boric asit – EDTA
TE	Tris – EDTA
XLD	Ksiloz Lizin Dekarboksilaz Agar
TLR-4	Toll-like receptor 4 (Köprü benzeri reseptör 4)
Tris	Tris (hidroksimetil) amino metan
TSI agar	Triple Sugar Iron Agar (Üç Şekerli Demirli Agar)
UEPLA	Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV	Ultraviyole
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1. <i>S. sonnei</i> 'nin 2001 yılı izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı	47
Şekil 4.2. 2001 <i>S. sonnei</i> plazmid elektroforez fotoğrafının (Şekil 4.1) şematik görünümü	48
Şekil 4.3. <i>S. sonnei</i> 'nin 2008 yılı izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı	49
Şekil 4.4. 2008 <i>S. sonnei</i> plazmid elektroforez fotoğrafının (Şekil 4.3) şematik görünümü	50
Şekil 4.5. <i>S. sonnei</i> 'nin 2009 yılı izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı	51
Şekil 4.6. 2009 <i>S. sonnei</i> plazmid elektroforez fotoğrafının (Şekil 4.5) şematik görünümü	52
Şekil 4.7. <i>S. flexneri</i> 'nin 2009 yılı izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı	56
Şekil 4.8. 2009 <i>S. flexneri</i> plazmid elektroforez fotoğrafının (Şekil 4.7) şematik görünümü	57
Şekil 4.9. <i>S. sonnei</i> izolatlarında gözlenen PFGE paternlerinin bantları	60
Şekil 4.10. 2001 <i>S. sonnei</i> izolatlarına ait PFGE bantları	61
Şekil 4.11. 2008 <i>S. sonnei</i> ve <i>S. flexneri</i> izolatlarına ait PFGE bantları	61
Şekil 4.12. 2009 <i>S. sonnei</i> ve <i>S. flexneri</i> izolatlarına ait PFGE bantları	62
Şekil 4.13. <i>S. sonnei</i> izolatlarının PFGE ile elde edilen bantlarının dendogramı (UPGMA yöntemi)	63
Şekil 4.14. <i>S. flexneri</i> izolatlarında gözlenen PFGE izolatlarının bantları	64
Şekil 4.15. <i>S. flexneri</i> izolatlarının PFGE ile elde edilen bantlarının dendogramı (UPGMA yöntemi)	64

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. <i>Shigella</i> türlerinin biyokimyasal test sonuçları	13
Tablo 2.2. <i>Shigella</i> ve <i>E. coli</i> ayrımı için kullanılan biyokimyasal özellikler	14
Tablo 3.1. <i>Shigella</i> izole edilen hastaların cinsiyet ve yaş grupları	23
Tablo 4.1. Çalışmaya alınan <i>Shigella</i> türlerinin yıllara göre dağılımı	40
Tablo 4.2. <i>Shigella</i> türlerinde antibiyotiklere dirençli kökenlerin sayı ve oranı	41
Tablo 4.3. 2001, 2008 ve 2009 <i>S. sonnei</i> izolatlarında antibiyotiklere dirençli kökenlerin sayı ve oranı	43
Tablo 4.4. 2001, 2008 ve 2009 <i>S. flexneri</i> izolatlarında antibiyotiklere dirençli kökenlerin sayı ve oranı	44
Tablo 4.5. 2001, 2008 ve 2009 <i>S. sonnei</i> izolatlarında görülen antibiyotik direnç modelleri ve bu modellere sahip kökenlerin sayı ve oranı	45
Tablo 4.6. 2001, 2008 ve 2009 <i>S. flexneri</i> izolatlarında görülen antibiyotik direnç modelleri ve bu modellere sahip kökenlerin sayı ve oranı	46
Tablo 4.7. <i>S. sonnei</i> kökenlerinin taşıdığı plazmidler ve bu plazmidleri taşıyan kökenlerin sayı ve oranı	53
Tablo 4.8. <i>S. sonnei</i> kökenlerinde görülen plazmid profilleri ve bu profile sahip kökenlerin sayı ve oranı	55
Tablo 4.9. <i>S. flexneri</i> kökenlerinin taşıdığı plazmidler ve bu plazmidleri taşıyan kökenlerin sayı ve oranı	58
Tablo 4.10. <i>S. flexneri</i> kökenlerinde görülen plazmid profilleri ve bu profile sahip kökenlerin sayı ve oranı	59
Tablo 4.11. 2001 <i>S. sonnei</i> izolatlarının antimikrobiyal direnç modelleri, plazmid profilleri ve PFGE paternleri	66

Tablo 4.12. 2008 <i>S. sonnei</i> izolatlarının antimikrobiyal direnç modelleri, plazmid profilleri ve PFGE paternleri	67
Tablo 4.13. 2009 <i>S. sonnei</i> izolatlarının antimikrobiyal direnç modelleri, plazmid profilleri ve PFGE paternleri	68
Tablo 4.14. 2001, 2008 ve 2009 <i>S. flexneri</i> izolatlarının antimikrobiyal direnç modelleri, plazmid profilleri ve PFGE paternleri	69
Tablo 4.15. <i>S. dysenteriae</i> izolatının antimikrobiyal direnç modeli, plazmid profili ve PFGE paterni	70

1. GİRİŞ

Shigella cinsi *Enterobacteriaceae* ailesindedir. *Shigella* türleri basilli dizanteriye yol açan en önemli etkenlerdir; akut ishal olgularının %5-15'inden; dizanteri olgularının %30-50'sinden sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Çaylan, 2008). İshal nedeniyle 5 yaşın altındaki çocuklarda dünyada yılda 2,5 milyon ölüm vakası görülmekte ve ishaller tüm ölümlerinin %21'inden sorumlu tutulmaktadır (Kosek ve ark., 2003). Dünyada çocuklarda gelişen ishallerin %10 ile 50 kadarından *Shigella* türleri sorumlu bulunmuştur. Yılda 165 milyon kişi *Shigella* ile infekte olmaktadır. Bunların 100 milyonu gelişmekte olan ülkelerde görülmekte ve 1 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır (Dupont, 2010). Şigeloz genellikle 6 aylık ve 10 yaş arası çocuklarda görülmektedir. İnfeksiyonların büyük çoğunluğu 5 yaşın altındaki çocuklarda görülmektedir. Malnutrisyonlu çocuklarda, immun yetmezlikli hastalarda, yaşlılarda ağır ve komplike seyredebilmektedir (Dupont, 2010; Kotloff ve ark., 1999; Aysev, 2008; Niyogi, 2005).

Shigella'lar en bulaşıcı ishal etkenidir, çok düşük sayıda (100-200) canlı bakteri alınması infeksiyon için yeterlidir. Etkenin insandan insana geçiş göstermesi, infekte ve kolonize insanların hastalığın asıl rezervuarı olması nedeniyle toplumda kolayca yayılabilirler. Yaşam alanlarının kalabalık olması, kişisel hijyen kurallarına dikkat edilmemesi, su kaynakları ve kanalizasyon sistemlerinin sağlık koşullarına uymaması infeksiyon riskini artırır. Çocuk kreşleri, gündüz bakım merkezleri, evsiz barınakları, askeri kışlalar gibi toplu yaşam bölgelerinde görülme sıklığı artmakta ve salgınlara neden olabilmektedir (Butler ve Scheld, 2004).

Shigella türleri hastalarda asemptomatik ya da kısa süreli sulu diyareden ciddi komplikasyonlara ve ölümlere varabilen klinik tablolara neden olur. Ateş, kramp şeklinde karın ağrıları, tenesmus, kanlı mukuslu dışkılama ile dizanteri oluştururlar. Sağlıklı bireylerde hastalık 5-7 günde kendiliğinden sınırlanır. Antimikrobiyal tedavi uygulanmadığında dışkı ile bakteri atılımı 1-4 hafta sürebilir (Hale, 1998; Erdem, 1999; Aysev, 2008; Niyogi, 2005; Dupont, 2010).

Ülkemizin farklı bölgelerinde ishal şikayeti ile başvuran hastalardan *Shigella* izolasyon oranı %0,5-25 arasında değişmektedir (Otkun ve ark., 1997; Yurdakök ve ark., 1997; Aysev ve Güriz, 1998; Büke ve ark., 1999; Kanan ve Aksüt, 2003; Demirtürk, 2004; Alıcı ve ark., 2006).

Farklı coğrafik bölgelerde ve sosyoekonomik seviyelerdeki topluluklarda, *Shigella* türlerinin izolasyon sıklığı değişkenlik göstermektedir. *S. flexneri* gelişmekte olan, *S. sonnei* ise gelişmiş ülkelerde en sık izole edilen türdür (Aysev, 2008; Alıcı ve ark., 2006; Black ve Lanata, 2007). Türkiye’de yapılan çeşitli araştırmalarda 1980 ve 1987 yılları arasında en çok izlenen türün *S. flexneri* olduğu, 1987’den sonra *S. sonnei* izolasyonunda sürekli bir artış görüldüğü saptanmıştır. 1990’dan sonra *S. sonnei* en sık izole edilen tür olarak birinci sıraya yerleşmiştir (Ceyhan ve ark., 1996; Aysev ve Güriz, 1998; Özmert ve ark., 2005; Alıcı ve ark., 2006; Pullukçu ve ark., 2007). Ancak *S. flexneri*’nin daha sık gözlemlendiği çalışmalar da vardır (Otkun ve ark. 1997; Birengel ve ark., 1998; Kaleli ve ark., 1998; Özkalp, 2000; Yazgı ve ark., 2001).

Shigella türlerinin yüksek bulaşıcılık göstermesi nedeniyle, halk sağlığını korumak amacıyla dışkı kültürü pozitif olan ya da basilli dizanteri tanısı alan her hasta tedavi edilmelidir (Dupont, 2010). Ampirik antibiyotik seçimi yaparken bölgesel direnç durumunun bilinmesi gereklidir. Günümüzde *Shigella* izolatlarında görülen çoklu antibiyotik direncinin tedavide büyük sorunlara neden olduğu bildirilmektedir. Geçen yıllarda sıkça kullanılan trimetoprim/sülfametoksazol ve ampisiline karşı birçok ülkede yüksek oranda direnç geliştiği görülmektedir Bu nedenle *Shigella*’lar için antibiyotik direnç sürveyansı önem taşımaktadır. Ayrıca hastaların antibiyotik tedavisi dışkı kültürlerinde üretilen *Shigella* kökenlerinin antibiyotik duyarlılık testi sonuçları doğrultusunda düzenlenmelidir (Goldberg, 2008; Dupont, 2010).

İnfeksiyon hastalıkları ile ilişkili epidemiyolojik araştırmalarda olgulardan izole edilen mikroorganizmalar arasındaki ilişkinin gösterilmesi önem taşımaktadır. Salgınlardan izole edilen mikroorganizmalar tek bir etyolojik ajandan köken

almaktadır. Salgın izolatları genetik olarak tamamen benzer veya yakın ilişkilidir (Olive ve Bean, 1999).

Epidemiyolojik araştırmalarda izole edilen mikroorganizmalar arasındaki ilişkilerin belirlenmesi; salgın durumunda salgın kaynağını ve yayılma yollarını belirlemek, kokenler arasındaki klonal ilişkileri ve genetik yakınlığı araştırmak, organizmanın virulan suşlarını belirlemek, hastane infeksiyonları ve toplumsal kaynaklı infeksiyonları belirlemek, hastalarda görülen reaktivasyonu, reinfeksiyondan ayırt etmek, infekte populusyondaki epidemik klonların sirkülasyonunu ve zaman içindeki prevelansını izleyerek epidemiyolojik srveyans ve kontrol yöntemleri geliştirmek için önemlidir (Olive ve Bean, 1999; Arbeit, 2003). Bu amaçlarla günümüzde çeşitli fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemlerine başvurulmaktadır.

Shigella infeksiyonlarında, izole edilen etkenin tür düzeyinde tanımlanması o bölgede endemik olan türün belirlenebilmesini sağlar, ancak izolatlar arasındaki ilişkileri değerlendirmek için yeterli kabul edilmemektedir. Fenotipik tiplendirme yöntemi olarak *Shigella*'larda geçmişte kullanılmış olan kolisin tiplendirme ve bakteriyofaj tiplendirme gibi yöntemler, sonuçların değerkenlik göstermesi; zahmetli, zaman alıcı olmaları; referans merkezlerinde uygulanır oluşları; düşük ayırım gücüne sahip olmaları nedeniyle günümüzde epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilmemektedir (Tenover ve ark., 1997; Van Belkum ve ark., 2007). *Shigella* izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında fenotipik tiplendirme yöntemi olarak değerlendirilmesi çok yaygın ve son derece pratik bir durumdur. Ayrıca bu yöntemle izolatlarda yeni gelişen antibiyotik dirençlerini göstermek mümkündür (Pfaller, 2001).

Son 25 yılda epidemiyolojik çalışmalarda *Shigella* izolatlarında plazmid ve kromozom DNA'larını incelemeye olanak veren genotipik (moleküler) yöntemler geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanılmıştır. Günümüzde PFGE pek çok mikroorganizmanın tiplendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir (Goering, 2004).

Bu alışmada *Shigella*'ların epidemiyolojik özelliklerini aydınlatmak amacıyla Ankara'da çeşitli hastanelerin Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında Ağustos 2001–Ekim 2001, Ağustos 2008–Ekim 2008 ve Temmuz 2009–Ekim 2009 tarihleri arasında, hastaların dışkı örneklerinden standart yöntemlerle izole edilen 60 *Shigella* izolatu incelenerek:

1. Ankara ilinde *Shigella* türlerinin günümüzdeki dağılımının belirlenmesi;
2. *Shigella* türlerinde antibiyotiklere direnç oranlarının belirlenerek, *Shigella* infeksiyonlarının tedavisine ışık tutulması;
3. *Shigella* türlerinde antibiyotik direnç modellerinin fenotipik tiplendirme yöntemi olarak değerlendirilmesi;
4. *Shigella* türlerindeki plazmid profillerinin belirlenmesi ve tiplendirme yöntemi olarak değerlendirilmesi;
5. *Shigella* türlerinin *Xba*I enzimi kullanılarak PFGE ile incelenmesi;
6. *Shigella* türlerinin epidemiyolojik incelenmesinde tiplendirme yöntemi olarak antibiyotik direnç modeli, plazmid profil analizi ve PFGE'nin karşılaştırılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Shigella ilk kez 1896'da Japon bilim adamı Dr. Kiyoshi Shiga tarafından tanımlanmıştır. İlk izole edilen *Shigella* tipi *Shigella dysenteriae* tip 1'dir. 1897'de Japonya'da meydana gelen, Japonca kırmızı diyare anlamına gelen sekiri (dizanteri) salgını 91.000' den fazla insanı etkilemiş ve %20 oranında mortaliteye neden olmuştur. Dr. Kiyoshi Shiga bu salgına neden olan mikroorganizmayı tanımlamış ve *Bacillus dysenteriae* adını vermiştir. *Shigella* terim olarak ilk kez 1930'da Bergey's Manual of Determinative Bacteriology' de kullanılmış ve sonrasında Shiga'nın basili *Shigella dysenteriae* tip1 olarak adlandırılmıştır (Niyogi, 2005).

Dr. Kiyoshi Shiga'nın keşfinden birkaç yıl sonra alman mikrobiyolog Kruse dizanteri salgınlarında, benzer ancak serolojik ve biyokimyasal olarak farklı organizmalar izole etmiştir. Bu bulgular daha sonra Flexner tarafından doğrulanmıştır ve önce *B.pseudodysenteriae*, *B. paradysenteriae*, sonra *B. dysenteriae* Flexner ve son olarak da *Shigella flexneri* olarak isimlendirilmiştir. 1915'te Duval, Castellani ve Kruse laktozu geç fermente eden *Shigella* varyantı bulmuşlar ve *B. paraysenteriae* tip E olarak isimlendirmişlerdir. Bu mikroorganizma üzerinde Sonne daha ileri çalışmalar yapmış ve mikroorganizma *S. sonnei* olarak anılmıştır. 1930'un başlarında İngiliz mikrobiyolog Boyd, *S. flexneri*'ye benzeyen mannitol pozitif mikroorganizmalar tanımlamış ve 1938 sonunda bu grup organizmalar *S.boydii* olarak adlandırılmıştır (Keush, 2002).

2.2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Shigella'lar Enterobacteriaceae ailesi içinde Escherichieae kabilesinde yer alırlar. Yaklaşık 2-3 µm boyunda ve 0,5 µm eninde, hareketsiz, kapsülsüz, gram negatif basillerdir (Erdem, 1999).

2.3. Kültür zellikleri

Shigella'lar fakültatif anaerob, oksidaz negatif bakterilerdir. En iyi üreme ısısı 37°C'dir. Enterobakterilerin ürediği çoğu besiyerlerinde kolay rerler. Kanlı agarda 2-3 mm çapında gri yarı saydam, düzgün, hemoliz yapmayan nemli koloniler oluştururlar. Buyyonda homojen bulanılık yaparlar. MacConcey agarda 2-3 mm çapında renksiz görünümde (laktoz negatif) koloniler oluştururlar (Erdem, 1999; Bilgehan, 2000; Keush, 2002).

2.4. Antijenik Yapı

Shigella'lar hücre duvarının dış membranında yer alan lipopolisakkaritlerin O antijeni bileşenlerine göre 4 ana gruba bölünmüşlerdir: A, B, C ve D (Niyogi, 2005). A, B ve C grupları minör O antijenlerine göre alt gruplara (serotiplere) bölünmüştür (Nataro ve ark., 2007):

1. *Shigella dysenteriae* (Grup A) (15 serotip)
2. *Shigella flexneri* (Grup B) (8 serotip)
3. *Shigella boydii* (Grup C) (19 serotip)
4. *Shigella sonnei* (Grup D) (1 serotip)

O antijeni ısıya dayanıklıdır. Bazı *Shigella* suşlarında kapsüler polisakkarit (K) veya zarf antijeni vardır. Serotiplendirmede K antijeninin önemi yoktur. Fakat O antijenine bağlı serolojik tiplendirmeyi önler. Bakteri süspansiyonu 100°C'de 1 saat kaynatılarak K antijeni uzaklaştırılırsa, O antijeni uygun antiserumlarla aglutinasyon verebilir. *Shigella* 'lar hareketsiz olduklarından H (flagellar) antijeni yoktur (Altwegg ve Bockemühl, 1998; Erdem, 1999; Nataro ve ark., 2007).

2.5. Virulans ve Patojenite zellikleri

Sağlıklı kişiler *Shigella*'ları ağız yolu ile kontamine su ve gıdalarla alırlar. Doğada yalnızca insanlar bu bakterinin doğal kaynağı ve rezervuarlarıdır. Olduğca virlan

enterik patojenlerdir, alınan 10-100 kadar bakteri sağlıklı insanlarda hastalığa yol açabilir. Mide asidini geçen bakteriler ince barsak boşluğunda hızla çoğalmaya başlamakta ve daha sonra kolon duvarına invaze olmaktadır (Altwegg ve Bockemühl, 1998). *Shigella* infeksiyonları yüzeysel infeksiyonlardır. Nadir durumlar dışında mukoza altına penetre olmaz (Dupont, 2010).

2.5.1. *Shigella*'nın Hücresel Patogenezi

Shigella'nın sebep olduğu infeksiyon çok basamaklı bir süreçtir. *Shigella* vucutta koruyucu bariyer görevi gören barsak epitelini geçer ve mukozaya erişir. İnfeksiyonun ilk fazında *Shigella* epitel bariyerin apikal yüzünden girmez. Bunun yerine giriş için mikrofild hücreleri (M hücre) hedef alır. M hücrelerinden giren *Shigella* epitel tabakasını transitozla geçer ve submukozada makrofajlarla karşılaşır (Philpott ve ark., 2000; Schroeder ve Hilbi, 2008). *Shigella* kaspas-1 bağımlı apoptoz indüksiyonu yaparak makrofajlar içinde hayatta kalmayı başarabilir. Makrofaj hücre ölümüne proinflamatuvar sitokinler interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-18 (IL-18) salınımı eşlik eder. Bu sitokinler akut ve masif inflamatuvar cevapta önemli medyatörlerdir (Suzuki ve Sasakawa, 2001; Phalipon ve Sansonetti, 2007). Makrofaj ölümü ile serbest kalan *Shigella* epitelyal hücrelere bazolateral yüzeyden girme ve bu hücrelerde çoğalma yeteneğine sahiptir (Suzuki ve Sasakawa, 2001; Ogawa ve ark., 2008).

Sitoplazmik *Shigella*, aktin polimerizasyonu gerçekleştirerek hareket eder (Suzuki ve Sasakawa, 2001). Bu şekilde konak immün savunmanın ekstraselüler komponentlerinden kaçarak bitişiğindeki epitel hücrelerine yayılım gösterebilir. Epitel hücrelerinin invazyonu IL-8 üretimini arttırarak güçlü inflamatuvar yanıtı neden olur. İnterlökin-8 (IL-8), infeksiyon alanına polimorfonükleer lökositlerin (PMN) göç etmesini sağlar (Philpott ve ark., 2000).

PMN infiltrasyonu epitel tabakanın bütünlüğüne zarar verir ve lümendeki bakterinin M hücrelerine ihtiyaç duymadan submukozaya erişebilmesine olanak tanır. Ayrıca *Shigella*, epitel arasında bulunan sıkı bağlantı (tight-junction) proteinlerinin yapısını

güçsüzleştirir. Böylece makrofaj ölümü, epitel tabakasının hasarı ve PMN'lerin yoğun birikimi, bakteriyel infeksiyonu ve doku hasarını artırır. Bu süreçler *Shigella*'nın karakteristik patolojisinin gelişimine neden olur. Sonunda infeksiyon bölgesine göç eden PMN'ler bakteriyi yakalar ve öldürür (Keush, 2002; Schroeder ve Hilbi, 2008; Sansonetti, 2006). *Shigella* tarafından oluşturulan ciddi doku hasarı, su, besin ve mineral emiliminin bozulmasına neden olur. Kanlı, mukuslu ve sulu diyare görülür. Membran geçirgenliği ve elektrolit dengesi bozulur, kontrolsüz iyon ve sıvı sekresyonu görülür (Schroeder ve Hilbi, 2008).

2.5.2. Toksinleri

Shigella suşları 3 farklı enterotoksin salgılar: *Shigella* enterotoksin 1 (shET1), *Shigella* enterotoksin 2 (shET2) ve Shiga toksin (Stx). Kromozom tarafından kodlanan shET1 tüm *S. flexneri* 2a suşları tarafından salgılanır. Diğer *Shigella* türlerinde nadir görülür. shET2 *Shigella* virulansından sorumlu büyük plazmid üzerinde yer almaktadır ve birçok farklı *Shigella* serotipi tarafından kodlanır (Fasano ve ark., 1995; Keush, 2002). Stx nörotoksik, sitotoksik ve enterotoksik etkili bir toksindir ve kromozomda yer alan genler tarafından kodlanır. Sadece *Shigella dysenteriae* serotip 1 tarafından üretilir. Stx A ve B altünitinden oluşmuştur. Shiga toksin B altüniti ile hedef hücrelerde bulunan bir glikolipid reseptörüne bağlanır. A altüniti konak hücrede ribozomun 60S altünitine irreversibl bağlanarak protein sentezini inhibe eder ve hücre ölümüne neden olur (Keush, 2002; Niyogi, 2005). Bu toksin kolon, böbrek, santral sinir sisteminde vasküler lezyon gelişiminden sorumludur (Cherla ve ark., 2003).

2.5.3. *Shigella* Virulansı

Shigella'ların fenotipini oluşturan genetik bilgi bakteri kromozomunda ve virulansla ilgili olduğu kabul edilen büyük plazmidde kodlanır. Bu büyük virulans plazmid *Shigella*'ların temel virulans determinantıdır. Virulans plazmid tarafından kodlanan genler; invazyon plazmid antijenlerinin üretiminde (İpa), tipIII sekresyon sisteminin sentezinde, bakterinin endositik olarak alımı ve endositik vakuollerin yıkımında,

bakterinin intra ve interselüler yayılımında ve virülans genlerinin düzenlenmesinde görev alırlar (Torres, 2004).

Bu mekanizmanın temel elementi Tip 3 Sekresyon Sistemi'dir (T3SS). T3SS bakterinin konak hücre ile fiziksel temasını sağlayarak, yaklaşık 25 kadar proteinini ökaryotik konak hücreye doğrudan ulaştırmasını sağlar. Ulaştırılan bu efektör proteinler çeşitli konak hücre işlemlerinde rol oynarlar (Torres, 2004; Veenendaal ve ark., 2007; Blocker ve ark. 2008). Virulansla ilişkili genler patojenite adaları (patogenicity islands, PAI) adı verilen bölgelerde bulunur. Virulans plazmidindeki patojenite adalarına ek olarak kromozomda *Shigella* patojenite adaları (SHI) tanımlanmıştır. SHI'nın varlığı ve genomik lokalizasyonu *Shigella* suşları arasında farklılık gösterir ve virulans fenotipleri çeşitliliğine katkıda bulunur. Burada kodlanan genler SigA ve ShET1 barsak lümenine sıvı sekresyonundan, Pic mukus yıkımından, *iucA-D* ve *iutA* demir kazanımından, *shiA* inflamasyonun baskılanmasından sorumludur (Schroeder ve Hilbi, 2008).

Shigella'larda hücre duvarındaki lipopolisakkarit (LPS) doğal immun sistemin aktivasyonuna yol açan en önemli virulans faktörüdür. Konağın *Shigella*'lara immun yanıtı serotipe özgü yanıttır. LPS, lipid A ve somatik (O) antijen yapısından oluşmuştur. O antijeni kompleman aracılı lizise direnç sağlar. Lipid A komponenti ise güçlü inflamatuvar cevabın tetiklenmesinde önemli rol oynar. LPS ekstraselüler çevreden LPS-bağlayan proteinler aracılığı ile membran bağlı CD14'e taşınır. Burada aksesuar molekül MD-2 ile beraber hücre yüzey reseptörü Toll-like reseptör 4 (TLR-4)'e sunulur. TLR aktivasyonu sitozolik nükleer faktör-kappa B'nin (NF-κB) nükleusa yer değiştirmesine ve pro-inflamatuvar sitokin genlerin transkripsiyonuna yol açar (Phalipon ve Sansonetti, 2003).

2.5.4. *Shigella* Patogenezinin Moleküler Belirleyicileri

2.5.4.1. *Shigella* Virulans Plazmid

Şigellozun hücrel patogenezi ve klinik yansıması çok sayıda bakteriyel virulans faktörlerinin karmaşık aktivitesinin toplamı sonucunda ortaya çıkar. Bakteriyel invazyon ve intraselüler yaşam için gerekli moleküler mekanizmanın temel bölümü virulans plazmidinde kodlanır. Farklı *Shigella* suşlarında bulunan virulans plazmidlerinin sekanslanması sonucunda yaklaşık 200 kb büyüklüğündeki plazmidlerin ortalama 100 gen içerdiği gösterilmiştir. Plazmidin kor bölgesi 31 kb'lık korunmuş 'giriş bölgesi' dir. Bu bölgenin epitel hücrelerine girişten ve makrofaj ölümünden sorumlu olduğu görülmüştür (Keush, 2002; Torres, 2004; Schroeder ve Hilbi, 2008). Giriş bölgesi, birbirlerine ters yönde transkripte olan iki kümeye ayrılmıştır ve 34 gen içerir. Fonksiyonları temel alınarak 4 farklı gruba ayrılabilir.

İlk grup T3SS tarafından salınan proteinleri içerir. Bu proteinler arasında *Shigella*'nın baskın immunojenik antijenleri vardır; invazyon plazmid antijenleri İpaA, B, C, D. Bunlardan üçü; İpaB, C, D anahtar virulans faktörlerdir. Konak hücre invazyonu ve intraselüler yaşam için gerekli fonksiyonları yanında bu proteinler diğer efektör proteinlerin salınımını ve ökaryotik konak hücreye alınımını kontrol ederler (Schroeder ve Hilbi, 2008). İkinci grup genler *mxi* (membrane expression of *ipa*) ve *spa* (surface presentation of *ipa*) olarak adlandırılır. *Mxi-Spa* lokusu, T3SS oluşumu ve fonksiyonu için gerekli komponentleri kodlar. Giriş bölgesinin yarısından fazlasını işgal eder ve *ipa* proteinleri ve diğer efektör proteinlerin sekresyonu için gereklidirler (Parsot, 2009). Bu temel virulans faktörleri yanında giriş bölgesi iki transkripsiyon aktivatörü; VirB ve MxiE içerir. Bu üçüncü grup giriş bölgesinde yeralan T3SS ilişkili genleri düzenler. Son olarak dördüncü gruptaki dört gen şaperonları kodlar (*ipgA*, *ipgC*, *ipgE* ve *spa15*). Bu şaperonlar T3SS substratlarını bakteriyel sitoplazmada stabilize eder. *İpgC* ve *spa15*, giriş bölgesinin dışında lokalize T3SS efektör genlerin transkripsiyonel regülasyonundan sorumludur (Schroeder ve Hilbi, 2008).

Giriş bölgesi dışında kodlanan virulansla ilişkili genler tanımlanmıştır. *İcsA* (*virG*) geni bakterinin infekte hücre stoplazmasında hareketinden sorumlu proteini kodlar, *virF* geni *icsA* ve *virB* ekspresyonunu kontrol eden transkripsiyonel aktivatör proteini kodlar (Torres, 2004).

Shigella'nın epitel tabakasında yayılımı aktin polimerizasyonuna bağlıdır. İcsA-konak Neuronal Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) ve Arp2;3 kompleksi ile aktin polimerizasyonuna bağlı mekanizma ile konak hücre sitoplazması boyunca hareket eden *Shigella*, bitişiğindeki epitel hücresinin plazma membranındaki sıkı bağlantı bölgelerine gelir. Oluşan protrüzyonlar komşu hücre tarafından endositozla içeri alınır (Suzuki ve Sasakawa, 2001; Phalipon ve Sansonetti, 2003; Sansonetti, 2006). Bakteriye çevreleyen çift kat membranın T3SS ve translokator proteinler İpaB, İpaC ve İpaD ile lizisinden sonra *Shigella* sitoplazmada serbest hale geçer ve yeni bir replikasyon döngüsü ve hücreden hücreye yayılım başlar. İnfekte olan kolon epitel hücrelerinin nekrozu, epitel bariyerin yıkımı, şiddetli inflamatuvar cevap şigelozda görülen hemoraji, mukozal ödem, mikroülserasyonları açıklar (Schroeder ve Hilbi, 2008).

2.6. Örnekler

Mikrobiyolojik inceleme için dışkı örnekleri alınmalıdır. Dışkı örneği alınamayan hastalarda rektal sürüntü örnekleri de kullanılabilir. İnceleme için dışkı örneklerinin kanlı mukuslu olan bölümü kullanılır. Örneklerden nativ veya boyalı preparatlar hazırlanarak eritrosit ve lökosit varlığı araştırılır.

Hastalardan örnekler, özellikle hastalığın başladığı ilk 4 gün içinde ve antibiyotik tedavisi başlanmadan alınmalı ve mümkün olduğunca çabuk laboratuvara gönderilmelidir. Eğer örnekler hemen ekilemeyecek ise uygun taşıma besiyerine konmalıdır. Bu amaçla Cary-Blair, Amies, Stuart besiyerleri gibi besiyerleri kullanılabilir (Rsh; Sur ve ark., 2004).

2.6.1. Kültür

2.6.1.1. İzolasyon

Shigella 'lar dışkı örneklerinde diğer gram negatif bakteriler tarafından baskılanma eğiliminde oldukları için ayırtıcı – seçici özelliği olan besiyerleri tercih edilmelidir. Kültür için en az iki farklı besiyerine ekim yapılmalıdır. *Shigella* 'ların dışkı örneklerinden izolasyonu için MacConkey agar ve EMB (Eosin Metilen Mavisini) agar kullanılabilir. Deoksikolat sitrat agar (DCA) (Leifson's besiyeri), *Salmonella* – *Shigella* agar (SS) ve ksiloz lizin dekarboksilaz agar (XLD) besiyerleri de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu besiyerlerinde bulunan sodyum deoksikolat, *Shigella* 'nın üremesini engellemezken, floradaki gram negatif bakterilerin üremesini baskılamaktadır. Ancak SS agar, *S. dysenteriae* serotipinin üremesini baskılayacağı için önerilmemektedir. *Shigella* 'lar laktoz fermentasyonu yapamadıkları için besiyerlerinde renksiz koloniler oluştururlar. Bu tipte koloniler yapan bakteriler, biyokimyasal ve serolojik olarak incelenerek identifikasyon yapılır (Altwegg ve Bockemühl, 1998; WHO, 1999; Rshm; Nataro ve ark., 2007; Dupont, 2010).

2.6.1.2. İdentifikasyon

2.6.1.2.1. Biyokimyasal Testler

İzolasyon besiyerlerinde üreyen şüpheli koloniler KIA (kligler iron agar) veya TSI (triple sugar iron agar) besiyerinde biyokimyasal veya serolojik olarak incelenebilir. *Shigella* türleri karakteristik olarak bu besiyerlerinde yatık kısımda alkali ve dipte asit oluştururlar, H₂S üretmezler. Metil kırmızısı pozitif, voges proskauer, simmon's sitrat ve üreaz negatiftir. Lizin dekarboksilaz negatiftir. *S. flexneri*, *S. boydii* ve *S. dysenteriae* biyokimyasal olarak benzer özellikler gösterir. *S. sonnei* ornitin dekarboksilaz ve beta-galaktozidaz aktivitesi bulundurması ve indol reaksiyonunun negatif olması ile diğer *Shigella* türlerinden ayrılır. Bazı *S. sonnei* izolatları laktozu (%2) ve sükrozu (%1) geç fermente ederler. *S. dysenteriae* mannitol fermentasyonu yapamaması ile diğer *Shigella* türlerinden ayrılır. *S. flexneri* serotip 6 ve *S. boydii*

serotip 14 karbonhidratlardan gaz oluşturabilirler (Erdem, 1999; Winn Jr ve ark., 2006; Nataro ve ark., 2007). Tablo 2.1’de *Shigella* türlerinin biyokimyasal test sonuçları görülmektedir.

Tablo 2.1. *Shigella* türlerinin biyokimyasal test sonuçları (Erdem, 1999)

Biyokimyasal test	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>
Serogrup	A	B	C	D
Beta galaktozidaz	-	-	-	+
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	+
İndol yapımı	D	D	D	-

Karbonhidrat fermentasyonu

Laktoz	-	-	-	-
Mannitol	-	+	+	+
Raffinoz	-	D	-	-
Sükroz	-	-	-	-
Ksiloz	-	-	D	-

D: Değişken

Çoğu *Shigella* serotipinin somatik (O) antijenleri bazı *E. coli* serotiplerinin antijenleri ile benzer ya da ilişkili olduğundan çapraz reaksiyon vererek yanılmaya neden olabilir. Serolojik olarak negatif olan şüpheli kültürler daha ileri biyokimyasal testlerle incelenmelidir (Nataro ve ark., 2007). *Shigella* ve *E. coli*’nin biyokimyasal olarak ayrımı için kullanılan çeşitli özellikler tablo 2.2’de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. *Shigella* ve *E. coli* ayrımı için kullanılan biyokimyasal özellikler

Test	<i>Shigella</i>	İnaktif <i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>
Lizin dekarboksilaz	-	D	+
Hareket	-	-	+
Glukozdan gaz oluşturma	-	-	+
Asetat kullanımı	-	D	+
Mukat	-	D	+
Laktoz	-	D	+

D: Değişken

2.6.1.2.2. Serolojik Tanı

Shigella izolatlarının tanısı için serolojik testler gereklidir. *Shigella* cinsi *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* ve *S. sonnei* (sırasıyla A, B, C, D) olmak üzere dört antijen grubuna ayrılır. *Shigella dysenteriae* 15 serotip, *Shigella flexneri* 8 serotip (1'den 5'e kadar olan serotiplerin alt bölümlenmesi ile 11 alt serotipe ayrılır), *Shigella boydii* 19 serotip, *Shigella sonnei* 1 serotipe ayrılır (Nataro ve ark., 2007).

Serolojik identifikasyonda polivalan somatik O antijenlerini içeren antiserumlarla lam aglutinasyonu yapılır. Daha sonra serotipi belirlemek için monovalan antiserumlarla identifikasyona devam edilir.

2.6.1.2.3. Sereny Testi

Tavşan veya kobay gözüne bakteri süspansiyonu damlatıldığında gözde keratokonjonktivit oluşumu gözlenmesine dayalı bir testtir Bu test ile *Shigella*'ların epitelleri hasarlandırabilme yeteneği gösterilir. Test Enteroinvaziv *E.coli* (EIEC) kökenlerinde de pozitifdir (Erdem, 1999).

2.7. Yaptığı İnfeksiyonlar

Shigella türleri tenesmusla birlikte kanlı mukuslu dışkılama ile karakterize basilli dizanteri (şigelloz) hastalığının etkenleridir. İnkübasyon dönemi 1- 4 gün arasında değişir. *S. dysenteriae* infeksiyonunda 8 güne kadar çıkabilir. Şigelloz genellikle kendi kendini sınırlandırabilen bir hastalıktır. Tedavi verilmeyen olgularda semptomlar 7 günde geriler. İnfeksiyonun klinik belirtileri değişkendir. Bazı hastalarda asemptomatik ya da kısa süreli sulu diyare ile seyredebilmesine rağmen, risk faktörü olan hastalarda ciddi komplikasyonlara ve ölümlere neden olabilir (Hale, 1998; Niyogi, 2005; Goldberg, 2008).

Hastalıkta ilk belirtiler ateş ve kramp şeklinde karın ağrılarından hemen sonra görülen bol sulu dışkılamadır. Ateşin azalması ile beraber dışkılama sayısı artar, dışkı miktarı azalır. Bir iki gün içinde tenesmus ve sık dışkılama ihtiyacı ile birlikte kanlı mukuslu dışkılama görülür (Erdem, 1999; Aysev, 2008; Dupont, 2010). Karın ağrısı ve diyare hemen hemen her hastada görülür. Olguların %30'unda ateş, dışkıda %50 oranında mukus ve %40 oranında çok miktarda kan görülür (Dupont, 2010). Günde 10-20 bazen daha da fazla dışkılama görülür. Çocuklarda yüksek ateşe bağlı konvulziyonlar ve huzursuzluk, apati, menenjizm gibi diğer sinir sistemi belirtileri görülebilir (Erdem, 1999; Aysev, 2008).

Sağlıklı bireylerde hastalık 5-7 günde kendi kendine iyileşir. Antimikrobiyal tedavi uygulanmadığında dışkı ile bakteri atılımı 1-4 hafta sürebilir. Genel olarak *S. sonnei*'nin oluşturduğu hastalık *S. flexneri*'ye göre daha hafif ve kısa sürelidir. Malnutrisyonlu çocuklarda, immun yetmezlikli hastalarda, yaşlılarda akut, hayatı tehdit edici komplikasyonlar görülebilir. Bunlar dehidratasyon, hiponatremi, hipoglisemi gibi metabolik bozukluklar; toksik megakolon, rektal prolapsus, intestinal perforasyon gibi barsak komplikasyonları ve nadiren bakteriyemi ve sepsistir. Shiga toksin üreten *S. dysenteriae* infeksiyonuna bağlı olarak hemolitik üremik sendrom görülebilir. Nadir komplikasyonlar olarak artrit, konjonktivit görülebilir (Aysev, 2008; Niyogi, 2005; Butler ve Scheld, 2004).

2.8. Tedavi

Diyarede gelişen dehidratasyonu düzeltmek için uygulanacak ilk basamak tedavi rehidratasyon tedavisidir. Şigelozda genellikle ciddi dehidratasyon görülmemekte ve uygun hidrasyon ile kendi kendini sınırlamaktadır (Niyogi, 2005). Hastalığın insandan insana geçiş göstermesi ve infekte ya da kolonize insanların hastalığın asıl rezervuarları olmaları nedeniyle, halk sağlığını korumak amacıyla dışkı kültürü pozitif olan ya da basilli dizanteri tanısı alan her hasta tedavi edilmelidir (Dupont, 2010). Etkili oral antimikrobiyal kullanımı semptomlarda 48 saat içinde gerilemeye neden olur. Hastalığın süresini 5-7 günden 3 güne düşürür ve *Shigella* atılım süresini kısaltır (Niyogi, 2005). Erişkinlerde şigeloz tedavisinde florokinolonlar, çocuklarda sefalosporinler ilk seçenektir. Azitromisin erişkinlerde çoklu dirençli *Shigella* infeksiyonları tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılabilen ve çocuklarda da kullanımı uygun görülmektedir. Nalidiksik asit de çocuklarda kullanılacak bir antimikrobiyaldir (Dupont, 2010; Campbell ve ark., 2004).

2.9. Epidemiyoloji

Basilli dizanteri mevsimsel değişiklik göstermekte olup havanın ısındığı yaz aylarında daha sık görülmektedir. Uygunsuz sağlık koşullarında ve sınırlı su bulunan kalabalık bölgelerde salgınlara neden olabilmektedir. Tipik klinik tablosundan dolayı en kolay tanı konulan mikrobiyal diyare etkenlerindedir (Black ve Lanata, 2007).

Tüm dünyada yılda 165 milyon kişi *Shigella* ile infekte olmaktadır. Bunların 100 milyonu gelişmekte olan ülkelerde görülmekte ve 1 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır. *Shigella* infeksiyonlarının büyük kısmı (olguların %69'u) ve en yüksek ölüm oranları (ölümlerin %61'i) 5 yaşın altındaki çocuklarda görülmektedir. Yayınlanan birçok çalışmada çocuklarda gelişen ishallerin %10 ile 50 kadarından sorumlu bulunmuştur. Basilli dizanteri daha çok 6 aylık ve 10 yaş arası çocukların hastalığıdır. Genellikle 6 aylıktan küçük çocuklarda basilli dizanteri görülmemektedir. Anne sütü ile beslenmenin daha yaygın olduğu olan ülkelerde, kontamine yiyecek ve içecek alınmamasına, anne sütü ile beslenen çocuklardaki

barsak flora değişikliklerine ve anne sütündeki antikor varlığına bağlı olarak Şigelloz daha az görülen bir infeksiyondur (Dupont, 2010).

2.10. Tiplendirme Metodları

Shigella suşlarını tiplendirmek için fenotipik ve moleküler (genotipik) tiplendirme metodları kullanılır.

Tiplendirme yöntemleri başlıca Şu amaçlar için kullanılmaktadır:

1. Salgın araştırmalarında; salgın kaynağının ve yayılma yollarının belirlenmesi,
2. Hastaların epidemiyolojik olarak birbiriyle olan ilişkilerinin belirlenmesi,
3. Reaktivasyonun, reinfeksiyondan ayırt edilmesi,
4. Hastane infeksiyonları ve toplumsal kaynaklı infeksiyonların belirlenmesi,
5. Laboratuvar kontaminasyonlarının saptanması,
6. Antibiyotik direncinden sorumlu genler hedef alınarak yapılan tiplendirme ile dirençli kökenlerin tanımı ve yaygınlıklarının belirlenmesi,
7. Virulansla ilişkili genlerin tanımı ve yaygınlıklarının saptanması,
8. İnfeksiyonlar arasındaki ilişkileri belirlemek için kökenler arasındaki klonal ilişkinin ve genetik olarak yakınlığının araştırılması,
9. İnfekte popülasyondaki epidemik klonların sirkülasyonu ve zaman içindeki prevalansını izleyerek, epidemiyolojik sörveyans ve kontrol yöntemlerinin değerlendirilmesi (Durmaz, 2001; Pfaller, 2001; Arbeit, 2003).

2.10.1. Fenotipik Tiplendirme Yöntemleri

Fenotipik yöntemler, gen ekspresyon ürünlerini inceleyerek suşları ayırt etmede kullanılır (Tenover ve ark., 1997). Yalnızca fenotipik yöntemler kullanılarak yukarıda sayılan amaçlardan bazıları sağlanabilir. Epidemiyolojik amaçlarla *Shigella*'ların tiplendirilmesinde serotiplendirme, faj tiplendirme, biyotiplendirme, antibiyotik duyarlılığına göre tiplendirme gibi farklı fenotipik yöntemler kullanılmaktadır (Altwegg ve Bockemühl, 1998).

2.10.1.1. Biyotiplendirme

Sıkça kullanılan tiplendirme metodudur. Geniş ölçekli biyokimyasal identifikasyon testlerini içerir ve organizmayı bu fenotipik belirteçleri içerip içermemesine göre karakterize eder. Çoğu *Shigella* izolatları metabolik olarak inaktif olduğu için tiplendirmede güçlük çekilir (Altwegg ve Bockemühl, 1998).

2.10.1.2. Rezistotiplendirme (Antibiyotik Duyarlılığına Göre Tiplendirme)

Antibiyotiklere karşı duyarlılıkların değişken olmasına dayanarak suşlar arası farklılığı ortaya koymada faydalı olabilir. Ancak direnç çoğunlukla plazmid aracılığı ile meydana gelir. Direnç plazmidleri kolayca kaybolabildiği veya yeni kazanılabildiği için stabil olmayan karakterler oluştururlar. Elde edilen izolatlardan antibiyogramlar rutin olarak yapılmakta olduğu için iki ya da daha fazla suşun benzerliği hakkında ipucu verebilir. Ancak antibiyotiklerin seçici ekolojik baskısı altında direnç paternlerinin çabucak değişebildiği unutulmamalıdır (Tenover ve ark., 1997; Altwegg ve Bockemühl, 1998).

2.10.1.3. Bakteriyofaj Tiplendirimi (Faj Tiplendirimi)

Shigella'ların alt tiplendiriminde 1945 yılından beri kullanılan bir yöntemdir (Altwegg ve Bockemühl, 1998). Bu yöntemde bakteriyofajların belirli tip bakterileri infekte etme özgülüğünden yararlanır. Bakteriyofajların kullanıldığı tiplendirme yöntemleri çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmıştır. Faj tiplendirme yöntemleri hızlı olmasına, ucuz ve stabil ayıraçlar kullanılmasına rağmen, uygulanması kolay değildir. Faj tiplendirme yöntemi özel bakteriyofaj kolleksiyonları gerektirmekte ve sadece belirli referans merkezlerinde uygulanabilmektedir. Günümüzde epidemiyolojik çalışmalarda bile sıklıkla kullanılan bir yöntem olmaktan çıkmıştır (Altwegg ve Bockemühl, 1998; Bilgehan, 2005).

2.10.2. Moleküler (Genotipik) Tiplendirme Yöntemleri

Bir mikroorganizmanın fenotipik özellikleri, genotipini tümüyle yansıtmamaktadır. Bu nedenle fenotipik yöntemler, güvenilir ve stabil epidemiyolojik belirteç olmaktan çıkmışlardır. Günümüzde epidemiyolojik çalışmalarda genotipik (moleküler) yöntemlerin kullanılması tercih edilmektedir (Van Belkum ve ark., 2007).

Genotipik tiplendirme yöntemleri özellikle antibiyotik direncinden sorumlu genlerin tanımı ve kökenlerdeki yaygınlıklarının belirlenmesi; virulansla ilişkili genlerin tanımı ve kökenlerdeki yaygınlıklarının saptanması; infeksiyonlar arasındaki ilişkileri belirlemek üzere kökenler arasındaki klonal ilişkinin ve genetik olarak yakınlığının araştırılması; popülasyondaki epidemik klonların sirkülasyonu ve zaman içindeki prevalansının izlenerek, epidemiyolojik sürveyans ve kontrol yöntemlerinin değerlendirilmesi için kullanılmalıdır (Durmaz, 2001; Pfaller, 2001; Arbeit, 2003).

Genotipik tiplendirme yöntemlerinin yaygın kullanım alanı bulabilmesi için belirli kriterlere sahip olmaları gerekmektedir;

1. Tiplendirebilirlik,
2. Ayırım gücü,
3. Tekrarlanabilirlik,
4. Stabilité,
5. Tekniğin kullanım kolaylığı, fiyatı, sonuç verme süresi ve sonuçlarının kolayca yorumlanabilir olması,
6. Yöntemin değişik mikroorganizma grubu veya fazla sayıda örneğin analizine uygunluğu (Olive ve Bean, 1999; Arbeit, 2003; Van Belkum ve ark. 2007).

Bu kriterlerin tamamını karşılayacak tek bir yöntem olmadığı için özellikle kapsamlı epidemiyolojik çalışmalarda birkaç tiplendirme yönteminin birlikte ve ayrıca fenotipik yöntemlerle birlikte kullanılması önerilmektedir (Durmaz, 2001; Rademarker ve Savelkoul, 2004).

2.10.2.1. Plazmid Profil Analizleri

Plazmidler çoğunlukla kovalen olarak kapalı, dairesel yapıda, çift iplikçikli kromozom dışı DNA molekülleridir. Bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olurlar. Bir bakteride bulunan plazmidlerin sayısı büyüklüğü ve nitelikleri uzun zaman aynı kalır ve yavru hücrelere de aynen aktarılırlar. Bu şekilde aynı bakterilerden kaynaklanan kökenlerdeki plazmid şablonunun aynı olmasının epidemiyolojik araştırmalarda önemi vardır (Bilgehan, 2005). Epidemiyolojik araştırmalarda ilk kullanılan DNA bazlı tekniktir (Tenover ve ark., 1997). Hücrelerden ekstrakte edilen plazmidler agaroz jel elektroforezinde yürütülüp ethidium bromide ile boyanarak plazmid profili elde edilir. Farklı suşlardan elde edilen plazmid profilleri kıyaslanarak suşlar arası benzerlikler ortaya konulur. Uygulanması kolay bir metoddur. Diğer konvansiyonel yöntemlere kıyasla hızlı bir ya da iki gün içinde sonuç veren bir yöntemdir. Ancak kromozom DNA'sının incelendiği diğer moleküler yöntemlere göre duyarlılığı daha düşüktür (Altwegg ve Bockemühl, 1998). Yöntemde karşılaşılabilecek problemlerden biri plazmidlerin ekstra kromozomal genetik elemanlar olmaları nedeniyle kolayca kaybedilebilmeleri veya bakterinin yeni bir plazmidle infekte olmasıdır. Ayrıca bazı izolatlarda plazmid olmaması ve bu nedenle de tiplendirilememesi ya da az sayıda plazmid içermesine bağlı düşük ayırım gücüne sahip olması, karşılaşılan diğer problemlerdendir. Bu nedenle zaman ve yer sınırlaması olan çalışmalarda tercih edilebilir (Arbeit, 2003).

2.10.2.2. Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE)

İlk kez 1983'te Schwartz ve Cantor tarafından tanımlanmıştır. Epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde, kültürde üretilen bakteriler düşük erime ısıyla agaroz ile karıştırılır ve özel kalıplar içine dökülür. Agaroz içine hapsolmuş bakterinin hücre duvarı ve hücresel proteinleri deterjan ve enzimlerle parçalanır. Hücre parçalanması ile açığa çıkan bütün DNA, uygun restriksiyon enzimiyle kesilir. DNA parçaları içeren agaroz kalıplar, elektroforez uygulanacak agaroz jel içine yerleştirilir. Farklı yönlerden belirli sürelerde elektrik akımı (pulse) verilmesi ile

DNA parçaları ayrıştırılır. Bu yöntemde, enzimin kestığı DNA bölgesinin sayısı ve yerine göre, farklı sayı ve boyutta DNA parçaları elde edilir. İşlem sonucunda elde edilen DNA bant profilleri kıyaslanarak suşlar arası ayırım yapılır (Durmaz, 2001; Arbeit, 2003; Foxman ve ark., 2005; Goering, 2004). Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımıyla değerlendirilerek suşların birbirleriyle olan ilişkisi ortaya konur. PFGE yöntemi 20 ve 600 kb arası büyüklükteki DNA segmentlerinin ayırt edilmesine olanak tanımaktadır. Yöntemin ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği birçok bakteri türü için yüksektir. Dikkatli bir standardizasyon ile ulusal veritabanları oluşturmak mümkündür. Uygulama için özel pahalı aletler gerektirmesi ve 2-4 gün gibi uzun bir zamanda sonuç vermesi tekniğin dezavantajlarıdır (Tenover ve ark., 1997; Arbeit, 2003; Van Belkum ve ark., 2007).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. *Shigella* Kökenleri

Ankara’da çeşitli hastanelerin Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında Ağustos 2001–Ekim 2001, Ağustos 2008–Ekim 2008 ve Temmuz 2009–Ekim 2009 tarihleri arasında, hastaların dışkı örneklerinden standart yöntemlerle izole edilen 60 *Shigella* izolatu çalışmaya alındı.

3.1.1. İzolatların Sayısı ve İzole Edildiği Laboratuvarlar

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı: 28

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı: 15

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı: 9

Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı: 8

Çalışmaya alınan 2001 yılı kökenlerinin sayısı 23’tür. Bunların tümü Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen ve laboratuvarın kültür koleksiyonlarında saklanan kökenlerdir.

Çalışmaya alınan 2008 yılı kökenlerinin sayısı 10’dur. Bunların 5’i Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında; 5’i Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen kökenlerdir.

Çalışmaya alınan 2009 yılı kökenlerinin sayısı 27’dir. Bunların 5’i Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarında; 10’u Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Mikrobiyoloji Laboratuvarında; 8'i Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında; 4'ü Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen kökenlerdir.

Çalışmaya 2001 yılında alınan 23; 2008 yılında alınan 10; 2009 yılında alınan 27 *Shigella* kökeninin izole edildiği hastaların cinsiyetleri ve yaş grupları tablo 3.1'de gösterilmektedir.

Hastaların %40'ı kız; %60'ı erkek hastadır. Hastaların 9'u (%15,0) 0-2 yaş arasında; 8'i (%13,3) 3-5 yaş arasında; 26'sı (%43,3) 6-15 yaş arasında; 12'si (%20) 16-30 yaş arasında; 2'si (%3,3) 31-45 yaş arasında; 3'ü (%5,0) 45 yaş ve üzerindedir.

Tablo 2.1. *Shigella* izole edilen hastaların cinsiyet ve yaş grupları

Yaş Grupları	2001		2008		2009		Toplam (%)	
	Kız	Erkek	Kız	Erkek	Kız	Erkek	Kız	Erkek
0-2 yaş	1	2	-	-	1	5	2 (28,7)	7 (77,7)
3-5 yaş	1	2	1	-	-	4	2 (25)	6 (75)
6-15 yaş	9	4	1	3	4	5	14 (53,8)	12 (46,1)
16-30 yaş	1	3	2	1	1	4	4 (33,3)	8 (66,6)
31-45 yaş	-	-	1	-	-	1	1 (50)	1 (50)
45 ve üzeri yaş	-	-	-	1	1	1	1 (33,3)	2 (66,6)
Toplam	12	11	5	5	7	20	24 (40)	36 (60)

3.2. Çalışmaya Alınan Kökenlerin Tanımlanması

Çalışmaya alınan izolatların aşağıdaki özellikleri kontrol edilerek *Shigella* kökenleri olduğu doğrulandı (Erdem, 1999; Winn Jr ve ark., 2006; Nataro ve ark., 2007).

1. MacConkey agarda (LAB M 064615) tek koloni ekiminden 18-24 saat sonra laktozu fermente etmeyen renksiz koloniler oluşturması;
2. Üç şekerli demirli besiyerinde (Triple Sugar Iron Agar-TSI agar; HIMEDIA 0000052947) tipik üreme biçimi olan dipte asit (sarı), yatık kısımda alkali (kırmızı) görünümde üreme olması; gaz ve H₂S oluşturmaması;
3. Lizin demir agarda (Lysine Iron Agar-LIA agar; MERCK, V205240 827) *Shigella*'lara özgü dipte asit (sarı), yatık kısımda alkali (kırmızı) görünümde üreme olması ve H₂S oluşturmaması;
4. Cragie (Kregi) besiyerinde hareketsiz bakteri görünümü oluşması;
5. Üreaz besiyerinde (Christensen Urea Agar Base; SIGMA, 1321268) üreyi hidrolize etmeyip, besiyerinin rengini değiştirmemesi;
6. Sitrat besiyerine (Simmon's Citrate Agar; HIMEDIA, 0000012405) ekimden sonra sitratı kullanmayıp besiyerinde renk değişikliği oluşturmaması;
7. Buyyona ekimden sonra türlere göre değişen triptofandan indol oluşturma özellikleri.

3.2.1. Serolojik Tiplendirme

Shigella olduğu tanımlanan bakteriler, standart yöntemlerle uygun antiserumlar kullanılarak lam aglutinasyonu yöntemi ile serotiplendirme yapılarak tür düzeyinde identifikasyonları sağlandı.

3.2.1.1. Kullanılan Antiserumlar

1. *Shigella* Antiserum Poly Group A, *S. dysenteriae* Types 1-7 (Becton Dickenson, 228341)
2. *Shigella* Antiserum Poly Group B, *S. flexneri* Types 1-6 (Becton Dickenson, 228351)
3. *Shigella* Antiserum Poly Group C, *S. boydii* Types 1-7 (Becton Dickenson, 228361)
4. *Shigella* Antiserum Poly Group D, *S. sonnei* Types I & II (Becton Dickenson, 228371)

3.2.1.2. Yöntem

Lam aglutinasyonu için sırasıyla *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* ve *S. boydii* antiserumları kullanıldı. Uygulama aşağıdaki basamaklara uyularak yapıldı.

1. Bir öze yardımıyla TSI besiyerinden alınan koloniler bir lamın üzerine damlatılan iki damla steril serum fizyolojik ile (SF) homojenize edildi.
2. SF ile homojenize edilen karışımın birine antiserum damlatıldı, diğeri kontrol olarak kullanıldı.
3. Antiserum damlatılan süspansiyon 30 saniye ile 1 dakika kadar nazikçe çevrilerek, aglutinasyon olup olmadığı incelendi.
4. Aglutinasyon oluştuğunda kaydedildi.

3.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Antimikrobiyal duyarlılık testi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. Kalite kontrolü *E. coli* ATCC 25922 suşu ile yapıldı. Orta duyarlılık durumu gösteren kökenler dirençli olarak kabul edildi. İki ve daha fazla ilaca direnç varlığı, çoklu ilaç direnci olarak değerlendirildi (Sivapalasingam ve ark., 2006).

3.3.1. Kullanılan Antibiyotikler

Ampisilin (10 µg)

Amoksisilin/Klavulonik asit (20/10 µg)

Gentamisin (10 µg)

Kloramfenikol (30 µg)

Nalidiksik Asit (30 µg)

Sefalotin (30 µg)

Sefotaksim (30 µg)

Seftazidim (30 µg)

Siprofloksasin (5 µg)

Tetrasiklin (30 µg)

Trimetoprim/Sülfametoksazol (1,25;23,75 µg)

Antibiyotik diskleri Becton Dickenson tarafından üretilmiştir.

3.3.2. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapıldı. İstatistiksel değerlendirmede Pearson ki- kare testi ve Fisher'in kesin ki-kare testi kullanıldı.

3.4. Kökenlerin Saklanması

Çalışmaya alınan her bir *Shigella* kökeni serolojik tanımlamadan sonra moleküler yöntemlerle araştırılana kadar mikrobank mikroorganizma saklama tüplerinde (Pro-Lab Diagnostics, PL 160 M) ve derin dondurucuda – 80 °C'de saklandı.

3.5. Plazmid Profil Analizi

3.5.1. Gereçler

3.5.1.1. Saklama Tüplerindeki Kökenlerin Yeniden Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri

Lurie – Bertani (LB) Broth

MacConkey Agar

LB sıvı besiyeri

Hazırlanması:

Pancreatic digest of casein	5,0 gr/ 500 ml
NaCl	2,5 gr/ 500 ml
Yeast extract	5,0 gr/ 500 ml

1. Kuru toz halindeki besiyerleri tartılarak 500 ml distile su içine konuldu.
2. 121° C’de 15 dakika sterilize edildi.
3. Besiyeri soğuduktan sonra steril cam tüplere aktarıldı ve + 4°C’de buzdolabında saklandı.

3.5.1.2. Kimyasal Malzemeler

Pancreatic digest of casein (DIFCO 68797 JA)

Yeast extract (OXOİD 312 46840)

Mac Conkey Agar (LAB M 064615)

Tris base (APPLİCHEM 5J000218)

EDTA (MERCK 6358898)

SDS (RIEDEL – de HAEN 03150)

NaOH (SİGMA 37H1215)

Phenol (MERCK A 550101 451)

Clorophorm (DOP 0001)

İsoamil alkol (MERCK K 33548279 438)
Tris – Cl (AMRESCO 0434B04)
EDTA (MERCK 6358898)
Tris base (APPLİCHEM 5J000218)
Boric asid (LABKİM 111000)
Agarose (PRONA 081523 PR)
Etidyum Bromid (APPLİCHEM 3G00397)

3.5.1.3. Araçlar

Elektroforez Tankı (SUNRISE, Amerika)
Güç Kaynağı (BIO – RAD, Amerika)
Santrifüj (EPPENDORF, Almanya)
Çalkalamalı Su Banyosu (GFL, Almanya)
Su Banyosu (ELEKTRO MAG, Türkiye)
Otomatik pipetler (EPPENDORF, Almanya)
UV transilluminatör (VİLBER – LOURMAT TFX – 20 M, Fransa)
Fotoğraf Makinesi (CANON POWER SHOT G5, Kanada)
Derin Dondurucu (SANYO, Japonya)
Santrifüj tüpleri 15 ml (MERT, Türkiye)
Eppendorf tüpleri 1,5 ml (GREINER BIO-ONE, Almanya)

3.5.1.4. Plazmid DNA Eldesi İçin Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar

50 mM Tris/ 1 mM EDTA, pH 8,0

Hazırlanması:

1 M Tris base	1 ml
0,5 M EDTA	40 µl
dd H ₂ O	18 960 µl

0,05 M Tris/ %3 SDS (pH 12,52 – 12,56) + 2 M NaOH

Hazırlanması:

Tris base	0,302 gr
SDS	1,5 gr
dd H ₂ O	48 ml

Bu şekilde hazırlanan stok solüsyon aşağıdaki şekilde kullanılır:

4,8 ml (stok solüsyon) + 0,205 µl 2 M NaOH (taze)

Fenol – kloroform

Hazırlanması:

Fenol	100 gr
Kloroform	96 ml
İzoamil alkol	4ml
TE tampon	20 ml

TE tamponu

Hazırlanması:

1 M TRİS – Cl (pH 7,5) stok	10 mM TRİS – Cl
500 mM EDTA (pH 8,0) stok	1 mM EDTA

Agaroz jel (%0,6)

Hazırlanması:

Agar	0,24 gr
TBE × 1	40 ml
Etidyum Bromür	1,5 µl

TBE × 5 tamponu

Hazırlanması:

Tris base	54 gr
Borik asit	27,5 gr
0,5 M EDTA (pH 8,0)	20 ml
dd H ₂ O	1000 ml

TBE × 1 tamponu

Hazırlanması:

TBE × 5	100 ml
dd H ₂ O	400 ml

3.5.2. Kökenlerin Üretilmesi

1. Mikrobank mikroorganizma saklama tüplerinde – 80°C’de tutulan her bir köken için birer boncuk alınarak, 3 ml LB sıvı besiyeri içeren tüplere ekildi ve 37 °C’lik etüvde inkube edildi.
2. Ekimden 24 saat sonra her örneğin MacConkey agar besiyerine, öze kullanarak tek koloni düşürecek şekilde ekimleri yapıldı ve yeniden 37°C’de inkübe edildi.
3. 24 – 48 saat sonra MacConkey agarda oluşan laktoz negatif kolonilerden bir koloni seçilerek, yeniden 3 ml LB sıvı besiyeri bulunan tüplere ekim yapıldı.
4. Daha sonra bu tüpler, 37°C’de su banyosunda 18 saat çalkalanarak bekletildi.
5. Ertesi gün plazmid ekstraksiyonu yapıldı.

3.5.3. Plazmid DNA Eldesi ve Elektroforezi

3.5.3.1. Standart Bakteriler

Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü’nden temin edilen, 90 kb büyüklüğünde tek bir plazmid taşıyan 020255 nolu *Salmonella* Typhimurium kökeni, 5,7; 5,8 ve 4,8 kb büyüklüklerinde üç plazmid taşıyan 006956 nolu *Salmonella* Enteritidis kökeni ve

53,7; 7,2; 5,6; 5,1 kb büyüklüklerinde 4 plazmid taşıyan *E. coli* V517 kökeni deneyde standart bakteriler olarak kullanıldı.

3.5.3.2. Plazmid DNA Eldesi

Kado ve Liu yöntemi küçük değişiklikler yapılarak uygulandı (Kado ve Liu, 1981).

1. Çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 18 saat bekletilerek sıvı LB besiyerinde üretilen bakteri kültürleri taşımayacak şekilde eppendorf tüplerine aktarıldı.
2. Eppendorf tüpleri 6000 rpm'de 3 – 5 dakika santrifüjlendi.
3. Santrifüj sonrası eppendorf tüplerini ters çevirerek süpernatant döküldü.
4. Eppendorf tüpünün dip kısmında kalan çökelti (pellet) üzerine 40 µl 50 mM Tris/ 1 mM EDTA (pH 8,0) konuldu ve hafif pipetaj yapıldı.
5. Üzerine 200 µl 0,05 M Tris; %3 SDS (pH 12,52 – 12,56) eklendi ve çok hafif alt üst edildi.
6. Eppendorf tüplerinin kapakları kapatıldıktan sonra ayrıca parafilm ile sarıldı.
7. Eppendorf tüpleri 55°C'de 30 dakika su banyosunda tutuldu.
8. Üzerine 200 µl fenol; kloroform eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 9 000 – 10 000 rpm'de 2 – 3 dakika santrifüj edildi.
9. Süpernatant yeni eppendorf tüpüne aktarıldı.
10. 8. maddedeki işlem iki defa daha uygulandı.
11. Her bir kökenden elde edilen plazmid DNA'larından 15 – 20 µl örnek, 0,5 × TBE tampon ile 0,5 µl etidyum bromür içeren %0,6'lık agaroz jele yüklendi ve 90 – 100 Voltaj altında elektroforezi yapıldı.

3.5.3.3. Plazmid Elektroforezi ve Plazmidlerin Tanımlanması

Elektroforez 0,5 × TBE tampon ile 0,5 µl etidyum bromür içeren %0,6'lık agaroz jelde yapıldı. Etidyum bromür ile boyanan jeldeki plazmid DNA'larına ait bantlar UV transilluminatör ile görüntüledikten sonra fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekildi. Fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra plazmid büyüklükleri, standart kökenlerin büyüklükleri bilinen plazmidleri ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.5.3.4. Yöntemin Ayırım Gücünün Hesaplanması

Plazmid profil analizi yönteminin ayırım gücü Simpson'un farklılık indeksine dayalı şu formülü ile hesaplandı (Hunter ve Gaston, 1988):

$$DP = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j-1)$$

- DP : Ayırım gücü
s : Elde edilen profil (tip) sayısı
j : Tip numarası
x : Tip içindeki izolat sayısı
x_j: : j. tipe düşen örnek sayısı
N : Popülasyon büyüklüğü (toplam izolat sayısı)

3.6. Pulsed-Field Jel Elektroforezi

3.6.1. Gereçler

3.6.1.1. Saklama Tüplerindeki Kökenlerin Yeniden Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri

Brain heart infusion broth

Brain Heart Infusion Broth Sıvı Besiyeri

Hazırlanması:

Brain heart infusion broth	18,5 gr
ddH ₂ O	500 ml

1. Kuru toz halindeki besiyerleri tartılarak 500 ml distile su içine konuldu.
2. 121° C'de 15 dakika sterilize edildi.
3. Besiyeri soğuduktan sonra santrifüj tüplerine aktarıldı ve + 4° C'de saklandı.

3.6.1.2. Kimyasal Malzemeler

Brain heart infusion broth (MERCK 1.10493)
Agarose Low Melt Large DNA Grade (APPLICHEM A3762.0025)
Pulsed-field certified agarose (BIORAD 162-0138)
Lambda ladder PFG Marker (A New England Biolabs N0340S)
Tris base (APPLICHEM 5J000218)
EDTA (MERCK 6358898)
SDS (RIEDEL – de HAEN 03150)
NaCl (MERCK 567440)
N-Lauroyl Sarcosine (SIGMA 61K00361)
*Xba*I enzimi (FERMENTAS 00037025)
Tango buffer (FERMENTAS 00033251)
Proteinaz K (FERMENTAS 00022411)
Etidyum Bromid (APPLICHEM 3G00397)

3.6.1.3. Araçlar

CHEF DR II system (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA)
Plug mold (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA)
Santrifüj (EPPENDORF, Almanya)
Kuru ısıtıcı Blok (TECHNE DB2A, İngiltere)
Su Banyosu (ELEKTRO MAG, Türkiye)
Otomatik pipetler (EPPENDORF, Almanya)
Eppendorf tüpleri 1,5 ml (GREINER BIO-ONE, Almanya)
UV transilluminatör (VILBER – LOURMAT TFX – 20 M, Fransa)
Fotoğraf Makinesi (CANON POWER SHOT G5, Kanada)
Derin Dondurucu (SANYO, Japonya)
Spektrofotometre (HITACHI, Japonya)
Santrifüj tüpleri 15 ml (MERT, Türkiye)
Mikrodalga fırın (BEKO, Türkiye)

3.6.1.4. Pulsed-Field Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar

TE tamponu, pH 8,0

Hazırlanması:

1 M Tris (pH 8,0) stok	10 mM Tris – Cl
500 mM EDTA (pH 8,0) stok	1 mM EDTA

Lizis tamponu

Hazırlanması:

1 M Tris (pH 8,0) stok	20 ml
0.5 M EDTA	40 ml
N-Lauroyl Sarcosine	4 gr
ddH ₂ O	340 ml

SE tamponu, pH 8,0

Hazırlanması:

NaCl	0,435 gr
EDTA	0,903 gr
ddH ₂ O	100 ml

SDS tamponu

Hazırlanması:

SDS	4 gr
ddH ₂ O	40 ml

Enzim karışımı

Hazırlanması:

<i>Xba</i> I enzimi 10U/μl	2 μl
Tango buffer	10 μl
ddH ₂ O	58 μl

TBE × 5 tamponu

Hazırlanması:

Tris base	54 gr
Borik asit	27,5 gr
0,5 M EDTA (pH 8,0)	20 ml
dd H ₂ O	1000 ml

TBE × 0,5 tamponu

Hazırlanması:

TBE × 5	100 ml
dd H ₂ O	900 ml

Agaroz jel (%1,3)

Hazırlanması:

Pulsed-field certified agarose	1,43 gr
TBE × 0,5	110 ml

Plug hazırlamak için kullanılan low melt agaroz (%1,3)

Low melt agaroz	0,13 gr
TE	10 ml
SDS	500 µl

3.6.2. Kökenlerin Üretilmesi

1. Mikrobank mikroorganizma saklama tüplerinde – 80°C’de tutulan her bir köken için birer boncuk alınarak, 3 ml brain heart broth sıvı besiyeri içeren santrifüj tüplerine ekildi ve 37°C’de 24 saat inkübe edildi.
2. Ekimden 24 saat sonra her örneğin MacConkey agar besiyerine, öze kullanarak tek koloni düşürecek şekilde ekimleri yapıldı ve yeniden 37°C’de inkübe edildi.
3. 24 – 48 saat sonra MacConkey agarda oluşan laktoz negatif kolonilerden bir koloni seçilerek, yeniden 7 ml brain heart broth sıvı besiyeri bulunan santrifüj tüplerine ekim yapıldı ve 37°C’de 24 saat inkübe edildi.

4. Santrifüj tüplerinde üreyen izolatlar 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası tüpler ters çevrilerek süpernatant döküldü.
6. Dip kısmında kalan çökelti (pellet) üzerine 1000 µl steril ddH₂O konuldu ve hafif pipetaj yaparak bakteri süspansiyonu elde edildi.
7. Bakteri süspansiyonu optik dansite 0,12'den az olacak şekilde ayarlandı.

3.6.3. Pulsed-Field Jel Elektrofrez (PFGE) Uygulaması

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından belirlenen PFGE protokollerine uyularak gerçekleştirildi (Ribot ve ark., 2006; WHO, 2004).

1. Bakteri süspansiyonu içeren eppendorf tüpleri 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası eppendorf tüplerini ters çevirerek süpernatant döküldü.
2. Eppendorf tüpünün dip kısmında kalan çökelti (pellet) üzerine 300 µl SDS konuldu ve hafif pipetaj yapıldı.
3. Üzerine 25 µl proteinaz K ilave edildi ve çok hafif alt üst edildi.
4. Üzerine 700 µl % 1,3'lük low melt agaroz/SDS ilave edildi ve homojen olacak şekilde hafif pipetaj yapıldı.
5. Elde edilen karışım pipet yardımıyla plug kalıplarına dağıtıldı ve donması için +4°C'de 15 dakika beklendi.
6. Santrifüj tüplerine 5'er ml lizis tamponu ve 25'er µl proteinaz K konuldu.
7. Elde edilen donmuş pluglar santrifüj tüplerinin içlerine konuldu ve 54°C su banyosunda 2 saat bekletildi.
8. Sürenin sonunda santrifüj tüplerindeki lizis tamponu/ proteinaz K uzaklaştırılarak 5 ml ddH₂O ilave edildi ve 54°C'de su banyosunda 15 – 20 dakika bekletildi; bu işlem bir kez daha tekrar edildi.
9. Santrifüj tüplerindeki ddH₂O uzaklaştırılarak 5 ml TE ilave edildi ve 54°C'de su banyosunda 15 – 20 dakika bekletildi; bu işlem dört kez daha tekrar edildi.
10. Hazırlanan pluglar 1 ml TE içeren eppendorf tüplerine konuldu ve +4'ye kaldırıldı.

11. Ertesi gün pluglar bistüri yardımıyla uygun boyutta kesilerek 90 µl ddH₂O/ 10 µl tango buffer içeren eppendorf tüplerine konuldu.
12. Eppendorf tüpleri 37°C'de ısıtıcı blokta 10 dakika bekletildi.
13. İçlerindeki ddH₂O/ tango buffer uzaklaştırılarak her bir eppendorf tüpünde 20U *Xba*I, 10 µl tango buffer ve 58 µl ddH₂O olacak şekilde hazırlanan enzim karışımı ilave edildi.
14. Eppendorf tüpleri 37°C'de ısıtıcı blokta 4 saat bekletildi.
15. Enzimle kesilen pluglar tarakların üzerine yerleştirilerek 15 dakika yapışması beklendikten sonra agaroz jel aparatına yerleştirildi.
16. %1,3'lük pulsed-field jel agaroz hazırlandı. 1,43 gr pulsed-field jel agaroz 110 mL 0,5 × TBE tamponu içinde mikrodalga fırında çözüldü.
17. 55 – 60°C sıcaklığa gelen jelin 10 ml'si sonradan kullanılmak üzere ayrıldı ve kalan agaroz, jel aparatına dökülüp donması beklendi.
18. Elektroforez tankına 2L 0,5X TBE tamponu konuldu ve pompa ayarlanarak 14°C'de sirküle edildi.
19. Donmuş olan agaroz jelden taraklar nazikçe çekildi ve ayrılan çukura Lambda ladder PFG Marker yerleştirildi.
20. Ayrılan pulsed-field agaroz jel tekrar eritildi ve tarak çukurları pipet yardımıyla dolduruldu.
21. Jel tablasının kenarları çıkarıldı, etrafındaki jel artıkları temizlendi ve elektroforez tankına yerleştirildi.
22. CHEF cihazında 0,5 × TBE tamponu içerisinde 6V/cm'de, 14°C'de initial time 2,2'de, final time 63,8'de 18 saat süreyle yürütüldü.
23. Elektroforez sonunda etidyum bromür ile boyanan jeldeki DNA'lara ait bantlar UV transilluminatör ile görüntülendikten sonra fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekildi.
24. İzolatlar arasındaki genetik ilişki Gene Directory Software (Syngene, Cambridge, UK) programında; Dice katsayısı, UPGMA metodu ve %1 tolerans değeri kullanılarak dendogramlar oluşturulup değerlendirildi.

3.6.4. Yöntemin Ayırım Gücünün Hesaplanması

PFGE yönteminin ayırım gücü, aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı (Hunter ve Gaston, 1988).

$$DP = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j-1)$$

- DP : Ayırım gücü
s : Elde edilen profil (tip) sayısı
j : Tip numarası
x : Tip içindeki izolat sayısı
x_j: : j. tipe düşen örnek sayısı
N : Popülasyon büyüklüğü (toplam izolat sayısı)

4. BULGULAR

4.1. *Shigella* Türleri

Çalışmaya alınan 60 *Shigella* kökeninin 49'unun *Shigella sonnei* (%81,6), 10'unun *Shigella flexneri* (%16,6), 1'inin *Shigella dysenteriae* (%1,6) olduğu belirlendi.

Ağustos 2001 – Ekim 2001 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Merkez Laboratuvarında izole edilen 23 *Shigella* izolatının 22'si *S. sonnei*, 1'inin *S. flexneri* olduğu bulundu.

Ağustos 2008 – Ekim 2008 tarihleri arasında Türkiye Cumhuriyeti. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen 5 *Shigella* izolatının hepsi *S. sonnei*; Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen 5 *Shigella* izolatının 4'ü *S. sonnei*, 1'i *S. flexneri* idi. Ağustos 2008 – Ekim 2008 tarihleri arasında izole edilen toplam 10 *Shigella* izolatının 9'unun *S. sonnei*, 1'inin *S. flexneri* olduğu belirlendi.

Temmuz 2009 – Ekim 2009 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Merkez Laboratuvarında izole edilen 5 *Shigella* izolatının 4'ü *S. sonnei*, 1'i *S. flexneri*; Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen 8 *Shigella* izolatının 5'i *S. sonnei*, 3'ü *S. flexneri*; Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen 4 *Shigella* izolatının 2'si *S. sonnei*, 2'si *S. flexneri*; Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen 10 *Shigella* izolatının 7'si *S. sonnei*, 2'si *S. flexneri* ve 1'i *S. dysenteriae* idi. Temmuz 2009 – Ekim 2009 tarihleri arasında yukardaki dört laboratuvarında izole edilen toplam 27 *Shigella* izolatının 18'inin *S. sonnei*, 8'inin *S. flexneri* ve 1'inin *S. dysenteriae* olduğu bulundu.

Ankara ilinde izole edilerek çalışmaya alınan *Shigella* izolatlarının izolasyon yıllarına göre türlere dağılımı tablo 4.1’de izlenmektedir. Çalışmaya alınan 49 *S. sonnei*’nin 22’si 2001 yılında; 9’u 2008 yılında; 18’i 2009 yılında izole edilen kökenlerdir. On *S. flexneri*’nin 1’i 2001; 1’i 2008 ve 8’i 2009 yılında izole edilen kökenlerdir. Bir *S. dysenteriae* kökeni 2009 yılında izole edildi.

Tablo 4.1. Çalışmaya alınan *Shigella* türlerinin yıllara göre dağılımı

İzolasyon Tarihi	İzolat sayısı			
	<i>S. sonnei</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. dysenteriae</i>	Toplam
2001	22 (%95,6)	1 (%4,4)	-	23
2008	9 (%90)	1 (%10)	-	10
2009	18 (%66,6)	8 (%29,6)	1 (%3,7)	27
Toplam	49 (%81,6)	10 (%16,6)	1 (%1,6)	60

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi ve Antibiyotik Direnç Modelleri

Çalışmaya alınan 60 *Shigella* kökeninin disk diffüzyon yöntemi ile antibiyotiklere in-vitro dirençleri incelendiğinde ampisiline 16 (%26,6), amoksisilin/klavulonik asite 10 (%16,6), kloramfenikole 9 (%15), nalidiksik asite 6 (%10), sefalotine 14 (%23,3), sefotaksime 4 (%6,6), tetrasikline 4 (%68,3), trimetoprim/sülfametoksazole 55 (%91,6) köken dirençli bulundu.

İncelenen *S. sonnei* izolatlarının 6’sı (%12,2) ampisiline, 1’i (%2) amoksisilin/klavulonik asite, 6’sı (%12,2) nalidiksik asite, 13’ü (%26,5) sefalotine, 4’ü (%8,1) sefotaksime, 32’si (%65,3) tetrasikline, 48’i (%97,9) trimetoprim/sülfametoksazole dirençli bulundu. İzolatların 41’inde çoklu ilaç direnci gözlemlendi (%83,6).

S. flexneri izolatlarının 10’u (%100) ampisiline, 9’u (%90) amoksisilin/klavulonik asite, 9’u (%90) kloramfenikole, 1’i (%10) sefalotine, 9’u (%90) tetrasikline, 9’u (%90) trimetoprim/sülfametoksazole dirençli bulundu. İzolatların hepsinde çoklu ilaç direnci görüldü (%100). *S. flexneri*’de ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit,

kloramfenikol direnci *S. sonnei*'ye göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek bulundu ($p<0.001$).

2009 yılında Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen ve bu çalışmanın tek *S. dysenteriae* kökeni olan izolat incelenen tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu.

Çalışmaya alınan *Shigella* kökenlerinin hiçbirinde gentamisin, seftazidim ve siprofloksasin direnci görülmedi. *S. sonnei* ve *S. flexneri* türlerinde antibiyotiklere dirençli kökenlerin sayı ve oranı tablo 4.2'de görülmektedir.

Tablo 4.2. *Shigella* türlerinde antibiyotiklere dirençli kökenlerin sayı ve oranı

Antibiyotik	<i>S. sonnei</i>	<i>S. flexneri</i>
	(n:49)	(n:10)
	n (%)	n (%)
Ampisilin (A)	6 (12,2)	10 (100)
Amoksisilin/Klavulonik asit (A/K)	1 (2,0)	9 (90)
Gentamisin (G)	-	-
Kloramfenikol (C)	-	2 (20)
Nalidiksik asit (N)	6 (12,2)	7 (70)
Sefalotin (Cf)	13 (26,5)	1 (10)
Sefotaksim (Ct)	4 (8,1)	-
Seftazidim (Cz)	-	-
Siprofloksasin (Cip)	-	-
Tetrasiklin (T)	32 (65,3)	9 (90)
Trimetoprim/Sülfametoksazol (Sxt)	48 (97,9)	9 (90)

2001 *S. sonnei* izolatlarından 1'i (%4,5) nalidiksik asite, 4'ü (%18,1) sefalotine, 20'si (%90,9) tetrasikline, 22'si (%100) trimetoprim/sülfametoksazole dirençli bulundu. İzolatların 21'inde (%95,4) çoklu ilaç direnci gözlemlendi.

2008 *S. sonnei* izolatlarından 2'si (%22,2) ampisiline, 1'i (%11,1) amoksisilin/klavulonik asite, 2'si (%22,2) sefalotine, 2'si (%22,2) tetrasikline, 8'i (%88,8) trimetoprim/sülfametoksazole dirençli bulundu. İzolatların 5'inde (%55,5) çoklu ilaç direnci gözlemlendi.

2009 *S. sonnei* izolatlarından 4'ü (%22,2) ampisiline, 5'i (%27,7) nalidiksik asite, 7'si (%38,8) sefalotine, 4'ü (%22,2) sefotaksime, 10'u (%55,5) tetrasikline, 18'i (%100) trimetoprim/sülfametoksazole dirençli bulundu. İzolatların 15'inde çoklu ilaç direnci gözlemlendi (%83,3). *S. sonnei* kökenlerinde yıllara göre nalidiksik asit ve sefotaksim direnç artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). *S. sonnei* kökenlerinde yıllara göre antibiyotiklere direnç durumu tablo 4.3'de görülmektedir.

Tablo 4.3. 2001, 2008 ve 2009 *S. sonnei* izolatlarında antibiyotiklere dirençli kökenlerin sayısı ve oranı

Antibiyotik	<i>S. sonnei</i>			
	2001 (n:22) n (%)	2008 (n:9) n (%)	2009 (n:18) n (%)	Toplam (n:49) n (%)
A	-	2 (22,2)	4 (22,2)	6 (12,2)
A/K	-	1 (11,1)	-	1 (2,0)
G	-	-	-	-
C	-	-	-	-
N	1 (4,5)	-	5 (27,7)	6 (12,2)
Cf	4 (18,1)	2 (22,2)	7 (38,8)	13 (26,5)
Ct	-	-	4 (22,2)	4 (8,1)
Cz	-	-	-	-
Cip	-	-	-	-
T	20 (90,9)	2 (22,2)	10 (55,5)	32 (65,3)
Sxt	22 (100)	8 (88,8)	18 (100)	48 (97,9)

A: Ampisilin, A/K: Amoksisilin/Klavulonik asit, G: Gentamisin, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksik asit, Cf: Sefalotin, Ct: Sefotaksim, Cz: Seftazidim, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim/Sülfametoksazol.

2001 ve 2008 *S. flexneri* izolatları; amoksisilin/klavulonik asite, ampisiline, tetrasikline, kloramfenikole, trimetoprim/sülfametoksazole dirençli bulundu. 2009 *S. flexneri* izolatlarından 8'i (%100) ampisiline, 7'si (%87,5) amoksisilin/ klavulonik asite, 7'si (%87,5) kloramfenikole, 1'i (%12,5) sefalotine, 7'si (%87,5) tetrasikline, 7'si (%87,5) trimetoprim/sülfametoksazole dirençli bulundu. İzolatların hepsinde çoklu ilaç direnci gözlemlendi. *S. flexneri* kökenlerinde yıllara göre antibiyotiklere direnç durumu tablo 4.4'de görülmektedir.

Tablo 4.4. 2001, 2008 ve 2009 *S. flexneri* izolatlarında antibiyotiklere dirençli kökenlerin sayısı ve oranı

Antibiyotik	<i>S. flexneri</i>			
	2001 (n:1) n (%)	2008 (n:1) n (%)	2009 (n:8) n (%)	Toplam (n:10) n (%)
A	1 (100)	1 (100)	8 (100)	10 (100)
A/K	1 (100)	1 (100)	7 (87,5)	9 (90)
G	-	-	-	-
C	1 (100)	1 (100)	7 (87,5)	9 (90)
N	-	-	-	-
Cf	-	-	1 (12,5)	1 (10)
Ct	-	-	-	-
Cz	-	-	-	-
Cip	-	-	-	-
T	1 (100)	1 (100)	7 (87,5)	9 (90)
Sxt	1 (100)	1 (100)	7 (87,5)	9 (90)

A: Ampisilin, A/K: Amoksisilin/Klavulonik asit, G: Gentamisin, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksik asit, Cf: Sefalotin, Ct: Sefotaksim, Cz: Seftazidim, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim/Sülfametoksazol.

S. sonnei izolatlarında 12 farklı antibiyotik direnç modeli izlendi. En sık görülen tetrasiklin ve trimetoprim/sülfametoksazol direnç modelini (T Sxt) 23 (%46,9) köken gösterdi. Fenotipik tiplendirme yöntemi olarak uygulanan antibiyotik direnç tiplendirimi yönteminin ayırım gücü Simpson'un farklılık indeksine dayalı formülü ile hesaplandı. Yöntemin ayırım gücü 0,75 bulundu.

2001 *S. sonnei* izolatlarında 4 antibiyotik direnç modeli gözlemlendi. En sık görülen trimetoprim/sülfametoksazol direnç modelini (Sxt) 16 (%72,7) köken gösterdi. Yöntemin ayırım gücü 0,46 bulundu. 2008 *S. sonnei* izolatlarında 5 antibiyotik direnç modeli gözlemlendi. En sık görülen trimetoprim/sülfametoksazol direnç modelini

(Sxt) 4 (%44,4) köken gösterdi. Yöntemin ayırım gücü 0,81 bulundu. 2009 *S. sonnei* izolatlarında 10 antibiyotik direnç modeli gözlemlendi. En sık görülen tetrasiklin ve trimetoprim/sülfametoksazol direnci modelini (T Sxt) 5 (%27,7) köken gösterdi. Yöntemin ayırım gücü 0,91 bulundu. *S. sonnei* kökenlerinde yıllara göre antibiyotik direnç modelleri tablo 4.5’de görülmektedir.

Tablo 4.5. 2001, 2008 ve 2009 *S. sonnei* izolatlarında görülen antibiyotik direnç modelleri ve bu modellere sahip kökenlerin sayısı ve oranı

Antibiyotik Direnç Modeli	<i>S. sonnei</i>			
	2001 n(%)	2008 n(%)	2009 n(%)	Toplam n(%)
Hepsine Duyarlı	-	-	-	-
A A/K Cf	-	1 (11,1)	-	1 (2,0)
A Cf Ct N T Sxt	-	-	1 (5,5)	1(2,0)
A Cf Ct T Sxt	-	-	1 (5,5)	1(2,0)
A Cf Ct Sxt	-	-	1 (5,5)	1(2,0)
A Ct N T Sxt	-	-	1 (5,5)	1(2,0)
A Sxt	-	1 (11,1)	-	1(2,0)
Cf T Sxt	4 (18,1)	-	1 (5,5)	5 (10,2)
Cf Sxt	-	1 (11,1)	2 (11,1)	3 (6,1)
N T Sxt	-	-	1 (5,5)	1(2,0)
N Sxt	1 (4,5)	-	2 (11,1)	3 (6,1)
T Sxt	16 (72,7)	2 (22,2)	5 (27,7)	23 (46,9)
Sxt	1 (4,5)	4 (44,4)	3 (16,6)	8 (16,3)

A: Ampisilin, A/K: Amoksisilin/Klavulonik asit, G: Gentamisin, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksik asit, Cf: Sefalotin, Ct: Sefotaksim, Cz: Seftazidim, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim/Sülfametoksazol

S. flexneri izolatlarında 4 farklı antibiyotik direnç modeli izlendi. En sık görülen ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, kloramfenikol, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfametoksazol direnç modelini (A A/K C T Sxt) 7 köken (%70) gösterdi. Antibiyotik direnç tiplendirimi yönteminin ayırım gücü 0,54 bulundu.

2001 ve 2008 yıllarındaki birer *S. flexneri* izolatında ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, kloramfenikol, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfametoksazol direnç modeli (A A/K C T Sxt) izlendi. 2009 *S. flexneri* izolatlarında 4 antibiyotik direnç modeli gözlemlendi. En sık görülen ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, kloramfenikol, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfametoksazol direnç modelini (A A/K C T Sxt) 5 (%62,5) köken gösterdi. Yöntemin ayırım gücü 0,65 bulundu. *S. flexneri* kökenlerinde yıllara göre antibiyotik direnç modelleri tablo 4.6'da görülmektedir.

Tablo 4.6. 2001, 2008 ve 2009 *S. flexneri* izolatlarında görülen antibiyotik direnç modelleri ve bu modellere sahip kökenlerin sayısı ve oranı

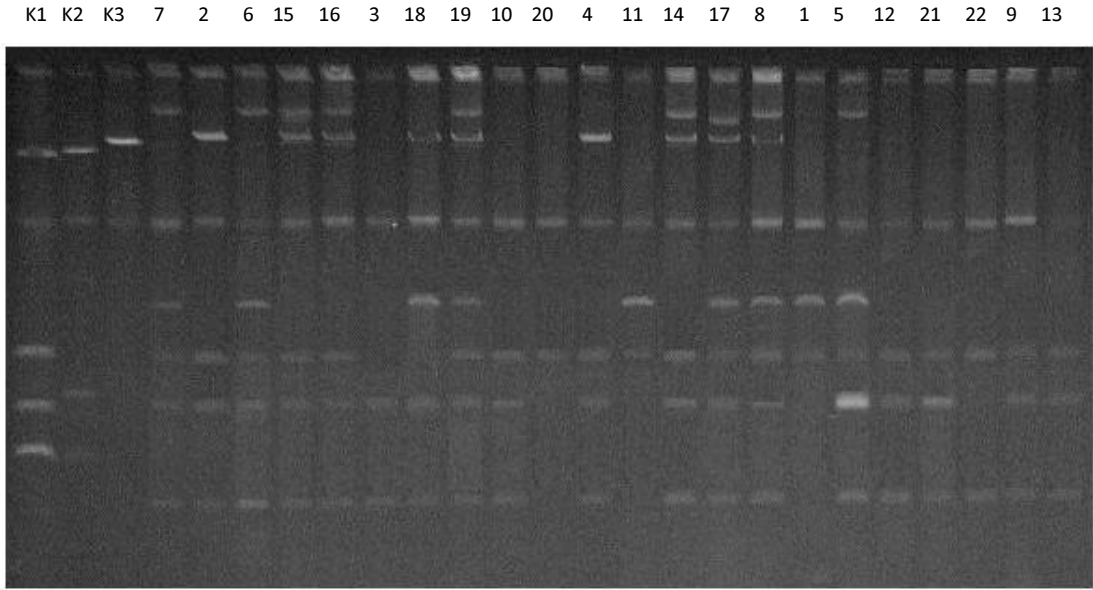
Antibiyotik Direnç Modeli	<i>S. flexneri</i>			
	2001 n (%)	2008 n (%)	2009 n (%)	Toplam n (%)
Hepsine Duyarlı	-	-	-	-
A A/K C T Sxt	1 (100)	1 (100)	5 (62,5)	7 (70)
A C Cf T Sxt	-	-	1 (12,5)	1 (10)
A A/K C T	-	-	1 (12,5)	1 (10)
A A/K Sxt	-	-	1 (12,5)	1 (10)

A: Ampisilin, A/K: Amoksisilin/Klavulonik asit, G: Gentamisin, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksik asit, Cf: Sefalotin, Ct: Sefotaksim, Cz: Seftazidim, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim/Sülfametoksazol

4.3. Plazmidler ve Plazmid Profilleri

Çalışmaya alınan *S. sonnei* kökenlerinin 1’den 7’ye kadar değişen sayı ve büyüklükte plazmid taşıdığı görüldü. Plazmidlerin en büyüğü 200, en küçüğü 3 kb büyüklüğünde bulundu. En yaygın görülen 4 kb’lık plazmid, 43 (%87,7) köken tarafından taşınmaktaydı.

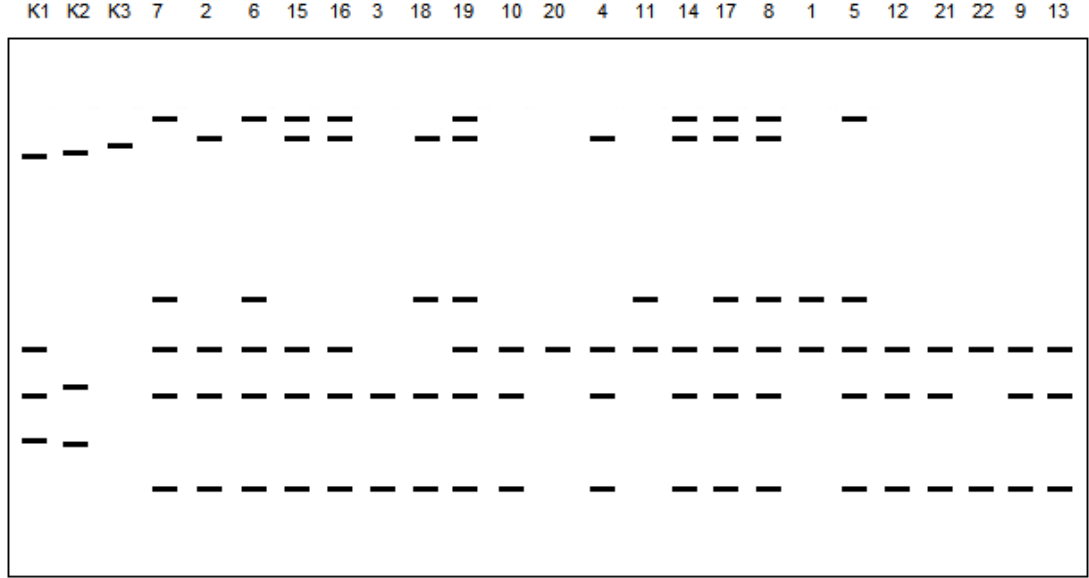
S. sonnei’nin 2001 yılı izolatlarının 1’den 6’ya kadar değişen sayı ve büyüklükte plazmid taşıdığı görüldü. Plazmidlerin en büyüğü 200, en küçüğü 4 kb büyüklüğünde bulundu. En yaygın olan 7 kb’lık plazmid, 20 (%90,9) kökende görüldü. Şekil 4.1’de 2001 yılı *S. sonnei* izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 4.1. *S. sonnei*’nin 2001 yılı izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı. K1. *E. coli* V 517, K2. Standart *S. Enteritidis* kökeni, K3. Standart *S. Typhimurium* kökeni, incelenen 22 *S. sonnei* kökeni.

Şekilde görülen *S. sonnei* 2001 yılı kökenlerinden 7 no’lu izolatın 200; 15; 7; 5,5 ve 4 kb büyüklüğünde 5 plazmidi bulunmaktadır. 2 no’lu izolat 120; 7; 5,5 ve 4 kb büyüklüğünde 4 plazmid taşımaktadır. 20 no’lu izolatın 7 kb’lık tek plazmidini

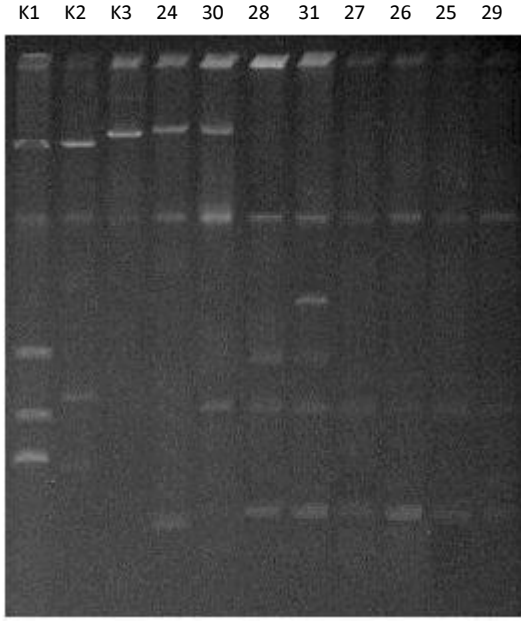
görülmektedir. Şekil 4.2’de *S. sonnei*’nin 2001 yılı izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı şematize edilerek gösterilmektedir.



Şekil 4.2. 2001 *S. sonnei* plazmid elektroforez fotoğrafının (Şekil 4.1) şematik görünümü.

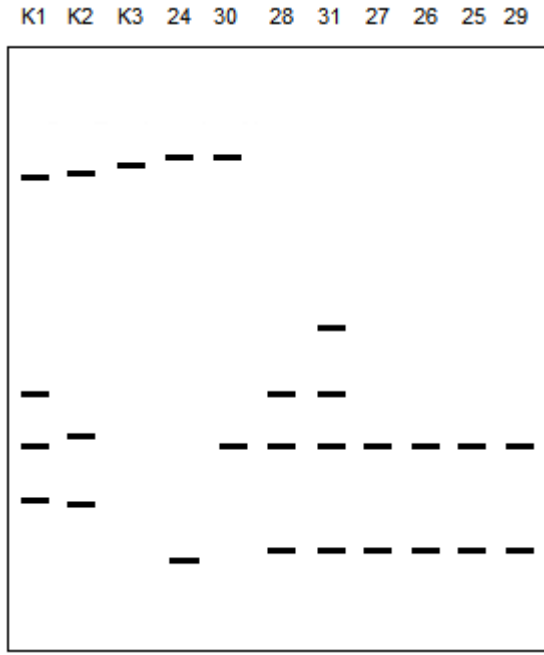
K1. 53,7; 7,2; 5,6; 5,1 kb, **K2.** 57; 5,8; 4,8 kb, **K3.** 90 kb, **7.** 200; 15; 7; 5,5; 4 kb, **2.** 120; 7; 5,5; 4 kb, **6.** 200; 15; 7; 5,5; 4 kb, **15.** 200; 120; 7; 5,5; 4 kb, **16.** 200; 120; 7; 5,5; 4 kb, **3.** 5,5; 4 kb, **18.** 120; 15; 5,5; 4 kb, **19.** 200; 120; 15; 7; 5,5; 4 kb, **10.** 7; 5,5; 4 kb, **20.** 7 kb, **4.** 120; 7; 5,5; 4 kb, **11.** 15; 7 kb, **14.** 200; 120; 7; 5,5; 4 kb, **17.** 200; 120; 15; 7; 5,5; 4 kb, **8.** 200; 120; 15; 7; 5,5; 4 kb, **1.** 15; 7 kb, **5.** 200; 15; 7; 5,5; 4 kb, **12.** 7; 5,5; 4 kb, **21.** 7; 5,5; 4 kb, **22.** 7; 4 kb, **9.** 7; 5,5; 4 kb, **13.** 7; 5,5; 4 kb.

S. sonnei’nin 2008 yılı izolatlarının 1’den 4’e kadar değişen sayı ve büyüklükte plazmid taşıdığı görüldü. Plazmidlerin en büyüğü 120, en küçüğü 3,5 kb büyüklüğünde bulundu. En yaygın olan 5,5 ve 4 kb’lık plazmid 7 (%77,7) kökünde görüldü. Şekil 4.3’de 2008 yılı *S. sonnei* izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 4.3. *S. sonnei*'nin 2008 yılı izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı. K1. *E. coli* V 517, K2. Standart *S. Enteritidis* kökeni, K3. Standart *S. Typhimurium* kökeni, incelenen 9 *S. sonnei* kökeni.

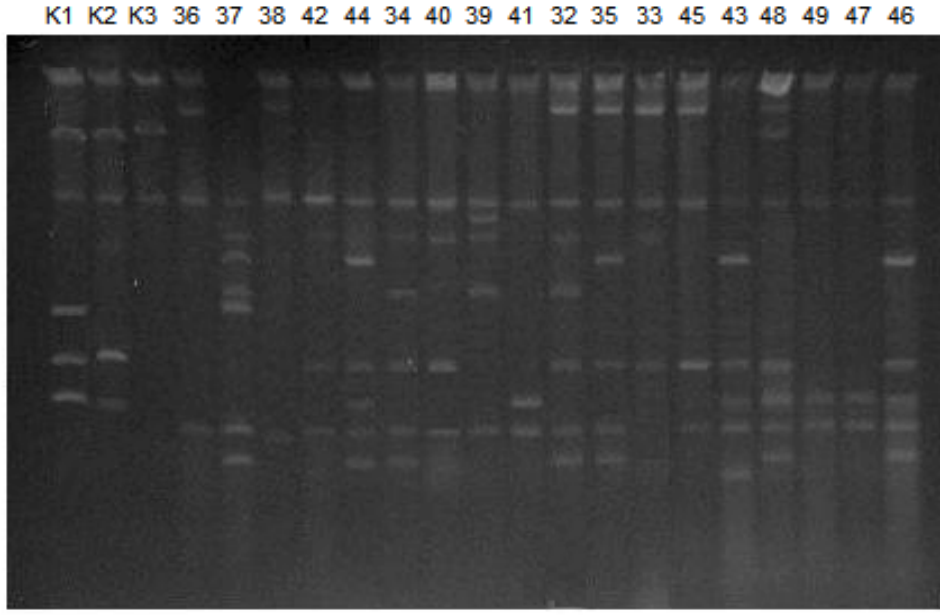
Şekilde görülen *S. sonnei* 2008 yılı kökenlerinden 24 no'lu izolatın 120 ve 3,5 kb büyüklüğünde 2 plazmidi bulunmaktadır. 27 no'lu izolat 5,5 ve 4 kb büyüklüğünde 2 plazmid taşımaktadır. 31 no'lu izolatın 15; 7; 5,5 ve 4 kb büyüklüğünde 4 plazmid taşıdığı görülmektedir. Şekil 4.4'de *S. sonnei*'nin 2008 yılı izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı şematize edilerek gösterilmektedir.



Şekil 4.4. 2008 *S. sonnei* plazmid elektroforez fotoğrafının (Şekil 4.3) şematik görünümü.

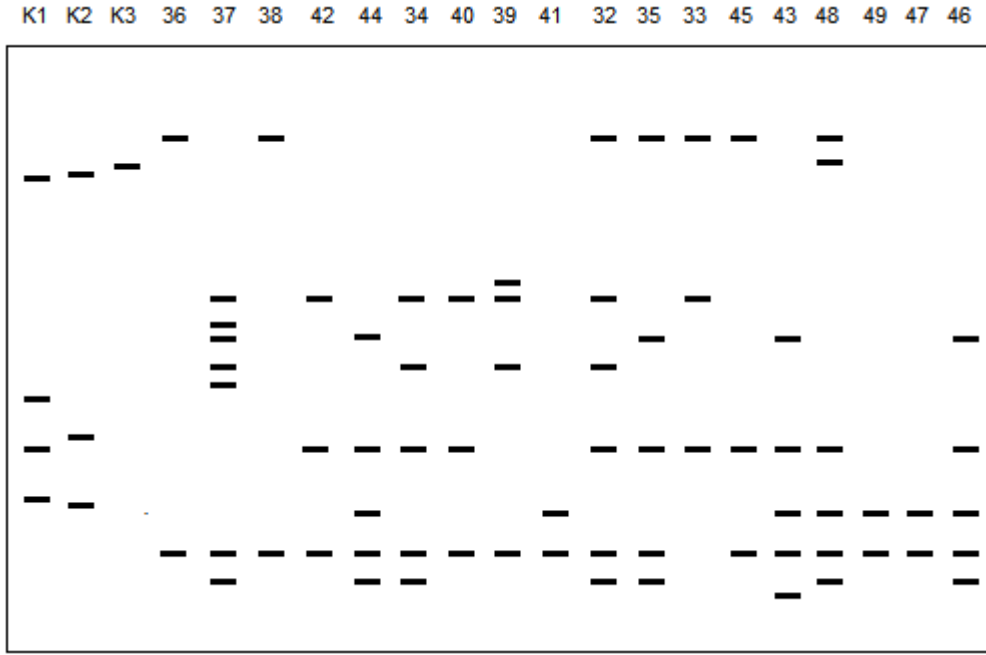
K1. 53,7; 7,2; 5,6; 5,1 kb, **K2.** 57; 5,8; 4,8 kb, **K3.** 90 kb, **24.** 120; 3,5 kb, **30.** 15 kb, **28.** 7; 5,5; 4 kb, **31.** 15; 7; 5,5; 4 kb, **27.** 5,5; 4 kb, **26.** 5,5; 4 kb, **25.** 5,5; 4 kb, **29.** 5,5; 4 kb.

S. sonnei'nin 2009 yılı izolatlarının 2'den 7'ye kadar değişen sayı ve büyüklükte plazmid taşıdığı görüldü. Plazmidlerin en büyüğü 200 en küçüğü 3 kb büyüklüğünde bulundu. En yaygın olan 4 kb'lık plazmid 17 (%94,4) kökünde görüldü. Şekil 4.5'de 2009 *S. sonnei* izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 4.1. *S. sonnei*'nin 2009 yılı izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı. K1. *E. coli* V 517, K2. Standart *S. Enteritidis* kökeni, K3. Standart *S. Typhimurium* kökeni, incelenen 18 *S. sonnei* kökeni.

Şekilde görülen *S. sonnei* 2009 yılı kökenlerinden 36 no'lu izolatın 200 ve 4 kb büyüklüğünde 2 plazmidi bulunmaktadır. 37 no'lu izolat 20; 18; 15; 12; 10; 4 ve 3,5 kb büyüklüğünde 7 plazmid taşımaktadır. 48 no'lu izolatın 200; 120; 5,5; 4,5; 4 ve 3,5 kb büyüklüğünde 6 plazmid taşıdığı görülmektedir. Şekil 4.6'da *S. sonnei*'nin 2009 yılı izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı şematize edilerek gösterilmektedir.



Şekil 4.6. 2009 *S. sonnei* plazmid elektroforez fotoğrafının (Şekil 4.5) şematik görünümü.

K1. 53,7; 7,2; 5,6; 5,1 kb, **K2.** 57; 5,8; 4,8 kb, **K3.** 90 kb, **36.** 200; 4 kb, **37.** 20; 18; 15; 12; 10; 4; 3,5 kb, **38.** 200; 4 kb, **42.** 20; 5,5; 4 kb, **44.** 15; 5,5; 4,5; 4; 3,5 kb, **34.** 20; 12; 5,5; 4; 3,5 kb, **40.** 20; 5,5; 4 kb, **39.** 25; 20; 12; 4 kb, **41.** 4,5; 4 kb, **32.** 200; 20; 12; 5,5; 4; 3,5 kb, **35.** 200; 15; 5,5; 4; 3,5 kb, **33.** 200; 20; 5,5 kb, **45.** 200; 5,5; 4 kb, **43.** 15; 5,5; 4,5; 4; 3 kb, **48.** 200; 120; 5,5; 4,5; 4; 3,5 kb, **49.** 4,5; 4 kb, **47.** 4,5; 4 kb, **46.** 15; 5,5; 4,5; 4; 3,5 kb.

İncelenen *S. sonnei* kökenleri arasında plazmid taşımayan suş izlenmedi. 2001’de 7 kb, 2008’de 5,5 ve 4 kb ve 2009’da 4 kb büyüklüğündeki plazmidlerin en yaygın görülen plazmidler olduğu bulundu. 120; 15; 5,5 ve 4 kb büyüklüğündeki plazmidler 2001, 2008 ve 2009 *S. sonnei* izolatlarında ortak görüldü. 25; 20; 18; 12; 10; 4,5 ve 3 kb büyüklüğündeki plazmidler 2009 *S. sonnei* izolatlarında izlenirken; 2001 ve 2008 *S. sonnei* izolatlarında izlenmedi. 3,5 kb büyüklüğündeki plazmid 2008 ve 2009 *S. sonnei* izolatlarında izlenirken; 2001 *S. sonnei* izolatlarında izlenmedi. 2008 yılı *S. sonnei* izolatlarında 200 kb büyüklüğündeki plazmid izlenmezken 2009 yılı *S. sonnei* izolatlarında 7 kb büyüklüğündeki plazmid izlenmedi. Tablo 4.7’de *S. sonnei*’nin 2001, 2008 ve 2009 yılı izolatlarının taşıdığı plazmidler ve bu plazmidleri taşıyan kökenlerin sayısı ve oranı görülmektedir.

Tablo 4.7. *S. sonnei* kökenlerinin taşıdığı plazmidler ve bu plazmidleri taşıyan kökenlerin sayısı ve oranı

Plazmidler (kb)	<i>S. sonnei</i>			
	2001 n (%)	2008 n (%)	2009 n (%)	Toplam n (%)
200	9 (40,9)	-	7 (38,8)	16 (32,6)
120	9(40,9)	2 (22,2)	1 (5,5)	12 (24,4)
25	-	-	1 (5,5)	1 (2,04)
20	-	-	7 (38,8)	7 (14,2)
18	-	-	1 (5,5)	1 (2,04)
15	9(40,9)	2 (22,2)	5 (27,7)	16 (32,6)
12	-	-	4 (22,2)	4 (8,1)
10	-	-	1 (5,5)	1 (2,04)
7	20 (90,9)	2 (22,2)	-	22 (44,8)
5,5	18 (81,8)	7 (77,7)	11 (61,1)	36 (73,4)
4,5	-	-	7 (38,8)	7 (14,2)
4	19 (86,3)	7 (77,7)	17 (94,4)	43 (87,7)
3,5	-	1 (11,1)	7 (38,8)	8 (16,3)
3	-	-	1 (5,5)	1 (2,04)

Çalışmaya alınan *S. sonnei* kökenlerinde toplam 27 plazmid profili izlendi. Plazmid profil analizi yönteminin ayırım gücü Simpson'un farklılık indeksine dayalı formülü ile hesaplandı. Yöntemin ayırım gücü 0,97 bulundu.

2001 *S. sonnei* kökenlerinde 10 plazmid profili gözlemlendi. En yaygın görülen plazmid profilinin 7; 5,5; 4 olduğu görüldü. Beş (%22,7) kökenin bu profile sahip olduğu izlendi. Yöntemin ayırım gücü 0,46 bulundu.

2008 *S. sonnei* kökenlerinde 6 plazmid profili gözlemlendi. En yaygın görülen plazmid profilinin 5,5; 4 olduğu görüldü. Dört (%44,4) suşun bu profile sahip olduğu izlendi. Yöntemin ayırım gücü 0,84 bulundu.

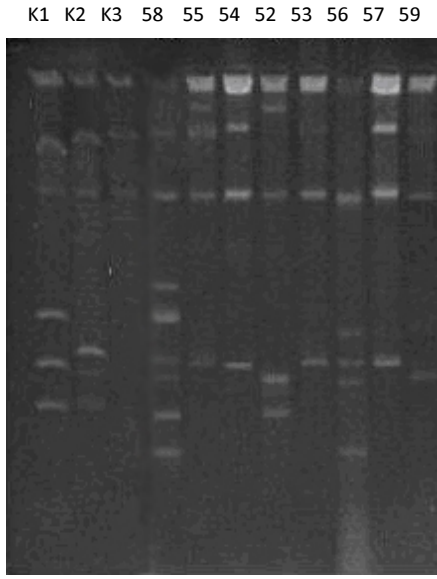
2001 ve 2008 yılı *S. sonnei* kökenlerinde görülen plazmid profillerinin hiçbiri 2009 yılı *S. sonnei* kökenlerinde görülmedi. Profillerden 5,5; 4 ve 7; 5,5; 4, 2001 ve 2008 yılı *S. sonnei* kökenlerinde görüldü. 2008 yılında 4 kökünde görülen (%44,4) ve en sık izlenen profil olan 5,5; 4 profili, 2001 yılında sadece 1 (%4,5) kökünde izlendi. 2001 yılında 5 (%22,7) kökünde izlenen 7; 5,5; 4 profili, 2008 yılında sadece 1 (%11,1) kökünde izlendi.

2009 *S. sonnei* kökenlerinde 13 plazmid profili gözlemlendi. En yaygın görülen plazmid profilinin 4,5; 4 olduğu görüldü. 3 (%16,6) suşun bu profile sahip olduğu izlendi. Yöntemin ayırım gücü 0,97 bulundu. Tablo 4.8'de *S. sonnei*'nin 2001, 2008 ve 2009 yılı izolatlarında gözlenen plazmid profilleri ve bu profillere sahip izolatların sayısı ve oranı görülmektedir.

Tablo 4.8. *S. sonnei* kökenlerinde görülen plazmid profilleri ve bu profile sahip kökenlerin sayısı ve oranı

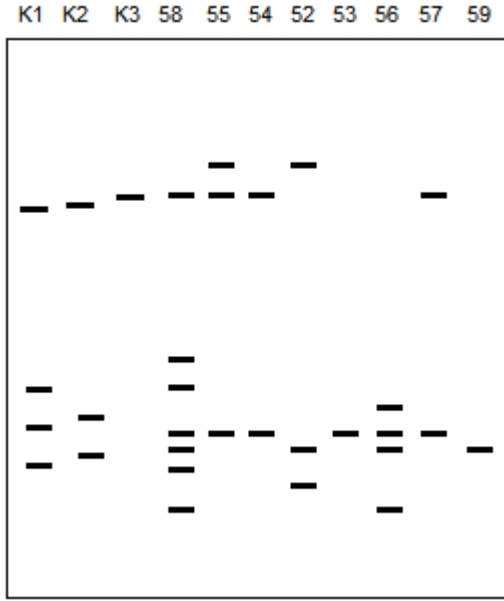
Plazmid profili	<i>S. sonnei</i>			
	2001 n (%)	2008 n (%)	2009 n (%)	Toplam n (%)
200; 120; 15; 7; 5,5; 4	3 (13,6)	-	-	3 (6,1)
200; 120; 7; 5,5; 4	3 (13,6)	-	-	3 (6,1)
200; 120; 5,5; 5; 4,5; 4; 3,5	-	-	1 (5,5)	1 (2,0)
200; 20; 12; 5,5; 4; 3,5	-	-	1 (5,5)	1 (2,0)
200; 20; 5,5	-	-	1 (5,5)	1 (2,0)
200; 15; 7; 5,5; 4	3 (13,6)	-	-	3 (6,1)
200; 15; 5,5; 4; 3,5	-	-	1 (5,5)	1 (2,0)
200; 5,5; 4	-	-	1 (5,5)	1 (2,0)
200; 4	-	-	2 (11,1)	2 (4,0)
120; 15; 5,5; 4	1 (4,5)	-	-	1 (2,0)
120; 7; 5,5; 4	2 (9,09)	-	-	2 (4,0)
120; 4	-	1 (11,1)	-	1 (2,0)
120; 3,5	-	1 (11,1)	-	1 (2,0)
25; 20; 12; 4	-	-	1 (5,5)	1 (2,0)
20; 18; 15; 12; 10; 4; 3,5	-	-	1 (5,5)	1 (2,0)
20; 12; 5,5; 4; 3,5	-	-	1 (5,5)	1 (2,0)
20; 5,5; 4	-	-	2 (11,1)	2 (4,0)
15	-	1 (11,1)	-	1 (2,0)
5,5; 4	1 (4,5)	4 (44,4)	-	5 (10,2)
15; 7	2 (9,09)	-	-	2 (4,0)
15; 7; 5,5; 4	-	1 (11,1)	-	1 (2,0)
15; 5,5; 4,5; 4; 3,5	-	-	2 (11,1)	2 (4,0)
15; 5,5; 4,5; 4; 3	-	-	1 (5,5)	1 (2,0)
7	1 (4,5)	-	-	1 (2,0)
7; 5,5; 4	5 (22,7)	1 (11,1)	-	6 (12,2)
7; 4	1 (4,5)	-	-	1 (2,0)
4,5; 4	-	-	3 (16,6)	3 (6,1)

2001 yılında izole edilen *S. flexneri* kökeninin 120 ve 5,1 kb büyüklüğünde plazmid taşıdığı görüldü. 2008 yılında izole edilen *S. flexneri* kökeninin 4 kb büyüklüğünde tek plazmid taşıdığı görüldü. 2009 *S. flexneri* izolatlarının 1’den 7’ye kadar değişen sayı ve büyüklükte plazmid taşıdığı görüldü. Plazmidlerin en büyüğü 200, en küçüğü 3,5 kb arasında değişmekteydi. En yaygın görülen 5 kb’lık plazmid 6 (%75) kökünde izlendi. Şekil 4.7’de 2009 *S. flexneri* izolatlarının taşıdığı plazmidler görülmektedir.



Şekil 4.7. *S. flexneri*’nin 2009 yılı izolatlarının plazmid elektroforez fotoğrafı. K1. *E. coli* V 517, K2. Standart *S. Enteritidis* kökeni, K3. Standart *S. Typhimurium* kökeni, incelenen 8 *S. flexneri* kökeni.

Şekil 4.8’de görülen *S. flexneri* 2009 yılı kökenlerinden 58 no’lu izolatin 120; 12; 7; 5; 4,5; 4; 3,5 kb büyüklüğünde 7 plazmidi, 55 no’lu izolatin 200, 120 ve 5 kb büyüklüğünde 3 plazmidi bulunmaktadır.



Şekil 4.8. 2009 *S. flexneri* plazmid elektroforez fotoğrafının (Şekil 4.7) şematik görünümü.

K1. 53,7; 7,2; 5,6; 5,1 kb, **K2.** 57; 5,8; 4,8 kb, **K3.** 90 kb, **58.** 120; 12; 7; 5; 4,5; 4; 3,5 kb, **55.** 200; 120; 5 kb, **54.** 120; 5 kb, **52.** 200; 4,5; 4 kb, **53.** 5 kb, **56.** 5,5; 5; 4,5; 3,5 kb, **57.** 120; 5 kb, **59.** 4,5 kb.

İncelenen *S. flexneri* kökenleri arasında plazmid taşımayan köken izlenmedi. 2009 yılı *S. flexneri* izolatlarında 5 kb büyüklüğündeki plazmidin en yaygın görülen plazmid olduğu bulundu. Tablo 4.9' da *S. flexneri*'nin 2001, 2008 ve 2009 yılı izolatlarının taşıdığı plazmidler ve bu plazmidleri taşıyan kökenlerin sayısı ve oranı görülmektedir.

Tablo 4.9. *S. flexneri* kökenlerinin taşıdığı plazmidler ve bu plazmidleri taşıyan kökenlerin sayısı ve oranı

Plazmidler (kb)	<i>S. flexneri</i>			
	2001 n (%)	2008 n (%)	2009 n (%)	Toplam n (%)
200	-	-	2 (25)	2 (20)
120	1 (100)	-	3 (37,5)	4 (40)
12	-	-	1 (12,5)	1 (10)
7	-	-	1 (12,5)	1 (10)
5,5	-	-	1 (12,5)	1 (10)
5,1	1 (100)	-	-	1 (10)
5	-	-	6 (75)	6 (60)
4,5	-	-	4 (50)	4 (40)
4	-	1 (100)	2 (25)	3 (30)
3,5	-	-	2 (25)	2 (20)

Çalışmaya alınan *S. flexneri* izolatlarında toplam 9 plazmid profili izlendi. Plazmid profil analizi yönteminin ayırım gücü 0,98 bulundu.

2009 *S. flexneri* kökenlerinde 7 plazmid profili görüldü. En yaygın görülen plazmid profilinin 120; 5 olduğu ve 2 (%12,5) kökenin bu profile sahip olduğu görüldü. Yöntemin ayırım gücü 0,97 bulundu. 2001 yılı *S. flexneri* izolatında görülen 120; 5,1 profili ve 2008 yılı *S. flexneri* izolatında görülen 4 kb büyüklüğündeki tek plazmidin oluşturduğu profil 2009 yılı *S. flexneri* izolatlarında görülmedi. Tablo 4.10'da *S. flexneri* 'nin 2001, 2008 ve 2009 yılı izolatlarında gözlenen plazmid profilleri ve bu profillere sahip izolatların sayısı ve oranı görülmektedir.

Tablo 4.10. *S. flexneri* kökenlerinde görülen plazmid profilleri ve bu profile sahip kökenlerin sayısı ve oranı

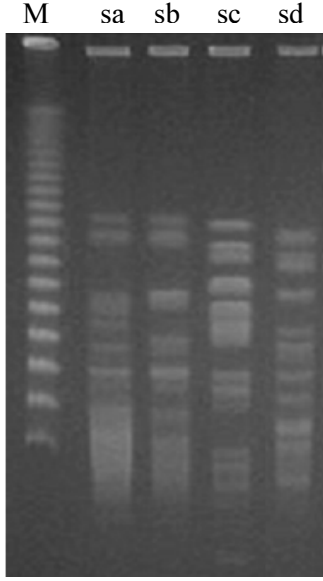
Plazmid profili	<i>S. flexneri</i>			
	2001 n (%)	2008 n (%)	2009 n (%)	Toplam n (%)
200; 120; 5	-	-	1 (12,5)	1 (10)
200; 4,5; 4	-	-	1 (12,5)	1 (10)
120; 12; 7; 5; 4,5; 4; 3,5	-	-	1 (12,5)	1 (10)
120; 5,1	1	-	-	1 (10)
120; 5	-	-	2 (25)	2 (20)
5,5; 5; 4,5; 3,5	-	-	1 (12,5)	1 (10)
5	-	-	1 (12,5)	1 (10)
4,5	-	-	1 (12,5)	1 (10)
4	-	1	-	1 (10)

4.4. PFGE Paternleri

XbaI enzimi kullanılarak uygulanan PFGE sonucunda elde edilen bantların *Shigella* kökenleri arasındaki genetik ilişkiyi belirlemek üzere bilgisayar programı (Gene Directory Software Programı) Dice katsayısı UPGMA metodu ve %1 tolerans değeri ile incelenerek oluşturulan dendogramlarla; incelenen 2001, 2008 ve 2009 yıllarına ait 49 *S. sonnei* izolatu 4 gruba ayrıldı. İzolatlardan 42'si (%85,7) sa, 5'i (%10,2) sb, 1'i (%2,0) sc ve 1'i (%2,0) sd paterni gösterdi. Yöntemin ayırım gücü 0,26 bulundu.

2001 yılında izole edilen 22 *S. sonnei* izolatu 2 gruba ayrıldı. İzolatlardan 21'i (%95,4) sa paterni ve 1'i (%4,5) sb paterni gösterdi. PFGE yönteminin ayırım gücü 0,10 bulundu. 2008 yılında elde edilen 9 *S. sonnei* izolatu 2 gruba ayrıldı. İzolatlardan 8'i (%88,8) sa ve 1'i (%11,1) sc paterni gösterdi. Yöntemin ayırım gücü 0,23 bulundu. 2009 yılında elde edilen 18 *S. sonnei* izolatu 3 gruba ayrıldı. İzolatlardan 13'ü (%72,2) sa, 4'ü (%2,5) sb ve 1'i (%1,3) sd paterni gösterdi.

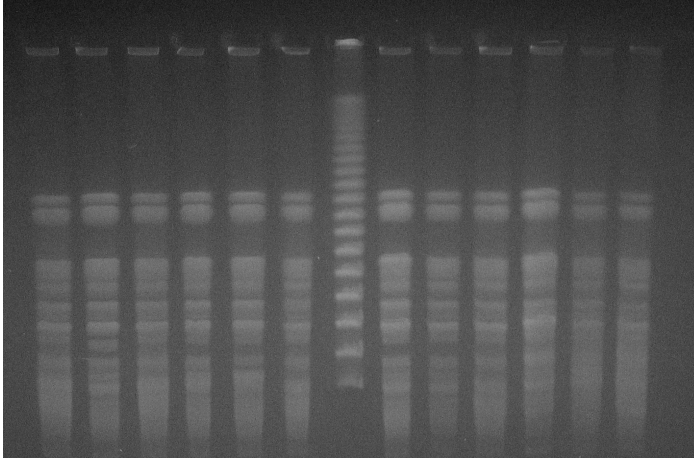
Yöntemin ayırım gücü 0,46 bulundu. Oluşturulan dendogramla sa, sb, sc, sd paternlerine ayrılan *S. sonnei* kökenlerinin bantları şekil 4.9'da görülmektedir.



Şekil 4.9. *S. sonnei* izolatlarında gözlenen PFGE paternlerinin bantları, M: Lambda ladder PFG Marker, sa, sb, sc, sd paternleri.

2001 yılında izole edilen 12 *S. sonnei* kökeninin *XbaI* enzimi ile kesildikten sonra PFGE'nde oluşturduğu bantlar şekil 4.10'da görülmektedir. Bu şuşların hepsi sa PFGE paterni göstermektedir.

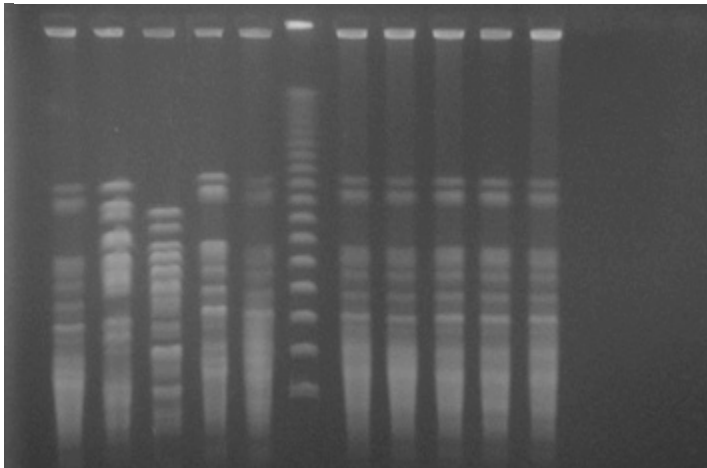
7 2 6 15 16 3 M 18 19 10 20 4 11



Şekil 4.10. 2001 *S. sonnei* izolatlarına ait PFGE bantları, M: Lambda ladder PFG Marker, incelenen 12 *S. sonnei* izolatı.

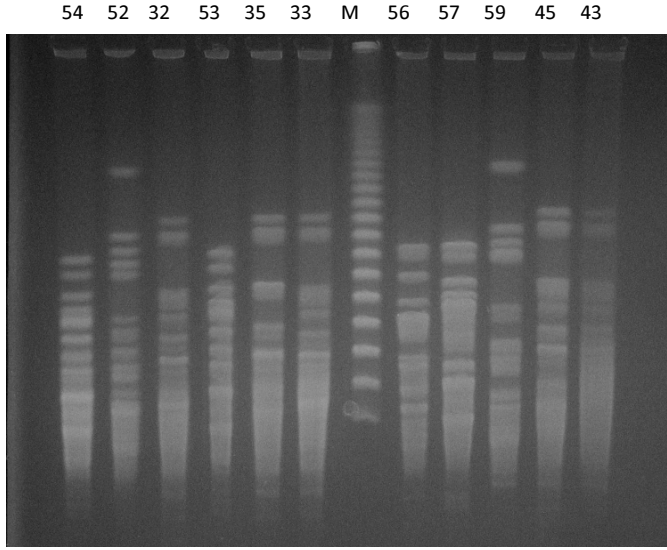
2008 yılında izole edilen 9 *S. sonnei* ve 1 *S. flexneri* kökeninin *XbaI* enzimi ile kesildikten sonra PFGE’nde oluşturduğu bantlar şekil 4.11’de görülmektedir. 51 numara ile gösterilen *S. flexneri* izolatı fa PFGE paterni göstermektedir. 30 numaralı *S. sonnei* izolatı sc, diğer *S. sonnei* suşları sa PFGE paterni göstermektedir.

24 30 51 28 31 M 27 26 25 29 23



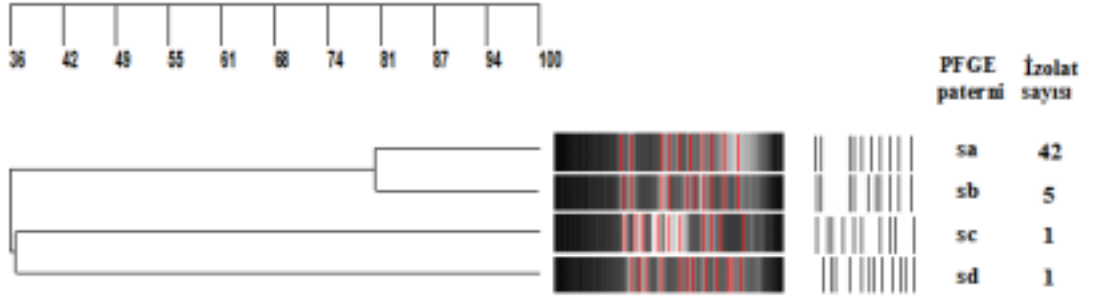
Şekil 4.11. 2008 *S. sonnei* ve *S. flexneri* izolatlarına ait PFGE bantları, M: Lambda ladder PFG Marker, *S. sonnei* (no: 24, 30, 28, 31 27, 26, 25, 29, 23) ve *S. flexneri* (no: 51) izolatları.

2009 yılında izole edilen 5 *S. sonnei* ve 6 *S. flexneri* kökeninin *Xba*I enzimi ile kesildikten sonra PFGE’nde oluşturduğu bantlar şekil 4.12’de görülmektedir.



Şekil 2 2009 *S. sonnei* ve *S. flexneri* izolatlarına ait PFGE bantları, M: Lambda ladder PFG Marker; *S. sonnei* (no: 32, 35, 33, 45, 43) ve *S. flexneri* (no: 54, 52, 53, 56, 57, 59) izolatları.

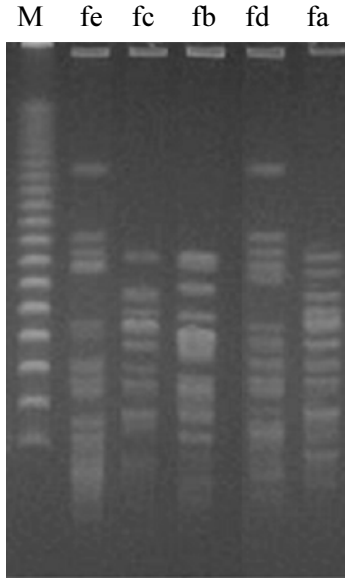
Şekil 4.13’de *S. sonnei* 2001, 2008 ve 2009 izolatlarının PFGE ile incelenmesi sonucu elde edilen bantların dendogramı görülmektedir. sa ve sb PFGE paterni benzerlik oranı 0,80; sc ve sd paterni benzerlik oranı 0,36; sa ve sc paterni benzerlik oranı 0,30; sa ve sd paterni benzerlik oranı 0,27; sb ve sd paterni benzerlik oranı 0,45; sb ve sc paterni benzerlik oranı 0,40 bulundu.



Şekil 4.3. *S. sonnei* izolatlarının PFGE ile elde edilen bantlarının dendrogramı (UPGMA yöntemi).

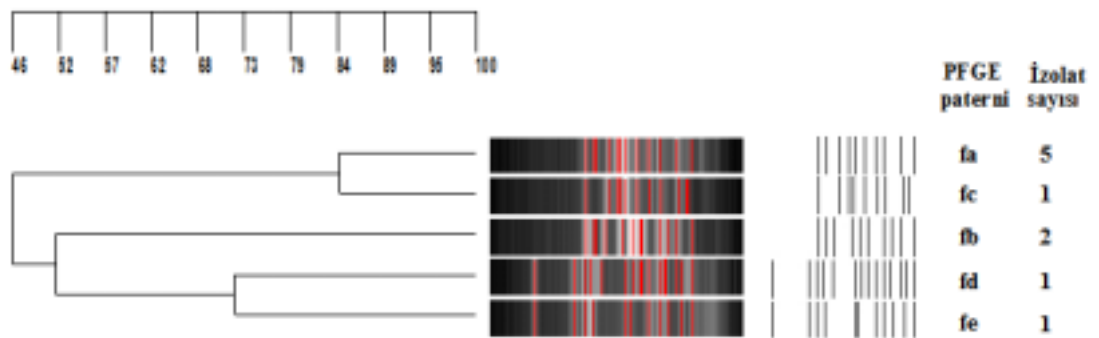
İncelenen 2001, 2008 ve 2009 yıllarına ait 10 *S. flexneri* izolatu 5 gruba ayrıldı. İzolatlardan 5'i (%50) fa, 2'si (%20) fb, 1'i (%10) fc, 1'i (%10) fd ve 1'i (%10) fe paterni gösterdi. Yöntemin ayırım gücü 0,76 bulundu.

2001 ve 2008 yılında elde edilen *S. flexneri* izolatları aynı PFGE paternini gösterdi (fa). 2009 yılında elde edilen 8 *S. flexneri* izolatları 5 gruba ayrıldı. İzolatlardan 3'ü (%37,5) fa, 2'si (%25) fb, 1'i (%12,5) fc, 1'i (%12,5) fd ve 1'i (%12,5) fe paterni gösterdi. Yöntemin ayırım gücü 0,83 bulundu. Oluşturulan dendrogramla fa, fb, fc, fd, fe paternlerine ayrılan *S. flexneri* kökenlerinin bantları şekil 4.14'de görülmektedir.



Şekil 4.14. *S. flexneri* izolatlarında gözlenen PFGE paternlerinin bantları, M: Lambda ladder PFG Marker, fe, fc, fd, fb, fa paternleri.

Şekil 4.15’de *S. flexneri* izolatlarının PFGE ile incelenmesi sonucu elde edilen bantların dendogramı görülmektedir. fa ve fc PFGE paterni benzerlik oranı 0,84; fd ve fe paterni 2009 *S. flexneri* izolatına ait olup benzerlik oranı 0,72 bulundu. Benzerlik oranları fa ve fb arasında 0,47; fa ve fd arasında 0,58; fa ve fe arasında 0,57; fc ve fb arasında 0,40; fd ve fc arasında 0,34; fc ve fe arasında 0,40; fb ve fd arasında 0,48 bulundu.



Şekil 4.15. *S. flexneri* izolatlarının PFGE ile elde edilen bantlarının dendogramı (UPGMA yöntemi)

4.5. Kökenlerin Antimikrobiyal Direnç Modelleri, Plazmid Profilleri ve PFGE Paternleri

2001 *S. sonnei* izolatlarının antimikrobiyal direnç modelleri, plazmid profilleri ve PFGE paternleri tablo 4.11’de gösterilmiştir.

Tablo 4.11. 2001 *S. sonnei* izolatlarının antimikrobiyal direnç modelleri, plazmid profilleri ve PFGE paternleri

İzolat no	İzolasyon Tarihi	Antimikrobiyal direnç modeli	Plazmid profili (kb)	PFGE paterni
1	26 08 2001	T Sxt	15; 7	sa
2	27 08 2001	T Sxt	120; 7; 5,5; 4	sa
3	27 08 2001	Sxt	5,5; 4	sa
4	27 08 2001	T Sxt	120; 7; 5,5; 4	sa
5	29 08 2001	Cf T Sxt	200; 15; 7; 5,5; 4	sa
6	31 08 2001	T Sxt	200; 15; 7; 5,5; 4	sa
7	03 09 2001	T Sxt	200; 15; 7; 5,5; 4	sa
8	03 09 2001	Cf T Sxt	200; 120; 15; 7; 5,5; 4	sa
9	03 09 2001	T Sxt	7; 5,5; 4	sa
10	05 09 2001	T Sxt	7; 5,5; 4	sa
11	06 09 2001	T Sxt	15; 7	sa
12	12 09 2001	T Sxt	7; 5,5; 4	sa
13	12 09 2001	T Sxt	7; 5,5; 4	sa
14	25 09 2001	T Sxt	200; 120; 7; 5,5; 4	sa
15	01 10 2001	T Sxt	200; 120; 7; 5,5; 4	sa
16	01 10 2001	T Sxt	200; 120; 7; 5,5; 4	sa
17	01 10 2001	Cf T Sxt	200; 120; 15; 7; 5,5; 4	sa
18	01 10 2001	N Sxt	120; 15; 5,5; 4	sa
19	01 10 2001	Cf T Sxt	200; 120; 15; 7; 5,5; 4	sa
20	02 10 2001	T Sxt	7	sa
21	03 10 2001	T Sxt	7; 5,5; 4	sa
22	12 10 2001	T Sxt	7; 4	sb

A: Ampisilin, A/K: Amoksisilin/Klavulonik asit, G: Gentamisin, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksik asit, Cf: Sefalotin, Ct: Sefotaksim, Cz: Seftazidim, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim/Sülfametoksazol

2008 *S. sonnei* izolatlarının antimikrobiyal direnç modeli, PFGE paterni ve plazmid profili sonuçları tablo 4.12’de gösterilmiştir.

Tablo 4.12. 2008 *S. sonnei* izolatlarının antimikrobiyal direnç modelleri, plazmid profilleri ve PFGE paternleri

İzolat no	İzolasyon Tarihi	Antimikrobiyal direnç modeli	Plazmid profili (kb)	PFGE paterni
23	04 08 2008	Sxt	120; 4	sa
24	02 09 2008	Sxt	120; 3,5	sa
25	05 09 2008	Cf Sxt	5,5; 4	sa
26	07 09 2008	Sxt	5,5; 4	sa
27	08 09 2008	Sxt	5,5; 4	sa
28	10 09 2008	T Sxt	7; 5,5; 4	sa
29	27 09 2008	A Sxt	5,5; 4	sa
30	06 10 2008	A A/K Cf	15	sc
31	10 10 2008	T Sxt	15; 7; 5,5; 4	sa

A: Ampisilin, A/K: Amoksisilin/Klavulonik asit, G: Gentamisin, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksik asit, Cf: Sefalotin, Ct: Sefotaksim, Cz: Seftazidim, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim/Sülfametoksazol

2009 *S. sonnei* izolatlarının antimikrobiyal direnç modeli, PFGE paterni ve plazmid profili sonuçları tablo 4.13’de gösterilmiştir. Kökenler sa, sb ve sd PFGE paternlerine dağılım göstermektedir.

Tablo 4.13. 2009 *S. sonnei* izolatlarının antimikrobiyal direnç modelleri, plazmid profilleri ve PFGE paternleri

İzolasyon no	İzolasyon Tarihi	Antimikrobiyal direnç modeli	Plazmid profili (kb)	PFGE paterni
32	22 07 2009	A Cf Ct T Sxt	200; 20; 12; 5,5; 4; 3,5	sa
33	02 08 2009	Sxt	200; 20; 5,5	sa
34	06 08 2009	T Sxt	20; 12; 5,5; 4; 3,5	sa
35	12 08 2009	A N Cf Ct T Sxt	200; 15; 5,5; 4; 3,5	sb
36	17 08 2009	N Sxt	200; 4	sb
37	23 08 2009	Sxt	20; 18; 15; 12; 10; 4; 3,5	sa
38	25 08 2009	A N Ct T Sxt	200; 4	sd
39	27 08 2009	N T Sxt	25; 20; 12; 4	sb
40	31 08 2009	Sxt	20; 5,5; 4	sa
41	31 08 2009	N Sxt	4,5; 4	sb
42	08 09 2009	Cf Sxt	20; 5,5; 4	sa
43	14 09 2009	T Sxt	15; 5,5; 4,5; 4; 3	sa
44	17 09 2009	T Sxt	15; 5,5; 4,5; 4; 3,5	sa
45	22 09 2009	A Cf Ct Sxt	200; 5,5; 4	sa
46	09 10 2009	Cf Sxt	15; 5,5; 4,5; 4; 3,5	sa
47	10 10 2009	Cf T Sxt	4,5; 4	sa
48	14 10 2009	T Sxt	200; 120; 5,5; 5; 4,5; 4; 3,5	sa
49	14 10 2009	T Sxt	4,5; 4	sa

A: Ampisilin, A/K: Amoksisilin/Klavulonik asit, G: Gentamisin, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksik asit, Cf: Sefalotin, Ct: Sefotaksim, Cz: Seftazidim, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim/Sülfametoksazol

Elde edilen veriler yöntemlerin beraber kullanımı ile tekrar değerlendirildi. Buna göre antibiyotik direnç tiplendirimi ve plazmid profil analizinin birlikte kullanımında ayırım gücü *S. sonnei* kökenleri için 0,97; antibiyotik direnç tiplendirimi ve PFGE yönteminin birlikte kullanımında ayırım gücü 0,79; plazmid profil analizi ve PFGE

yönteminin birlikte kullanımında ayırım gücü 0,97; tüm yöntemlerin beraber kullanıldığı durumda ayırım gücü 0,98 bulundu.

2001, 2008 ve 2009 *S. flexneri* izolatlarının antimikrobiyal direnç modelleri, plazmid profilleri ve PFGE paternleri tablo 4.14’de gösterilmiştir.

Tablo 4.14. 2001, 2008 ve 2009 *S. flexneri* izolatlarının antimikrobiyal direnç modelleri, plazmid profilleri ve PFGE paternleri

İzolasyon no	İzolasyon Tarihi	Antimikrobiyal direnç modeli	Plazmid profili (kb)	PFGE paterni
50	05 09 2001	A A/K C T Sxt	120; 5,1	fa
51	04 08 2008	A A/K C T Sxt	4	fa
52	19 07 2009	A C Cf T Sxt	200; 4,5; 4	fd
53	10 08 2009	A A/K C T Sxt	5	fa
54	15 08 2009	A A/K C T Sxt	120; 5	fa
55	22 08 2009	A A/K C T Sxt	200; 120; 5	fc
56	28 08 2009	A A/K C T	5,5; 5; 4,5; 3,5	fb
57	10 09 2009	A A/K Sxt	120; 5	fa
58	12 09 2009	A A/K C T Sxt	120; 12; 7; 5; 4,5; 4; 3,5	fb
59	20 09 2009	A A/K C T Sxt	4,5	fe

A: Ampisilin, A/K: Amoksisilin/Klavulonik asit, G: Gentamisin, C: Kloramfenikol, N: Nalidiksik asit, Cf: Sefalotin, Ct: Sefotaksim, Cz: Seftazidim, Cip: Siprofloksasin, T: Tetrasiklin, Sxt: Trimetoprim/Sülfametoksazol

S. flexneri kökenlerinin incelenmesinde elde edilen veriler yöntemlerin beraber kullanımı ile tekrar değerlendirildi. Antibiyotik direnç tiplendirimi ve plazmid profil analizinin birlikte kullanımında ayırım gücü 0,98; antibiyotik direnç tiplendirimi ve PFGE yönteminin birlikte kullanımında ayırım gücü 0,87; plazmid profil analizi ve PFGE yönteminin birlikte kullanımında ayırım gücü 0,98; üç yöntemin beraber kullanıldığı durumda ayırım gücü 1,0 bulundu.

S. dysenteriae izolatının antimikrobiyal direnç modeli, plazmid profili ve PFGE paterni tablo 4.15’de gösterilmiştir.

Tablo 4.15. *S. dysenteriae* izolatının antimikrobiyal direnç modeli, plazmid profili ve PFGE paterni

İzolat no	İzolasyon Tarihi	Antimikrobiyal direnç modeli	Plazmid profili (kb)	PFGE paterni
60	17 09 2009	Duyarlı	4,5	da

Duyarlı: Denenen tüm antimikrobiyallere duyarlı.

5. TARTIŞMA

Diyare ile seyreden hastalıklar, özellikle gelişmekte olan ülkelerde yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Birçok ülkede etyoloji, epidemiyoloji ve geçiş paternleri üzerine araştırmalar yapılarak diyareden korunmak için büyük çabalar sarfedilmektedir. Salgın araştırmaları yapmak; enterik patojenlerde bulaş yolları, risk faktörleri hakkında bilgi sağlamak ve salgınlarda kontrol stratejileri geliştirmek açısından önemlidir (Black ve Lanata, 2007).

Shigella virülansı yüksek bir patojendir. 100-200 bakterinin kontamine su ve yiyeceklerle alınması enfeksiyona neden olabilmektedir. İnsandan insana bulaş mümkün olmakta, uygunsuz hijyen koşullarında büyük salgınlara neden olabilmektedir. Tedavi almayan enfekte insanlar etkeni dışkıları ile 1-4 hafta kadar atarak etkenin yayılmasına neden olmaktadır (Dupont, 2010).

Shigella türleri çocuklarda gelişen ishallerin %10-50 kadarından sorumlu bulunmuştur. Dünyada yılda 165 milyon kişi *Shigella* ile enfekte olmaktadır. Bunların 100 milyonu gelişmekte olan ülkelerde görülmekte ve 1 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır (Dupont, 2010).

Ülkemizde enterik patojenlerin laboratuvar tanısı, doğrulama, tiplendirme ve sonuç analizinin standartlara uygun yapılmaması; hastalık bildiriminin yeterince önemsenmemesi nedeniyle ishal etyolojisi ve epidemiyolojisi hakkında güvenilir veri bulmak ve sağlıklı değerlendirme yapmak mümkün olmamaktadır (Öngen, 2006). Laboratuvar olanaklarına, kullanılan tekniklerin çeşitliliğine, bölgesel ve mevsimsel koşulların farklılığına bağlı olarak sonuçlar değişiklik gösterse de ishal etyolojisinin aydınlatılmasında bilimsel çalışmalardan yararlanmak gerekir.

Yağcı (1999) Ankara'da yaptığı çalışmada ishal şikayeti ile başvuran 400 hastanın dışkı örneğini incelemiş ve toplam 33 olguda bakteriyel etken üretmiştir. Bunların 23'ünde (%5,75) *Campylobacter* (21 *Campylobacter jejuni* ve 2 *Campylobacter*

coli), 8'inde (%2) *Salmonella* (3'ü *Salmonella* ser Typhimurium, 5'i *Salmonella* ser. Enteritidis) ve 2'sinde (%0,5) *Shigella* (*S. sonnei*) izole etmiştir.

Ekşi ve ark. (2007) Gaziantep'te 2000 yılında akut ishal yakınması ile başvuran beş yaşın altındaki 91 hastanın dışkı örneğini incelemiş, örneklerin 5 (%5,5)'inde bakteriyel etkenler izole etmişlerdir. Bakteriyel etkenlerin 2'si (%2,19) *Salmonella*, 3'ü (%3,29) *Shigella* bulunmuştur.

Öztürk ve ark. (1994) İstanbul'da 1890 ishalleri kapsayan çalışmalarında 578 vakada (%30,58) patojen bakteri saptamışlardır. Bunların 206'sını (%10,89) *Shigella*, 125'ini (%6,6) *Campylobacter*, 119'unu (%6,29) *Salmonella*, 62'sini (%5,35) EPEC, 51'ini (2,69) *Aeromonas* ve 15'ini (%0,79) diğer patojen bakteriler olarak bildirmişlerdir.

Günümüzde Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB) koordinasyonunda yürütülen 'Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA)' kapsamında ülke çapında birçok merkezin katılımıyla elde edilen verilere göre Ekim - Aralık 2007 tarihleri arasında incelenen enterik patojenlerin dağılımı *Shigella* %59,1; *Salmonella* %33,3; *E. coli* %1,5 *Citrobacter freundii* %0,9; *Escherichia fergussonii* %0,3 ve maya %4,6 şeklinde bulunmuştur (Güleşen ve Sevimli, 2008).

1989-2004 yıllarını kapsayan Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde 1989'da basilli dizanteri olgu sayısı 1551, ölüm sayısı 1 iken, 2004 yılında 605 olgu görülmüş, ölüm olgusu izlenmemiştir. Ancak laboratuvar tanı yetersizliği ve bildirim eksikliği nedeniyle gerçek rakamlara ulaşamamaktadır. Ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan çeşitli çalışmalarda ishal şikayeti ile başvuran hastaların dışkı örneklerinde *Shigella* izolasyon oranı %0,5-25 arasında değişmektedir. Salgın durumlarında izolasyon oranlarında artış izlenmektedir (Otkun ve ark., 1995; Yurdakök ve ark., 1997; Aysev ve Güriz, 1998; Büke ve ark., 1999; Yağcı, 1999; Kanan ve Aksüt, 2003; Demirtürk, 2004; Alıcı ve ark., 2006).

Şigelloz genellikle 6 aylık ve 10 yaş arası çocuklarda görülmektedir. İnfeksiyonların büyük kısmı 5 yaşın altındaki çocuklarda görülmekte olup yüksek mortalite ile seyretmektedir (Kotloff ve ark., 1999; Dupont, 2010). Bu çalışmada da *Shigella* izole edilen hastaların büyük çoğunluğunu çocuk yaş grubunun oluşturduğu görüldü; 60 hastanın 43'ü (% 71,6) 15 yaş ve altında bulundu. Hastaların 9'u (%15,0) 0-2 yaş arasında; 8'i (%13,3) 3-5 yaş arasında; 26'sı (%43,3) 6-15 yaş arasında; 12'si (%20) 16-30 yaş arasında; 2'si (%3,3) 31-45 yaş arasında; 3'ü (%5,0) 45 yaş ve üzerinde bulundu.

S. flexneri gelişmekte olan, *S. sonnei* ise gelişmiş ülkelerde en sık izole edilen türdür (Aysev, 2008; Alıcı ve ark., 2006; Black ve Lanata, 2007). Türkiye'de yapılan çeşitli araştırmalarda 1980 ve 1987 yılları arasında en çok izlenen türün *S. flexneri* olduğu, 1987'den sonra *S. sonnei* izolasyonunda sürekli bir artış görüldüğü saptanmıştır. 1990'dan sonra *S. sonnei* en sık izole edilen tür olarak birinci sıraya yerleşmiştir (Ceyhan ve ark., 1996; Aysev ve Güriz, 1998; Özmert ve ark., 2005; Alıcı ve ark., 2006; Pullukçu ve ark., 2007). *S. flexneri*'nin daha sık gözleendiği çalışmalar da vardır (Otkun ve ark., 1997; Birengel ve ark., 1998; Kaleli ve ark., 1998; Özkalp, 2000; Yazgı ve ark., 2001). UEPLA kapsamındaki ulusal verilere göre 2007 yılı *Shigella* türleri dağılımı sonuçları *S. sonnei* %89,6; *S. flexneri* %8,3; *S. boydii* %1,6 ve *S. dysenteriae* %0,5 olarak saptanmıştır (Güleşen ve Sevimli, 2008).

Bu çalışmada incelenen *Shigella* izolatlarında en sık görülen tür *S. sonnei* (%81,6) oldu. *S. flexneri* %16,6; *S. dysenteriae* ise %1,6 oranında izole edildi. *S. boydii* türüne rastlanmadı. 2001 yılında izole edilen 23 *Shigella* izolatının 22'si (%95,6) *S. sonnei*, 1'i (%4,3) *S. flexneri*; 2008 yılında izole edilen 10 *Shigella* izolatının 9'u (%90) *S. sonnei*, 1'i (%10) *S. flexneri* ve 2009 yılında izole edilen 27 *Shigella* izolatının 18'i (%66,6) *S. sonnei*, 8'i (%29,6) *S. flexneri*, 1'i (%3,7) *S. dysenteriae* bulundu.

Epidemiyolojik araştırmalarda izolatlar arasındaki ilişkileri araştırmak için tür düzeyinde tanımlama yeterli olmamaktadır. Hastane infeksiyonları ve toplumsal kaynaklı infeksiyonları belirlemek, salgın durumunda salgın kaynağını ve yayılma

yollarını belirlemek, kökenler arasındaki klonal ilişkileri ve genetik yakınlığı araştırmak, hastalarda görülen reaktivasyonu, reinfeksiyondan ayırt etmek, infekte popülasyondaki epidemik klonların sirkülasyonunu ve zaman içindeki prevalansını izleyerek epidemiyolojik sürveyans ve kontrol yöntemleri geliştirmek için fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemlerine başvurmak gerekir. Günümüzde epidemiyolojik çalışmalarda izolatları gen düzeyinde incelemeye olanak veren genotipik (moleküler) yöntemlerin kullanılması tercih edilmektedir (Pfaller, 2001; Arbeit, 2003; Van Belkum ve ark., 2007).

Bu çalışmada amacımız; 2001, 2008 ve 2009 yıllarında izole edilen *Shigella* türlerinin antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek ve bu izolatların epidemiyolojik tiplendirilmesinde antibiyotik duyarlılık modeli, PFGE ve plazmid profil analizi yöntemlerini kullanarak kendi içlerinde ve birbirleri ile olan ilişkilerini değerlendirmektir.

Dünyada ve ülkemizde *Shigella* kökenlerinde antimikrobiyal ilaçlara direnç oranları farklılık göstermektedir. Sivapalasingam ve ark. (2006) tarafından Amerika'da yapılan çalışmada 1999-2002 arasında 1,278 *S. sonnei* incelenmiş, ampisilin direnci %79, trimetoprim/sülfametoksazol direnci %48, amoksisilin/ klavulonik asit direnci %2, sefalotin direnci %7, nalidiksik asit direnci %1 bulunmuştur. Seftriakson ve siprofloksasin direnci izlenmemiştir.

Ashkenazi ve ark. (2003) İsrail' de yaptıkları çalışmada 1998-2000 yıllarında izole edilen *S. sonnei* izolatlarında %87 ampisilin direnci görülmüştür. İzolatların %97'sinde trimetoprim/sülfametoksazol, %89'unda tetrasiklin, %4'ünde kloramfenikol, %3'ünde nalidiksik asit, %0,4'ünde gentamisin, %0,2'sinde siprofloksasin, %0,9'unda sefiksim, %5'inde amoksisilin/klavulonik asit direnci bulunmuştur.

Vrints ve ark. (2009) Belçika'da yaptıkları 1990-2007 yıllarını kapsayan çalışmada *S. sonnei* izolatlarının ampisilin direncini %19,2 bulmuşlardır. Tetrasikline %59,3;

trimetoprim/sülfametoksazole %85,9; nalidiksik asite %3,8; kloramfenikole %3,7; amoksisilin/klavulonik asite %0,7; sefotaksime %0,2 oranında direnç bulmuşlardır.

Wu ve ark. (2009) Tayvan'da yaptıkları çalışmada 1996-2005 yılları arasında izole ettikleri *S. sonnei* kökenlerinde trimetoprim/sülfametoksazol direncini %50, ampisilin direncini %8,3 bulmuşlardır.

Türkiye'de Çiftçi ve ark. (2009) Afyon'da yaptıkları çalışmada 2002-2008 yıllarında izole edilen 139 *Shigella* suşunda %63 ampisilin, %23 trimetoprim/sülfametoksazol, %13 tetrasiklin, % 8 kloramfenikol direnci ile karşılaşmışlardır. Ayrıca bu çalışmada Türkiye'de ilk kez siprofloksasin direnci (%4) bildirilmiştir.

Pullukçu ve ark. (2007) İzmir'de yaptıkları çalışmada 1999-2006 yılları arasında izole ettikleri *S. sonnei* kökenlerinde %8 ampisilin, %1 kloramfenikol ve %84 trimetoprim/sülfametoksazol direnci izlemişlerdir.

Ankara'da yapılan çalışmalarda Aysev ve Güriz (1998) 1993-1996 yıllarında izole edilen 217 *S. sonnei* izolatında trimetoprim/sülfametoksazole %55; ampisiline %11,5; tetrasikline %46,5; streptomisine %75; kloramfenikole %2,7 oranında direnç bulmuşlardır.

Balaban ve ark. (2004) tarafından Ankara'da yapılan çalışmada 1992-1996 yılları arasında izole edilen *S. sonnei* kökenlerinde trimetoprim/sülfametoksazol direnci %38,0; ampisilin direnci %54; 1997-2000 yıllarında izole edilen *S. sonnei* izolatlarında trimetoprim/sülfametoksazol direnci %41,3; ampisilin direnci %30,5 bulunmuştur. Bu sonuçlara göre trimetoprim/sülfametoksazol direncinde artış gözlenirken ampisilin direncinde azalma izlenmiştir.

Özmert ve ark. (2005) Ankara'da yaptıkları çalışmada 1987-1994 ile 1995-2002 yıllarında izole ettikleri 170 *S. sonnei* suşunun antibiyotik dirençlerini kıyaslamış ilk dönem %25 buldukları ampisilin direncinin ikinci dönem %5,7'ye gerilediğini göstermişlerdir. 1995-2002 yıllarında izole edilen *S. sonnei* kökenlerinde

trimetoprim/sülfametoksazole %72,9; ampicilin/sulbaktam'a %2,8; kloramfenikole %1,2; gentamisine %1,5; seftriaksona %2,2 direnç görülmüştür.

Alıcı ve ark. (2006) Ankara'da yaptıkları çalışmada 1999-2003 yılları arasında izole ettikleri 96 *S. sonnei* kökeninde %8,3 oranında ampicilin direnci bulmuşlardır. Trimetoprim/sülfametoksazol direncini %87,5 olarak saptamışlardır. Bir (%1,04) izolatta sefotaksim direnci görülmüştür.

Bingöler'in (2003) 2001-2002 yıllarında Ankara'da izole ettiği *S. sonnei* kökenlerinde trimetoprim/sülfametoksazole %71,3; ampisiline %14,7; kloramfenikole %4, tetrasikline %81,9; streptomisine %94,2; sefalotine %1,6 oranında direnç görülmüştür.

Karacan ve ark. (2007) Ankara'da yaptıkları çalışmada, 2002 yılında izole ettikleri 165 *S. sonnei* türünde trimetoprim/sülfametoksazol direncini %96,4 olarak tespit etmişlerdir. İzolatların %8,5'inde ampicilin direncine, %1,2'sinde sefotaksim ve/veya seftriakson direncine rastlamışlardır. Ergönül ve ark'nın (2004) Ankara'da yaptığı, *Shigella* türlerinin beraber değerlendirildiği çalışmasında 20 yıl içinde ampicilin direncinin %64'ten %42'ye düştüğü belirtilmiştir.

Bu çalışmada *Shigella* kökenleri ampicilin, amoksisilin/klavulonik asit, gentamisin, kloramfenikol, nalidiksik asit, sefalotin, sefotaksim, seftazidim, siprofloksasin, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfametoksazol duyarlılıkları yönünden incelendi.

İncelenen *S. sonnei* izolatlarınının 6'sı (%12,2) ampisiline, 1'i (%2) amoksisilin/klavulonik asite, 6'sı (%12,2) nalidiksik asite, 13'ü (%26,5) sefalotine, 4'ü (%8,1) sefotaksime, 32'si (%65,3) tetrasikline, 48'i (%97,9) trimetoprim/sülfametoksazole dirençli bulundu.

Çalışmamızda 2001 *S. sonnei* izolatlarından 1'i (%4,5) nalidiksik asite, 4'ü (%18,1) sefalotine, 20'si (%90,9) tetrasikline, 22'si (%100) trimetoprim/sülfametoksazole dirençli bulundu.

2008 *S. sonnei* izolatlarından 2'si (%22,2) ampisiline, 1'i (%11,1) amoksisilin/klavulonik asite, 2'si (%22,2) sefalotine, 2'si (%22,2) tetrasikline, 8'i (%88,8) trimetoprim/sülfametoksazole dirençli bulundu.

2009 *S. sonnei* izolatlarından 4'ü (%22,2) ampisiline, 5'i (%27,7) nalidiksik asite, 7'si (%38,8) sefalotine, 4'ü (%22,2) sefotaksime, 10'u (%55,5) tetrasikline, 18'i (%100) trimetoprim/sülfametoksazole dirençli bulundu. Çalışmaya alınan *S. sonnei* kökenlerinin hiçbirinde gentamisin, kloramfenikol, siprofloksasin ve seftazidim direnci görülmedi.

Dünyada ve ülkemizde *S. sonnei* kökenlerinde trimetoprim/sülfametoksazole yüksek oranlarda direnç görülmesi dikkat çekicidir. Bu çalışmada Ankara'da izole edilen 49 *S. sonnei* kökeninde trimetoprim/sülfametoksazol direnci %97,9 oranında bulundu. Bu bulgular Ankara'da giderek artan oranda trimetoprim/sülfametoksazol direnci görüldüğünü ve bu antibiyotiğin günümüzde ampirik tedavi seçeneği olarak uygun olmadığını gösterdi. Yakın zamana kadar trimetoprim/sülfametoksazolün tedavide yaygın olarak kullanılmasının yüksek oranda direnç gelişimine neden olduğu düşünülmektedir.

Ampisiline karşı artmış duyarlılık, geçmiş yıllarda bu antimikrobiyale karşı görülen yüksek direnç nedeniyle kullanımının terk edilmesi ve direnç gelişiminden sorumlu genlerinin kaybedilmesi ile açıklanabilir. Bu çalışmada 2001 yılında izole edilen *S. sonnei* kökenlerinde ampisilin direnci görülmedi ancak 2008 ve 2009 yılında izole edilen *S. sonnei* suşlarında ampisilin direnci %22,2 olarak saptandı. Ampisiline direnç görülmemesi nedeniyle bu ajanın kullanımının yaygınlaşması sonucu direnç gelişiminde artış izlendiği düşünülmektedir. Çocuklarda siprofloksasin yan etkilerinden dolayı kullanılmamaktadır. Bundan dolayı çocukluk çağında şigeloz tedavisinde ilk seçenek durumunda düşünülebilecek olan ampisiline karşı giderek yükselmekte olan direnç oranları antibiyotik seçiminde duyarlılık testlerinin önemini bir kez daha gözler önüne sermektedir.

Üstün ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada, Ankara’da 2001 yılında *S. sonnei* salgını görüldüğünü bildirmiş ve inceledikleri 54 *S. sonnei* izolatının hepsinin trimetoprim/sülfametoksazole dirençli, ampisiline ise duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde 2001 yılında izole edilen 22 *S. sonnei* kökeninin tümü trimetoprim/sülfametoksazol’e dirençli ve tümü ampisiline duyarlı bulundu. Bu bulgular çalışmamızda incelenen 2001 yılı *S. sonnei* izolatlarının daha önce bildirilen 2001 yılı *S. sonnei* salgını ile ilişkili kökenler olabileceğini düşündürdü.

Dünyada ve ülkemizde sefotaksim ve seftriaksona karşı direnç görülmeye başlamıştır (Özmert ve ark., 2005; Alıcı ve ark., 2006; Karacan ve ark., 2007; Vrints ve ark., 2009). Yaptığımız çalışmada da 2001 ve 2008 *S. sonnei* kökenlerinde sefotaksim direnci görülmezken, 2009’da % 22,2 oranında görüldü. *S. sonnei* kökenlerinde sefotaksim direnç artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Bu direnç artışı şigeloz tedavisinde yüksek direnç nedeniyle trimetoprim/sülfametoksazol ve ampisilin kullanımının terk edilmesi ve 3. kuşak sefalosporinlerin kullanımının yaygınlaşması ile açıklanabilir.

Ranjbar ve ark. (2009) tarafından İran’da yapılan bir çalışmada da nalidiksik asite karşı direnç 2001 yılında %1 saptanırken, 2002-2004 yılları arasında toplanan *S. sonnei* izolatlarında %5’e çıktığı görülmüştür.

Talukder ve ark. (2006) Bangladeş’te yaptıkları çalışmada 1999-2003 yıllarında izole ettikleri 445 *S. sonnei* kökenlerinde nalidiksik asite karşı direnç oranını %60 bulmuşlardır.

Vrints ve ark. (2009) Belçika’da yaptıkları çalışmada 1990-2007 yılları arasında toplanan *S. sonnei* izolatları incelenmiş, 1990’larda %2,5 olan nalidiksik asit direnci 2004’te %12,8 ve 2007’de %8,2 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada 2001 yılında izole edilen 22 *S. sonnei* izolatının 1’inde (%4,5) nalidiksik asit direnci görülürken, 2009 yılında izole edilen 18 *S. sonnei* izolatının

5'inde (%27,5) nalidiksik asit direncine rastlandı. Florokinolon antibiyotikler nalidiksik asit türevleri olduğu için nalidiksik asit direnci florokinolon direnci ile ilişkili bulunmaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri florokinolonlara genellikle iki basamaklı mutasyon sonucunda direnç geliştirirler. *gyrA* genindeki mutasyon, dar spektrumlu nalidiksik asit gibi kinolonlara tam direnç ve florokinolonlara azalmış duyarlılıktan; *gyrA*, *parC*, veya *gyrB* genlerinde mutasyon da florokinolonlara tam dirençten sorumludur. Bu nedenle nalidiksik asite direnç siprofloksasine direncin belirleyicisi olarak kabul edilmektedir. Nalidiksik asite dirençli kökenlerde siprofloksasin için MİK değerleri incelendiğinde azalma görülebilmektedir (Sivapalasingam ve ark., 2006). Yapılan bazı çalışmalarda florokinolonlara karşı direnç gösterilmiştir (Niyogi, 2005; Yismaw ve ark., 2006; Kuo ve ark., 2008; Ranjbar ve ark., 2009).

Ülkemizde Çiftçi ve ark. (2009) tarafından Afyon'da yapılan çalışmada 139 *Shigella* izolatının 5'inde (%4), Birengel ve ark. 'nın (1998) Ankara'da yaptıkları çalışmada bir *S. flexneri* kökeninde siprofloksasine direnç görülmüştür. Nalidiksik asite karşı artan oranda direnç görülmesi, günümüzde *Shigella* infeksiyonlarında hala en potent ilaç olan siprofloksasine direnç gelişebileceği ve tedavide büyük sorunlarla karşılaşılabilen endişesi yaratmaktadır.

Shigella suşları plazmid, transpozon, integron gibi hareketli DNA elementleri aracılığı ile antibiyotiklere hızla çoklu direnç geliştirebilmektedirler. Sivapalasingam ve ark.'nın (2006) Amerika'da yaptıkları çalışmada 2 ve daha fazla antibiyotiğe direnç, çoklu ilaç direnci (MDR) kabul edilmiş ve *S. sonnei* izolatlarının %59'unda çoklu ilaç direnci bulunmuştur.

Aysev ve Güriz (1998) Ankara'da yaptıkları çalışmada *S. sonnei* suşlarının %56'sında 3 veya daha fazla antibiyotiğe direnç görüldüğü bildirilmiştir. Bu izolatlarda 8 antibiyotik direnç modeli izlenmiş, en sık görülen modelin tetrasiklin trimetoprim/sülfametoksazol streptomisin (T Sxt St) olduğu bulunmuştur (%39,6).

Kuo ve ark. (2008) 8 Asya ülkesini kapsayan çalışmalarında *S. sonnei* izolatlarında 10 farklı antibiyotik direnç modeli bulmuş, üç ve daha fazla antibiyotiğe direncin %23 oranında görüldüğünü bildirmişlerdir. En sık görülen modelin benzer şekilde tetrasiklin trimetoprim/sülfametoksazol (T Sxt) olduğunu ve izolatların %36'sında görüldüğünü bildirmişlerdir. İkinci sıklıkta olan trimetoprim/sülfametoksazol ampisilin trimetoprim/sülfametoksazol tetrasiklin (A Sxt T) direnç modeli izolatların %11'inde izlenmiş ve izolatların %16'sı denenen tüm antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur.

Vrints ve ark. (2009) Belçika'da yaptıkları çalışmada *S. sonnei* izolatlarının %63,5'inin 4 ve daha fazla antibiyotiğe direncini çoklu ilaç direnci kabul etmiş, en sık izlenen modelin tetrasiklin streptomisin trimetoprim/sülfametoksazol (T St Sxt) (%42,7) olduğunu bildirmişlerdir. Bunu sırasıyla ampisilin tetrasiklin streptomisin trimetoprim/sülfametoksazol (A T St Sxt) (%6,1), ampisilin streptomisin trimetoprim/sülfametoksazol (A St Sxt) (%5,5) ve tetrasiklin nalidiksik asit streptomisin trimetoprim/sülfametoksazol (T N St Sxt) (%3,0) modeli izlemiştir.

Farklı çalışmalarda farklı sayılardaki antibiyotiğe direnç çoklu ilaç direnci kabul edilmiştir. Sayısal veriler değerlendirilirken bu farklar dikkate alınmalıdır. Yaptığımız çalışmada 2 ve daha fazla ilaca direnç çoklu ilaç direnci kabul edildi ve *S. sonnei* izolatlarının 41'inde gözlemlendi (%83,6). Çalışmada incelenen *S. sonnei* izolatlarında 12 farklı antibiyotik direnç modeli bulundu. Tüm antibiyotiklere duyarlı izolat görülmedi. İzolatların 23'ünün (%46,9) gösterdiği tetrasiklin trimetoprim/sülfametoksazol (T Sxt) direnç modelinin en yaygın direnç modeli olduğu belirlendi. Trimetoprim/sülfametoksazol (Sxt) direnci ikinci en sık izlenen model olup izolatların 8'inde (%16,3) gözlemlendi.

Çalışmamızda 2001 ve 2008 yılında izole edilen 2 *S. flexneri* izolatı amoksisilin/klavulonik asite, ampisiline, tetrasikline, kloramfenikole, trimetoprim/sülfametoksazole dirençli bulundu. 2009 yılında izole edilen 8 *S. flexneri* izolatından, tetrasikline 7 (%87,5), trimetoprim/sülfametoksazole 7 (%87,5), ampisiline 8 (%100), amoksisilin/klavulonik asite 7 (%87,5), sefalotine 1 (%12,5), kloramfenikole

7 (%87,5) izolat dirençli bulundu. Tüm izolatlar sefotaksim, seftazidim, nalidiksik asit, siprofloksasin ve gentamisine duyarlı bulundu.

Yapılan çeşitli çalışmalarda *S. flexneri* türünde ampisiline karşı direncin *S. sonnei* türüne göre daha yüksek oranda görüldüğü bildirilmektedir (Aysev ve Güriz, 1998; Özmert ve ark., 2005; Alıcı ve ark., 2006; Karacan ve ark., 2007; Pullukçu ve ark., 2007; Khan ve ark., 2009; Wu ve ark., 2009). Bu çalışmada da *S. flexneri* izolatlarının tümünde ampisilin direnci görülmüş, direnç yüksekliği *S. sonnei* kökenlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). *S. sonnei* türünde kloramfenikol direnci bulunmamışken *S. flexneri* türünde %90 oranında direnç saptanmıştır. *S. flexneri* türlerinde görülen yüksek kloramfenikol direnci *S. sonnei* türlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Bu bulgu kloramfenikol direncinin *S. flexneri* türünde daha sık rastlandığını bildiren çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Aysev ve Güriz, 1998; Özmert ve ark., 2005; Sivapalasingam ve ark., 2006; Kuo ve ark., 2008).

Pullukçu ve ark. (2007) İzmir’de yaptıkları çalışmada *S. flexneri* kökenlerinde trimetoprim/sülfametoksazole %42, *S. sonnei* kökenlerinde %84 direnç gözlemişlerdir. Balaban ve ark. (2004) 1997-2000 yıllarında izole edilen *S. flexneri* kökenlerinde trimetoprim/sülfametoksazole %40,8; *S. sonnei* kökenlerinde %41,3 oranında direnç gözlemişlerdir. Özmert ve ark. (2005) trimetoprim/sülfametoksazol direncini *S. flexneri* kökenlerinde %62,1; *S. sonnei* kökenlerinde %72,9 bulmuşlardır. Çalışmamızda da *S. flexneri* kökenlerinde trimetoprim/sülfametoksazol direnci (%90) *S. sonnei* kökenlerinden (%97,9) düşük bulundu. Direnç farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.001$).

S. flexneri türlerinde görülen yüksek amoksisilin/klavulonik asit direnci (%90) *S. sonnei* türlerine (%2,0) göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Bu bulgu diğer çalışmalarla uyumludur (Sire ve ark., 2008).

Najafi ve ark.’nın (2008) yaptıkları çalışmada inceledikleri *S. flexneri* kökenlerinde iki ve daha fazla antibiyotiğe direnci çoklu direnç kabul edilmiş, en sık izlenen

direnç modellerinin sırasıyla ampisilin, trimetoprim/sülfametoksazol (A Sxt) (%35,3), ampisilin, eritromisin (A E) (%29,7) ve tetrasiklin trimetoprim/sülfametoksazol (T Sxt) (%29,6) olduğu gözlenmiştir.

Mandomando ve ark. (2009) Mozambik'te yaptıkları çalışmada 2 ve daha fazla antibiyotiğe direnç çoklu direnç kabul edilmiş, *S. flexneri* türlerinde çoklu direnç görülme oranı %63 bulunmuştur. En sık ampisilin, trimetoprim/sülfametoksazol, kloramfenikol, tetrasiklin (A Sxt C T) (%49) modeli; ikinci sıklıkta ampisilin, kloramfenikol, tetrasiklin (A C T) modeli izlenmiştir.

Fullá ve ark. (2005) Şili'de yaptıkları çalışmada *S. flexneri* kökenlerinde ampisilin, trimetoprim/sülfametoksazol, kloramfenikol, tetrasiklin (A Sxt C T) en sık izlenen çoklu ilaç direnci modeli olup izolatların %53,8'inde görülmüştür. İkinci sıklıkta ise ampisilin, kloramfenikol, tetrasiklin (A C T) (%13,8) modeli görülmüştür.

Aysev ve Güriz (1998) Ankara'da yaptıkları çalışmada *S. flexneri* izolatlarında 8 antibiyotik direnç modeli izlenmiş, en sık görülen modelin ampisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, streptomisin, trimetoprim/sülfametoksazol (A T C St Sxt) olduğunu bulmuşlardır (%48,6). İkinci sıklıkta ise ampisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, trimetoprim/sülfametoksazol (A T C Sxt) modeli izlenmiştir (%19,4). Bu çalışmada en sık gözlenen direnç modeli ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim/sulfametaksozol (A A/K C T Sxt) olup *S. flexneri* izolatlarının 7'sinde (%70) gözlendi. İzolatlardan 1'i (%10) ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, kloramfenikol, tetrasiklin (A A/K C T), 1'i (%10) ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, trimetoprim/sulfametaksozol (A A/K Sxt) direnç modeli gösterdi.

Çalışmamızda *S. flexneri* izolatlarında 4 antibiyotik direnç modeli izlendi ve tümünde çoklu ilaç direnci görüldü. 2001 ve 2008'de izole edilen iki köken aynı antibiyotik modeli gösterdi (A A/K C T Sxt).

Çalışmamızda diğer çalışmalarla uyumlu şekilde *S. flexneri* izolatlarında (%100) *S. sonnei*' ye (%83,6) göre daha sık çoklu ilaç direnci görüldü (Aysev ve Güriz, 1998; Özmert ve ark., 2005; Sivapalasingam ve ark., 2006; Pullukçu ve ark., 2007; Kuo ve ark., 2008; Tiruneh, 2009). *S. flexneri* infeksiyonlarının *S. sonnei*' ye göre daha ciddi seyretmesi nedeniyle, daha fazla hastanede yatış görülmesi ve antibiyotiklerin daha yaygın kullanımı, antibiyotiklere yüksek orandaki direnci ve çoklu ilaç direncinin fazlalığını açıklayabilir. Türkiye'de *S. flexneri* türü, *S. sonnei*'ye göre daha az görülmektedir. Her ne kadar bulgularımız diğer çalışmalarla uyumlu olsa da bir bölgede endemik bulunan bakterinin antibiyotik duyarlılık profilini belirlemek için daha çok sayıda izolatla çalışma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Shigella'larda görülen yüksek antibiyotik direnci, tedavinin önünde büyük engel oluşturmaktadır. Bir bölgede görülen antibiyotik direnç paternlerini sürekli izlemek doğru ampirik tedavi düzenlemek için güvenilir sonuçlar verebilmektedir. Basilli dizanteri hastalarında etkin tedavi için gaita kültürü yapılmalı ve takibinde antibiyotik duyarlılık testleri yapılarak sonuçlar doğrultusunda antibiyotik kullanımı sağlanmalıdır.

Epidemiyolojik çalışmalarda antibiyotik duyarlılık testlerinin kullanımı sınırlıdır. Seçici ekolojik baskı direnç paternlerini değiştirebilmektedir. Antibiyotik direnci gelişiminin çeşitli genetik mekanizmaları vardır. Bakteride spontan nokta mutasyonları meydana gelebilmekte veya spesifik direnç genleri plazmidler ya da transpozonlar aracılığı ile bir cinsteki diğer kökenlere ve hatta diğer cinslere geçebilmektedir. Tek bir plazmid veya transpozon birçok antibiyotiğe karşı direnç genini taşıyabilmektedir. Diğer yandan spesifik seçici baskı ortadan kalktığında bu direnç genleri kaybedilebilmektedir (Arbeit, 2003).

Epidemiyolojik çalışmalarda *Shigella* türlerinin moleküler tiplendirilmesinde PFGE, plazmid profil analizi, PCR, ribotiplendirme ve diğer bazı yöntemler sıkça tercih edilen yöntemlerdir. Plazmidler bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olabilen kromozom dışı DNA molekülleridir. Bir bakteride bulunan plazmidlerin sayısı ve büyüklüğü incelenerek bakterinin plazmid profili elde edilebilir. Plazmid

profil analizi epidemiyolojik araştırmalarda ilk kullanılan moleküler tekniktir (Tenover ve ark., 1997; Arbeit, 2003). Plazmid profil analizi 1980'li yıllardan beri *Shigella*'larda birçok çalışmada sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu alışmalarda *Shigella* türlerinin heterojen plazmid popülasyonuna sahip olduğu görülmüştür.

Na-Ubol ve ark. (2006) tarafından Tayland'da yapılan çalışmada 2000-2003 yılları arasında toplanan 183 *Shigella* suşunun (167 *S. sonnei* ve 16 *S. flexneri*) plazmid profilleri incelenmiş ve 16 farklı plazmid paterni elde edilmiştir. Plazmid boyutları 6, 5,5; 5; 4,5; 4; 3,25; 2,75; 2,5; 2; 1,75; 1,5 ve 1,25 kb olarak bulunmuştur. En sık izlenen plazmidin 4,5 kb (165 izolat) olduğu, bunu sırasıyla 3,25 kb (161 izolat), 5,5 kb (129 izolat), 1,75 kb (121 izolat), 1,5 kb (izolat), 5 kb (21 izolat), 2 kb (16 izolat), 2,75 kb (12 izolat), 1,25 kb (9 izolat) ve 6 kb (8 izolat) büyüklüğündeki plazmidin takip ettiği gösterilmiştir.

Farshad ve ark. (2006) tarafından İran' da yapılan bir çalışmada 82 *Shigella* suşu (61 (%74,39) *S. sonnei*, 16 (%19,51) *S. flexneri*, 3 (%3,65) *S. boydii* ve 2 (%2,43) *S. dysenteriae*) plazmid profili yönünden incelenmiş ve suşların 5-14 arası değişen sayıda plazmid taşıdığı gösterilmiştir. Plazmid boyutları 1-21 kb arasında bulunmuş ve en sık rastlanılan 2-3 kb'lık plazmidler suşların %96,34'ünde görülmüştür. 25 kb'lık plazmid sadece 2 suşta bulunmuştur (%2,1). Daha büyük boyuttaki plazmidlerin düşük stabilitede olduğu ve kolay kaybedildiği vurgulanmıştır.

Brian ve ark. (1993) Texas'ta yaptıkları çalışmada 26 *S. sonnei* izolatını incelemiş ve bunların 2'si hariç tümünün 70; 45; 15; 5,2; 3,8; 3,3 MDa büyüklüğünde 6 plazmid taşıdığı görülmüştür. İzolatların 1'inde 3,3 MDa büyüklüğündeki plazmid bulunmazken, 38 MDa büyüklüğündeki plazmid sadece 1 izolatta izlenmiş. 120 MDa'luk virülans plazmidini hiçbir izolatta gözlenmemiş olup izolatların saklanması sürecinde kaybedildiği belirtilmiştir.

Talukder ve ark. (2006) Bangladeş'te yaptıkları çalışmada 1999-2003 yıllarında izole ettikleri 445 *S. sonnei* kökeninin %90'ından fazlasının 5; 1,8; 1,4 MDa büyüklüğünde plazmid taşıdığı bulunmuştur. 35-80 MDa'luk plazmidlerin,

kökenlerin %12'si tarafından taşındığı görülmüştür. İzolatların %54'ünde 120 MDa büyüklüğündeki virülans plazmidi izlenmemiştir. İzolatların -70° C'de uzun süre saklanması veya tekrarlayan subkültürlerin virülans plazmidinde kayıba yol açtığını savunmuşlardır.

Ülkemizde *Shigella*'larda plazmid ve plazmid profillerinin araştırıldığı çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu çalışmada *S. sonnei* kökenlerinin 1'den 7'ye kadar değişik sayı ve büyüklükte plazmid taşıdığı görüldü. İzolatlarda farklı büyüklüklerde 14 plazmid izlendi. Plazmidlerin en büyüğü 200, en küçüğü 3 kb büyüklüğünde bulundu. Plazmid taşımayan kökene rastlanmadı. En sık görülen plazmidler sırasıyla 4 kb (%87,7); 5,5 kb (%73,4); 7kb (%44,8); 200 kb (%32,6); 15 kb (%32,6); 120 kb (%24,4); 3,5 kb (%16,3); 20 kb (%14,2); 4,5 kb (%14,2); 12 kb 4 (%8,1); 25 kb (%2,04); 18 kb (%2,04); 10 kb (%2,04); 3 kb (%2,04) büyüklüğünde bulundu.

Çalışmamızda 14 plazmidten sadece 4'ü (120; 15; 5,5 ve 4 kb) 2001, 2008 ve 2009 *S. sonnei* izolatlarında ortak görüldü. 25; 20; 18; 12; 10; 4,5 ve 3 kb büyüklüğündeki plazmidler sadece 2009 *S. sonnei* izolatlarında izlendi. 3,5 kb büyüklüğündeki plazmid 2008 ve 2009 *S. sonnei* izolatlarında izlenirken; 2001 *S. sonnei* izolatlarında izlenmedi. 7 kb büyüklüğündeki plazmidin 2001 ve 2008 *S. sonnei* izolatlarında bulunduğu, 2009 *S. sonnei* izolatlarında ise bulunmadığı görüldü.

Çalışmamızda 2001 yılında izole edilen *S. flexneri* kökeninin 120 ve 5,1 kb büyüklüğünde plazmid taşıdığı görüldü. 2008 yılında izole edilen *S. flexneri* kökeninin 4 kb büyüklüğünde tek plazmid taşıdığı görüldü. 2009 *S. flexneri* izolatlarının 1'den 7'ye kadar değişik sayı ve büyüklükte plazmid taşıdığı görüldü. Plazmidlerin en büyüğü 200, en küçüğü 3,5 kb arasında büyüklüğündeydi. En yaygın görülen 5 kb'lık plazmid, 6 (%75) kökende izlendi. Plazmid taşımayan kökene rastlanmadı. 120 kb'lık plazmidin 2001 ve 2009 izolatlarında, 4 kb'lık plazmid ise 2008 ve 2009 izolatlarında ortak görüldü.

Shigella'larda invazyon ve intraselüler yaşam için gerekli temel proteinleri kodlayan genlerin 200 kb büyüklüğündeki virülans plazmidinde yer aldığı bilinmektedir

(Keush, 2002; Torres, 2004; Schroeder ve Hilbi, 2008). Bazı araştırmalarda *Shigella*'ların hücre içi invazyonunu gösteren bir hayvan deneyi olan Sereny testi, bu plazmidi taşımayan kökenlerle olumsuz bulunmuştur (Tacket ve ark., 1984). Yapılan çalışmalarda 200 kb büyüklüğündeki virulansla ilişkili plazmidin stabil olmadığı ve kolayca kaybedilebildiği bildirilmiştir (Talukder ve ark., 2006; Brian ve ark., 1993). Bu çalışmada 200 kb büyüklüğündeki plazmid 2001 *S. sonnei* izolatlarında %40,9; 2009 *S. sonnei* izolatlarında %38,8; 2009 *S. flexneri* izolatlarında %25,0 oranında görülürken 2008 *S. sonnei*, 2001 ve 2009 *S. flexneri* izolatlarında görülmedi. Bu çalışmada plazmid profil analizi ile belirlenen 200 kb büyüklüğündeki plazmidin virulans ile ilişkili plazmid olup olmadığı belirlenmemiştir. Virülans plazmidini göstermek için plazmid profil analizi ile bir plazmidin büyüklüğünün gösterilmesinin yeterli olmayacağını, plazmid üzerinde yer aldığı bilinen invazyon plazmid antijenleri (ipa) gibi genlerin belirlenmesine yönelik yöntemler kullanılmasının daha doğru sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz.

Çalışmaya alınan *S. sonnei* kökenlerinde toplam 27 plazmid profili izlendi. Genotipik tiplendirme yöntemi olarak kullanılan plazmid profil analizi yönteminin ayırım gücü Simpson'un farklılık indeksine dayalı formülü ile hesaplandı ve 0,97 bulundu.

2001 *S. sonnei* kökenlerinde 10 plazmid profili görüldü. Yöntemin ayırım gücü 0,92 bulundu. En sık izlenen profilin 7; 5,5; 4 olduğu ve izolatların %22,7'sinde izlendiği belirlendi. 2008 *S. sonnei* kökenlerinde 6 plazmid profili görüldü ve yöntemin ayırım gücü 0,84 bulundu. En sık izlenen profilin 5,5; 4 olduğu ve izolatların %44,4'ünde izlendiği belirlendi. 2009 *S. sonnei* kökenlerinde 13 plazmid profili gözlemlendi. Yöntemin ayırım gücü hesaplandığında 0,97 bulundu. En sık izlenen profilin 4,5; 4 olduğu ve izolatların %16,6'sında izlendiği belirlendi.

2001 ve 2008 yılında görülen profillerden hiçbirisi 2009 yılında izlenmedi. Buna sebep olarak profilleri oluşturan 25; 20; 18; 12; 10; 4,5 ve 3 kb büyüklüğündeki plazmidlerin sadece 2009 *S. sonnei* izolatlarında izlenmesi gösterilebilir. Profillerden 5,5; 4 ve 7; 5,5; 4; 2001 ve 2008 yılı *S. sonnei* kökenlerinde ortak görüldü. 2008 yılında 4 kökende görülen (%44,4) ve en sık izlenen profil olan 5,5; 4 profili, 2001

yılında sadece 1 (%4,5) kökünde izlendi. 2001 yılında 5 (%22,7) kökünde izlenen 7; 5,5; 4 profili, 2008 yılında sadece 1 (%11,1) kökünde izlendi.

2001 *S. sonnei* izolatlarının plazmid profilleri incelendiğinde izolatların içerdiği plazmidlerin sayısı ve büyüklüklerinin yüksek oranda birbirine yakın olduğu, profiller arası farklılıkların bazı izolatlarda bir ya da iki plazmidin varlığı veya yokluğundan kaynaklandığı dikkat çekmektedir. Çalışmamızdaki izolatların saklanması laboratuvarlardan laboratuvara taşınması sırasındaki pasajların plazmidlerde kayıplara yol açtığı ve dolayısıyla belirlenen profil çeşitliliğine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu nedenle 2001 *S. sonnei* izolatlarının birbirine yakın kökenler olduğu sanılmaktadır.

Çalışmaya alınan *S. flexneri* izolatlarında toplam 9 plazmid profili izlendi. Yöntemin ayırım gücü 0,98 bulundu. 2009 yılında izole edilen 8 *S. flexneri* kökeninde 7 plazmid profili görüldü. En yaygın görülen plazmid profilinin 120; 5 olduğu ve 2 (%12,5) kökenin bu profile sahip olduğu görüldü. 2001 yılı *S. flexneri* izolatında görülen 120; 5,1 profili ve 2008 yılı *S. flexneri* izolatında görülen 4 kb büyüklüğündeki tek plazmidin oluşturduğu profil 2009 yılı *S. flexneri* izolatlarında görülmedi.

Plazmid profil analizi uygulanması kolay ve düşük maliyetli bir yöntemdir. Ancak belirtilen sebeplerden dolayı laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği düşük olup ulusal sürveyans çalışmalarında veritabanı oluşturmak için kullanılması uygun bir yöntem değildir. Bu nedenle yöntemin zaman ve bölge sınırlaması olan çalışmalarda ya da diğer tiplendirme yöntemleri ile birlikte değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Farshad ve ark. (2006) Nisan-Ekim 2003 tarihleri arasında 6 aylık süre içinde topladıkları 61 *S. sonnei* izolatını antimikrobiyal duyarlılık testi ve plazmid profil analizi ile incelemişler; antimikrobiyal duyarlılık testi ile 8, plazmid profil analizi ile 42 grup elde etmişlerdir. İnceledikleri 16 *S. flexneri* izolatında antimikrobiyal duyarlılık testi ile 5, plazmid profil analizi ile 14 grup elde etmişlerdir. Bu veriler

sonucunda plazmid profil analizinin ayırım gücünün antimikrobiyal duyarlılık testine göre daha yüksek olduğunu, antimikrobiyal duyarlılık testinin hastalığa neden olan klonları ayırmada yetersiz olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada *S. sonnei* kökenleri plazmid profil analizi ile 27, antibiyotik duyarlılık testi ile 12 gruba ayrıldı ve *S. sonnei* izolatlarını incelemede plazmid profil analizinin ayırım gücü (0,97) antimikrobiyal duyarlılık testine (0,75) göre yüksek bulundu.

Plazmid profil analizinde, aynı plazmidin farklı konformasyonda (lineer ya da sirküler) bulunması halinde jel elektroforezinde farklı gibi görünmesi ya da aynı büyüklükte değişik sayıda plazmidin bulunması halinde jelde tek plazmid bandı görülmesi, ayrıca farklı izolatlarda aynı büyüklükte bulunan plazmidlerin DNA sekanslarının ve fonksiyonlarının aynı olmaması gibi nedenlerle yanıltıcı sonuçlar alınabilir. Plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle bu sorunların üstesinden gelmek mümkündür (Foley ve ark., 2009). Plazmid profil analizi ile suşlar arası ayırım yapılamayan ve özellikle tek plazmide sahip izolatların ileri çalışmalarda restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle daha fazla ayırım gücü elde edilebilir (Mayer, 1988). Bu çalışmada *Shigella*'ların çok sayıda plazmid taşıması ve plazmid profili incelemesi ile yüksek düzeyde ayırım gücünün elde edilebilmesi nedeniyle, restriksiyon enzimleri ile ileri inceleme yapmaya gereksinim duyulmadı.

PFGE, kromozomal DNA'nın uygun enzimlerle kesilmesi sonucu oluşan band paternlerinin kıyaslanması ile izolatlar arası genetik ayırımın yapıldığı bir yöntemdir. Moleküler tiplendirme yöntemleri arasında altın standart kabul edilmektedir. Standart protokollere uyulduğunda laboratuvarlar arasında tekrarlanabilirliği yüksek bir methodur. Bu yöntemle, bir bölgede salgın olguları tespit edilip kaynağı belirlenebilir ve koruyucu önlemler alınabilir. Ayrıca salgın olgularını sporadik olgulardan ayırmak, farklı toplumlarda dolaşımda olan izolatları belirlemek, izole edilen kökenler arası genetik benzerlikleri tespit etmek ve hatta dünyada herhangi bir yerde izole edilen kökenlerle kıyaslamak, suşların zaman içinde bölgeler arası yayılımını izlemek mümkündür (Goering, 2004; Foley ve ark., 2009).

PFGE yöntemi *Shigella* türlerinin incelenmesinde tüm dünyada yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. *Shigella* türlerinin için optimum sayı ve büyüklük aralığı sağlayan enzimlerin *XbaI* ve *SfiI* olduğu belirtilmiştir (Goering, 2004). Birçok çalışmada *Shigella*'ların PFGE ile incelenmesinde tek enzim olarak *XbaI* enziminin kullanıldığı görülmüştür (Navia ve ark., 1999; Delappe ve ark., 2003; Na-Ubol ve ark., 2006).

Terajima ve ark.'nın (2004) Japonya'da yaptıkları çalışmada 2001 yılında *S. sonnei* izolasyonunda artış görülmüştür. PFGE ile yaptıkları incelemede 223 izolatin 200'ünde ve yurtdışından ithal edilen şüpheli midyelerden izole ettikleri kökenlerde aynı veya benzer PFGE paterni bulmuşlardır. Bölgesel PFGE veritabanını incelediklerinde bu paternin daha önce Japonya'da görülmediğini bulmuşlardır. Salgın kaynağının kontamine midye olduğunu göstermişlerdir. İzolatların antibiyotik direnç modellerinin de PFGE'ni destekler nitelikte benzer olduğunu bulmuşlardır. Çalışmalarında toplumda daha önce görülmeyen PFGE paternine sahip kökenlerin oranında artış görülmeye başlanmasının ortak kaynaktan doğan salgın için uyarıcı nitelikte olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda 60 *Shigella* izolatını *XbaI* enziminin kullanıldığı PFGE yöntemi ile inceledik. *S. sonnei* izolatlarının PFGE incelemesi sonucu 4 patern (sa, sb, sc, sd) izlendi. Bu yöntemin ayırım gücü 0,26 bulundu. 2001 yılında izole edilen 22 *S. sonnei* izolatu 2 gruba ayrıldı. İzolatlardan 21'i (%95,4) sa paterni ve 1'i (%4,5) sb paterni gösterdi. 2008 yılında elde edilen 9 *S. sonnei* izolatu 2 gruba ayrıldı. İzolatlardan 8'i (%88,8) sa ve 1'i (%11,1) sc paterni gösterdi. 2009 yılında elde edilen 18 *S. sonnei* izolatu 3 gruba ayrıldı. İzolatlardan 13'ü (%72,2) sa, 4'ü (%2,5) sb ve 1'i (%1,3) sd paterni gösterdi.

S. flexneri izolatlarının incelenmesi sonucunda 5 PFGE paterni (fa, fb, fc, fd, fe) elde edildi. Yöntemin ayırım gücü 0,76 bulundu. 2001 ve 2008 *S. flexneri* izolatları fa paterni gösterirken 2009 yılı *S. flexneri* izolatlarının 3'ü (%37,5) fa, 2'si (%25) fb, 1'i (%12,5) fc, 1'i (%12,5) fd ve 1'i (%12,5) fe paterni gösterdi.

S. sonnei izolatlarının PFGE’nde elde edilen dendogramı ile sa ve sb PFGE paterni benzerlik oranı 0,80; sc ve sd paterni benzerlik oranı 0,36; sa ve sc paterni benzerlik oranı 0,30; sa ve sd paterni benzerlik oranı 0,27; sb ve sd paterni benzerlik oranı 0,45; sb ve sc paterni benzerlik oranı 0,40 bulundu.

S. flexneri izolatlarının PFGE’nde elde edilen dendogramı ile fa ve fc PFGE paterni benzerlik oranı 0,84; fd ve fe paterni 2009 *S. flexneri* izolatına ait olup benzerlik oranı 0,72 bulundu. Benzerlik oranları fa ve fb arasında 0,47; fa ve fd arasında 0,58; fa ve fe arasında 0,57; fc ve fb arasında 0,40; fd ve fc arasında 0,34; fc ve fe arasında 0,40; fb ve fd arasında 0,48 bulundu.

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı ve Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğünün aylık raporuna (2002) göre Ankara’da 2001 yılında toplanan 724 dışkı örneği incelenmiş ve izole edilen enterik patojenlerin %76,4’ünü *Shigella* cinsi oluşturmuştur. Nisan ve Ağustos aylarındaki örnek sayılarındaki artışın başlıca nedeni olarak salgın şüphesi gösterilmiştir.

Üstün ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada 2001 yılında Ankara’da yaz aylarında *S. sonnei* salgını görüldüğü bildirilmiştir. Bu çalışmada 2001 *S. sonnei* izolatlarında PFGE ile yaptığımız incelemede bir köken dışındaki tüm kökenlerin aynı profili (sa) göstermesi (%95,4), bu izolatların salgın dönemine ait ve bahsedilen salgınla ilişkili izolatlar olduğunu düşündürdü.

Akçalı ve ark. (2008) 2000 yılında izole ettikleri 4 ve 2001 yılında izole ettikleri 12 *S. sonnei* kökenini PFGE ile tiplendirmiş ve bunların ayırt edilemez veya yakın ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu kökenin Ankara bölgesinde önceden toplumda dolaşan *S. sonnei* suşunun devam eden yayılımı ile ilişkili olduğunu düşünmüşlerdir.

Lin ve ark. (1999) Tayvan’da 1995-1996 yıllarındaki büyük bir salgından ve 1998-1999 yıllarındaki 5 salgından izole edilen 55 *S. sonnei* kökenlerini, antibiyotik duyarlılık testi, plazmid profili ve PFGE ile incelemişler; antibiyotik duyarlılık testi

ile 2, plazmid profil analizi ile 3, PFGE ile 1 profil elde edildiğini bildirmişler. 1998-1999 yılları izolatlarının 1995 salgın izolatlarının devamı olduğu düşünülmüştür.

Brian ve ark. (1993) Texas'ta yaptıkları çalışmada salgın izolatlarını ve sporadik izolatları antimikrobiyal duyarlılık testi, plazmid profil analizi, plazmid DNA restriksiyon fragman paterni ve PFGE ile incelemiş ve sonuçta salgın suşlarının birçok sporadik izolattan antimikrobiyal duyarlılık testi ile ayrılabilmediğini ancak plazmid analizinin ve PFGE'nin salgın izolatlarını sporadik izolatlardan ayıramadığını göstermişlerdir. Sonuç olarak yakın ilişkili olan izolatlar belirli bir zaman periyodunda belirli bir coğrafi bölgede baskın olarak bulunuyorsa, salgın suşlarını sporadik izolatlardan ayırt etmenin güç olacağını savunmuşlardır.

Çalışmamızda PFGE ile yapılan inceleme sonucu 2008 yılında izole edilen *S. sonnei* izolatlarının %88,8'i; 2009 yılında izole edilen izolatların %72,2'si sa paterni göstermiştir. Bu izolatların, 2001 yılında izole edilen ve bildirilen *S. sonnei* salgınına ait olduğu düşünülen suşlar ile aynı paterni göstermesi, Ankara'da aynı kökenin uzun zamandan beri dolaşımında olması nedeniyle bu kökenin endemik olduğunu göstermekte ve dolayısıyla PFGE yöntemi ile salgın suşlarını sporadik suşlardan ayırmanın güç olacağını düşündürmektedir.

Bu çalışmada 2001 yılında izole edilen 22 adet *S. sonnei* suşu PFGE ile 2, plazmid profil analizi ile 10, antibiyotik duyarlılık profili ile 4 gruba ayrılmıştır. Yöntemlerin ayırım gücü sırasıyla 0,10; 0,46 ve 0,46 bulunmuştur. 2001 *S. sonnei* salgınına ait izolatlar olduğunu düşündüğümüz kökenlerde PFGE yönteminin ayırım gücü düşük bulunmuştur. Ancak plazmid profili ile kökenlerin 10 gruba ayrılması, plazmidlerin ekstrakromozomal genetik elemanlar olmaları nedeniyle kolayca bakteriyi terk edebilmeleri veya bakterilerin yeni bir plazmidle kolayca infekte olabilmeleri ya da plazmidlerin saklanma sürecinde kaybedilmeleri bu nedenle de farklı plazmid profilleri göstermeleri ile açıklanabilir. Bundan dolayı epidemiyolojik incelemelerde kromozomal DNA'yı incelemeye olanak veren PFGE yönteminin kökenler arası klonal ilişkileri değerlendirmede faydalı sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada 2001 ve 2008 yılında elde edilen *S. flexneri* izolatları aynı PFGE paternini göstermiştir (fa). 2009 yılı *S. flexneri* izolatlarının 3'ü (%37,5) fa, 2'si (%25) fb, 1'i (%12,5) fc, 1'i (%12,5) fd ve 1'i (%12,5) fe paterni göstermiştir. Bu bulgular Ankara ilinde *S. sonnei*'ye göre düşük oranda izole edilen *S. flexneri* kökenlerinde heterojen PFGE paterni bulunduğu gösterse de daha fazla sayıda izolatla çalışma yapmak gerekmektedir.

Günümüzde moleküler tekniklerin ilerlemesi ile *Shigella*'ların epidemiyolojik çalışmalarında birçok yöntem kullanılmaktadır. REP-PCR yöntemi bakteriyel genomda dağılmış olarak bulunan doğal olarak korunmuş tekrarlayan DNA dizilerini arasındaki bölgenin PCR ile çoğaltılması ve oluşan ürünlerin kıyaslanması sonucunda izolatlar arası ayırımı yapılabildiği bir yöntemdir (Rademarker ve Savelkoul, 2004). Ribotiplendirme mikroorganizmalarda yüksek oranda korunmuş rRNA genlerinin kromozomal bölgelerindeki DNA polimorfizminden faydalanılarak yapılan bir tiplendirme metodudur (Meaysa ve ark., 2004).

Liu ve ark. (1995) Çin'de yaptıkları çalışmada birbirleri ile epidemiyolojik ilişkili 4 infeksiyon insidansı ve 2 sporadik insidansa ait 20 *S. sonnei* izolatını plazmid profili, plazmidlerin restriksiyon endonükleaz analizi, PFGE, ribotiplendirme ve ERIC-PCR ile incelemiştir. 5,0 ve 10,1 kb arası büyüklüklerde 1 ile 3 plazmid içeren 6 plazmid profili, *XbaI* enzimi kullanarak yaptıkları PFGE ile 7 ve ERIC PCR ile 7 patern göstermişlerdir. Bu yöntemlerle bulunan paternlerin epidemiyolojik ilişkili izolatları içeren gruplar içinde aynı, her bir grup arasında farklı olduğunu izlemiştir. Ribotiplendirme ile sadece 2 grup elde etmişler ve ribotiplendirme yönteminin epidemiyolojik ilişkili izolatları sporadik izolatlardan ayırmada diğer yöntemlere göre yetersiz olduğunu bulmuşlardır.

Navia ve ark. (1999) tarafından Tanzania'da yapılan çalışmada Temmuz- Eylül 1997 arasında toplanan 86 *Shigella* suşu PFGE, REP-PCR, plazmid analizi, antibiyotik duyarlılıkları yönlerinden incelenmiştir. Suşların 78'i (%90) *S. flexneri* olup 3-6 adet farklı plazmid bulunmuş ve 8 plazmid paterni gösterilmiştir. *S. flexneri* PFGE ve REP-PCR ile 4 gruba, 4 *S. sonnei* kökeni 2 gruba, 4 *S. dysenteriae* kökeni tek gruba ayrılmıştır. PFGE paterni aynı, ancak plazmid profilleri ve antibiyotik direnç

paternleri farklı olan kökenler izlenmiştir. Bu yüzden direncin muhtemelen plazmid tarafından taşındığı düşünülmüştür. Diğer yandan aynı PFGE ve aynı plazmid profillerine sahip olan suşların farklı antibiyotik direnç paternine sahip olmaları da direnç genlerini taşıyan transpozon ya da integron varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Yaptığımız çalışmada 2009 *S. flexneri* kökenlerinde 4 antibiyotik direnç modeli, 7 plazmid profili, 5 PFGE paterni izlenmiştir. Aynı antibiyotik paternine sahip ancak farklı PFGE ve farklı plazmid profili tipinde olan izolatlar, antibiyotik direncinin plazmid veya direnç genlerini taşıyan transpozon ya da integron kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür.

Lee ve ark. (2000) Tayvan'da okul çağı çocukları arasında çıkan üç farklı salgından izole edilen 58 *S. sonnei* izolatını ve epidemiyolojik olarak ilişkisiz sporadik klinik infeksiyonlardan izole edilen 8 kontrol izolatını antimikrobiyal duyarlılık, plazmid profil analizi, PFGE ve ribotiplendirme ile incelemişlerdir. PFGE ve plazmid profil analizinin ribotiplendirmeye göre ayırım gücünü daha yüksek bulmuşlar ve bu iki yöntemin kombine kullanımının *S. sonnei*'nin epidemiyolojik analizinde faydalı olacağını savunmuşlardır. Epidemiyolojik çalışmalarda, tek bir moleküler tiplendirme yöntemi kullanımının yetersiz olabileceği, farklı yöntemler uygulanarak beraber değerlendirilmesinin ayırım gücünü arttıracığı bilinmektedir (Struelens, 1998; Goering, 2004; Rademarker ve Savelkoul, 2004).

Bu çalışmada Ankara ilinde izole edilen *S. sonnei* kökenlerinde (sa) PFGE paterninin endemik görüldüğü izlendi ve bu nedenle PFGE ile yapılan incelemede yöntemin ayırım gücü düşük bulundu (0,26). Elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda kökenler arasında ayırım gücünün arttığı görüldü. Buna göre antibiyotik direnç tiplendirimi ve plazmid profil analizinin birlikte kullanımında ayırım gücü 0,97; antibiyotik direnç tiplendirimi ve PFGE yönteminin birlikte kullanımında 0,79; plazmid profil analizi ve PFGE yönteminin birlikte kullanımında 0,97; tüm yöntemlerin beraber kullanıldığı durumda 0,98 bulundu. Bu nedenle PFGE yöntemine ek olarak bir başka tiplendirme yöntemi kullanılmasının ve yöntemlerin beraber değerlendirilmesinin *Shigella*'ların epidemiyolojik çalışmalarında kökenler arası ayırım gücünü arttırmada faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda Ankara ilinde izole edilen 60 *Shigella* kökeni incelendi ve 49'u (%81,6) *S. sonnei*, 10'u (%16,6) *S. flexneri*, 1'i *S. dysenteriae* (%1,6) bulundu.

Fenotipik tiplendirme yöntemi olan antibiyotik duyarlılık testi ile *S. sonnei* izolatlarında 12; *S. flexneri* izolatlarında 4 antibiyotik direnç modeli bulundu. Bu sonuçlar Simpson'un farklılık indeksine dayalı formülü ile değerlendirildiğinde antibiyotik direnç tiplene'nin *S. sonnei* kökenlerinde ayırım gücü 0,75; *S. flexneri* kökenlerinde 0,54 bulundu. Bu durumda antibiyotik direnç tiplene ile *Shigella* izolatları alt tiplere ayrılabilirdiği ve yöntemin ayırım gücünün yüksek bulunduğu belirlendi.

Plazmid profili ile yapılan inceleme sonucunda *Shigella* kökenlerinin 1 ile 7 arasında değişik sayı ve büyüklükte plazmid taşıdıkları görüldü. *S. sonnei* kökenlerinde 27; *S. flexneri* kökenlerinde 9 plazmid profili izlendi. Simpson'un farklılık indeksi ile plazmid profil analizinin *S. sonnei* kökenlerinde ayırım gücü 0,97; *S. flexneri* kökenlerinde 0,98 bulundu. Bu yöntemin ayırım gücü PFGE ve antibiyotik direnç modeli yönteminden yüksek bulundu.

Antibiyotik direnç modeli ve plazmid profil analizinin *Shigella* kökenlerinin alt tiplere ayrılması için yararlı yöntemler olduğu görüldü. Ancak antibiyotik direnç mekanizmalarının çeşitliliği ve plazmidlerin stabil olmaması nedeniyle sonuçların değişkenlik gösterebileceği, bu nedenle bu yöntemlerin zaman ve yer sınırlaması olan çalışmalarda tercih edilmesinin uygun olacağı düşünölmektedir (Tenover ve ark., 1997; Arbeit, 2003).

Kromozomal DNA incelenmesine olanak veren PFGE yönteminin epidemiyolojik çalışmalarda güvenle kullanılabilirdiği kabul görmektedir (Tenover ve ark., 1997; Goering, 2004). Çalışmamızda PFGE ile *S. sonnei* izolatlarında 4; *S. flexneri* izolatlarında 5 farklı patern belirlendi. Simpson'un farklılık indeksi formölüne göre sonuçlar değerlendirildiğinde PFGE'nin *S. sonnei* izolatlarında ayırım gücü 0,26; *S. flexneri* izolatlarında ayırım gücü 0,76 olarak bulundu. Bu durumda PFGE'nin çalışmamızda incelediğimiz *Shigella* izolatları için ayırım gücünün diğer

yöntemlerden daha düşük olduğu görüldü. Bu durumun Ankara'da belirli *Shigella* klonlarının dolaşımında olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda uyguladığımız antibiyotik direnç tipleme, plazmid profil analizi ve PFGE yöntemini birlikte değerlendirdiğimizde ayırım gücünün yükseldiğini gözlemekteyiz. Bu nedenle *Shigella* kökenlerinin epidemiyolojik çalışmalarında birden fazla yöntem kullanılmasının yüksek ayırım gücü elde etmek için gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Ankara ilinde görülen *Shigella* türlerinin dağılımının ve antibiyotiklere direnç oranlarının belirlenmesi; kökenlerin antibiyotik direnç profili, plazmid profil analizi ve PFGE yöntemleriyle incelenmesi ve kullanılan bu yöntemlerin karşılaştırılması amacıyla yapılan çalışmamızda Ankara'da çeşitli hastanelerin Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Ağustos 2001–Ekim 2001, Ağustos 2008–Ekim 2008 ve Temmuz 2009–Ekim 2009 tarihleri arasında, hastaların dışkı kültürlerinden izole edilen 60 *Shigella* kökeni incelenmiştir.

1. İncelenen 60 *Shigella* kökeninin 49'u *S. sonnei*, 10'u *S. flexneri*, 1'i *S. dysenteriae* bulunmuştur. 2001 yılında izole edilen 23 *Shigella* kökeninin 22'si *S. sonnei*, 1'i *S. flexneri*, 2008 yılında izole edilen 10 *Shigella* kökeninin 9'u *S. sonnei*, 1'i *S. flexneri*; 2009 yılında izole edilen 27 *Shigella* kökeninin 18'i *S. sonnei*, 8'i *S. flexneri* 1'i *S. dysenteriae* bulunmuştur. 2000'li yıllarda Ankara ilinde yaygın olan türün *S. sonnei* olduğu anlaşılmıştır.

2. *Shigella* kökenlerinin CLSI önerileri doğrultusunda disk diffüzyon yöntemi ile antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları incelenmiştir. Ampisiline 16 (%26,6), amoksisilin/klavulonik asite 10 (%16,6), kloramfenikole 9 (%15), nalidiksik asite 6 (%10), sefalotine 14 (%23,3), sefotaksime 4 (%6,6), tetrasikline 4 (%68,3), trimetoprim/sülfametoksazole 55 (%91,6) köken dirençli bulunmuştur. Bu nedenle günümüzde *Shigella*'larda antibiyotik direncinin önemle dikkate alınması gereken boyutlarda olduğu olduğu anlaşılmıştır. *Shigella* türlerinin antibiyotik direnci karşılaştırılmış; *S. flexneri*'nin ampisilin, kloramfenikol, amoksisilin/klavulonik asit direnci *S. sonnei*'ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Ayrıca 2001 ve 2008 *S. sonnei* kökenlerinde sefotaksim direnci görülmezken, 2009'da % 22,2 oranında görülmüştür. Direnç artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 2001 yılında izole edilen 22 *S. sonnei* izolatının 1'inde (%4,5) nalidiksik asit direnci görülürken, 2009 yılında izole edilen 18 *S. sonnei* izolatının 5'inde (%27,5) nalidiksik asit direncine rastlanmıştır. Nalidiksik asit direncinde yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). *S. sonnei*

izolatlarının 41'inde (%83,6), *S. flexneri* izolatlarının 10'unda (%100) çoklu ilaç direnci (iki veya daha fazla sayıda antibiyotiğe direnç) gözlenmiş, oran farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

3. *S. sonnei* izolatlarında 12 farklı antibiyotik direnç modeli izlenmiştir. En sık görülen tetrasiklin trimetoprim/sülfametoksazol direnç modelini (T Sxt) 23 (%46,9) suş göstermiştir. *S. flexneri* izolatlarında 4 farklı antibiyotik direnç modeli izlenmiştir. En sık izlenen ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, kloramfenikol, tetrasiklin trimetoprim/sülfametoksazol direnç modelini (A A/K C T Sxt) 7 suş (%70) göstermiştir. Simpson'un farklılık indeksine dayalı formülü ile antibiyotik direnç tiplene yönteminin ayırım gücü *S. sonnei* kökenlerinde 0,75; *S. flexneri* kökenlerinde 0,54 bulunmuştur.

4. *Shigella* kökenlerinden Kado ve Liu yöntemi kullanılarak plazmid DNA'sı elde edilmiş ve plazmid profilleri araştırılmıştır. Plazmid taşımayan kökene rastlanmamıştır. *S. sonnei* kökenlerinin 1 ile 7 arasında değişik sayı ve büyüklükte plazmid taşıdığı görülmüştür. Plazmid büyüklükleri 200; 120; 25; 20; 18; 15; 12; 10; 7; 5,5; 4,5; 4; 3,5; 3 kb bulunmuştur. 4 kb (%87,0) büyüklüğündeki plazmidin en yaygın görülen plazmid olduğu bulunmuştur. 200 kb büyüklüğündeki virülans plazmidi 16 (%32) izolatta izlenmiştir. *S. flexneri* kökenlerinin 1 ile 7 arasında değişik sayı ve büyüklükte plazmid taşıdıkları görülmüştür. Plazmid büyüklükleri 200; 120; 12; 7; 5,5; 5,1; 5; 4,5; 4; 3,5 kb bulunmuştur. En yaygın görülen 5 kb'lık plazmid 5 (%60) kökende izlenmiştir. 200 kb'lık virülans plazmidi 2 (%20) izolatta izlenmiştir.

5. Çalışmaya alınan *S. sonnei* kökenlerinde 27 plazmid profili izlenmiştir. En sık izlenen plazmid profilinin 7; 5,5; 4 olduğu ve 6 (%12,2) kökenin bu profile sahip olduğu görülmüştür. *S. flexneri* izolatlarında 9 plazmid profili izlenmiştir. En yaygın görülen plazmid profilinin 120; 5 olduğu ve 2 (%20) suşun bu profile sahip olduğu bulunmuştur. Plazmid profil analizinin ayırım gücü Simpson'un farklılık indeksi ile *S. sonnei* kökenlerinde 0,97; *S. flexneri* kökenlerinde 0,98 bulunmuştur.

6. Çalışmaya alınan *Shigella* kökenleri WHO ve CDC standartları doğrultusunda *XbaI* enzimi kullanılarak yapılan PFGE ile incelenmiştir. *S. sonnei* kökenleri 4 (sa, sb, sc, sd); *S. flexneri* kökenleri 5 (fa, fb, fc, fd, fe) PFGE paterni göstermiştir. *S. sonnei* izolatlarında en sık sa paterni (%85,7); *S. flexneri* izolatlarında en sık fa paterni görülmüştür (%40). Yöntemin ayırım gücü *S. sonnei* kökenleri için 0,26; *S. flexneri* kökenleri için 0,76 bulunmuştur. Bu durum Ankara'da belirli *Shigella* klonlarının dolaşımında olduğunu göstermektedir.

7. *Shigella* kökenlerinin tiplendirilmesinde kullanılan yöntemler beraber değerlendirilerek ayırım güçleri hesaplanmıştır. *S. sonnei* kökenlerinde uygulanan PFGE yöntemi, antibiyotik direnç tiplemesi ile beraber değerlendirildiğinde ayırım gücü 0,79; plazmid profil analizi ile beraber değerlendirildiğinde ayırım gücü 0,97 bulunmuştur. Kullanılan tüm yöntemler beraber değerlendirildiğinde ayırım gücünün 0,98'e yükseldiği görülmüştür.

8. Antibiyotik direnç tiplendirimi ve plazmid profil analizinin *Shigella* kökenlerinin tiplendirilmesinde ayırım gücünün yüksek olduğu görülmüştür. *Shigella* kökenlerinin epidemiyolojik incelemesinde kromozom DNA'sını incelemeye olanak veren PFGE yönteminin klonal ilişkileri değerlendirmede değerli olduğu, ancak Ankara'da aynı klonun uzun zamandan beri dolaşımında olması nedeniyle ek bir tiplendirme yöntemi ile beraber değerlendirilmesinin ayırım gücünün yükseltilmesi için gerekli olduğu belirlenmiştir.

ÖZET

***Shigella* Kökenlerinin Antibiyotik Direnç Modelleri, Plazmid Profil Analizi ve Pulsed-Field Jel Elektroforezi ile İncelenmesi**

Bu çalışmada Ankara ilinde görülen *Shigella* türlerinin dağılımının belirlenmesi; *Shigella* türlerinde antibiyotiklere direnç oranlarının belirlenmesi; antibiyotik direnç modelleri, plazmid profil analizleri ve PFGE yöntemleriyle incelenmesi; *Shigella* türlerinin incelenmesinde tiplendirme yöntemi olarak antibiyotik direnç modeli, plazmid profil analizi ve PFGE'nin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya Ankara'da Ağustos 2001–Ekim 2001, Ağustos 2008–Ekim 2008 ve Temmuz 2009–Ekim 2009 tarihleri arasında standart yöntemlerle klinik örneklerden izole edilen 60 *Shigella* kökeni alınmıştır. İzolatların 49'u (%81,6) *S. sonnei*, 10'u (%16,6) *S. flexneri*, 1'i *S. dysenteriae* (%1,6) olarak tanımlanmıştır.

Shigella kökenlerinin CLSI önerileri doğrultusunda disk diffüzyon yöntemi ile antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları incelenmiştir. Ampisiline 16 (%26,6), amoksisilin/klavulonik asite 10 (%16,6), kloramfenikole 9 (%15), nalidiksik asite 6 (%10), sefalotine 14 (%23,3), sefotaksime 4 (%6,6), tetrasikline 4 (%68,3), trimetoprim/sülfametoksazole 55 (%91,6) köken dirençli bulunmuştur. *Shigella* türlerinin antibiyotik direnci karşılaştırılmış *S. flexneri*'nin ampisilin, kloramfenikol, amoksisilin/klavulonik asit direnci *S. sonnei*'ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$).

Shigella kökenlerinin incelenmesinde fenotipik tiplendirme yöntemi olarak antibiyotik direnç tiplendirimi kullanılmıştır. *S. sonnei* izolatlarında 12 farklı antibiyotik direnç modeli izlenmiş, en sık görülen tetrasiklin ve trimetoprim/sülfametoksazol direnç modelini (T Sxt) 23 (%46,9) köken göstermiştir. *S. flexneri* izolatlarında 4 farklı antibiyotik direnç modeli izlenmiş, en sık izlenen ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, kloramfenikol, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfametoksazol direnç modelini (A A/K C T Sxt) 7 köken (%70) göstermiştir. Simpson'un farklılık indeksine dayalı formülü ile antibiyotik direnç tiplendirme yönteminin ayırım gücü *S. sonnei* kökenleri için 0,75; *S. flexneri* kökenleri için 0,54 bulunmuştur.

Shigella kökenlerinden Kado ve Liu yöntemi kullanılarak plazmid DNA'sı elde edilmiş ve plazmid profilleri araştırılmıştır. Plazmid taşımayan kökene rastlanmamıştır. *Shigella* kökenlerinin plazmid profil analizi sonucunda 1 ile 7 arasında değişik sayılarda ve 200 ile 3 kb arasında değişen büyüklüklerde plazmid taşıdıkları görülmüştür.

S. sonnei kökenlerinde 27, *S. flexneri* kökenlerinde 9 plazmid profili izlenmiştir. Plazmid profil analizinin ayırım gücü *S. sonnei* kökenlerinde 0,97; *S. flexneri* kökenlerinde 0,98 bulunmuştur.

Shigella kökenleri WHO ve CDC protokolleri doğrultusunda *Xba*I enzimi kullanılarak PFGE yöntemi ile incelenmiştir. *S. sonnei* kökenleri 4, *S. flexneri*

kökenleri 5 PFGE paterni göstermiştir. *S. sonnei* izolatlarında en sık sa paterni (%85,7); *S. flexneri* izolatlarında en sık fa paterni görülmüştür (%50). PFGE yönteminin ayırım gücü *S. sonnei* kökenleri için 0,26; *S. flexneri* kökenleri için 0,76 bulunmuştur.

Üç yöntem beraber değerlendirildiğinde ayırım gücünün 0,98'e yükseldiği gösterilmiştir. Epidemiyolojik amaçlarla *Shigella* kökenlerinin incelenmesinde PFGE'nin klonal ilişkileri değerlendirmede uygun olduğu; ancak Ankara'da aynı klonun uzun zamandır dolaşımda olması nedeniyle antibiyotik direnç modeli ve/veya plazmid profil analizi ile birlikte kullanılmasının ayırım gücünün yükseltilmesi için yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Shigella*, antibiyotik duyarlılıkları, antibiyotik direnç modeli, plazmid profil analizi, pulsed-field jel elektroforezi

SUMMARY

Investigation of *Shigella* Strains by Antibiotic Resistance Models, Plasmid Profile Analysis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis

In this study we aimed to determine the distribution of *Shigella* species isolated in Ankara city, determine antibiotic resistance among *Shigella* strains; investigate by antibiotic resistance models, plasmid profile analysis and PFGE methods, compare antibiotic resistance models, plasmid profile analysis and PFGE as typing methods in *Shigella* species.

Totally 60 *Shigella* strains isolated by standart methods from clinical samples between August 2001- October 2001, August 2008- October 2008 and July 2009- October 2009 were included in this study. Of the isolates 49 (%81,6) were *S. sonnei*, 10 (%16,6) *S. flexneri* and 1 (%1,6) *S. dysenteriae*.

Shigella strains were investigated for in-vitro antibiotic susceptibilities by disc diffusion method according to the directions of CLSI. The number of isolates resistant to antibiotics and resistance rates were as follows; 6 (%26,6) for ampicillin, 10 (%16,6) for amoxicillin/clavulanic acid, 9 (%15) for chloramphenicol, 6 (%10) for nalidixic acid, 14 (%23,3) for cephalothin, 4 (%6,6) for cephotaxim, 4 (%68,3) for tetracycline and 55 (%91,6) for trimethoprim/sulfamethoxazole. Antibiotic resistance among *Shigella* species were compared and ampicillin, chloramphenicol, amoxicillin/clavulanic acid, resistance in *S. flexneri* were higher then *S. sonnei* which is found to be statistically significant ($p < 0.001$).

Antibiotic resistance typing is performed as a phenotypic typing method in investigation of *Shigella* strains. *S. sonnei* isolates demonstrated 12 antibiotic resistance models, the most common tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance model (T Sxt) was observed in 23 (%46,9) of the isolates. *S. flexneri* demonstrated 4 antibiotic resistance models, the most common ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, chloramphenicol, tetracycline, and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance model (A A/K C T Sxt) was observed in 7 (%70) of the isolates. Discriminatory power of the antibiotic resistance typing method was calculated according to the Simpson's discriminatory index formula and found as 0,75 for *S. sonnei* and 0,54 for *S. flexneri*.

Plasmid DNA of *Shigella* strains were extracted by the method of Kado and Liu and plasmid profiles were analysed. All strains were found to have plasmids. Plasmid profile analysis revealed that *Shigella* strains have different number of plasmids between 1-7 and different sizes of plasmids ranging from 200-3 kb.

Totally 27 plasmid profiles in *S. sonnei* and 9 profiles in *S. flexneri* was observed. The discriminatory power of plasmid profile analysis is calculated as 0,97 for *S. sonnei* and 0,98 for *S. flexneri*.

Shigella strains were examined by PFGE method using *Xba*I enzyme performed by following directions of WHO and CDC protocols. Four PFGE patterns were obtained in *S. sonnei*, 5 in *S. flexneri*. Sa pattern in *S. sonnei* (%85,7) and fa pattern in *S. flexneri* (%50) were the most frequently found patterns. Discriminatory power of PFGE method is calculated as 0,26 for *S. sonnei* and 0,76 for *S. flexneri*.

When the three method were evaluated together, the discriminatory power increases to 0,98. In investigation of *Shigella* strains for epidemiological purposes, PFGE is found to be convenient for evaluating clonal relations but because of the same clone is in circulation for a long time of period in Ankara, performing antibiotic typing method and/or plasmid profile analysis in addition to PFGE will be usefull in increasing discriminatory power of the method.

Key Words: *Shigella*, antibiotic susceptibility, antibiotic resistance model, plasmid profile analysis, pulsed-field gel electrophoresis

KAYNAKLAR

Akçalı, A., Levent, B., Akbaş, E., Esen, B. (2008). Typing of *Shigella sonnei* strains isolated in some provinces of Turkey using antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis methods. *Mikrobiyoloji Bulvarı* **42(4)**: 563-572.

Alıcı, O., Açıkgöz, Z., Gamberzade, S., Göçer, S., Karahocagil, M.K. (2006). Antibiotic resistance rates of *Shigella* species isolated from stool cultures in the years 1999-2003. *Mikrobiyoloji Bulvarı* **40(1-2)**: 9-14.

Altwegg, M., Bockemühl, J. (1998). *Escherichia* and *Shigella*. In: *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections* (ed. L. Collier, A. Balows, M. Susman) *Systemic Bacteriology* (ed. A. Balows, B.I. Duerden), pp.935-967. Arnold: London.

Arbeit, R.D. (2003). Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: *Manual of Clinical Microbiology* (ed. P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Tenover), pp.116-139. ASM Press: Washington.

Ashkenazi, S., Levy, I., Kazaronovski, V., Samra, Z. (2003). Growing antimicrobial resistance of *Shigella* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51(2)**: 427-429.

Aysev, A.D., Güriz, H. (1998). Drug Resistance of *Shigella* Strains Isolated in Ankara – Turkey, 1993-1996. *Scandinavian Journal of Infections Diseases* **30(4)**: 351-353.

Aysev, A.D. (2008). *Shigella* Türleri. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Etkenlere Göre Enfeksiyonlar* (ed. A.W. Topçu, G. Söyletir, M. Doğanay), pp.2164-2168. Nobel Tıp Kitapevleri: İstanbul.

Balaban, N., Mumcuoğlu, İ.I., Ulusoy, A., Hayırlıoğlu, N., Yetener, V., Bodur, H. (2004). *Shigella* türlerinin epidemiyolojisindeki ve antimikrobiyal duyarlılıklarındaki değişim. *Flora* **9(3)**: 200-203.

Bilgehan, H. (2000). *Shigella*. *Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları* (ed. H. Bilgehan), pp.17-19. Fakülteler Kitabevi: İzmir.

Bilgehan, H. (2005). Mikroorganizma Genetiği. *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi* (ed. H. Bilgehan), pp.120-152. Fakülteler Kitabevi: İzmir.

Bingöler, E.B. (2003). Çocukluk Çağı Akut Gastroenteritlerinde Non Tifoidal *Salmonella* ve *Shigella* Sıklığı, Klinik Özellikleri, Antibiyotik Direnci ve Serotiplendirme. Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara.

Birengel, S., Kurt, H., Boşca, A., Erdem, B., Tekeli, E. (1998). *Salmonella* ve *Shigella* Cinsi Bakterilerin Çeşitli Antibiyotiklere İn Vitro Duyarlılıkları. *İnfeksiyon Dergisi* **12(4)**: 471-476.

Black, R.E., Lanata, C.F. (2007). Diarrheal Diseases. In *Infectious Disease Epidemiology: Theory and Practice* (ed. K.E. Nelson, C.F.M. Williams), pp.759-786. Jones and Bartlett Publishers: Massachusetts.

Blocker, A.J., Deane, J.E., Veenendaal, A.K., Roversi, P., Hodgkinson, J.L., Johnson, S., Lea, S.M. (2008). What's the point of the type III secretion system needle?. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105(18)**: 6507-6513.

Brian, M.J., Van, R., Townsend, I., Murray, B.E., Cleary, T.G., Pickering, L.K. (1993). Evaluation of the molecular epidemiology of an outbreak of multiply resistant *Shigella sonnei* in a day-care center by using pulsed-field gel electrophoresis and plazmid DNA analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **31(8)**: 2152-2156.

Butler, T., Scheld, W.M. (2004). Shigellosis. In *Cecil Textbook of Medicine*. (ed. L. Goldman, D. Ausiello), pp.1852-1854. Saunders: Philadelphia.

Büke, A.Ç., Karakartal, G., Tünger, A., Kamçioğlu, S., Nafie, B. (1999). 1996-1998 Yılları Yaz Dönemindeki İshalli Olgularda *Salmonella* ve *Shigella* Prevalansı ve Antimikrobik Duyarlılıkları. *İnfeksiyon Dergisi* **13(3)**: 355-357.

Campbell, J.D., Kotloff, K.L., Levine, M.M. (2004). Specific and Non Specific Treatment of Diarrhea. In *Infectious Diseases* (ed. S.L. Gorbach, J.G. Bartlett, N.R. Blacklow), pp.702-710. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.

Ceyhan, M., Akan, O., Kanra, G., Ecevit, Z., Seçmeer, G., Berkman, E. (1996). Changing patterns of the prevalence of different *Shigella* species and their antibiotic susceptibilities in Ankara, Turkey. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*. **14(3)**: 187-189.

Cherla, R.P., Lee, S.Y., Tesh, V.L. (2003). Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiology Letters* **228(2)**: 159-166.

CLSI. Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing, 18th Informational Supplement. CLSI Document M1000-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratories Standarts Institute; 2008

Çaylan, R. (2008). Bakteriyal İshaller. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Etkenlere Göre Enfeksiyonlar* (ed. A.W. Topçu, G. Söyletir, M. Doğanay), pp.1051-1064. Nobel Tıp Kitapevleri: İstanbul.

Çiftçi, İ.H., Aşık, G., Aktepe, O.C. (2009). Dışkı Kültürlerinden İzole Edilen *Shigella* Suşları İçin 7 Yıllık Değerlendirme. 24. ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi sy. 84. Fethiye.

DeLappe, N., O'Halloran, F., Fanning, S., Corbett-Feeney, G., Cheasty, T., Cormican, M. (2003). Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolates from western Ireland, an area of low incidence of infection. *Journal of Clinical Microbiology* **41(5)**: 1919-1924.

Demirtürk, N. (2004). Akut İshalli Olguların Değerlendirilmesi: 2 Yıllık İzlem. *ANKEM* **18(1)**: 24-27.

Dupont, H.L. (2010). *Shigella* Species (Bacillary Dysentery). In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (ed. G.L. Mandell, J.E. Bennett), pp.2905-2919. Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia.

Durmaz, R. (2001). Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji* (ed. R. Durmaz), pp.139-147. Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul.

Ekşi, F., Karşılıgil, T., Bayram, A. (2007). Çocukluk Yaş Grubu İshallerinde Escherichia Coli O157:H7'nin Araştırılması. *Van Tıp Dergisi* **14 (1)**: 15-18.

Erdem, B. (1999). Enterobacteriaceae. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* (ed. G. Mutlu, T. İzmir, A.T. Cengiz, Ş. Ustaçelebi, E. Tümbay, Ö. Mete), pp.471-515. Güneş Kitabevi: Ankara.

Farshad, S., Sheikhi, R., Japoni, A., Basiri, E., Alborzi, A. (2006). Characterization of *Shigella* strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of ipa genes. *Journal of Clinical Microbiology* **44(8)**: 2879-2883.

Fasano, A., Noriega, F.R., Maneval, D.R. Jr., Chanasongram, S., Russell, R., Guandalini, S., Levine, M.M. (1995). *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. *The Journal of Clinical Investigation* **95(6)**: 2853-2561.

Foley, S.L., Lynne, A.M., Nayak, R. (2009). Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* **9(4)**: 430-440.

Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J.S., Manning, S.D., Marrs, C.F. (2005). Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives & Innovations* **2**: 10.

Fullá, N., Prado, V., Durán, C., Lagos, R., Levine, M.M. (2005). Surveillance for Antimicrobial Resistance Profiles Among *Shigella* Species Isolated from a Semirural Community in The Northern Administrative Area of Santiago, Chile. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **72(6)**: 851-854.

Goering, R.V. (2004). Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In *Molecular Microbiology: Diagnostic principles and practice* (ed. D.H. Persing, F.C. Tenover, J. Versalovic, Y-W. Tang, E.R. Unger, D.A. Relman, T.J. White), pp.185-196. ASM Press: Unated States of America.

Goldberg, M.B. (2008) Shigellosis. In *Cecil Medicine* (ed. L. Goldman, D. Ausiello), pp.2246-2248. Saunders Elsevier: Philadelphia.

Güleşen, R.K., Sevimli, F.S., Uepla Çalışma Grubu Üyeleri. (2008). Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA) Verilerinin İlk Üç Aylık Analiz Sonuçları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* **65(1)**: 1-3.

Hale, T.L. (1998). Bacillary Dysentery. In: *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections* (ed. L. Collier, A. Balows, M. Susman) *Bacterial Infections* (ed. W.J. Hausler Jr, M. Susman), pp.479-493. Arnold: London.

Hunter, P.R., Gaston, M.A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* **26(11)**: 2465-2466.

Kado, C.I., Liu, S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology* **145**: 1365-1373.

Kaleli, İ., Özen, N., Şengül, M., Akşit, F. (1998). *Shigella* Suşlarının Antimikrobiyal Ajanlara Duyarlılıkları. *İnfeksiyon Dergisi* **12(3)**: 381-383.

Kanan, B., Aksüt, F. (2003). Akut Gastro-Enteritli Olgularda *Campylobacter* Sıklığının Araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* **17(1)**: 11-14.

Karacan, C., Tavıl, B., Topal, Y., Zorlu, P., Tayman, C. (2007). Evaluation of shigellosis in a Turkish children's hospital. *Pediatrics International* **49**: 589-592.

Keusch, G.T. (2002). *Shigella*. In *Molecular Medical Microbiology* (ed. M. Susman), pp.1279-1290. Academic Press: London.

Khan, E., Jabeen, K., Ejaz, M., Siddiqui, J., Shezad, M.F., Zafar, A. (2009). Trends in antimicrobial resistance in *Shigella* species in Karachi, Pakistan. *The Journal of Infection in Developing Countries* **3(10)**: 798-802.

Kotloff, K.L., Winickoff, J.P., Ivanoff, B., Clemens, J.D., Swerdlow, D.L., Sansonetti, P.J., Adak, G.K., Levine, M.M. (1999). Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bulletin of the World Health Organization* **77(8)**: 651-666.

Kosek, M., Bern, C., Guerrant, R.L. (2003). The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin of the World Health Organization* **81(3)**: 197-204.

Kuo, C.Y., Su, L.H., Perera, J., Carlos, C., Tan, B.H., Kumarasinghe, G., So, T., Van, P.H., Chongthaleong, A., Song, J.H., Chiu, C.H. (2008). Antimicrobial susceptibility of *Shigella* isolates in eight Asian countries, 2001-2004. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **41(2)**: 107-111.

Lee, T.M., Chang, L.L., Chang, C.Y., Wang, J.C., Pan, T.M., Wang, T.K., Chang, S.F. (2000). Molecular analysis of *Shigella sonnei* isolated from three well-documented outbreaks in school children. *Journal of Medical Microbiology* **49(4)**: 355-360.

Lin, C.S., Wang, T.K., Tsai, J.L., Ho, S.I., Lee, C.L., Chen, H.Y., Pan, T.M. (1999). Relatedness of *Shigella sonnei* isolates from six outbreaks in Tao-Yuan area, Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **32(4)**: 278-282.

Liu, P.Y., Lau, Y.J., Hu, B.S., Shyr, J.M., Shi, Z.Y., Tsai, W.S., Lin, Y.H., Tseng, C.Y. (1995). Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* **33(7)**: 1779-1783.

Mandomando, I., Jaintilal, D., Pons, M.J., Vallès, X., Espasa, M., Mensa, L., Sigauque, B., Sanz, S., Sacarlal, J., Macete, E., Abacassamo, F., Alonso, P.L., Ruiz, J. (2009). Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance in *Shigella* and *Salmonella* isolates from children under five years of age with diarrhea in rural Mozambique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53(6)**: 2450-2454.

Mayer, L.W. (1988) Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **1(2)**: 228-243.

Meaysa, C.L., Broersma, K., Nordina, R., Mazumder, A. (2004). Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *Journal of Environmental Management* **73**: 71-79.

- Najafi, N., Ghasemian, R., Shariatzadeh, M., Alian, S. (2008). Antimicrobial Resistance of *Shigella* from Patients with Acute Diarrhea. Quaemshahr, Mazandaran, Iran. *Research Journal of Biological Sciences* **3(3)**: 332-336.
- Nataro, J.P., Bopp, C.A., Fields, P.I., Kaper, J.B., Strockbine, N.A. (2007). *Escherichia, Shigella* and *Salmonella*. In *Manual of Clinical Microbiology* (ed. P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, M.A. Pfaller), pp. 677-679. ASM Press: Washington.
- Na-Ubol, M., Samosornsuk, S., Von Seidlein, L., Tapchaisri, P., Ali, M., Clemens, J.D., Chaicumpa, W. (2006). Molecular characteristics of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhoea in a new industrialized area of Thailand. *Epidemiology and Infection* **134(5)**: 997-1003.
- Navia, M.M., Capitano, L., Ruiz, J., Vargas, M., Urassa, H., Schelleberg, D., Gascon, J., Vila, J. (1999). Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. *Journal of Clinical Microbiology* **37(10)**: 3113-3117.
- Niyogi, S.K. (2005). Shigellosis. *The Journal of Microbiology* **43(2)**: 133-143.
- Ogawa, M., Handa, Y., Ashida, H., Suzuki, M., Sasakawa, C. (2008). The versatility of *Shigella* effectors. *Nature Reviews Microbiology* **6(1)**: 11-16.
- Olive, D.M., Bean, P. (1999). Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37(6)**: 1661-1669.
- Otkun, M., Akata, F., Karabay, O., Tatman-Otkun, M., Tuğrul, M., DüNDAR, V. (1997). Edirne’de 1994 ve 1995 Yıllarında İzole Edilen *Shigella* Türlerinde Antimikrobik Direnci. *İnfeksiyon Dergisi* **11(1)**: 11-14.

- Öngen, B. (2006). Türkiye'de İshal Etkenleri. *ANKEM* **20(Ek 2)**: 122-134.
- Özkalp, B. (2000). *Shigella* Cinsi Bakterilerin Çeşitli Antibiyotiklere İn-Vitro Duyarlılık Durumu. *İnfeksiyon Dergisi* **14(4)**: 515-517.
- Özmert, E.N., Göktürk, B., Yurdakök, K., Yalçın, S.S., Gür, D. (2005). *Shigella* Antibiotic Resistance in Central Turkey: Comparison of the Years 1987–1994 and 1995–2002. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **40**: 359-362.
- Öztürk, R., Midilli, K., Okyay, K., Eroğlu, C., Aygün, G., Kenani, Y., Sarsan, A. (1994). Çocuk ve Erişkin Yaş Grubu Sürgün Olgularında *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* Sıklığının Araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* **24**: 42-45.
- Parsot, C. (2009). *Shigella* type III secretion effectors: how, where, when, for what purposes?. *Current Opinion Microbiology* **12(1)**: 110-116.
- Pfaller, M.A. (2001). Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerging Infections Diseases* **7(2)**: 312-318.
- Phalipon, A., Sansonetti, P.J. (2003). Shigellosis: Innate Mechanisms of Inflammatory Destruction of the Intestinal Epithelium, Adaptive Immune Response, and Vaccine Development. *Critical Reviews in Immunology* **23**: 371-401.
- Phalipon, A., Sansonetti, P.J. (2007). *Shigella*'s ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival?. *Immunology and Cell Biology* **85**: 119-129.
- Philpott, D.J., Edgeworth, J.D., Sansonetti, P.J. (2000). The pathogenesis of *Shigella flexneri* infection: lessons from *in vitro* and *in vivo* studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society Lond B Biological Sciences* **355**: 575-586.

Pullukçu, H., Aydemir, Ş., Sipahi, O.R., Yamazhan, T., Tünger, A. (2007). 1999-2006 Yılları Arasında Dışkı Kültürlerinden İzole Edilen 439 *Shigella* Kökeninin Tür Dağılımı ve Antibakteriyel Direnç Durumları. *ANKEM* **21(3)**: 137-141.

Rademaker, J.L.W., Savelkoul, P. (2004). PCR Amplification-Based Microbial Typing. In *Molecular Microbiology: Diagnostic principles and practice* (ed. D.H. Persing, F.C. Tenover, J. Versalovic, Y-W. Tang, E.R. Unger, D.A. Relman, T.J. White), pp.197-221. ASM Press: Unated States of America.

Ranjbar, R., Soltan-Dallal, M.M., Pourshafie, M.R., Mammina, C. (2009). Antibiotic resistance among *Shigella* serogroups isolated in Tehran, Iran (2002-2004). *Journal of Infection in Developing Countries* **15;3(8)**: 647-648.

Refiksaydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı. *Shigella* İzolasyonu ve İdentifikasyonu Standart İşletim Prosedürü.

Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease* **3(1)**: 59-67.

Sansonetti, P.J. (2006). The bacterial weaponry: lessons from *Shigella*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1072**: 307-312.

Schroeder, G.N., Hilbi, H. (2008). Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion and death by type III secretion. *Clinical Microbiology Reviews* **21(1)**: 134-156.

Sire, J.M., Macondo, E.A., Perrier-Gros-Claude, J.D., Siby, T., Bahsoun, I., Seck, A., Garin, B. (2008). Antimicrobial resistance in *Shigella* species isolated in Dakar, Senegal (2004-2006). *Japanese Journal of Infections Diseases* **61(4)**: 307-309.

Sivapalasingam, S., Nelson, J.M., Joyce, K., Hoekstra, M., Angulo, F.J., Mintz, E.D. (2006). High prevalence of antimicrobial resistance among *Shigella* isolates in the United States tested by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System from 1999 to 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50(1)**: 49-54.

Struelens, M.J. (1998). Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* **93(5)**: 581-585.

Sur, D., Ramamurthy, T., Deen, J., Bhattacharya, S.K. (2004). Shigellosis: challenges & management issues. *The Indian Journal of medical research* **120**: 454-462.

Suzuki, T., Sasakawa, C. (2001). Molecular Basis of the Intracellular Spreading of *Shigella*. *Infection and Immunity* **69**: 5959-5966.

Tacket, C.O., Shahid, N., Huq, M.I., Alim, A.R., Cohen, M.L. (1984). Usefulness of plasmid profiles for differentiation of *Shigella* isolates in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology* **20(2)**: 300-301.

Talukder, K.A., Islam, Z., Dutta, D.K., Islam, M.A., Khajanchi, B.K., Azmi, I.J., Iqbal, M.S., Hossain, M.A., Faruque, A.S., Nair, G.B., Sack, D.A. (2006). Antibiotic resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolated from patients with diarrhoea between 1999 and 2003 in Bangladesh. *Journal of Medical Microbiology* **55**: 1257-1263.

T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı ve Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. (2002). İnfeksiyöz Ajan Sürveyansı: Enterik Patojenler Laboratuvarı 2001 Yılı Gaita Kültürü Sonuçları. *Aylık Epidemiyoloji Raporu* **1**: 20.

Tenover, F.C, Arbeit, R.D, Goering, R.V. (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **18(6)**: 426-439.

Terajima, J., Tamura, K., Hirose, K., Izumiya, H., Miyahara, M., Konuma, H., Watanabe, H. (2004). A multi-prefectural outbreak of *Shigella sonnei* infections associated with eating oysters in Japan. *Microbiology and Immunology* **48(1)**: 49-52.

The Enterobacteriaceae. (2006). In Koneman Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (ed. W. Winn Jr, S. Allen et al eds.), pp.211-302. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia.

Tiruneh, M. (2009). Serodiversity and antimicrobial resistance pattern of *Shigella* isolates at Gondar University teaching hospital, Northwest Ethiopia. *Japanese Journal of Infections Diseases* **62(2)**: 93-97.

Torres, A.G. (2004). Current aspects of *Shigella* pathogenesis. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* **46(3-4)**: 89-97.

Üstün, C., Arslantürk, A., Karademir, A. (2002). The Antimicrobial Susceptibility Test Among Clinical Isolates of *Shigella sonnei* in Ankara, Summer 2001. *Clinical Microbiology and Infection* **8:S1**: 125.

WHO; CDS; CSR; EDC; 99.8. (1999). Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera. Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia, pp.17-35.

World Health Organisation (2004). R.S. Hendriksen (ed). A global salmonella surveillance and laboratory support Project and laboratory protocols.

Wu, C.H., Huang, L.T., Huang, I.F., Liu, J.W., Chen, J.B., Liang, C.D., Hwang, K.P., Tiao, M.M. (2009). Acute non-outbreak shigellosis: ten years experience in southern Taiwan. *Chang Gung Medical Journal* **32(1)**: 59-65.

Van Belkum, A., Tassios, P., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M. (2007). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* **3**: 1-46.

Veenendaal, A.K., Hodgkinson, J.L., Schwarzer, L., Stabat, D., Zenk, S.F., Blocker, A.J. (2007). The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Molecular Microbiology*. **63(6)**: 1719-1730.

Vrints, M., Mairiaux, E., Van Meervenne, E., Collard, J.M., Bertrand, S. (2009). Surveillance of antibiotic susceptibility patterns among *Shigella sonnei* strains isolated in Belgium during the 18-year period 1990 to 2007. *Journal of Clinical Microbiology*. **47(5)**: 1379-1385.

Yağcı, S. (1999). Çocukluk Çağı İshal Etkenleri Arasında *Campylobacter* Türlerinin Sıklığı. Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara.

Yazgı, H., Ertek, M., Erol, S., Aktaş, O. (2001). Erzurum Yöresinde İzole Edilen *Shigella* Türleri ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi **31**: 169-173.

Yismaw, G., Negeri, C., Kassu, A. (2006). A five-year antimicrobial resistance pattern observed in *Shigella* species isolated from stool samples in Gondar University Hospital, northwest Ethiopia. *Ethiopian Journal of Health Development* **20(3)**: 194-198.

Yurdakök, K., Şahin, N., Özmert, E., Berkman, E. (1997). *Shigella* gastroenteritis: clinical and epidemiological aspects, and antibiotic susceptibility. *Acta Paediatrica Japonica* **39(6)**: 681-684.