

TÜRKİYE’NİN BAZI İLLERİNDE İZOLE EDİLEN *SHIGELLA SONNEI* SUŞLARININ ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ VE “PULSED FIELD” JEL ELEKTROFOREZİ YÖNTEMLERİ İLE TİPLENDİRİLMESİ

TYPING OF *SHIGELLA SONNEI* STRAINS ISOLATED IN SOME PROVINCES OF TURKEY USING ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS METHODS

Alper AKÇALI¹, Belkis LEVENT¹, Efsun AKBAŞ¹, Berrin ESEN¹

¹ Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara. (aakcali@isnet.net.tr)

ÖZET

Shigella türleri enfektif dozlarının düşük olması nedeniyle kişiden kişiye bulaşın kolay ve sekonder atak hızının yüksek olduğu, zaman zaman büyük epidemilere yol açan enfeksiyonlara sebep olabilir. *Shigella sonnei*, gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde ishallerin önemli bir sebebi olup yakın dönemde Türkiye’de *Shigella* serogrupları arasında en sık bildirilenidir. Bu çalışmada 1999 yılında Marmara bölgesi depremi sonrasındaki izlemde İzmit (n= 5), Adapazarı (n= 6) ve Yalova (n= 2) illeri ile 1997, 2000 ve 2001 yıllarında Ankara’da (n= 17) izole edilen toplam 30 *S. sonnei* izolatının, antimikrobiyal direnç paneli ve *XbaI* restriksiyon enzimi kullanılarak “pulsed field” jel elektroforezi (PFGE) ile tiplendirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışılan izolatların tümü gentamisin, seftriakson, imipenem, nalidiksik asit ve siprofloksasine duyarlı bulunmuş; streptomisine 23 (%76.6), trimetoprim/sülfametoksazole 21 (%70), tetrasikline 20 (%66.6), ampisiline 6 (%20), sulbaktam/ampisiline 3 (%10) ve kloramfenikole 1 (%3.3) izolat dirençli olarak saptanmıştır. Üçer izolatın (%10) tetrasiklin ve sefoperazona orta duyarlı olduğu tespit edilmiş; 4 (%13.3) izolat ise tüm antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur. Antimikrobiyal dirençleri gruplandırıldığında toplam dokuz farklı patern izlenmiştir. *XbaI* enzimi ile kesilen bakteri DNA’larının PFGE’si sonucunda, izolatlar A (n= 24) ve B (n= 6) olmak üzere iki ana gruba ve ana grupla yakın veya olası ilişkili olan 13 alt tip olmak üzere toplam 15 PFGE tipine sınıflandırılmıştır. Ankara içinde aynı klondan köken alan suşların 2000-2001 yıllarında dolaşımda olduğu tespit edilmiştir. İzolatların elde edildiği illerde birden fazla klonun dolaşımda olduğu saptanmıştır. Çalışmamız ile Türkiye’de *S. sonnei* izolatlarının PFGE ile tiplendirilebileceği gösterilmiş olup, Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Ağı için başlangıç verisi elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Shigella sonnei*, antimikrobiyal direnç, PFGE, tiplendirme.

ABSTRACT

Shigella species may lead to large epidemics owing to their low infective doses and frequent transmission from person to person with high secondary attack rates. *Shigella sonnei* is one of the most pre-

valent causative agent of infectious gastroenteritis in developing and developed countries and it is the most frequently reported *Shigella* serotype from Turkey in recent years. The aim of this study was to determine the types of *S. sonnei* strains isolated in different provinces of Turkey [in Marmara earthquake regions (Izmit, n= 5; Adapazari, n= 6; Yalova, n= 2) in 1999 and in Ankara (n= 17) in 1997, 2000 and 2001] according to their antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) patterns. All isolates were found sensitive to gentamicin, ceftriaxone, imipenem, nalidixic acid and ciprofloxacin. Twenty three (76.6%) of isolates were found resistant to streptomycin, 21 (70%) to trimethoprim-sulfamethoxazole, 20 (66.6%) to tetracycline, 6 (20%) to ampicillin, 3 (10%) to ampicillin/sulbactam and 1 (3.3%) to chloramphenicol. Three (%10) isolates were detected as intermediate susceptible to tetracycline and cefoperazone, while four isolates (13.3%) were susceptible to all antimicrobial agents tested. A total of nine different patterns were obtained according to antimicrobial resistance patterns. PFGE was performed by *Xba*I restriction enzyme. Isolates were grouped into A (n= 24) and B (n= 6) main PFGE types and into 13 closely or possibly related types. A total of 15 different PFGE patterns were identified among the isolates. It was determined that isolates from the same clone disseminated in Ankara during the years 2000-2001. Overall, different clones of *S. sonnei* strains were in dissemination in the provinces included. This study indicated that different *S. sonnei* clones were in circulation in Turkey and these results constitute the basic molecular preliminary data for the National Enteric Pathogens Laboratory Network in Turkey.

Key words: *Shigella sonnei*, antimicrobial resistance, PFGE, typing.

GİRİŞ

Tüm dünya genelinde her yıl meydana gelen *Shigella* enfeksiyonu sayısının 164.7 milyon kadar olduğu düşünülmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde *Shigella* cinsi bakterilerin yol açtığı dizanteri tablosu, çocukluk yaşlarındaki ishal ve mortalite sebeplerinin başında gelmektedir. Beş yaş altı çocuklarda her yıl 113 milyon olgu ortaya çıktığı ve bunların 667.000'inin ölümlerine sonuclandığı bildirilmektedir¹. Ülkemizdeki ishal insidansı kesin olarak bilinmemekle birlikte, bu sayının 1-1.5 milyon olgu/yıl olduğu ve büyük çoğunluğunu çocukların oluşturduğu, 30.000 kadar ishalleri olgunun kaybedildiği tahmin edilmektedir².

Türkiye'den yapılan çeşitli çalışmalarda, ishal şikayetiyle başvuranların dışkılarından *Shigella* spp. izolasyon sıklığının %2-11.4 arasında ve *Salmonella* izolasyon sıklığının bu oranın ortalama dört katı kadar olduğu bildirilmiştir³⁻⁵. Farklı coğrafik bölgelerde ve sosyoekonomik seviyelerdeki topluluklarda, *Shigella* türlerinin izolasyon sıklığı değişiklik göstermektedir⁶. Türkiye'de son yıllarda *Shigella* türleri içerisinde en sık *S. sonnei*'nin izole edildiği bildirilmektedir^{7,8}. Sağlık Bakanlığının 2005 yılı verilerine göre, *S. sonnei* (%56.5) en sık bildirilen *Shigella* türü olurken, bunu sırasıyla *S. dysenteriae* (%22.9), *S. flexneri* (%14.5) ve *S. boydii* (%6.1) izlemektedir⁹.

Enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde, olgulardan izole edilen mikroorganizmalar arasındaki epidemiyolojik ilişkinin gösterilmesi büyük önem taşımaktadır. Genel olarak salgınlara yol açan etyolojik etken genetik olarak eş veya yakın ilişkili organizmadan köken almaktadır¹⁰. Enfeksiyon etkenlerinin alt tiplerine göre sınıflandırılması; toplumsal veya nozokomiyal salgınlara ve enfeksiyon kaynağının saptanması ile yayılımının takibini, virülen suşların belirlenmesini, enfeksiyon nedeniyle tedavi edilen hastalarda re-enfeksiyon veya relapsın değerlendirilmesini ve aşılama programlarının izlenebilmesini mümkün kılmaktadır¹¹. Fenotipik tiplendirme yöntemleri; ayrıştırma güçlerinin zayıf ol-

ması, tekrarlanabilirliklerinin düşük olması, sonuçların değişkenlik göstermesi ve geç sonuç vermeleri gibi nedenlerle, 1980'li yıllardan itibaren yerlerini genotipik yöntemlere bırakmışlardır¹². İlk kez 1984 yılında Schwartz ve Cantor¹³ tarafından tanımlanmış olan "Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)", genotipik yöntemler içinde ayrıştırma gücü ve tekrarlanabilirliği yüksek olduğu için günümüzde pek çok etyolojik etkenin moleküler tiplendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir^{10,14}. *Shigella* türlerinin PFGE ile tiplendirilebildiğini ise ilk kez 1991 yılında Soldati ve Piffaretti¹⁵ bildirmiştir.

Bu çalışma, ülkemizin İzmit, Adapazarı, Yalova ve Ankara illerinde izole edilen *S.sonnei* suşlarının fenotipik (antimikrobiyal direnç paneli ile) ve genotipik (PFGE ile) yöntemlerle tiplendirilmesi ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi amacıyla planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ankara bölgesinden 1997 yılında izole edilmiş bir, 2000 yılında izole edilmiş dört, 2001 yılında izole edilmiş 12 ve 1999 yılında Marmara bölgesi depremi sonrasındaki izlemde Adapazarı'ndan izole edilmiş 6, İzmit'ten 5 ve Yalova'dan 2 olmak üzere toplam 30 *S.sonnei* izolatu çalışmaya dahil edildi. İzolatlar çalışılincaya kadar %16 gliserollü trip-tik soy buyyon besiyerinde -80°C'de saklandı.

Antimikrobiyal duyarlılık testi "National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS)" önerilerine göre disk difüzyon yöntemiyle çalışıldı¹⁶. Antibiyotik diskleri olarak ampisilin (10 µg), ampisilin/sulbaktam (10/10 µg), sefoperazon (75 µg), seftriakson (30 µg), kloramfenikol (30 µg), siprofloksasin (5 µg), gentamisin (10 µg), imipenem (10 µg), nalidiksik asit (30 µg), tetrasiklin (30 µg), trimetoprim/sülfametoksazol (SXT) (1.25/23 µg) ve streptomisin (10 µg) (BBL Sensi-Disc, Becton Dickinson, ABD) kullanıldı. Kalite kontrolü *E.coli* ATCC 25922 suşu ile yapıldı. İzolatlar duyarlılık farklılıklarına göre gruplandırıldı.

S.sonnei izolatlarının kromozomal DNA'ları agaroz gömülmüş şekilde hazırlandı ve *Xba*I (Wakko Nippon Gene, Japonya) enzimi ile kesildikten sonra PFGE işlemi CHEF-DR® II sistemi (Biorad, ABD) ile gerçekleştirildi¹⁷. 12°C'de sıcaklığı sabit tutulan TBE tampon çözeltilisi içinde, 6V/cm voltaj gradienti altında, 4-7 saniye "switch" zamanında 11 saat, 7-50 sn "switch" zamanında 9 saat elektroforez şartları kullanıldı. Jel, etidyum bromür ile boyandıktan sonra görüntüleme sistemi (Alpha Imager 1220, ABD) ile görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı. Lambda ladder DNA bantlarının büyüklükleri referans alınarak, bant büyüklükleri hesaplandı.

Otuz adet izolatin PFGE bantlarının Dice indeksleri hesaplanarak benzerlik matrisi oluşturuldu¹⁸. Elde edilen matristen izolatların farklılık (*f*) değerleri (*f*= 1-D) hesaplandı ve farklılık matrisi oluşturuldu. Farklılık matrisinden, UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) yöntemi kullanılarak MEGA¹⁹ yazılımı version 2.1 ile dendrogram elde edildi. İzolatlar Tenover ve arkadaşları²⁰ tarafından oluşturulan PFGE paternlerini yorumlama kriterlerine göre sınıflandırıldı. Ana PFGE tipleri gruplandırılıp harfle belirlendikten sonra, yakın ilişkili ve olası ilişkili izolatlar harf yanında rakamla belirtilerek alt tiplere sınıflandırıldı.

BULGULAR

Çalışılan izolatların tümü gentamisin, seftriakson, imipenem, nalidiksik asit ve siprofloksasine duyarlı bulunmuştur. Streptomisine 23 (%76.6), SXT'ye 21 (%70), tetrasikline 20 (%66.6), ampisiline 6 (%20), sulbaktam/ampisiline 3 (%10), kloramfenikole 1 (%3.3) izolatın dirençli olduğu saptanmış; 3'er izolat (%10) tetrasiklin ve sefoperazona orta duyarlı olarak tespit edilmiş, 4 izolat ise tüm antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur. İzolatlar antimikrobiyal duyarlılıklarına göre gruplandırıldığında toplam 9 farklı patern izlenmiştir (Tablo I).

*Xba*I enzimi ile kesilen bakteri DNA'larından elde edilen bantların değerlendirilmesiyle (Resim 1), izolatlar A ve B olmak üzere iki ana gruba ve ana grupla yakın veya olası ilişkili olan 13 alt tip olmak üzere toplam 15 PFGE tipine sınıflandırılmıştır (Şekil 1). İki kardeşten elde edilen 120 ve 121 no'lu izolatlar arasında bir, huzur evi ve rehabilitasyon merkezinden izole edilen izolatlardan 122 no'lu ile 123, 128 no'lu izolatlar arasında tek bant farklılığı gözlenmiştir.

Çalışılan izolatların epidemiyolojik bilgileri, antimikrobiyal direnç paternleri ve PFGE tipleri Tablo I'de görülmektedir.

TARTIŞMA

Shigella enfeksiyonları, etken mikroorganizmanın enfektif dozlarının düşük olması nedeniyle kişiden kişiye bulaşın kolay ve sekonder atak hızının yüksek olduğu, zaman zaman büyük epidemilere yol açan enfeksiyonlar olup, özellikle beş yaş altı çocuklarda ve dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olarak güncelliğini korumaktadır^{1,6}.

Türkiye'de bulaşıcı hastalıkların bildirim sistemi 2005 yılında güncellenmiştir. Güncellenen bildirim sistemi kapsamında ilk kez bazı hastalık etkenlerinin laboratuvarından bildiriminin yapılmasıyla, laboratuvarlar da doğrudan bildirim sistemine dahil edilmiştir²¹. *Shigella* türleri 2005 yılı Ocak ayından itibaren uygulamaya giren yeni sistemde laboratuvarlar tarafından bildirilmeye başlanmıştır. Bildirim sisteminde yapılan güncellemelerin ardından bildirimi zorunlu bulaşıcı hastalıkların tanı ve bildirimine ilişkin laboratuvarların sisteme etkin katılımını sağlayabilmek amacıyla gerekli altyapının oluşturulması için bildirim sistemine entegre "ulusal bir laboratuvar ağı"nın kurulması gündeme gelmiştir. 2007 yılında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi tarafından mikrobiyoloji laboratuvarları arasında veri ve suş akışı sağlanarak, laboratuvar verilerinin zamanında, tam ve doğru olarak değerlendirilebilmesi amacıyla enterik bakteriyel patojenler için bir laboratuvar ağı kurulması çalışmaları başlatılmıştır. Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA), ülkedeki enterik bakteriyel enfeksiyon eğilimleri ve suş dağılımları hakkında bilgi sahibi olunmasını ve bu verilerin halk sağlığının korunmasına yönelik olarak kullanılmasını hedeflemektedir. Başlangıçta Ankara ve değişik illerdeki 32 laboratuvara ulaşmış olan bu ağı, gelecekte ülke genelindeki devlet hastaneleri, üniversite hastaneleri, özel hastaneler, halk sağlığı laboratuvarları, bölge hıfzıssıhha enstitüleri ve özel laboratuvarların da dahil edilmesi planlanmaktadır. Ağı kapsamında yer alan patojen etkenlerden biri de *Shigella* türleri olup, ağıın ülke genelindeki *Shigella* türlerinin dağılımı, epidemiyolojik

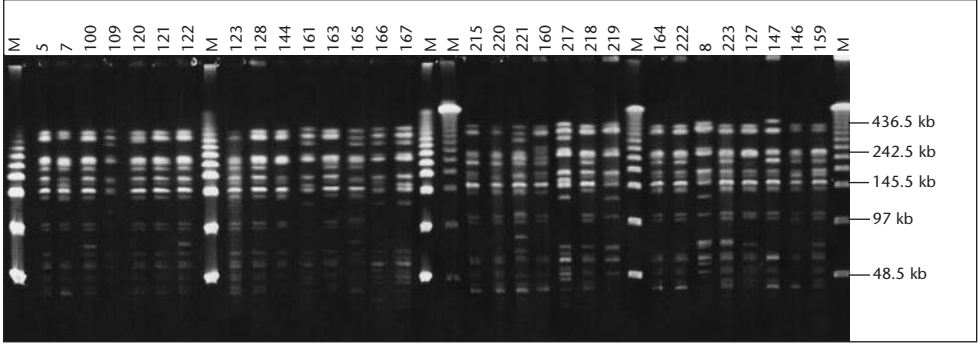
Tablo 1. İzolatların Antimikrobiyal Direnç Paternleri ve PFGE Tipleri

İzolasyon yeri	Tarihi	İzolat no	Antimikrobiyal Direnç Paterni	PFGE tipi
Ankara	1997	222	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A6
Ankara	Eylül, 2000	5	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A
Ankara	Eylül, 2000	7	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A6
Ankara	Eylül, 2000	223	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A1
Ankara	Eylül, 2000	8	AMP ^R , T ^R , ST ^R	B3
Ankara	Haziran, 2001	100	AMP ^R	A4
Ankara	Temmuz, 2001	109	T ^I	B1
Ankara	Ağustos, 2001	127	Hepsine duyarlı	A5
Ankara	Ağustos, 2001	120*	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A3
Ankara	Ağustos, 2001	121*	SXT ^R , ST ^R	A
Ankara	Ağustos, 2001	122**	AMP ^R , SAM ^R , SXT ^R , T ^R , ST ^R , CFP ^I	A2
Ankara	Ağustos, 2001	123**	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A
Ankara	Ağustos, 2001	128**	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A
Ankara	Eylül, 2001	144	Hepsine duyarlı	A5
Ankara	Ekim, 2001	147	AMP ^R , SXT ^R , T ^R , ST ^R	A7
Ankara	Eylül, 2001	146	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A6
Ankara	Ekim, 2001	159	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A
İzmit	1999	215	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A6
İzmit	1999	220	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A6
İzmit	1999	166	Hepsine duyarlı	B
İzmit	1999	221	AMP ^R , SAM ^R , SXT ^R , T ^R , ST ^R , CFP ^I	A10
İzmit	1999	165	AMP ^R , SAM ^R , SXT ^R , T ^R , ST ^R , CFP ^I	A9
Adapazarı	1999	160	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A8
Adapazarı	1999	218	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A
Adapazarı	1999	167	Hepsine duyarlı	B
Adapazarı	1999	217	T ^I	B
Adapazarı	1999	161	T ^I	B
Adapazarı	1999	219	SXT ^R , ST ^R , C ^R	B2
Yalova	1999	163	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A
Yalova	1999	164	SXT ^R , T ^R , ST ^R	A6

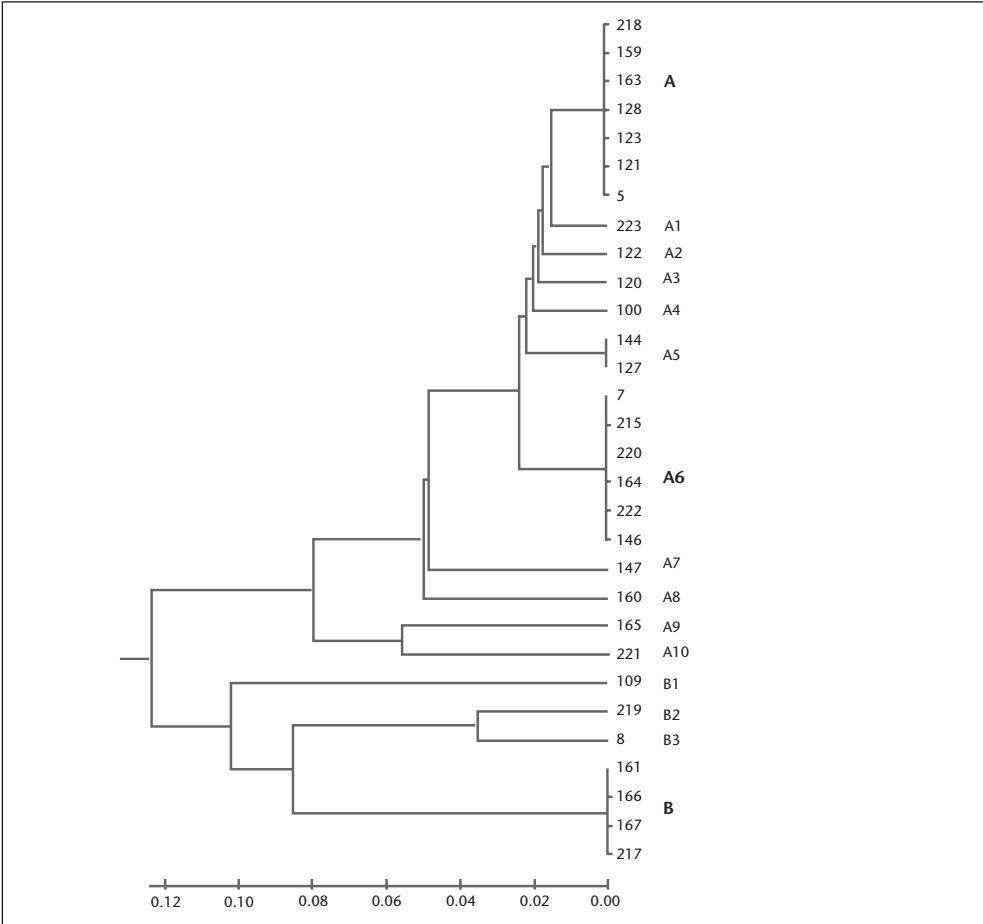
* Aynı dönemde iki kardeşten izole edilmişlerdir.

** Ankara şehir merkezi dışındaki bir huzur evinde gözlenen ishal olgularından aynı dönemde izole edilmişlerdir.

R: Dirençli, I: Orta düzeyde duyarlı, AMP: Ampisilin, SAM: Sulbaktam/ampisilin, SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol, T: Tetrasiklin, ST: Streptomisin, CFP: Sefoperazon, C: Kloramfenikol.



Resim 1. *S. sonnei* izolatlarının PFGE bantları (Alpha Imager 1220 ile elde edilen görüntü, M: Lambda belirteci. İki PFGE jeli yan yana gösterilmiştir. Rakamlar izolat numaralarını göstermektedir; epidemiyolojik bilgileri Tablo 1’de verilmiştir.).



Şekil 1. İzolatların PFGE’de elde edilen bantlarının dendrogramı (MEGA version 2.1, UPGMA yöntemi).

ilişkilerinin incelenmesi ve antimikrobiyal direnç durumlarının izlenmesi açısından önemli bilgiler vereceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, ülkemizdeki *S.sonnei* izolatlarının antimikrobiyal direnç paternlerinin ve kökensel dağılımının belirlenmesi ve ileride elde edilecek *S.sonnei* izolatlarının PFGE ile değerlendirilmesinde temel başlangıç verisinin oluşturulması hedeflenmiştir.

Ankara bölgesinde 1993 ile 2002 yılları arasında yapılan değişik çalışmalarda; *S.sonnei* izolatlarında SXT direnci %55.3-72.9, ampicilin direnci ise %5.7-11.5 arasında değişen oranlarda bildirilmektedir^{5,7,22,23}. Pullukçu ve arkadaşları⁸ ise Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine 1999-2006 yılları arasında başvuran hastalardan izole ettikleri 296 *S.sonnei* izolatında SXT direncini %84, ampicilin direncini %8 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 21 (%70) izolat SXT'ye dirençli iken 6 (%20) izolat ampisiline dirençli bulunmuştur. Bu bulgular, bir dönem ampirik olarak sık kullanılan SXT'ye karşı direncin giderek artış gösterdiğini düşündürmektedir.

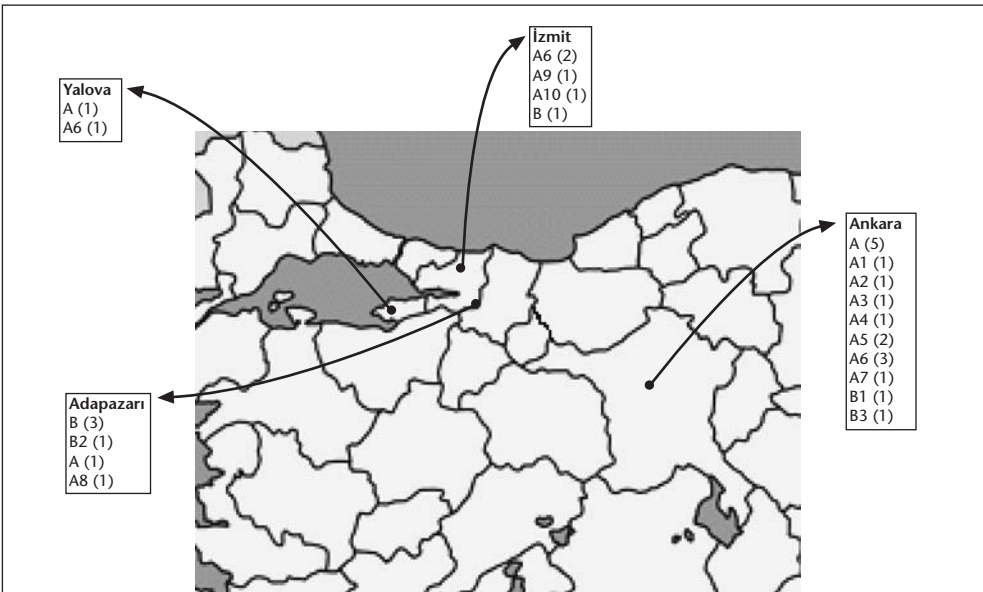
Günümüzde *S.sonnei* ile ilgili epidemiyolojik araştırmalarda çeşitli moleküler yöntemler ve PFGE başarı ile kullanılmaktadır. Matsumoto ve arkadaşları²⁴ Japonya'daki sekiz farklı salgından izole edilen 53 izolat ile aynı dönemde içlerinde Türkiye'nin de bulunduğu deniz aşırı seyahatlerden dönen kişilerden izole ettikleri 58 farklı sporadik *S.sonnei* izolatını antimikrobiyal duyarlılık, kolisin tiplendirme, plazmid profil analizi (PPA) ve PFGE yöntemleri ile tiplendirmişlerdir. Farklı enzimleri kullandıkları PFGE'de, *XbaI*'ın optimum sayıda bantları ve en net PFGE paternini sağladığını bildirmişler; PFGE'nin izolatları ayrıştırma antimikrobiyal duyarlılık, kolisin tiplendirme ve PPA'dan daha başarılı olduğunu saptamışlardır²⁴. Bazı salgın izolatları ile seyahat öyküsü olan kişilerden elde edilen izolatların yakın ilişkili PFGE tipine sahip olmasını, insanların ve gıdaların yoğun hareketi ile ilişkili olabileceği şeklinde değerlendirmişlerdir. Dört ay ara ile ortaya çıkan iki farklı salgında yakın ilişkili PFGE tipi elde etmişler ve bu salgınların aynı kökenli suşun devam eden yayılımı olabileceğini düşünmüşlerdir²⁴. Bizim çalışmamızda da, Eylül 2000 tarihinde Ankara'dan elde edilen izolatlar 2001 yılında elde edilen bazı izolatlarla aynı veya yakın ilişkili PFGE tipine sahipti. 2001 yılındaki bu izolatların, Ankara bölgesinde önceden toplumda dolaşan *S.sonnei* suşunun devam eden yayılımı ile ilişkili olduğu düşünülebilir.

Bangladeş'te yapılan bir çalışmada, *S.sonnei* izolatlarında SXT ve ampicilin direnci sırasıyla %89 ve %9.5 olarak saptanmış; PFGE'de beş ana tipe birlikte ilişkili alt tipler tespit edilmiştir²⁵. Bu çalışmada ayrıca, diğer bir moleküler tiplendirme yöntemi olan ribotiplendirme ile PFGE karşılaştırılmış ve PFGE'nin suşların ayırımında daha başarılı olduğu ifade edilmiştir²⁵. Bizim çalışmamızda, izolatların antimikrobiyal direnç paterni (ADP) ile dokuz gruba, PFGE ile toplam 14 gruba ayrılabilmesiyle PFGE'nin *S.sonnei* izolatlarının tiplendirilmesinde kullanılabileceği ve fenotipik bir yöntem olan ADP'den daha başarılı olduğu gösterilmiştir.

Lee ve arkadaşları²⁶ Tayvan'da okul çocukları arasında çıkmış su kaynaklı üç farklı salgındaki 58 ve bunlarla epidemiyolojik olarak ilişkisiz sekiz *S.sonnei* izolatını antimikrobiyal duyarlılık, PPA, ribotiplendirme ve PFGE yöntemleriyle sınıflandırmaya çalışmışlardır. PFGE ile her salgının tek bir kökenden kaynaklandığını ve bunların birbirinden farklı ol-

duğunu, ayrıca salgın izolatlarının ve sporadik izolatların farklı kökenlerden geldiğini göstermişlerdir. Yine Tayvan'da yapılan bir çalışmada, altı farklı dönemde toplanmış 20 *S. sonnei* izolatının tiplendirmesinde, PFGE ve "ERIC-PCR"nin, diğer yöntemler olan PPA, plazmid restriksiyon enzim analizi ve ribotiplendirmeye göre daha başarılı olduğu bildirilmiştir²⁷. Araştırmacılar, izolasyon sıklığının arttığı üç aylık bir dönemde toplanmış sekiz sporadik izolatın hepsinin tüm yöntemlerde aynı tipi gösterdiğini saptamışlar ve bu izolatların toplulukta o dönemde dolaşan tek bir bakteriyel kökene ait olabileceğini düşünmüşlerdir²⁷. Çalışmamızda Ağustos-Ekim 2001 tarihleri arasında Ankara'dan izole edilen 10 izolatın ayırt edilemez veya yakın ilişkili PFGE tipine sahip olması, bu dönemde gerçekleşen olgu kümelenmesinin²⁸ tek bir bakteriyel kökenden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Vahaboğlu ve arkadaşları²⁹ Marmara Bölgesi depremi döneminde İzmit ilinde izole ettikleri 15 *S. flexneri* izolatında, üç farklı antimikrobiyal duyarlılık paterni gözlemişler, uyguladıkları genotipik yöntemlerden RAPD (Random amplified polymorphic DNA) ile üç, kromozomun *EcoRI* restriksiyon endonükleaz ile analizi sonrasında iki farklı genotip elde etmişlerdir. Bu bulgularıyla İzmit ilinde birden fazla *Shigella* suşunun ishale yol açtığını bildirmişlerdir²⁹. Bizim çalışmamızda, İzmit ilinden elde edilen beş *S. sonnei* izolatında üç farklı antimikrobiyal duyarlılık paterni izlenirken, A6 alt PFGE tipinden iki, A6 PFGE alt tipi ile olası ilişkili birer adet A9 ve A10 ve B PFGE tipinden bir genotip gözlenmiştir. İzmit ili için bizim çalışmamız sonucunda da, birden fazla *S. sonnei* kökeninin ishale yol açtığı söylenebilir. Marmara Bölgesi depremindeki tüm iller incelendiğinde ise (Şekil 2), bölge genelinde birden fazla *S. sonnei* kökeninin dolaşımında olduğu görülmektedir. De Lappe ve



Şekil 2. Bölge haritasında PFGE tiplerinin dağılımları (Parantez içinde o paterni gösteren izolat sayıları verilmiştir.).

arkadaşları³⁰ İrlanda'da izole edilmiş yedi ve İtalya'da izole edilmiş 30 *S.sonnei* izolatını PFGE ile tiplendirerek ülkeler ve bölgeler arasındaki izolatları değerlendirmeyi amaçlamışlar ve birbirinden farklı iki suşun bu ülkelerde dolaştığını, bu iki suş içinde yakın ilişkili izolatların her iki ülkede de izole edildiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda Ankara'da sıklıkla A ana ve alt PFGE tipleri gözlenirken, Marmara Bölgesindeki üç şehirde, farklı A, B ana ve alt PFGE tipleri gözlenmiştir (Şekil 2). B ana PFGE tipinin Marmara Bölgesinde yoğunlaştığı düşünülebilir. Ancak ülkemizde PFGE tiplerinin bölgeler veya topluluklar için dağılımının belirlenebilmesinde daha çok sayıdaki ve uzun dönemdeki izolatların değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Türkiye genelinde kurulacak olan laboratuvar ağı (UEPLA) ile enterik patojenlerin epidemiyolojik ilişkilerinin incelenmesi ülke genelindeki suşların yayılımını izlemeye önemli bilgiler verecektir. Çalışmamızla, ülkemizdeki *S.sonnei* izolatlarının PFGE ile tiplendirilebileceği gösterilmiş olup, farklı şehirlerde farklı dönemlerde farklı alt tiplerin dolaştığı tespit edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Katkılarından dolayı Japon Uluslararası İş Birliği Ajansı (JICA) ve Dr. Jun Yatsuyanagi'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ 1999; 77: 651-66.
2. Kanra G, Akalın HE. Akut gastrointestinal enfeksiyonlar, s: 127-51. Kanra G (ed). Enfeksiyon Hastalıkları. 1993, 2. Baskı. Güneş Kitabevi, Ankara.
3. Zarakolu P, Gözalan A, Öncül Ö. 1995-1997 yılları arasında izole edilen *Shigella* suşlarının serotip dağılımı ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumlarının araştırılması. Mikrobiyol Bul 1998; 32: 295-9.
4. Zarakolu P, Levent B, Aktepe OC, Güvener C. Poliklinik vakalarından izole edilen *Salmonella* ve *Shigella* suşlarının değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg 1996; 53: 31-4.
5. Ceyhan M, Akan Ö, Kanra G, et al. Changing patterns of the prevalence of different *Shigella* species and their antibiotic susceptibilities in Ankara, Turkey. J Diarrhoeal Dis Res 1996; 14: 187-9.
6. Keusch GT, Bennish LM. Shigellosis, pp: 593-615. In: Evans AS, Brachman PS (eds), Bacterial Infections of Humans, Epidemiology and Control. 1991, 2nd ed. Plenum Medical, New York.
7. Özmert E, Göktürk B, Yurdakök K, Yalçın SS, Gür D. *Shigella* Antibiotic Resistance in Central Turkey: Comparison of the years 1987-1994 and 1995-2002. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 40: 359-62.
8. Pullukcu H, Aydemir Ş, Sipahi OR, Yamazhan T, Tünger A. 1999-2006 yılları arasında dışkı kültürlerinden izole edilen 439 *Shigella* kökeninin tür dağılımı ve antibakteriyel direnç durumları. Ankem Derg 2007; 21: 137-41.
9. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Çalışma Yılı 2005. 2006, Ankara.
10. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999; 37: 1661-9.
11. Pfaller M, Herwaldt LA. The clinical microbiology laboratory and infection control: emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. Clin Infect Dis 1997; 25: 858-70.
12. Pfaller M. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. Emerg Infect Dis 2001; 7: 312-8.

13. Schwartz D, Cantor C. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37: 67-75.
14. Goering RV. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993; 14: 595-600.
15. Soldati L, Piffaretti JC. Molecular typing of *Shigella* strains using pulsed field gel electrophoresis and genome hybridization with insertion sequences. *Res Microbiol* 1991; 142: 489-98.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 8th ed. Approved Standard M2-A8. 2003. NCCLS/CLSI, Wayne, Pa.
17. Yatsuyanagi J, Saito S, Sato H, et al. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 294-7.
18. Struelens MJ, DeRyck R, Deplano A. Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing, pp: 159-76. In: Dijkshoorn L, Towner KJ, Struelens MJ (eds), *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data*. 2001, 1st ed. Elsevier, New York.
19. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001; 17: 1244-5.
20. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
21. Bayazıt Y. Türkiye'de bulaşıcı hastalıklar bildirimi sistemi. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2005; 62: 73-6.
22. Aysev AD, Guriz H. Drug resistance of *Shigella* strains isolated in Ankara, Turkey, 1993-1996. *Scand J Infect Dis* 1998; 30: 351-3.
23. Kuzucu Ç, Baktır E, Acar N. 1998-1999 yılları arasında izole edilen *Salmonella* ve *Shigella* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2001; 58: 11-4.
24. Matsumoto M, Suzuki Y, Saito M, et al. Epidemiologic study of *Shigella sonnei* from sequential outbreaks and sporadic cases using different typing techniques. *Microbiol Immunol* 1998; 42: 259-64.
25. Talukder KA, Islam Z, Dutta KD. Antibiotic resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolated from patients with diarrhoea between 1999 and 2003 in Bangladesh. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1257-63.
26. Lee T, Chang L, Chang C, et al. Molecular analysis of *Shigella sonnei* isolated from three well-documented outbreaks in school children. *J Med Microbiol* 2000; 49: 355-60.
27. Liu P, Lau Y, Hu B, et al. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1779-83.
28. T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı ve Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Enfeksiyöz ajan surveyansı: Enterik patojenler laboratuvarı 2001 yılı gaita kültürü sonuçları. Aylık Epidemiyoloji Raporu 2002; 1: 20.
29. Vahaboğlu H, Gündeş S, Karadenizli A, et al. Transient increase in diarrheal diseases after the devastating earthquake in Kocaeli, Turkey: results of an infectious disease surveillance study. *Clin Infect Dis* 2001; 31: 1386-9.
30. De Lappe N, Doran G, Connor JO, Mammina C, Cormican M. Use of pulsed-field gel electrophoresis for comparison of similar but distinguishable isolates of *Shigella sonnei* collected in Ireland and Italy. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3808-10.