Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2013; 47(1): 35-48*

Ankara'da İzole Edilen *Shigella* Kökenlerinin Antibiyotik Direnç Modelleri, Plazmid Profil Analizi ve Değişken Alanlı Jel Elektroforezi ile İncelenmesi

Characterization of *Shigella* Strains Isolated in Ankara, Turkey by Antimicrobial Resistance Models, Plasmid Profile Analysis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Begüm SARAN[1], Birsel ERDEM[1], Fazıl Alper TEKELİ[1], Fikret ŞAHİN[1], Ahmet Derya AYSEV[2]

[1] Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbn-i Sina Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
[1] *Ankara University Faculty of Medicine, Ibn-i Sina Hospital, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.*

[2] Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Cebeci Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.
[2] *Ankara University Faculty of Medicine, Cebeci Research and Practice Hospital, Department of Pediatrics, Ankara, Turkey.*

Geliş Tarihi (Received): 16.04.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 10.11.2012

ÖZET

Shigella türleri tüm dünyada özellikle çocukluk çağlarında görülen ishallerin en önemli etkenlerindendir. İnsandan insana geçiş göstermesi, enfekte ve kolonize insanların hastalığın asıl rezervuarı olması nedeniyle toplumda kolayca yayılabilir ve salgınlara yol açabilirler. Bu çalışmada, Ankara ilinde 2001, 2008 ve 2009 yıllarında izole edilen 60 *Shigella* izolatı antimikrobiyal duyarlılık testi, plazmid profil analizi (PPA) ve değişken alanlı (pulsed field) jel elektroforezi (PFGE) ile incelenmiştir. *Shigella* izolatlarının epidemiyolojik olarak değerlendirilmesinde, fenotipik tiplendirme yöntemi olarak antibiyotik direnç tiplendirimi (ADT), genotipik tiplendirme yöntemi olarak ise PPA ve PFGE ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. İzolatların 49 (%81.6)'u *S.sonnei*, 10 (%16.6)'u *S.flexneri* ve biri *S.dysenteriae* (%1.6) olarak tanımlanmıştır. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile araştırıldığında en yüksek direncin trimetoprim/sülfametoksazol (%91.6)'e karşı olduğu, bunu tetrasiklin (%68.3) ve ampisilinin (%26.6) izlediği görülmüştür. *S.flexneri* izolatlarında izlenen ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit ve kloramfenikol direnci *S.sonnei*'ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p< 0.001$). Siprofloksasin, gentamisin ve seftazidime karşı direnç saptanmamıştır. *S.sonnei* izolatlarında 12, *S.flexneri* izolatlarında ise 4 antibiyotik direnç modeli izlenmiştir. İzolatların tümünün 1'den 7'ye kadar değişen sayı ve büyüklüklerde plazmid taşıdıkları görülmüştür. *S.sonnei* izolatlarında 27 ve *S.flexneri* izolatlarında 8 plazmid profili belirlenmiştir. PFGE yöntemi ile *S.sonnei* izolatları 4, *S.flexneri* izolatları 5 patern göstermiştir. PFGE yönte-

İletişim (Correspondence): *Uzm. Dr. Begüm Saran, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbn-i Sina Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06100 Ankara, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *+90 312 595 8197,* ***E-posta (E-mail):*** *begumsaran@hotmail.com*

miyle Ankara'da izole edilen *S.sonnei* izolatlarında belirgin klonal benzerlik olduğu tespit edilmiş; yöntemin ayırım gücü 0.26 olarak hesaplanmıştır. *S.sonnei* izolatlarında PPA ve ADT yöntemlerinin ayırım gücünün daha yüksek olduğu (sırasıyla 0.97 ve 0.75) gözlenmiştir. Çalışmamızda stabil olmayan hareketli genetik elemanların yer değiştirebilme özelliklerinin, PPA ve ADT yöntemlerinin ayırım gücünün yükselmesinde etkili olduğu düşünülmüştür. Bu yöntemlerin kısa zaman dilimi içinde toplanmış ve uzun süre saklanmamış izolatların incelenmesinde uygun olduğu, PFGE yönteminin ise klonal ilişkileri göstermek için uygun olmakla birlikte aynı klonun dolaşımda olduğu coğrafi bölgelerde ADT ve/veya PPA ile birlikte değerlendirilmesinin *Shigella* izolatlarında ayırım gücünün yükseltilmesinde faydalı olacağı gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Shigella; antibiyotik direnci; antibiyotik direnç tiplendirimi; plazmid profil analizi; değişken alanlı jel elektroforezi; moleküler epidemiyoloji.*

ABSTRACT

Shigella is one of the most important causative agents of diarrhea especially in childhood. Since man is the main reservoir of *Shigella* and human to human transmission is possible, *Shigella* can easily spread in public and cause outbreaks. In this study, a total of 60 *Shigella* strains isolated in Ankara, Turkey by years 2001, 2008 and 2009 were investigated by their antimicrobial susceptibility profiles, plasmid profile analysis (PPA) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). For epidemiological investigation, the results obtained by antibiotic resistance typing (ART) which was the phenotyping method, was compared to the results of the genotyping methods which were PPA and PFGE. Of the isolates 49 (81.6%) were *S.sonnei*, 10 (16.6%) were *S.flexneri* and one was (1.6%) *S.dysenteriae*. Antimicrobial susceptibilities were evaluated by disc diffusion method and the highest resistance rates were found against trimethoprim/sulfamethoxazole (91.6%), followed by tetracycline (68.3%) and ampicillin (26.6%). Resistance against ampicillin, chloramphenicol and amoxycillin/clavulanic acid were found higher in *S.flexneri* isolates than *S.sonnei* ($p< 0.001$). All isolates were found to be susceptible to ciprofloxacin, gentamicin and ceftazidime. *S.sonnei* demonstrated 12 and *S.flexneri* demonstrated 4 antibiotic resistance models. All isolates were carrying plasmids with varying sizes and varying numbers between 1 to 7. *S.sonnei* isolates demonstrated 27 and *S.flexneri* isolates demonstrated 8 plasmid profiles. *S.sonnei* isolates were clustered in 4 patterns and *S.flexneri* were clustered in 5 patterns by PFGE. This method demonstrated obvious clonal similarity among *S.sonnei* strains isolated in Ankara and discriminative power (DP) was calculated as 0.26. PPA and ART demonstrated higher DP among *S.sonnei* strains (0.97 and 0.75, respectively). In this study gain or loss of instable genetic mobile elements were thought to be responsible for higher discriminative powers of PPA and ART methods. These typing methods were found to be appropriate for the epidemiological investigation of strains collected in a short time period. PFGE was found to be convenient for the evaluation of clonal relatedness of the strains, however, in such geographical areas where the same clone was in circulation, use of ART and/or PPA together with PFGE would be useful for precise discrimination of *Shigella* strains.

Key words: *Shigella; antibiotic resistance; antibiotic resistance typing; plasmid profile analysis; pulsed-field gel electrophoresis; molecular epidemiology.*

GİRİŞ

Şigelloz, özellikle gelişmekte olan ülkelerde ishalli çocuklarda mortalite ve morbiditenin en önemli sebeplerindendir. Yılda 165 milyon kişi *Shigella* ile enfekte olmakta; bunların 100 milyonu gelişmekte olan ülkelerde görülmekte ve 1 milyon kişide ölüm ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyonların büyük çoğunluğu 5 yaşın altındaki çocuklarda görülür. Mal-

nütrisyonlu çocuklarda, immün yetmezlikli hastalarda ve yaşlılarda enfeksiyon ağır ve komplike seyredebilir[1].

Shigella türlerinin dağılımı bölgelere ve sosyoekonomik duruma göre değişiklik gösterebilir. *S.flexneri* gelişmekte olan ülkelerde daha sık görülmekteyken *S.sonnei*, gelişmiş ülkelerde daha sık görülmektedir[2]. Türkiye'nin değişik bölgelerinde görülen tüm ishallerin %0.5-25'inden *Shigella* sorumludur[3-5]. Yapılan çalışmalar 1990 yılından beri Türkiye'de en sık görülen türün *S.sonnei* olduğunu göstermiştir[6,7]. *Shigella* türlerinin yüksek bulaşıcı özellik göstermesi nedeniyle, halk sağlığını korumak için dışkı kültüründe üreme olan ya da basilli dizanteri tanısı alan her hasta tedavi edilmelidir[1]. *Shigella* türlerinde görülen çoklu ilaç direnci antimikrobiyal tedavide sıkıntılara yol açmaktadır. 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[1,8].

Epidemiyolojik çalışmalarda izolatlar arasındaki ilişkiler araştırılarak toplum sağlığı için önemli veriler elde edilir. Salgın durumunda salgın kaynağını ve yayılma yollarını belirlemek; hastane enfeksiyonları ve toplum kaynaklı enfeksiyonları saptamak; hastalarda görülen reaktivasyonu, reenfeksiyondan ayırt etmek; enfekte popülasyondaki epidemik klonların dolaşımını ve zaman içindeki prevalansını izleyerek epidemiyolojik sürveyans ve kontrol yöntemleri geliştirmek için fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemlerine başvurmak gerekmektedir[9-11].

Bu çalışmada Ankara ilinden izole edilen *Shigella* türlerinin günümüzdeki dağılımlarının incelenmesi, antibiyotik duyarlılık paternlerinin belirlenmesi ve 2001, 2008 ve 2009 yıllarında izlenen direnç paternleri arasındaki farkların belirlenmesi amaçlanmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testi epidemiyolojik inceleme yöntemi olarak kullanılmış ve *Shigella* izolatları antibiyotik direnç modeli, plazmid profil analizi ve değişken alanlı (pulsed-field) jel elektroforezi (PFGE) ile epidemiyolojik olarak değerlendirilmiştir. Ankara'daki *Shigella* izolatlarının tiplendirilmesinde bu yöntemlerin faydaları ve ayırım güçlerinin kıyaslanması planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ankara'da hastaların dışkı örneklerinden standart yöntemlerle izole edilen toplam 60 *Shigella* izolatı çalışmaya alındı. İzolatların 23'ü Ağustos 2001-Ekim 2001 tarihlerinde izole edilen ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarının kültür koleksiyonunda saklanan izolatlardan seçildi. İzolatların 10'u Ağustos 2008-Ekim 2008 ve 27'si Temmuz 2009-Ekim 2009 tarihleri arasında Ankara'da çeşitli hastanelerin Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında izole edildi. İzolatların tür tayini anti-O serumu (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak lam aglütinasyonu ile yapıldı.

Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Antimikrobiyal duyarlılık testi "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemiyle yapıldı[12]. İzolatların ampisilin (AMP; 10 µg), amoksisilin/klavulanik asit (A/K; 20/10 µg), gentamisin (GEN; 10 µg), kloramfe-

nikol (CL; 30 µg), nalidiksik asit (NA; 30 µg), sefalotin (CF; 30 µg), sefotaksim (CT; 30 µg), seftazidim (CZ; 30 µg), siprofloksasin (CIP; 5 µg), tetrasiklin (TET; 30 µg) ve trimetoprim/sülfametoksazol (TMP-SXT; 1.25/23.75 µg)'e karşı duyarlılıkları ticari antibiyotik diskleri (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak araştırıldı. İki ve daha fazla antibiyotiğe karşı direnç, çoklu direnç olarak kabul edildi.

Plazmid Profil Analizi

Plazmid ekstraksiyonu, Kado ve Liu[13] tarafından tanımlanan yöntemde küçük değişiklikler yapılarak uygulandı. Her bir izolattan elde edilen plazmid DNA'ları TBE tampon içindeki %0.6'lık agaroz jele yüklendi ve 100 V'da iki saat boyunca elektroforez uygulanarak ayrışmaları sağlandı. Yöntemde kontrol suşları olarak, Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü'nden temin edilen, 90 kb büyüklüğünde tek bir plazmid taşıyan 020255 no'lu *Salmonella* Typhimurium izolatı; 57, 5.8 ve 4.8 kb büyüklüğünde üç plazmid taşıyan 006956 no'lu *Salmonella* Enteritidis izolatı ve 53.7, 7.2, 5.6 ve 5.1 kb büyüklüğünde dört plazmid taşıyan *E.coli* V517 izolatı kullanıldı. Jel etidyum bromür ile boyandıktan sonra plazmid DNA'larına ait bantlar UV transillüminatör ile görüntülendi (TFX- 20M; Vilber lourmat, France).

PFGE

Bu yöntem, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) tarafından belirlenen protokollere uygun olarak gerçekleştirildi[14,15]. İnkübasyon sonucu MacConkey agarda üreyen bakteri kolonisinden 10^9 CFU/ml konsantrasyonunda süspansiyon hazırlandı. Süspansiyon üzerine 25 µl proteinaz K ilave edildikten sonra %1.3 LMP (low-melt point agarose) ile karıştırıldı ve "plug" kuyucuklarına yerleştirildi. "Plug"lar 20 U X*bal* (Fermentas) restriksiyon enzimi ile 37°C'de 4 saat boyunca kesime bırakıldı. CHeF DR II (Bio-Rad Hercules, ABD) sistemi kullanılarak 0.5X TBE içindeki %1.3'lük agaroz jelde 14°C'de 6 V/cm'de 18 saat boyunca elektroforez uygulandı. Jel etidyum bromür ile boyanarak UV transillüminator ile görüntülendi. Jel, "Gene Directory Software (GDS)" (Synegene, İngiltere) bilgisayar programı kullanılarak değerlendirildi. İzolatlar arasındaki genetik ilişki GDS programında; Dice katsayısı, UPGMA metodu ve %1 tolerans değeri kullanılarak oluşturulan dendogramlar ile değerlendirildi. Yöntemin ayırım gücü Simpson's formülü kullanılarak hesaplandı[16].

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler Pearson ki-kare testi ve Fisher'in kesin ki-kare testi kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 60 *Shigella* izolatının 49 (%81.6)'unun *S.sonnei*, 10 (%16.6)'unun *S.flexneri*, 1'inin *S.dysenteriae* (%1.6) olduğu belirlenmiştir. 2001, 2008 ve 2009 yıllarında izole edilen *Shigella* izolatlarının tür dağılımı Tablo I'de gösterilmiştir.

Shigella türlerinin antibiyotiklere direnç durumu ve yıllar içindeki değişimi Tablo II'de görülmektedir. Çoklu ilaç direnci, 41 (%83.6) *S.sonnei* ve 9 (%100) *S.flexneri*

Tablo I. *Shigella Türlerinin Yıllara Göre Sayısal Dağılımı*

Yıllar	*S.sonnei* (n)	*S.flexneri* (n)	*S.dysenteriae* (n)	Toplam (n)
2001	22	1	-	23
2008	9	1	-	10
2009	18	8	1	27
Toplam	49	10	1	60

izolatında gözlenmiştir. *S.sonnei* izolatlarında en yüksek direnç TMP-SXT'ye karşı (%97.9) saptanmış; izolatların %65.3'ü TET'e, %26.5'i CF'e dirençli bulunmuştur. *S.flexneri* izolatlarında AMP'e %100; TET, TMP-SXT, CL ve A/K'e karşı %90 oranında direnç izlenmiştir. CİP, GEN ve CZ'ye karşı direnç görülmemiştir. *S.flexneri* izolatlarında izlenen AMP, A/K ve CL direnci *S.sonnei*'ye göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p< 0.001$).

S.sonnei ve *S.flexneri* türlerinde görülen antibiyotik direnç modelleri ve yıllar içindeki değişimleri Tablo III'te verilmiştir. *S.sonnei* izolatlarında 12 farklı antibiyotik direnç modeli görülmüş; en sık görülen direnç modeli 23 (%46.9) izolat ile TET ve TMP-SXT olmuştur. İzolatların 8 (%16.3)'i TMP-SXT ve 5 (%10.2)'i CF, TET ve TMP-SXT direnç modeli göstermiştir. Antibiyotik direnç tiplendirimi yönteminin ayırım gücü 0.75 olarak hesaplanmıştır. *S.flexneri* izolatlarında ise 4 farklı antibiyotik direnç modeli izlenmiş; en sık görülen modelin AMP, A/K, CL, TET ve TMP-SXT (%70) olduğu görülmüştür. *S.flexneri* için yöntemin ayırım gücü 0.54 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmamızda, *S.sonnei* izolatlarının 1'den 7'ye kadar değişen sayı ve büyüklükte plazmid taşıdığı görülmüştür. Plazmidlerin en büyüğü 200, en küçüğü 3 kb büyüklüğündedir. En yaygın görülen plazmid, 43 (%87.7) izolatın sahip olduğu 4 kb'lık plazmiddir. *S.sonnei* izolatlarında toplam 27 plazmid profili izlenmiş; yöntemin ayırım gücü 0.97 olarak hesaplanmıştır. 2001 yılında izole edilen *S.sonnei* izolatlarında 10; 2008'de 6 ve 2009'da 13 plazmid profili izlenmiştir. 2009'da elde edilen profillerin 2001 ve 2008'de elde edilenlerden farklı olduğu belirlenmiştir. En sık izlenen profiller 2001'de "7; 5.5; 4" 2008'de ise "5.5; 4" olarak saptanmıştır. 2001 yılında izole edilen *S.flexneri* izolatının 120 ve 5 kb büyüklüğünde iki adet; 2008 yılında izole edilen *S.flexneri* izolatının 4 kb büyüklüğünde bir adet ve 2009 yılında izole edilen *S.flexneri* izolatlarının 1'den 7'ye kadar değişen sayı ve büyüklüklerde plazmid taşıdıkları görülmüştür. Plazmidlerin en büyüğü 200, en küçüğü 3,5 kb arasında değişmektedir. En yaygın görülen 5 kb'lık plazmid 6 izolatta (%75) izlenmiştir. *S.flexneri* izolatlarında toplam 8 plazmid profili belirlenmiş; en sık izlenen plazmid profili "120; 5" olarak tespit edilmiştir. Yöntemin ayırım gücü 0.96 olarak hesaplanmıştır. *Shigella* izolatlarının plazmid profilleri Tablo IV'te görülmektedir.

PFGE yöntemi ile *S.sonnei* izolatları dört gruba ayrılmış; izolatlardan 42 (%85.7)'si sa, 5 (%10.2)'i sb, 1 (%2.0)'i sc ve 1 (%2.0)'i sd paterni göstermiştir. Yöntemin ayırım gücü Simpson's formülü ile 0.26 olarak bulunmuştur. 2001 yılında izole edilen 22

Tablo II. *2001, 2008 ve 2009 Yıllarında İzole Edilen Shigella Türlerinin Antibiyotik Dirençleri*

	S.sonnei				***S.flexneri***			
Antibiyotik	**2001 (n: 22) n (%)**	**2008 (n: 9) n (%)**	**2009 (n: 18) n (%)**	**Toplam (n: 49) n (%)**	**2001 (n: 1) n (%)**	**2008 (n: 1) n (%)**	**2009 (n: 8) n (%)**	**Toplam (n: 10) n (%)**
AMP	-	2 (22.2)	4 (22.2)	6 (12.2)	1 (100)	1 (100)	8 (100)	10 (100)
A/K	-	1 (11.1)	-	1 (2.0)	1 (100)	1 (100)	7 (87.5)	9 (90)
GEN	-	-	-	-	-	-	-	-
CL	-	-	-	-	1 (100)	1 (100)	7 (87.5)	9 (90)
NA	1 (4.5)	-	5 (27.7)	6 (12.2)	-	-	-	-
CF	4 (18.1)	2 (22.2)	7 (38.8)	13 (26.5)	-	-	1 (12.5)	1 (10)
CT	-	-	4 (22.2)	4 (8.1)	-	-	-	-
CZ	-	-	-	-	-	-	-	-
CİP	-	-	-	-	-	-	-	-
TET	20 (90.9)	2 (22.2)	10 (55.5)	32 (65.3)	1 (100)	1 (100)	7 (87.5)	9 (90)
TMP-SXT	22 (100)	8 (88.8)	18 (100)	48 (97.9)	1 (100)	1 (100)	7 (87.5)	9 (90)

AMP: Ampisilin; A/K: Amoksisilin/Klavulanik asit; GEN: Gentamisin; CL: Kloramfenikol; NA: Nalidiksik asit; CF: Sefalotin; CT: Sefotaksim; CZ: Seftazidim; CİP: Siprofloksasin; TET: Tetrasiklin; SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol.

Tablo III. *2001, 2008 ve 2009 Yıllarında İzole Edilen Shigella Türlerinin Antibiyotik Direnç Paternleri*

Antibiyotik direnç paterni	2001 n (%)	2008 n (%)	2009 n (%)	Toplam n (%)
S.sonnei				
AMP- A/K-CF	-	1 (11.1)	-	1 (2)
AMP-CF-CT-NA-TET-SXT	-	-	1 (5.5)	1 (2)
AMP-CF-CT- TET-SXT	-	-	1 (5.5)	1 (2)
AMP-CF-CT-SXT	-		1 (5.5)	1 (2)
AMP-CT-NA-TET-SXT	-	-	1 (5.5)	1 (2)
AMP-SXT	-	1 (11.1)	-	1 (2)
CF-TET-SXT	4 (18.1)	-	1 (5.5)	5 (10.2)
CF-SXT	-	1 (11.1)	2 (11.1)	3 (6.1)
NA-TET-SXT	-	-	1 (5.5)	1 (2)
NA-SXT	1 (4.5)	-	2 (11.1)	3 (6.1)
TET-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)
S.flexneri				
AMP-A/K-CL-TET-SXT	1 (100)	1 (100)	5 (62.5)	7 (70)
AMP-CL-CF-TET-SXT	-	-	1 (12.5)	1 (10)
AMP-A/K-CL-TET	-	-	1 (12.5)	1 (10)
AMP-A/K-SXT	-	-	1 (12.5)	1 (10)

AMP: Ampisilin; A/K: Amoksisilin/Klavulanik asit; CL: Kloramfenikol; NA: Nalidiksik asit; CF: Sefalotin; CT: Sefotaksim; TET: Tetrasiklin; SXT: Trimetoprim/Sülfametoksazol.

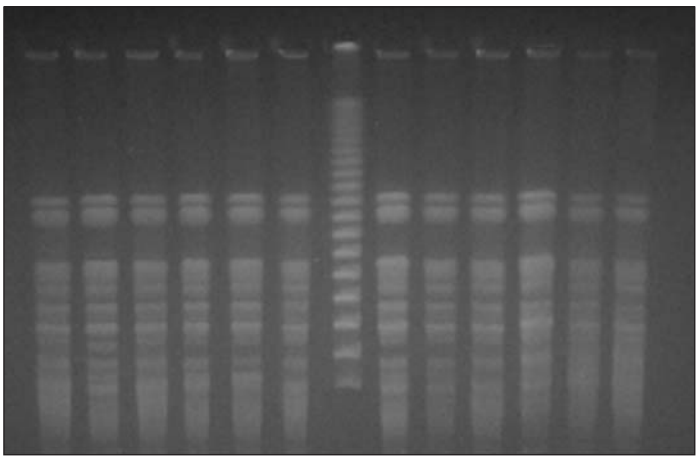
S.sonnei izolatı iki gruba ayrılmış; izolatlardan 21 (%95.4)'i sa paterni ve 1 (%4.5)'i sb paterni göstermiştir (Şekil 1). 2008 yılında elde edilen dokuz *S.sonnei* izolatı da iki gruba ayrılmış; izolatlardan 8 (%88.8)'i sa ve 1 (%11.1)'i sc paterni göstermiştir. 2009 yılında elde edilen 18 *S.sonnei* izolatı üç gruba ayrılmış; izolatlardan 13 (%72.2)'ü sa, 4 (%2.5)'ü sb ve 1 (%1.3)'i sd paterni göstermiştir. Yöntemin ayırım gücü 2001, 2008 ve 2009 yılları izolatları için sırasıyla 0.10, 0.23 ve 0.46 olarak hesaplanmıştır. *S.sonnei* izolatlarının PFGE ile incelenmesi sonucu elde edilen bantların dendogramı Şekil 2'de verilmiştir.

S.flexneri izolatlarının 5 PFGE paterni gösterdiği belirlenmiştir. 2001 ve 2008 yılında elde edilen *S.flexneri* izolatları aynı PFGE paternini (fa) göstermiştir. 2009 yılında elde edilen 8 *S.flexneri* izolatı ise 5 gruba ayrılmış; izolatlardan 3 (%37.5)'ü fa, 2 (%25)'si fb, 1 (%12.5)'i fc, 1 (%12.5)'i fd ve 1 (%12.5)'i fe paterni göstermiştir. Yöntemin ayırım gücü Simpson's formülü ile 0.83 bulunmuştur. Oluşturulan dendogramla paternlere ayrılan *S.flexneri* izolatlarının bantları Şekil 3'te görülmektedir.

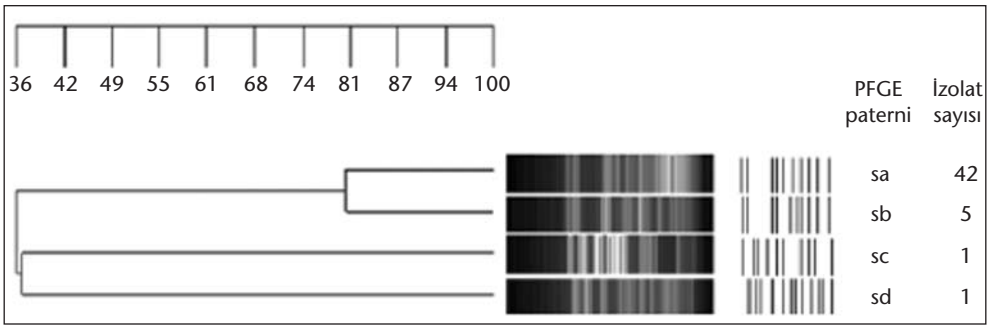
2001, 2008 ve 2009 yıllarında izole edilen *S.sonnei* ve *S.flexneri* izolatlarının antimikrobiyal direnç modelleri, plazmid profilleri, PFGE paternleri ve yöntemlerin ayırım gücü Tablo V'te gösterilmiştir.

Tablo IV. *2001, 2008 ve 2009 Yıllarında İzole Edilen Shigella Türlerinin Plazmid Profilleri*

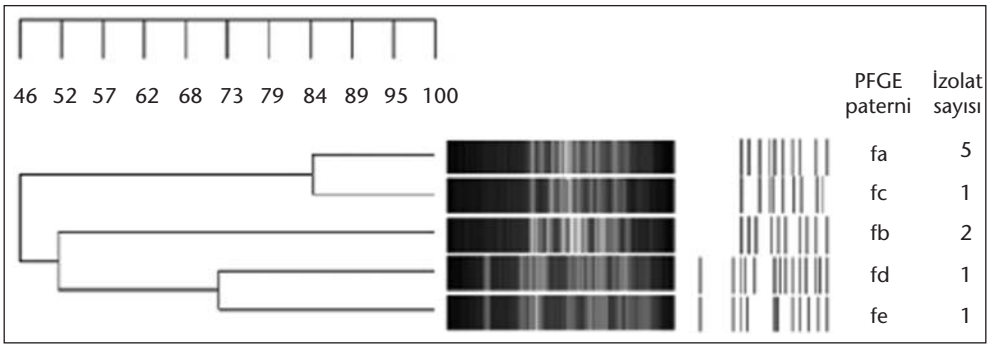
Plazmid profili	2001 n (%)	2008 n (%)	2009 n (%)	Toplam n (%)
S.sonnei				
200; 120; 15; 7; 5.5; 4	3 (13.6)	-	-	3 (6.1)
200; 120; 7; 5.5; 4	3 (13.6)	-	-	3 (6.1)
200; 120; 5.5; 5; 4.5; 4; 3.5	-	-	1 (5.5)	1 (2.0)
200; 20; 12; 5.5; 4; 3.5	-	-	1 (5.5)	1 (2.0)
200; 20; 5.5	-	-	1 (5.5)	1 (2.0)
200; 15; 7; 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)
20; 5.5; 4	-	-	2 (11.1)	2 (4)
15	-	1 (11.1)	-	1 (2)
15; 7	2 (9.09)	-	-	2 (4)
15; 7; 5.5; 4	-	1 (11.1)	-	1 (2)
15; 5.5; 4.5; 4; 3.5	-	-	2 (11.1)	2 (4)
15; 5.5; 4.5; 4; 3	-	-	1 (5.5)	1 (2)
7	1 (4.5)	-	-	1 (2)
7; 5.5; 4	5 (22.7)	1 (11.1)	-	6 (12.2)
7; 4	1 (4.5)	-	-	1 (2)
5.5; 4	1 (4.5)	4 (44.4)	-	5 (10.2)
4.5; 4	-	-	3 (16.6)	3 (6.1)
S.flexneri				
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 (12.5)	-	2 (25)	3 (30)
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 (12.5)	-	1 (10)



Şekil 1. *2001 yılında izole edilen S.sonnei suşlarında XbaI enzimi ile kesilmiş kromozomal DNA'lara ait PFGE sa paterni.*



Şekil 2. *S.sonnei izolatlarında UPGMA metodu kullanılarak elde edilen PFGE band paternlerine ait dendogram.*



Şekil 3. *S. flexneri izolatlarında UPGMA metodu kullanılarak elde edilen PFGE band paternlerine ait dendogram.*

Tablo V. *2001, 2008 ve 2009 Yıllarında İzole Edilen Shigella Türlerinin Antibiyotik Direnç Paterni, Plazmid Profili, PFGE Paterni Sayıları ve Yöntemlerin Ayırım Güçleri (DP)*

	S.sonnei			***S.flexneri***		
	Antibiyotik direnç paterni sayısı (DP)	**Plazmid profili sayısı (DP)**	**PFGE paterni sayısı (DP)**	**Antibiyotik direnç paterni sayısı (DP)**	**Plazmid profili sayısı (DP)**	**PFGE paterni sayısı (DP)**
2001	4 (0.46)	10 (0.91)	2 (0.10)	1	1	1
2008	5 (0.81)	6 (0.84)	2 (0.23)	1	1	1
2009	10 (0.91)	13 (0.97)	3 (0.46)	4 (0.65)	7 (0.97)	5 (0.83)
Toplam	12 (0.75)	27 (0.97)	4 (0.26)	4 (0.54)	8 (0.96)	5 (0.76)

TARTIŞMA

Shigella türlerinin dağılımı coğrafi bölgelere göre değişmektedir. Bu çalışmada Ankara'da en sık görülen türün *S.sonnei* (%81.6) olduğu tespit edilmiş; *S.flexneri* %16.6, *S.dysenteriae* ise %1.6 oranında izole edilirken, *S.boydii* türüne rastlanmamıştır.

Shigella izolatlarında antibiyotik direnci önemli bir sorun oluşturmaktadır. Dünyada ve ülkemizde *S.sonnei* izolatlarında TMP-SXT'ye yüksek oranlarda direnç görülmesi dikkat çekicidir. Bu çalışmada Ankara'da izole edilen 49 *S.sonnei* izolatında TMP-SXT direnci %97.9 oranında bulunmuştur. Bu bulgular Ankara'da giderek artan oranda TMP-SXT direnci görüldüğünü ve bu antibiyotiğin günümüzde ampirik tedavi seçeneği olarak uygun olmadığını göstermektedir. Yakın zamana kadar TMP-SXT'nin tedavide yaygın olarak kullanılmasının, yüksek oranda direnç gelişimine neden olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde yapılan değişik çalışmalarda ampisilin (AMP)'e karşı artmış duyarlılık izlenmektedir. Bu durum, geçmiş yıllarda bu antibiyotiğe karşı görülen yüksek direnç nedeniyle kullanımının terk edilmesi ve direnç gelişiminden sorumlu genlerin kaybedilmesi ile açıklanabilir[17,18]. Bu çalışmada 2001 yılında izole edilen *S.sonnei* suşlarında AMP direnci görülmemiş, ancak 2008 ve 2009 izolatlarında AMP direnci %22.2 olarak saptanmıştır. Ampisiline karşı duyarlılık artışı nedeniyle bu ajanın kullanımının yaygınlaşması sonucu direnç oranında artış izlendiği düşünülmektedir. Dünyada ve ülkemizde sefotaksim (CT) ve seftriaksona karşı direnç görülmeye başlamıştır[5,18-20]. Yaptığımız çalışmada da 2001 ve 2008 *S.sonnei* izolatlarında CT direnci görülmezken, 2009'da %22.2 oranında saptanmıştır. Bu direnç artışı, şigelloz tedavisinde yüksek direnç nedeniyle TMP-SXT ve AMP kullanımının terk edilmesi ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımının yaygınlaşması ile açıklanabilir.

Epidemiyolojik çalışmalarda PFGE ve plazmid profil analizi (PPA) sıkça tercih edilen yöntemlerdir[21-23]. *Shigella*, en önemli ishal etkenlerinden biri olmasına rağmen yurdumuzda *Shigella* ile ilgili moleküler yöntemler kullanılarak yapılan yeterli epidemiyolojik çalışma yoktur. Bu çalışmada 2001, 2008 ve 2009 yıllarında Ankara'da izole edilen *S.sonnei* ve *S.flexneri* izolatlarının plazmid profilleri ve PFGE sonuçları incelenmiştir. Ayrıca antibiyotik duyarlılık modelleri incelenerek fenotipik tiplendirme yapılmış ve ge-

notipik yöntemlerle kıyaslanmıştır. Değişik çalışmalarda *Shigella* izolatlarının farklı sayı ve büyüklüklerde plazmid taşıdıkları gösterilmiştir[22,24,25]. Bu çalışmada *Shigella* izolatlarının 1'den 7'ye kadar değişen sayılarda plazmid taşıdığı görülmüştür. *S.sonnei* izolatlarının plazmid büyüklükleri 3-200 kb, *S.flexneri* izolatlarının ise 3.5-200 kb arasında değişmektedir (Tablo IV). *Shigella* türleri ve plazmid profilleri arasında ilişki gözlenmemiştir.

Ankara'da 2001 yılında bir *S.sonnei* salgını olduğu bildirilmiştir[26,27]. Zira *S.sonnei*'nin dışkı örneklerinden izolasyonunda belirgin bir artış olduğu görülmüş (tüm enterik patojenlerin %76.4'ü), ancak salgına yönelik ileri araştırmalar yapılmamıştır. Bu çalışmada, 2001 yılında izole edilen 22 *S.sonnei* izolatı incelenmiş ve PFGE ile iki, PPA ile 10, antibiyotik direnç tiplendirimi ile dört gruba ayrıldığı belirlenmiştir. İzolatların 21'inin aynı PFGE paternini göstermesi, bunların 2001 *S.sonnei* salgınına ait izolatlar olduğunu düşündürmüştür. 2001 *S.sonnei* izolatlarının plazmid profilleri incelendiğinde, izolatların içerdiği plazmidlerin sayı ve büyüklüklerinin yüksek oranda birbirine yakın olduğu; bazı izolatlarda profiller arası farklılıkların ise bir ya da iki plazmidin varlığı veya yokluğundan kaynaklandığı dikkat çekmektedir. Plazmidler, hücreden hücreye transfer olabilen hareketli genetik elemanlardır. İzolatların saklanması ve laboratuvardan laboratuvara taşınması sırasında yapılan besiyeri pasajları plazmidlerde kayıplara yol açmaktadır[22,28]. Çalışmamızdaki izolatların saklanması, laboratuvardan laboratuvara taşınması sırasındaki pasajların plazmidlerde kayıplara yol açtığı ve dolayısıyla plazmid profillerinde daha fazla çeşitliliğe neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle PPA yönteminin belirli bir bölgede kısa zaman içinde izole edilen izolatlar için kullanımı önerilmektedir.

Shigella suşları plazmid, transpozon, integron gibi hareketli DNA elementleri aracılığı ile antibiyotiklere hızla direnç geliştirebilmektedirler. Farklı antibiyotik direnç paternleri bu hareketli elemanlarda meydana gelen değişiklikler ile ilişkilendirilebilir. Brian ve arkadaşları[22] Texas'ta yaptıkları çalışmada salgın izolatlarını ve sporadik izolatları; antibiyotik direnç tiplendirimi, PPA, plazmid DNA restriksiyon fragman paterni ve PFGE ile incelemiş, PPA ve PFGE'nin salgın izolatlarını sporadik izolatlardan ayıramadığını göstermişlerdir. Araştırıcılar, yakın ilişkili olan izolatların belirli bir zaman periyodunda belirli bir coğrafi bölgede baskın olarak bulunması halinde, salgın suşlarının sporadik izolatlardan ayırt edilmesinin güç olacağını savunmuşlardır[22]. Lin ve arkadaşları[23], 1995-1996 yıllarındaki büyük bir salgından ve 1998-1999 yıllarındaki 5 salgından izole edilen 55 *S.sonnei* izolatını antibiyotik direnç tiplendirimi, PPA ve PFGE ile incelemişler; antibiyotik direnç tiplendirimi ile 2, PPA ile 3, PFGE ile 1 profil elde etmişlerdir. Bu bulgular ile araştırıcılar, 1998-1999 yılları izolatlarının 1995 salgın izolatlarının devamı olduğunu düşünmüşlerdir[23].

Bu çalışmada, 2008 ve 2009 izolatlarının, 2001 yılında izole edilen ve bildirilen *S.sonnei* salgınına ait olduğu düşünülen izolatlar ile aynı PFGE paterni göstermesi, Ankara'da aynı kökenin uzun zamandan beri dolaşımda olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, stabil kromozomal DNA'yı inceleyen PFGE yönteminin, Ankara gibi klonal benzerlik göste-

ren kökenlerin toplumda dolaşımda olduğu bölgelerde, izolatlardaki klonal ilişkiyi incelemek için uygun bir yöntem olduğu görülmüştür. Ancak bu yönteme ek olarak bir başka tiplendirme yöntemi kullanılmasının ve yöntemlerin beraber değerlendirilmesinin *Shigella*'ların epidemiyolojik çalışmalarında izolatlar arası ayırım gücünü artırmada faydalı olacağı düşünülmüştür.

Navia ve arkadaşları[29] tarafından yapılan çalışmada, aynı PFGE ve aynı plazmid profillerine sahip olan izolatların farklı antibiyotik direnç modeline sahip olmaları, direnç genlerini taşıyan transpozon ya da integron varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Yaptığımız çalışmada 2009 *S.flexneri* izolatlarında dört antibiyotik direnç modeli, yedi plazmid profili, 5 PFGE paterni izlenmiştir. Aynı antibiyotik direnç modeline sahip ancak farklı PFGE ve farklı plazmid profili gösteren olan izolatlar, antibiyotik direncinin direnç genlerini taşıyan plazmid veya integron kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür. Bu çalışmada, Ankara'da dolaşımda olan *S.flexneri* izolatlarının ortak PFGE paternine sahip olmadıkları görülmüş; bu nedenle PFGE yönteminin, *S.flexneri* izolatlarında herhangi bir zaman diliminde belirli bir PFGE paterni baskın olarak tespit edildiğinde salgın için uyarıcı olabileceği; bir salgın durumunda ise salgın izolatlarını sporadik izolatlardan ayırt etmede kullanılabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak çalışmamızda, Ankara'da en sık izlenen *Shigella* türünün *S.sonnei* olduğu saptanmıştır. PFGE sonuçları Ankara'da izole edilen izolatlar arasında klonal benzerlik olduğunu göstermiş ve dolayısıyla bu yöntemin ayırım gücü düşük bulunmuştur. Bu durumda PFGE yönteminin diğer tiplendirme yöntemleriyle birlikte değerlendirilmesinin, *Shigella* izolatlarında yüksek ayırım gücü elde etmede faydalı olacağı gösterilmiştir.

TEŞEKKÜR

2008 ve 2009 yıllarına ait *Shigella* suşlarının toplanmasına katkıda bulunan Sayın Dr. Neriman Balaban ve Sayın Dr. İpek Mumcuoğlu (T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı), Sayın Dr. Şengül Özkan (Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı) ve Sayın Dr. Esra Karakoç'a (T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Dupont HL. *Shigella* Species (Bacillary Dysentery), pp: 2905-19. In: Mandell GL, Bennett JE (eds), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2009, 7th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. Black RE, Lanata CF. Diarrheal Diseases, pp: 759-78. In: Nelson KE, Masters Williams CF (eds), Infectious Disease Epidemiology: Theory and Practice. 2007, 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers, London, UK.
3. Otkun M, Akata F, Karabay O, Tatman M, Tuğrul M, Dündar V. Edirne'de 1994 ve 1995 yıllarında izole edilen *Shigella* türlerinde antimikrobik direnci. İnfeksiyon Derg 1997; 11(1): 11-4.
4. Aysev AD, Güriz H. Drug resistance of *Shigella* strains isolated in Ankara - Turkey, 1993-1996. Scand J Infect Dis 1998; 30(4): 351-3.
5. Alıcı O, Açıkgöz Z, Gamberzade S, Göçer S, Karahocagil MK. Antibiotic resistance rates of *Shigella* species isolated from stool cultures in the years 1999-2003. Mikrobiyol Bul 2006; 40(1-2): 9-14.

6. Erdem B. *Enterobacteriaceae*, pp: 471-515. In: Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1999, Güneş Kitabevi, Ankara.
7. Pullukçu H, Aydemir Ş, Sipahi OR, Yamazhan T, Tünger A. 1999-2006 yılları arasında dışkı kültürlerinden izole edilen 439 *Shigella* kökeninin tür dağılımı ve antibakteriyel direnç durumları. ANKEM 2007; 21(3): 137-41.
8. Goldberg MB. Shigellosis, pp: 2246-8. In: Goldman L, Ausiello D (eds), Cecil Medicine. 2008, Saunders Elsevier, Philadelphia.
9. Pfaller MA. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. Emerg Infect Dis 2001; 7(2): 312-8.
10. Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganims, pp: 116-39. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, ASM Press, Washington, DC.
11. Van Belkum A, Tassios P, Dijkshoorn L, et al; 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. Clin Microbiol Infect 2007; 13(3): 1-46.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th Informational Supplement. CLSI Document M1000-S18. 2008. CLSI, Wayne, PA.
13. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 1981; 145(3): 1365-73.
14. Hendriksen RS, Kummerfeldt B (eds). Pulsed field gel electrophoresis for Salmonella and E.coli. In: Global Salm-Surv: A Global Salmonella Surveillance and Laboratory Support Project of the World Health Organization. 2007, 7th ed. WHO, Geneva.
15. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis 2006; 3(1): 59-67.
16. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 1988; 26(11): 2465-6.
17. Balaban N, Mumcuoğlu İl, Ulusoy A, Hayırlıoğlu N, Yetener V, Bodur H. *Shigella* türlerinin epidemiyolojisindeki ve antimikrobiyal duyarlılıklarındaki değişim. FLORA 2004; 9(3): 200-3.
18. Özmert EN, Göktürk B, Yurdakök K, Yalçın SS, Gür D. *Shigella* antibiotic resistance in Central Turkey: comparison of the years 1987-1994 and 1995-2002. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 40(3): 359-62.
19. Karacan C, Tavil B, Topal Y, Zorlu P, Tayman C. Evaluation of shigellosis in a Turkish children's hospital. Pediatr Int 2007; 49(5): 589-92.
20. Vrints M, Mairiaux E, Van Meervenne E, Collard JM, Bertrand S. Surveillance of antibiotic susceptibility patterns among *Shigella sonnei* strains isolated in Belgium during the 18-year period 1990 to 2007. J Clin Microbiol 2009; 47(5): 1379-85.
21. Liu PY, Lau YJ, Hu BS, et al. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella* sonnei by different molecular typing methods. J Clin Microbiol 1995; 33(7): 1779-83.
22. Brian MJ, Van R, Townsend I, Murray BE, Cleary TG, Pickering LK. 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. J Clin Microbiol 1993; 31(8): 2152-6.
23. Lin CS, Wang TK, Tsai JL, et al. Relatedness of *Shigella sonnei* isolates from six outbreaks in Tao-Yuan area, Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 1999; 32(4): 278-82.
24. Na-Ubol M, Samosornsuk S, Von Seidlein L, et al. Molecular characteristics of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhoea in a new industrialized area of Thailand. Epidemiol Infect 2006; 134(5): 997-1003.
25. Farshad S, Sheikhi R, Japoni A, Basiri E, Alborzi A. Characterization of *Shigella* strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of ipa genes. J Clin Microbiol 2006; 44(8): 2879-83.
26. Üstün C, Arslantürk A, Karademir A. The antimicrobial susceptibility test among clinical isolates of *Shigella sonnei* in Ankara, Summer 2001. Clin Microbiol Infect 2002; 8 (S1): 125.

27. T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı ve Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. İnfeksiyöz Ajan Sürveyansı: Enterik Patojenler Laboratuvarı 2001 Yılı Gaita Kültürü Sonuçları. Aylık Epidemiyoloji Raporu 2002; 1(3): 20.
28. Talukder KA, Islam Z, Dutta DK, et al. Antibiotic resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolated from patients with diarrhoea between 1999 and 2003 in Bangladesh. J Med Microbiol 2006; 55(9): 1257-63.
29. Navia MM, Capitano L, Ruiz J, et al. Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. J Clin Microbiol 1999; 37(10): 3113-7.