

**T.C.  
FATİH ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN ÜRETİLEN SHIGELLA SUŞLARININ  
ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ VE "PULSED-FIELD GEL  
ELECTROPHORESIS" GENOTİPİK PROFİLLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. GÜL GÜNER SOYLU**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. MUSTAFA ULUKANLIGİL**

**Ankara – 2011**

**T.C.  
FATİH ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN ÜRETİLEN SHIGELLA SUŞLARININ  
ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ VE "PULSED-FIELD GEL  
ELECTROPHORESIS" GENOTİPİK PROFİLLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. GÜL GÜNER SOYLU**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç.Dr. MUSTAFA ULUKANLIGİL**

Bu uzmanlık tezi Fatih Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından P53011001 proje numarası ile desteklenmiştir.

**Ankara – 2011**

# İÇİNDEKİLER

---

	Sayfa
<b>TEŞEKKÜR</b>	İii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	iv,v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	Vi
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	Vii
<b>I. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1-2
<b>II. GENEL BİLGİLER</b>	3-36
II.1. Shiga basiline keşfediliş hikayesi	3-4
II.2. Morfoloji, üreme ve biyokimyasal özellikler	4-6
II.3. Antijenik yapı ve <i>Shigella</i> tipleri	6-7
II.4. Patofizyoloji	8-11
II.4.1. <i>Shigella</i> 'nın patojenite belirleyicileri	8-11
II.4.1.1. Virulans plazmidi	8-9
II.4.1.2. Kromozomal genler	9
II.4.1.3. <i>Shigella</i> toksinleri	9-11
II.5. <i>Shigella</i> enfeksiyonunda konak cevapları	11-12
II.5.1. <i>Shigella</i> ve intestinal epitelyal hücreler	11-12
II.5.2. <i>Shigella</i> ve makrofajlar	12
II.5.3. <i>Shigella</i> ve lökositler	12
II.6. <i>Shigella</i> enfeksiyonlarında immünite	12-13
II.7. Klinik	13-16
II.7.1. Şigelozun ekstraintestinal komplikasyonları.	14-16
II.7.1.1. <i>Shigella</i> bakteriyemisi	14
II.7.1.2. Cerrahi komplikasyonlar	14
II.7.1.3. Nörolojik manifestasyonlar	15
II.7.1.4. Ürogenital sistem	15
II.7.1.5. Neonatal şigeloz	15-16
II.8. Tanı	16-18
II.8.1. Klinik	16
II.8.2. Laboratuvar	16-18
II.9. Tedavi	18-20
II.10. Antimikrobiyal direnç	20-21
II.11. Aşı	21-24
II.11.1. Polisakkarit konjuge aşıları	21-22
II.11.2. Canlı atenüe aşılar	22-23
II.11.3. Diğer aday <i>Shigella</i> aşıları	23-24
II.12. Epidemiyoloji	24-26
II.13. Epidemiyolojik tiplendirme	26-36
II.13.1. Tiplendirme nedenleri	27-29
II.13.1.1. Enfeksiyon hastalıklarının sürveyansı	28
II.13.1.2. Salgın değerlendirilmesi	28-29
II.13.1.3. Enfeksiyon patogenezi ve gidişatının araştırılması	29
II.13.1.4. Bakteriyel popülasyon genetiklerinin araştırılması	29
II.13.2. Epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri	29-36
II.13.2.1. Fenotipik yöntemler	30-32
II.13.2.2. Genotipik yöntemler	32-34
II.13.2.3. PFGE	34-36

<b>III. MATERYAL VE METOD</b>	37-45
III.1. Çalışmada kullanılan izolatlar ve epidemiyolojik özellikleri	37
III.2. Stok suşların canlandırılması ve biyokimyasal doğrulama işlemleri	37
III.3. Moleküler doğrulama işlemleri	38-39
III.3.1. DNA ekstraksiyon	38
III.3.2. <i>Shigella ipaH</i> PCR	38-39
III.3.2.1. Kimyasallar	38
III.3.2.2. Ekipman	38
III.4. Antimikrobiyal duyarlılık testleri	40
III.5. PFGE	40-45
III.5.1. Kullanılan malzemeler	40-41
III.5.1.1. Ekipman	40
III.5.1.2. Kimyasallar	41
III.5.2. Test prosedürü	41-45
III.5.2.1. İzolatların hazırlanması	41
III.5.2.2. İzolatların agaroz gömülmesi	41-42
III.5.2.3. Agaroz içerisindeki hücrelerin parçalanması	42
III.5.2.4. Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması	42-43
III.5.2.5. Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın restriksiyonu	43
III.5.2.6. Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi	43-44
III.5.2.7. Elektroforez	44
III.5.2.8. Sonuçların gözlemlenmesi ve analizi	45
<b>IV. BULGULAR</b>	46-54
<b>V. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	55-60
<b>VI. ÖZET</b>	61
<b>VII. SUMMARY</b>	62
<b>VIII. KAYNAKLAR</b>	63-72

## *Teşekkür*

*Uzmanlık eğitimimde emeği geçen, mikrobiyoloji alanında bilgi ve beceri kazanmamı sağlayan ve tez konumun seçimi, yürütme ve sonuçların değerlendirilmesi aşamalarında desteğini esirgemeyen değerli Hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa Ulukanlıgil'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.*

*Tezimin moleküler çalışmalarını yürütmem için Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı olanaklarını hizmetimize sunmuş olan RSHM Başkanlığı'na, ayrıca yürütme ve yorumlama aşamalarında her türlü yardımı hiç çekinmeden sağlamış olan değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Rıza Durmaz'a teşekkür ederim.*

*Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını almış olduğum asistan arkadaşım Dr. Tutku Arslantaş'a ve emeği geçen tüm bölüm ve hastane çalışanlarımıza teşekkür ederim.*

*Tüm eğitim hayatım boyunca her türlü özveriye gösteren, beni her zaman destekleyen sevgili annem, babam ve ağabeylerime ve uzmanlık eğitimim için beni teşvik edip büyük özverilerle hep yanımda olmuş olan sevgili eşime ve uzmanlık eğitimim öncesi hazırlık aşaması ve eğitimim sırasında bir çocuk olarak çok fedakarlık göstermiş olduğuna inandığım canım kızıma çok teşekkür ederim.*

*Dr. Gül Güner Soylu-2011*

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

---

ADP	Antimikrobiyal duyarlılık paternleri
BGS	"Buffered glycerole saline"
CDC	"Centers for Disease Control and Prevention"
CHEF	"Contour Clamped Homogeneous Electric Fields"
CVD	"Center for Vaccine Development"
dNTP	Deoksiribonükleozit trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EIEC	Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
EMB	Eozin Metilen Blue
ETEC	Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
E-test	"Epsilometer strip method"
GIS	"Geographical Information System"
HLS	Hücre lizis süspansiyonu
HST	Hücre süspansiyon tamponu
IVI	"International Vaccine Institute"
ipaH	İnvaziv plazmid antijen H geni
Kb	Kilobaz
kDA	Kilodalton
KCN	Potasyum siyanür buyyon
LMA	Düşük erime ısılı agar
LPS	Lipopolisakkarit
MLEE	"Multilocus Enzym Electrophoresis"
MLST	"Multilocus Sequence Typing"
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
NA	Nutrient agar
NCCLS	"National Committee For Clinical Laboratory Standarts"
NO	Nitrik Oksit

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	"Pulsed-Field Gel Electrophoresis"
RE	Restriksiyon enzimi
RSHM	Refik Saydam Hifzısıhha Merkezi
SDS	Sodyum dodezil sülfat
ShET-1,ShET-2	<i>Shigella</i> enterotoksin 1 - 2
SLST	"Single Locus Sequence Typing"
SLT	"Shiga like" toksin
S-S	<i>Salmonella Shigella</i> agar
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TLR	"Tall-like reseptör"
TSI	"Triple sugar iron agar"
VT	Verotoksin
VNTR	"Variable number tendom repeat"
WHO	"World Health Organization"
WRARI	"Walter Reed Army Research Institute"

## ŞEKİLLER DİZİNİ

---

	Sayfa
Şekil.1 <i>Shigella spp.</i> Koyun kanlı agar (a) ve Nutrient agar (b) plaklarında koloni görüntüleri	5
Şekil.2 PCR jel görüntüsü [1-6] No'lu suşlar	46
Şekil.3 PCR jel görüntüsü [7-14] No'lu suşlar	46
Şekil.4 PCR jel görüntüsü [15-22] No'lu suşlar	46
Şekil.5 PCR jel görüntüsü [23-29] No'lu suşlar	46
Şekil.6 FastDigest <i>XbaI</i> PGFE görüntüsü, 2005-1.grup [1-10]	48
Şekil.7 FastDigest <i>XbaI</i> PFGE görüntüsü, 2005-2.grup [11-20]	48
Şekil.8 FastDigest <i>XbaI</i> PFGE görüntüsü, 2006 [21-29]	48
Şekil.9 FastDigest <i>NotI</i> PGFE görüntüsü, 2005-1.grup [1-10]	49
Şekil.10 FastDigest <i>NotI</i> PFGE görüntüsü, 2005-2.grup [11-20]	49
Şekil.11 FastDigest <i>NotI</i> PFGE görüntüsü, 2006 [21-29]	50
Şekil.12 <i>Shigella</i> FastDigest <i>XbaI</i> PFGE profili , 2005 [1-20]	50
Şekil.13 <i>Shigella</i> FastDigest <i>XbaI</i> PFGE profili , 2006 [21-29]	51
Şekil.14 <i>Shigella</i> FastDigest <i>XbaI</i> PFGE profili , 2005-2006 [1-29]	52



## TABLolar DİZİNİ

---

	Sayfa
Tablo.1 <i>Shigella spp.</i> ve <i>E.coli</i> ' nin ortak biyokimyasal özellikleri	5
Tablo.2 <i>Shigella spp.</i> ve <i>E.coli</i> ' nin ayırımında kullanılan biyokimyasal özellikler	6
Tablo.3 <i>Shigella</i> tür ve serotiplerinin dağılımı	7
Tablo.4 <i>Shigella</i> türlerinin biyokimyasal ve serolojik ayrımları	7
Tablo.5 Shiga toksin ailesi nomenklaturü	10
Tablo.6 Çalışmada kullanılan izolatların dağılımı	37
Tablo.7 <i>Shigella ipaH</i> PCR reaksiyon karışımı	39
Tablo.8 <i>Shigella ipaH</i> PCR amplifikasyon profili	39
Tablo.9 <i>FastDigest XbaI (NotI)</i> restriksiyon enzim karışımı	43
Tablo.10 PFGE koşulları	44
Tablo.11 Antimikrobiyal duyarlılık paternleri ve sıklıkları	47
Tablo.12 İzolatların antimikrobiyal duyarlılık paternleri (ADP) ve PFGE tipleri	53

## **I.GİRİŞ VE AMAC**

Enfeksiyona bağlı ishaller başta çocuklar olmak üzere yaşlı, debilize ve immun supresif hasta gruplarını ve düşük sosyoekonomik seviyedeki populasyonları etkilemekte ve yaşamı tehdit edici sonuçlar doğurabilmektedirler. Enfeksiyöz ishalin başta gelen etyolojik ajanlarından birisi olan *Shigella spp.* enfeksiyonları major bir global halk sağlığı problemi olarak görölmektedir. *S.sonnei* gelişmekte olan ve gelişmiş ölkelerde ishallerin önemli bir sebebi olup Türkiye için yakın dönemlerin en sık bildirilen *Shigella* serogrubu haline gelmiştir.

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

Enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde olgulardan izole edilen mikroorganizmalar arasındaki epidemiyolojik ilişkinin gösterilmesi büyük önem taşımaktadır. Genellikle salgınlara yol açan etyolojik ajanlar eş ya da yakın ilişkili klonlardan köken almaktadır. Enfeksiyon etkenlerinin alt tiplerine göre sınıflandırılması, toplumsal ya da hastane kaynaklı salgınlara ve enfeksiyon kaynağının belirlenmesi ile yayılımının takibini, virulan suşların saptanmasını, enfeksiyon sebebiyle tedavi edilen hastalarda reenfeksiyon ve ya relapsın değerlendirilmesini ve aşılama programlarının izlenebilmesini mümkün kılmaktadır.

Tiplendirme amacı ile 1980'lerin başlarına kadar kullanılmış olan fenotipik yöntemler ayırıtırma güçlerinin düşüklüğü, değişkenliklerin fazla olması, sonuçların geç elde edilmesi, özel ve yoğun laboratuvar çalışmalarını gerektirmesi gibi nedenlerle yerlerini genotipik tiplendirme yöntemlerine bırakmaktadır. Genotipik tiplendirme yöntemlerinden "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE), ayırıtırma gücünün ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması nedeniyle bir çok etyolojik ajan için altın standart olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmada 2005-2006 yıllarında Fatih Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ulaşan gaita örneklerinden izole edilmiş olan *Shigella* suşlarının fenotipik (antimikrobiyal duyarlılık paternlerinin belirlenmesi) ve genotipik

(PFGE analizi) yöntemlerle tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Bu sonuçlardan hareketle Ankara iline ait *Shigella spp.* suşları için ampirik tedaviye yön verebilecek bir antibiyotik duyarlılık bilgisine ulaşılması ve antimikrobiyal duyarlılık yanında PFGE analizi ile izolatlar arasında muhtemel klonal ilişkiyi ortaya koyarak bulaş derecelerinin belirlenmesi ve ileriye dönük enfeksiyon kontrol önerilerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

## **II. GENEL BİLGİLER**

### **II. I. Shiga basilinın keşfediliş hikayesi**

İlk izole edilen *Shigella* türü olan *S.dysenteria* tip 1 1896'da Kyoshi Shiga tarafından keşfedildi (1). Shiga, Shin ve Chiyo Sato'nun beşinci çocuğu olarak Kuzey Japonya'da Sendai'de 5 şubat 1871 tarihinde dünyaya geldi. Çocukluk yılları güçlüklerle geçti ve ekonomik güçlükler nedeniyle Kiyoshi, annesinin ailesi tarafından büyütüldü ve soyisim olarak annesinin kızlık soyismi olan Shiga'yı aldı. 1886'da ailesi Tokyo'ya taşındı. Shiga liseyi burada okudu. 1892'de Tokyo Imperial Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne giriş yaptı (2). Shiga tıp fakültesindeyken, 1899'da *Clostridium tetani*'nin saf kültürünün elde edilmesindeki başarısı, tetanus antitoksinini keşfetmesi ve immunoterapideki başarılarıyla uluslararası ün salmış olan Dr. Shiba Saburo Kitasato'dan çok fazla etkilenmişti (1). 1894'de Kitasato, Hong Kong'ta bir bubonik veba epidemisini inceledi ve bulgularını *Lancet* dergisinde yayınladı (1). Shiga mezun olduktan sonra Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsüne girdi ve Kitasato tarafından araştırma görevlisi olarak atandı. Başlangıçta tüberküloz ve difteri koğuşlarında çalışan Shiga 1897'nin sonlarında ilgi alanını bir "sekiri" (dizanteri) salgının mikrobiyolojik araştırmasına yönlendirdi. Japon sözcüğü "sekiri", Çince karakterlerden oluşmuş olup, "kırmızı diyare" manasına gelmektedir. 19.yüzyılın son dekadında Japonya'da periyodik olarak ortaya çıkan dizanteri epidemileri yüksek mortalite ile seyrediyor ve on binlerce kişiyi etkiliyordu (3). 1897 "sekiri" si 91.000'in üzerinde insanı etkiledi ve %20'nin üzerinde mortalite hızına ulaştı. Shiga, Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsü'nde 36 adet dizanteri hastasıyla çalıştı. Gaitadan, gram negatif, dekstrozu fermente eden indol reaksiyonu negatif ve mannitolden asit oluşturmeyen bir basil izole etti. Köpeklere inoküle edildiğinde organizma diyareye neden oluyordu. Shiga konvelesan dönemdeki dizanteri hastalarının serumuna maruz bırakıldığında organizmanın çöktüğünü gösterdi. Bulgularını, Dr.Kitasato'nun rehberliğinde yayınladı (1).

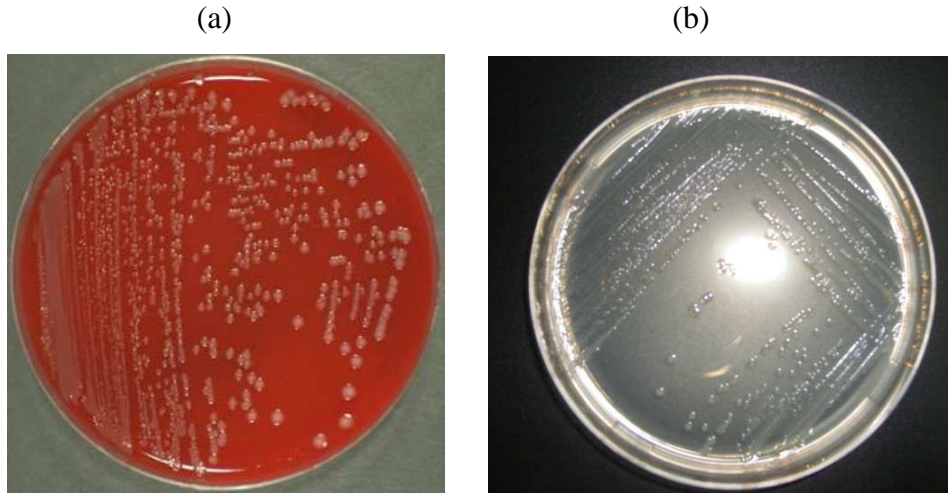
Shiga, başlangıçta *Bacillus dysenteria* olarak tanımladığı organizmanın özelliklerini belirlemeye devam etti (3). Özellikle, organizma tarafından üretilen toksik faktörler üzerinde yoğunlaştı. Bu faktörlerden birisi olan Shiga toksin hakkında tarihi içerikli bir derleme yayınlanmıştır (4). Shiga'nın dizanteri basilinı keşfini hemen takip eden yıllarda, diğer araştırmacılar tarafından benzer organizmalar rapor edildi (1,3). Takip eden 40 yıl boyunca ek olarak üç grup benzer organizma daha keşfedildi ve araştırmacıların isimleri

olan Shiga, Flexner, Boyd ve Sone'ye ithafla *S.dysenteria*, *S.flexneri*, *S.boydii* ve *S.sonnei* gibi isimlerle adlandırılarak *Shigella* genusu içerisinde taksonomik olarak yerini aldı. Adlandırma için çok sayıda revizyonlar yapıldı. Tür *Shigella* ismiyle "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" nin 1930 baskısında ilk defa yerini aldı (1). Dr.Shiga, 25 Ocak 1957'de 85 yaşında vefat etti. *New York Times*'ta yayınlanan ölüm ilanında en aktif yıllarında bakteriyolojideki dört ya da beş en muteber bilim adamlarından biri olduğu yazıldı (2).

## II. 2. Morfoloji, üreme ve biyokimyasal özellikleri

*Shigella* organizmaları gram negatif, fakültatif anaerobik, 2-4x0,6 µm boyutlarında, düz çomak şeklinde, flagellaları olmayan basillerdir. Genel kullanım besiyerlerinde kolay ürerler. Buyyonda homojen bulanıklık, jelozda yuvarlak hafif kabarık, düzgün yüzeyli, saydam ve *E.coli* kolonilerine benzer koloniler oluştururlar (Şekil 1. a ve b). *S.sonnei*'nin kolonileri biraz daha büyüktür ve sıklıkla koloni varyasyonları (S-R-Bomba koloniler) gösterirler. Optimal 37°C'de ürerlerse de, üredikleri sıcaklık sınırları geniş olup, 8-40°C arasında değişiklik göstermektedir (5,6).

*E.coli* ile ortak biyokimyasal özellikleri (Tablo.1) olmasına rağmen, laktozu 24 saat içinde fermente edememeleri, bazı nadir serotipler hariç glukozdan gaz oluşturamamaları ve hareketsiz olmaları ile *Shigella*'ların hemen tüm *E.coli* türlerinden ayrımları mümkündür (4,5). *E.coli* ve *Shigella*'ları birbirinden ayırmak için çeşitli biyokimyasal özellikler kullanılabilir (Tablo. 2).



**Şekil 1.** *Shigella spp.* Koyun kanlı agar (a) ve Nutrient agar (b) plaklarında koloni görüntüleri

**Tablo 1.** *Shigella spp.* ve *E.coli'nin* ortak biyokimyasal özellikleri (4)

Test	Sonuç
Metil-red	+
Voges-Preskauer	-
TSI agarda hidrojen sülfür oluşumu	-
Üre hidrolizi	-
Fenilalanin deaminaz	-
Potasyum siyanidde (KCN) üreme	-
Malonat kullanımı	-
Mannitol fermentasyonu	+*
Adonitol fermentasyonu	-
İnozitol fermentasyonu	-
Mukat fermentasyonu	D**
Dnaz	-

\**S.dysenteria* hariç \*\*D:Değişken

**Tablo.2.** *Shigella spp.* ve *E.coli*'nin ayrımında kullanılan biyokimyasal özellikler (4,6)

Test	<i>Shigella spp</i>	%	<i>E.coli</i>	%
İndol	D	38	+	99
Sitrat	-	0	D	24
Lizin dekarboksilaz	-	0	+	90
Arginin dekarboksilaz	-	8	D	17
Ornitin dekarboksilaz	D	20	+	63
Motilite	-	0	+	80
Glukozdan gaz	-	<2	+	91
Laktoz fermentasyonu	-	<1	+	91
Sükroz fermentasyonu	-	<1	+	50
Salisin fermentasyonu	-	0	+	40
Ksiloz fermentasyonu	-	2-5	+	95
Mukat fermentasyonu	-	0	+	92
Eskülin hidrolizi	-	0	D	31
Asetat kullanımı	-	0	+	84

D:Değişken

*Shigella*'lar kemorganotrofik yani hem solunumsal hem de fermentatif tipte metabolizmaları olan organizmalardır. Oksidaz negatiftirler. *Shigella dysenteriae* tip 1 ve birkaç *S.flexneri* serovarı dışında katalaz pozitifler. Metil red pozitif, Voges-Proskauer ve Simmons sitrat negatiftirler. Hidrojen sülfid üretmezler, üreyi hidrolize etmezler ve malonati kullanmazlar. Potasyum siyanür (KCN) buyyonda üreyemezler (5,7).

### II. 3. Antijenik yapı ve *Shigella* tipleri

*Shigella* cinsi A, B, C, D olarak dört major O antijenik gruba ayrılmaktadır. Major O antijenlerinin yanında, A, B, C grupları minör O antijenleri de içerir. Serolojik tiplendirme O antijenlerine göre yapılmaktadır (Tablo.3). *S.sonnei*'nin farklı serotipleri bulunmamaktadır. Tüm *Shigella* türleri epidemiyolojisi, mortalite oranları ve oluşan hastalığın ağırlığı farklı olmakla birlikte dizanteriye yol açabilirler (4,6).

**Tablo. 3.** *Shigella* tür ve serotiplerinin dağılımı (8)

Tür	Serogrup	Serotip
<i>S.dysenteriae</i>	Serogrup A	1-15
<i>S.flexneri</i>	Serogrup B	1-8
<i>S.boydii</i>	Serogrup C	1-19
<i>S.sonnei</i>	Serogrup D	1

Bazı suşlar K veya kapsül antijenleri içerir, fakat serolojik tiplendirme için kullanılmazlar. Ancak bu antijenlerin varlığı, O antijeninin serolojik reaksiyonlarını engelleyebilmektedir. Bu durum serolojik tiplendirme öncesi hücre süspansiyonunun kaynatılmasıyla ortadan kaldırılabilir. B grubunun 1-5. serotiplerinde fimbria gösterilebilmiştir, ancak tip 6 ve diğer *Shigella* tiplerinde bulunmamaktadır. Gösterilebilen tüm fimbria antijenleri immünolojik olarak eşittir. Tüm *Shigella*'lar hareketsiz olduğu için H antijenleri bulunmamaktadır (4,6,9).

Diğer tiplerden farklı olarak, *S.sonnei*'nin faz I veya form I olarak da bilinen S formu, *Plesiomonas shigelloides*'te de bulunan bir O antijen zinciri içerir. Bu zincir,  $\alpha(1-4)$  bağları ile birbirine bağlı 2-asetoamido-2-deoksi-L-altruronik asit ve 2-asetamido-4-amino-2,4,6-trideoksi-D-galaktoz disakkarit rezidülerinin,  $3(1-3)$  bağları ile tekrarlanmaları ile oluşur (10).

*Shigella* türleri bazı özellikleri ile birbirlerinden ayrılabilirler (Tablo. 4).

**Tablo. 4.** *Shigella* türlerinin biyokimyasal ve serolojik ayrımları (6,7,11)

Test	<i>S.dysenteriae</i>	<i>S.flexneri</i>	<i>S.boydii</i>	<i>S.sonnei</i>
Serogrup	A	B	C	D
İndol	D	d	d	-
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	+
ONPG	D	-	d	+
<i>Karbonhidrat fermentasyonu</i>				
<i>Mannitol</i>	-	+	+	+
<i>Rafinoz</i>	-	d	-	-
<i>Sükroz</i>	-	-	-	-
<i>Ksiloz</i>	-	-	d	-

- : <%9 suş pozitif, d : % 10-89 suş pozitif, + : > 90 suş pozitif



## II.4. Patofizyoloji

Şigellozun patogeneğinde anahtar rol, bakterinin kolonik mukozayı invaze etme yeteneğidir. İnvazyon prosesi, tam virulans için yeterli olmayan ancak invazyon için gerekli olan 210-220 Kb'lık bir plazmidin varlığına bağlıdır (12,13,14). Yeni bilgiler, yalnız bu proste yeralan moleküler mekanizmaları açıklamakla kalmamış, aynı zamanda hastalığın klinik belirtilerinin, enflamasyonla sonuçlanan bakteriyel virulans faktörleri ve konak cevabı arasındaki ilişkiye bağlı olduğunu da ortaya koymuştur (15,16). Ek olarak, doğal bağışıklık sisteminin hücresel ve moleküler efektörleri üzerindeki yeni görüşlere göre; bu sistem bazen bedeli kolonda lokal doku hasarı olsa bile, primer enfeksiyon sırasında etkenin eradikasyonunu sağlamakta ve sistemik yayılıma engel olmaktadır (14,17).

### II.4.1. *Shigella*'nın patojenite belirleyicileri

#### II.4.1.1. Virulans plazmidi

*Shigella flexneri* 5a M90T suşunun virulans plazmidinin sekanslanması, araştırmacılara tip III sekresyon sistemi tarafından sekrete edilen yaklaşık 25 proteini kodlayan genleri tanımlama şansını vermiştir (17). Bu sekresyon sistemi, diğer bazı gram negatif bakterilerde olduğu gibi, *Shigella* efektör moleküllerini bakteriyel stoplazmadan membrana ve konak hücrenin stoplazmasına aktarır (18). Virulans plazmidinin giriş bölgesi ya da ipa/mxi-spa lokusu olarak adlandırılan A.31-kb segmenti, *Shigella*'nın intestinal epitelyum hücrelerine girişi, makrofajların ölümü (apoptozis) ve PMN lökositlerin aktivasyonu için gerekli olan patojenite adasını oluşturur (19,20). Ada, farklı tanımlanmış iki ayrı operon şeklinde organize olmuştur (19,21).

En fazla çalışılmış olan virulans plazmid bölgelerinden biri İnvaziv Plazmid Antijen (Ipa) dir. İnvazyon için gerekli Ipa A'dan Ipa D'ye dört proteini kodlayan dört adet gen içermektedir (14,17,22). *Shigella* konak hücreye temas ettiğinde, Ipa B ve Ipa C, 25A porunu oluşturmak üzere, tek bir kompleks halinde konak membranına yerleşir (23). Ipa B, makrofajlarda apoptozisi indüklemek için gereklidir (16). Ipa C ile kombine olmuş Ipa B ve sitoplazmik şaperon Ipg C, hücreden hücreye geçiş için gerekli olan hücre membran lizisi için gereklidir (24).

Ics A (virG), vir K ve sop A (icsP) genleri, *Shigella*'nın enfekte ettiği hücrelerin stoplazmalarında hareket etmeleri ve diğer hücrelere yayılma yeteneklerinde rol oynar

(25). Bu genler sırasıyla interselüler yayılımda direkt olarak rol alan dış membran proteini (26), ics'nin doğru lokalizasyonu sağlamak için gerekli olan proteini (27), ve icsA'nın ayrılmasını sağlayan dış membran proteazını (28) kodlarlar. virF geni ipa genlerinin pozitif regülasyonu için gerekli olan virB lokusunu regüle eder. inv bölgesi Ipa proteinlerinin bakterinin dış membranına oryantasyonu için gereklidir (14,29).

#### **II.4.1.2. Kromozomal genler**

Patojenik süreçte, invazyon plazmid genlerinin temel virulansını tamamlayıcı şekilde pek çok kromozomal lokus rol alır. Bu nedenle tam virulans için bu genlere de ihtiyaç duyulur. Bu genler iki grup halinde kategorize edilebilir:

1. Plazmid virulans genlerinin ekspresyonunu regüle eden genler: virR geni, Ipa ve Mxi-Spa proteinlerinin ısı bağımlı ekspresyonunu kontrol eden histon benzeri bir molekülü kodlar (14,30).

Keratokonjonktivit provokasyon (IcpA) geni de virG'yi pozitif yönde regüle eder.

2. Lipopolisakkarit (LPS) ve sideroforları kodlayan, bakterilerin bağırsakta yaşaması ve konak savunma mekanizmalarına direnmesini sağlayan genler: *Shigella*'nın LPS'den yoksun (R koloniler) suşları avirulandır (12).

#### **II.4.1.3. *Shigella* toksinleri**

İlk defa 1903 yılında *S.dysenteriae* tip 1'in letal bir toksin ürettiği gösterilmiş ve hayvanlarda paralizye neden olduğundan Shiga nörotoksini olarak tanımlanmıştır (4). Yapılan çalışmalarda tavşan ileumunda bakteri özütünün sitotoksik ve enterotoksik etkilerinin gösterilmesiyle bakterinin birden fazla toksik etkisinin olduğu anlaşılmıştır. Toksin saflaştırma, toksine karşı poliklonal ve monoklonal antikoların elde edilmesiyle tüm bu etkilerden sorumlu bir tek molekülün olduğu saptanmış ve Shiga toksin olarak isimlendirilmiştir (31).

Bartlett ve ark.'nın (32) yaptığı çalışmada *S. dysenteriae* tip 1'in diğer *Shigella* tiplerinden 100 ila 1000 kat fazla toksin üretebildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada diğer *Shigella* türlerinin de sitotoksik etki gösterebildikleri ancak bu etkilerinin Shiga antitoksini ile nötralize edilemediği saptanmıştır. İlk kez Beutin ve ark. (33) *S.dysenteriae* tip 1 dışında Shiga toksin üretimini, izole ettikleri *S. sonnei* suşunda göstermişlerdir. *S. sonnei* suşunda toksin üretiminden sorumlu *stx* genini bir bakteriyofajda saptamışlar, nükleotid analizi yapılmış ve *S. dysenteriae* tip 1'in *stxA* altünitesi ile identik ve *stxB*

altünitesi ile tek bir nükleotid farkı olduğunu göstermişlerdir. *S. sonnei*'nin toksin üretme özelliğini bir *S. dysenteriae* tip 1 suşundan bu bakteriyofaj yoluyla kazandığını düşünmüşlerdir.

Shiga toksin, enzimatik ve yapısal olarak benzer olan ve "Shiga-like toksin" olarak adlandırılan toksinlerin prototipidir. Bazı *E. coli* serotiplerinde de "Shiga-like toksin"lerin gösterilmesiyle toksin nomenklatürü oluşturulmuştur (Tablo. 5). *E. coli* tarafından üretilen toksinler "transforming" faj genleri tarafından kodlanırken, Shiga toksin *S. dysenteriae* tip 1 kromozomunda *pyrF* lokusunun yanında yer alan *stx* genleri tarafından kodlanmaktadır (4).

**Tablo. 5.** Shiga toksin ailesi nomenklatürü (4)

Yeni adı	Eski adı	Gen	Gen ürünü
Shiga toksin	Shiga toksin	Stx	Stx
Shiga toksin tip 1	SLT-1, VT-1	stx1	Stx-1
Shiga toksin tip 2	SLT-2, VT-2	stx2	Stx-2

SLT: Shiga like toksin , VT: Verotoksin

Shiga toksin iki farklı peptid alt ünitesinden oluşmaktadır. Bunlar enzimatik olarak aktif 32 kDa ağırlığındaki A alt ünitesi ve terminal disakkarit olarak oc(1-4) bağı ile galaktoza bağlı, galaktoz içeren bir glikolipid (Gb3, globotriaosylceramide) olan, konak hücre reseptörüne bağlanmadan sorumlu ve birbiriyle aynı 7.7 kDa ağırlığındaki 5 adet B alt ünitesidir (31,34).

A alt ünitesi RNA N-glycosidase aktivitesine sahiptir. 28S ribozomal RNA'nın 5' ucundaki 4324 pozisyonundaki adenozinden bir adenin koparır, böylece 60S ribozomal altünitesine aminoasıl-tRNA bağlanması inhibe olur. Bu enzimatik aktivite protein sentezini inhibe eder, sonuçta hücre ölümü gerçekleşir (31,32).

Kolera toksini ve *E. coli* labil toksininin (LT) farklı olarak Shiga toksin intrasellüler cAMP seviyesini yükselterek ishale neden olmaz. Toksin sadece villüs hücrelerinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanıp bu hücreleri tahrip ettiği için, bu hücrelerin görevi olan sodyum absorpsiyonu baskılanır. Kript hücreleri etkilenmediği için bazal sıvı sekresyonu devam eder. Absorpsiyonun azalması ile birlikte sekresyonun normal devam etmesi sonucunda barsak lümeninde net sıvı birikimi gerçekleşir (35).

Shiga toksin üretimi demir konsantrasyonuna bağlı olarak *fur* lokusundaki genler tarafından kontrol edilmektedir. Bu genler demir bağlayıcı sideroforlar ve demir-siderofor kompleksinin alımını sağlayan iç ve dış membran proteinlerinin sentezinden sorumludurlar. Demir yeterli miktarlarda olduğunda proteinlerle kompleks oluşturarak, demir kontrollü genlerin yanındaki promotörlere bağlanarak bu genlerin baskılanmasını sağlar (31-35).

ShET-1 ve ShET-2 (*Shigella* enterotoksin) adında iki yeni toksin tanımlanmıştır. ShET-1 *set1* kromozomal geninde, ShET-2 ise invazyondan sorumlu 140 Mda plazmitindeki *sen* geninde kodlanır. Çoğu hastada dizanteri başlangıcından önce görülen sulu ishalden bu toksinlerin sorumlu olabileceği düşünülmektedir (36,33,34). Vargas ve ark. (34) yaptıkları çalışmada ShET-2'nin tüm *Shigella* suşlarında, ShET-1'in ise sadece *S.flexneri* suşlarında varlığını göstermişlerdir.

## **II.5. *Shigella* enfeksiyonlarında konak cevapları**

*Shigella* suşları ile konak arasındaki etkileşimler, bağırsaktaki histopatolojik değişiklikler ve şigelozun klinik prezentasyonu ile sonuçlanan enflamatuvar yanıtları tetikler (15,21). Sitokin ve kemokin cevapları, hem lokal olarak alınan rektal örneklerde hem de serumda gerçekleştirilen immunohistokimyasal çalışmalarda gösterilmiştir (15,37). Konak cevabı, enflamasyona yol açmakla birlikte, enfeksiyonun kontrolü için de zorunludur (17). Bir murin modelinde, konağın şigeloz defansı için doğal öldürücü (NK) hücre aracılı IFN  $\gamma$  üretiminin gerekli olduğu gösterilmiştir (7). *Shigella* enfeksiyonuna konak yanıtı, hücreden hücreye değişkenlik gösterdiği için, yanıtların her birinden kısaca bahsedilecektir.

### **II.5.1. *Shigella* ve İntestinal Epitelyal Hücreler**

*Shigella* kolonik epitelyumu, Peyer plaklarını örten, follikülle ilişkili epitelyum içerisindeki M hücreleri yoluyla geçer (12,21). Lenfoid follikülün tepe noktasında, bakteriler makrofajlarca fagosite edilir ve apoptozisle öldürülür (16,38). Bu strateji ile *Shigella* subepitelyal dokuya ulaşır ve kolonik epitelyal hücreleri bazolateral yüzeylerinden invaze eder (14). Giriş prosesinin başlangıç basamağında, *Shigella* filopodlar oluşturarak epitelyal hücrelerin içinde aktin polimerizasyonunu indükler (39). Proses, GRPaz'ların Rho ailesinin aktivasyonunu içerir (39,40). Girişten sonra, bakteriler membrana bağlı vakuollerini parçalar,

stoplazmada çoğalır ve IcsA (virG) proteinine bağı olan aktin tabanlı motiliteyi kullanırlar (14,41). Bu proses, parmaksı protrüzyonlar oluşturarak komşu hücelere yayılımı sağlar (21). Ek olarak, hücre içindeki *Shigella*, kolonik epitelyal hüceleri IL-6, IL-8 gibi proenflamatuvar sitokinleri eksprese etmek üzere programlar (15,42).

### **II.5.2. *Shigella* ve makrofajlar**

*Shigella*, M hüceleri boyunca kolonik epitelyumu geçtikten sonra, lokal makrofajlarca yakalanır. Daha sonra fagozomlardan çıkar ve iki saat içerisinde makrofajların apoptozisini ve enflamatuvar reaksiyonu indükler (16,38,42). Ipa B proteini, proenflamtuvar sitokinler olan "IL-1- $\beta$  converting enzim"e bağlanarak apoptozisi yönlendirir. (16,43). Bu enflamatuvar proses, enfeksiyonun eradikasyonu için çok önemlidir (21).

### **II.5.3. *Shigella* ve lökositler**

Masif polimorfonükleer lökosit çoğalması, başlıca intraselüler *Shigella* LPS postinvazyonu aracılığıyla olur (21). *Shigella* LPS, doğal immun cevabın dominant medyatörü "toll-like reseptör 4" (TLR 4)'ün yolculuğunu indükler (17,44). Lökosit göçü intestinal epitelyumun bütünlüğünü bozar (21). Her ne kadar bu bozulma, bakteriyel invazyona zemin hazırlayarak virulansa katkıda bulunur gibi gözükse de, aslında enfeksiyonu mukoza ve submukozaya sınırlar ve eninde sonunda eradikasyonu sağlar. Çünkü bakteriler polimorfonükleer lökositlerce öldürülür. Bu proses, ciddi kombine immun yetersizlikli fare-insan zenograft modelinde çok iyi demonstre edilmiştir (45).

## **II.6. *Shigella* enfeksiyonlarında immünite**

Pek çok kanıt, *Shigella* enfeksiyonun doğal koruyucu bağışıklık bıraktığını göstermektedir. Endemik bölgelerde, şigelloz insidansı yaşamın ilk beş yılında pik yapar ve daha sonra düşme gösterir. Bu durum, çocukluk çağındaki tekrarlayan enfeksiyonlara maruziyetlerin oluşturduğu immünitenin varlığı ile açıklanabilir (46). Hastalığın insidansı, askeri kamplar gibi yüksek riskli alanlarda kalış süresinin uzunluğu ile alakalı olarak düşer (47). Bu immünitenin serotip spesifik olduğuna inanılmaktadır. *Shigella*'nın somatik antijenlerine antikor cevabı enfeksiyonun erken aşamasında oluşur, bunu tipik olarak anti-

LPS antikorlarının oluşumu takip eder. Anti-LPS antikorları haftalar içinde düşen IgM yanıtıdır ve 1-2 yıl sürer (1).

Şili’li çocuklarla yapılan uzun bir kohort çalışmasından elde edilen bağışık yanıtın reenfeksiyona karşı % 76 koruma sağladığı sonucu, serotip spesifik doğal immünitinin önemli bir kanıtı olmuştur (48). Dahası, *S.sonnei* ya da *S.flexneri* ile deneysel olarak enfekte edilmiş gönüllü yetişkinlerle yapılan bir çalışmada etken suşlara tekrar maruziyet durumunda belirgin bir şekilde hastalıktan korundukları gözlemlenmiştir. (% 64-74 koruyucu etkinlik) (49,50). Bu durum immünizasyon için LPS determinantlarına olan ilginin yeniden canlanması sonucunu doğurmuştur (51).

## II.7. Klinik

Şigeloz tipik olarak pek çok fazdan geçerek ilerler ve *Shigella* enfeksiyonlarının belirtileri, enfekte eden türler, konağın yaşı, risk faktörlerinin varlığı ve konağın spesifik immun durumuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. İnkübasyon periyodu bir ila dört gündür, ancak *Sdysenteriae*’da sekiz güne kadar uzayabilir (52). Şigeloz ya da akut basiller dizanteri, klinik prezentasyon spektrumu, kısa süren sulu diyareden enflamatuvar bağırsak hastalığına kadar değişebilen, invaziv bir kalın bağırsak enfeksiyonudur. Klinik hastalık, tipik olarak birkaç yüz ila birkaç bin organizmanın alımından 24-48 saat sonra, ateş halsizlik ve anoreksi gibi konstitüsyonel semptomlarla başlar. Sulu diyare tipik olarak dizanteriden önce olur (53) ve sıklıkla hafif geçecek enfeksiyonun tek klinik belirtisidir (46). Sık küçük volümlerde kanlı, mukoid dışkılama, abdominal kramplar ve tenesmusla karakterize bariz dizanteri tablosuna geçiş saatler ya da günleri bulur. Dizanteri olan hastalarda, tutulum en şiddetli olarak distal kolondadır ve oluşan enflamatuvar kolitin bulgusu olarak, ileoçekal sıvı akışını gösteren sık, az volümlü dışkılama görülür. Ciddi enfeksiyonu olan hastalar günde yirmiden fazla sayıda dizanterik dışkılama yapabilirler (54). Dizanteri aynı zamanda günlük 200-300 ml serum proteinin feçesle kaybı ile karakterizedir. Serum proteinindeki bu kayıp malnütrisyon ve büyümede gerileme sonuçlarını doğuracak olan nitrojen depolarının eksilmesi sorununa yol açar. İmmun faktörlerin azalması, eş zamanlı farklı enfeksiyöz hastalıkların meydana gelmesi riskini artırır ve mortalitede kayda değer artışa yol açar (1).

Başlangıçta göze çarpan bir bulgu olan anoreksi, hastalığın konvelesan döneminde bile devam ederek, şigelozda sıklıkla ortaya çıkan nutrisyonel durumda bozulma olgusuna

katkıda bulunabilir. Büyük sıvı kayıpları ve ciddi dehidratasyon şigellozda nadir rastlanan durumlardır (55). Şigelloz sırasında çok çeşitli ekstraintestinal belirtiler ortaya çıkabilir.

## **II.7.1 Şigellozun ekstraintestinal komplikasyonları**

### **II.7.1.1. *Shigella* bakteriyemisi**

Her ne kadar genellikle kolonik mukozayla sınırlı kalsa da, şigelloz bazen ekstraintestinal komplikasyonlara neden olabilir. Bakteriyemi ya da septisemi, şigelloz sırasında nadiren ortaya çıkar ve başlıca gelişmekte olan ülkelerde rapor edilmiştir (12,56). Örneğin Bangladeş'ten bir çalışmaya göre, şigellozlu hastaların %4'ünde bakteriyemi görülmüştür (56). Bakteriyemi, daha sıklıkla malnütrisyonlu küçük infantlarda ve *S.dysenteriae* serotip 1'le enfekte hastalarda görülmüş olup, ciddi mortalite hızı ile ilişkili bulunmuştur. Güney İsrail'den bir çalışmada *Shigella* bakteriyemili onbeş çocuk tanımlanmıştır (57). Hastaların yaş ortalaması 20 ay olup 13 hastada (%87) kilo alma yetersizliği görülmüştür. Suşların çoğu (%87) *S.flexneri* olup, *S.dysenteria* serotip I hiçbir hastada gözlemlenmemiş, hiç ölüm rapor edilmemiştir (57). AIDS hastalarında dikkat çekilmesi gereken bir husus, bu hastalarda şigellozun daha sık ya da daha ciddi olmadığı ancak bakteriyemi ile daha sık ilişkili olduğudur (58).

### **II.7.1.2. Cerrahi Komplikasyonlar**

Miran ve arkadaşları (59) kırk yıllık bir periyotta şigellozun cerrahi komplikasyonlarını yaşamış elli yedi çocuk hastaya dair yayınlanmış raporları yeniden gözden geçirmiş ve komplikasyonları dört grupta kategorize etmişlerdir: Perforasyonlu ve perforasyonsuz apandisitler (n=16 %28), intestinal obstrüksiyon (n=30 %53), kolonik perforasyon (n=10,% 17) ve intraabdominal abse (n=1,% 2) (73). 13 çocuk (%23), antimikrobiyal tedaviye rağmen ölmüştür (59).

Pediatristler, nadir görülmesine rağmen geçikmiş teşhis nedeniyle ortaya çıkan belirgin morbidite ve mortalite sebebiyle, şigellozun cerrahi komplikasyon risklerine karşı uyanık olmalıdır. Tanının konması, sıklıkla şigelloz semptomları ile peritonit semptomlarının çakışması nedeniyle gerçekleştirilememektedir. Bazı otörler, hastada perforasyon belirtisi olmadığı müddetçe, peritonit bulguları olsa bile akut fazda laparotomiden uzak durmayı önermektedir (59).

### **II.7.1.3. Nörolojik manifestasyonlar**

Her ne kadar Bangladeş'ten bir çalışmada, etkilenen çocukların %29'unda ölüm, %6'sının nörolojik semptomsuz olduğu belirtilmiş olsa da, şigellozun nörolojik bulguları genellikle şifa ile sonuçlanmaktadır (60). Nöbetler en sık rastlanan nörolojik belirtiler olup, onu ensefalopatinin bulguları olan letarji, dezoryantasyon, ya da koma takip etmektedir (60,61,62). Gelişmiş ülkelerde bile, hastaların az bir kısmında ensefalopati, ciddi, antibiyotik tedavisine yanıtız ve fatal seyredebilir (63). Hipoglisemi ve elektrolit anormalliklerinin belirgin patolojik rol oynamadığı gelişmiş ülkelerde, hiponatremi ve erken gelişen beyin ödemi rapor edilmiştir (60,62,64). Bir murin modelinde yapılan tamamlayıcı çalışmalar, beyin ödemindeki erken gelişim basamaklarını ve TNF  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  ve Nitrik oksit (NO) üretimi gibi konak yanıt faktörlerinin major patojenik rollerini dokümente etmiştir (65,66,67).

### **II.7.1.4. Ürogenital sistem**

Nadir durumlar da olsa *Shigella* tarafından oluşturulan vulvovajinitler ve idrar yolu enfeksiyonları hakkında oldukça iyi kaynaklar mevcuttur (12,68). Gelişmiş ülkelerden yapılan yayınlar, bu enfeksiyonların teşhis ve tedavisindeki problemlere ışık tutmuştur (68,69). USA'den bir vaka raporunda, *S.flexneri*'nin neden olduğu kronik vulvovajinit tanımlanmıştır (69). Vajinal akıntı ve kanamayla gelen hastada başlangıçta nonspesfik vulvovajinit ve hemorajik sistitten şüphe edilmesi tanıyı geciktirmiş; patojenin antimikrobiyal rezistansı nedeniyle çeşitli ampirik antimikrobiyal tedavi kürleri başarısız olmuştur. Sonuçta, 3 yaştan sonra, on dört günlük siprofloksasin tedavisi vajinal akıntının kesilmesini sağlamıştır. Bir başka çalışmada dirençli *S.sonnei* suşu üriner traktus enfeksiyonuna neden olmuş ve ancak 3. kuşak sefalosporinle tedavi edilebilmiştir (68). Buradan anlaşılacağı üzere, enfeksiyonların görülme sıklığının azlığı nedeniyle, tanıları sıklıkla gecikmekte, *Shigella*'nın antibiyotik rezistansı nedeniyle de ampirik tedaviler sıklıkla başarısız olmaktadır (68,69).

### **II.7.1.5. Neonatal Şigelloz**

2001 yılındaki bir yayında, 0-16 yaş grubunda şigelloz vakalarının sadece % 0.6'sını yenidoğan enfeksiyonları oluşturmaktadır. Enfeksiyona maruz kalan infantların sadece % 1,6'sı hastalık tablosu oluşturmuştur (12,70). Bu bulgu, plasentadan ya da emzirme



sırasında anne sütünden bebeğe geçen maternal koruyucu faktörlerin varlığı ile açıklanmıştır (12,71).

Şigellozlu yenidoğanlar, çok yüksek olmayan ateşle seyreden, sıklıkla kanlı olmayan hafif diyare tablosu sergilerler. Bununla birlikte komplikasyonlar daha büyük çocuklara nazaran daha sık görülür ve septisemi, menenjit, dehidratasyon, kolonik perforasyon ve toksik megakolon şeklinde olabilir (70). Lojistik regresyon analizlerinde, gelişmekte olan ülkelerde infant mortalitesinin belirleyicileri, gram negatif bakteriyemi, hiponatremi, hipoproteinemi ve ileus olmuştur (70).

## **II.8. Tanı**

### **II.8.1. Klinik**

Sulu diyare ve ateşi olan hastalarda şigellozdan şüphelenilmelidir. Enfeksiyonun diyare safhası klinik olarak diğer bakteriyel, viral ve protozoona bağlı enfeksiyonlardan ayırt edilemez. Bulantı ve kusma *Shigella* diyaresine eşlik edebilir ancak bu semptomlar non-tifoidal *Salmonella* ve enterotoksijenik *E.coli* enfeksiyonları sırasında da gözlenmektedir. Kanlı, mukuslu gaitalar şigellozu kuvvetle işaret eder ancak ayırıcı tanıda *EIEC* (Enteroinvaziv *E.coli* ), *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* türleri ve *Entamoeba histolytica* mutlaka düşünülmelidir. Amebiyazisli hastaların gaitalarında her ne kadar kan görülmesi olağansa da, genellikle *Shigella*'da olduğu gibi açık kırmızı olmaktan ziyade koyu kahverengidir. Şigelloz hastasının sigmoidoskopik muayenesinde diffüz eritematöz mukozal yüzey, küçük ülserler görülürken, ambiyaziste genelize enflamasyon yoktur ve aralıklı ülserlerle karakterizedir (1).

### **II.8.2. Laboratuvar**

Her ne kadar klinik belirtiler şigelloz şüphesini uyandırsa da, teşhis feçesten *Shigella* bakterisinin izolasyon ve identifikasyonuna bağlıdır. *Shigella* insan vücudu dışında kısıtlı bir süre canlı kalabilir, o nedenle gaita örnekleri toplandıktan sonra birkaç saat içerisinde işleme alınmalıdır (72). Fekal örnekler, patojenin gaitada genellikle yüksek sayıda bulunduğu erken evrelerde ve tercihen antibiyotik tedavisi başlanmadan evvel toplanmalıdır. Pozitif kültürler, sıklıkla hastalığın akut fazında alınmış taze gaita örneklerinin kan bulaşmış mukoid kısımlarından elde edilir. Spesimen hızlı bir şekilde işleme alınacaksa ya da "swab", "Cary-Blair transport medium" ile korunaklı olarak

taşınacaksa *Shigella* kültürü için rektal "swab" da kullanılabilir. BGS (buffered glyserol saline) besiyeri de *Shigella* örneklerinin transportu için kullanılabilir. Feçesin eklenmesiyle pembe rengin sebat etmesiyle alkali olduğu anlaşılan BGS'nin Cary-Blair medyumdan daha iyi olduğu düşünülmektedir. *Shigella*'nın laboratuvarında mikrobiyolojik olarak izolasyonu tipik olarak, klinik örneğin anaerobik normal florayı inhibe etmek için ayırıcı/selektif besiyerine inokülasyonu ile başlar. Sıklıkla kullanılan primer izolasyon besiyerleri MacConkey, Hekton enterik, *Salmonella-Shigella*, Ksiloz Lizin dezoksikolat Sitrat agar medyum dur. Bununla birlikte, *S.dysenteria* tip 1 ve *S.sonnei Salmonella-Shigella* agarda iyi çoğalmaz. Bu besiyeri diğer gram negatif bakterilerin üremesini inhibe eden safra tuzları ve laktozu fermente eden koliformları, *Shigella* gibi laktozu fermente etmeyenlerden ayıran pH indikatörleri içerir. Gaita örnekleri "Hajna gram negatif broth" gibi zenginleştirici besiyerine inoküle edilip daha sonra selektif yada ayırıcı bir agarda subkültürü yapılabilir. Primer izolasyon besiyerinde 37°C'de bir gecelik inkübasyonu takiben, renksiz laktozu fermente etmeyen koloniler TSI (Triple Sugar Iron Agar) besiyerine inoküle edilir. Bu ayırıcı besiyerinde, *Shigella* besiyerinin yatık kısmında alkali, dip kısmında asit görüntü oluştururken, gaz oluşumu gözlenmez. Bu reaksiyon, tahmini bir identifikasyon verir, sonucu doğrulamak için serogrup ve serotiplere spesifik ticari antiserumlar mevcuttur (WHO/CDD/83.3).

Normal intestinal floraaya ait bazı *E.coli* biyotipleri *Shigella* türlerine yakın benzerlik gösterir (Örneğin; hareketsizdirler, laktozu geç fermente ederler.) Bu koliformlar genellikle lizin dekarboksilaz reaksiyonu ile *Shigella*'dan ayrılabilirler. Bununla birlikte, bazı koliformlar, *Shigella* benzeri virulans plazmid taşıdıklarından enteroinvaziv hastalığa neden olabilirler ve bu patojenler konvansiyonel olarak EIEC serotipleri açısından zahmetli serolojik tiplendirmeler yapılarak identifiye edilirler. *Shigella* tespiti için hızlı ve duyarlı teknikler geliştirilmiştir. Bu metodlarda, invazyon plazmid lokusu ya da *IpaH* antijen virulans faktör gibi virulans genlerinin karşılığı olan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) primerleri ya da gen problemleri kullanılır. Her ne kadar konvansiyonel diagnostik metodlardan daha duyarlı olsalar da, bu teknikler sofistike laboratuvarlar gerekmektedir; ancak muhtemelen klinik laboratuvarlarda rutin kullanım için spesifik hale getirileceklerdir (1).

Doğrulanmış *Shigella* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık testleri "Committee for Clinical Laboratory Standarts" (CLSI) rehberliğinde agar difüzyon teknik metodu ile gerçekleştirilmelidir. Agar ve broth dilüsyon metodları da oldukça sık kullanılmaktadır (73). "Epsilometer strip method" (E-Test) de minimum inhibitör konsantrasyonunun kesin

olarak tanımlanması için sıklıkla kullanılan bir tekniktir (74). Bununla birlikte, tekniğin başlıca dezavantajı yüksek maliyetli oluşudur. Kuzey Carolina'da Fort Braggy'de bir *Shigella* enfeksiyonu salgınında kişisel bilgisayar bazlı "Coğrafik Enformasyon Sistemi" (GIS) uygulanmıştır. GIS bir halk salgınının oluşumunda, enfeksiyöz hastalıkların geçiş şekillerinin dinamiklerini direkt olarak gözlemlemek için etkili ve pratik yollar sunan bir sistemdir (75).

## II.9 . Tedavi

Rehidratasyon tedavisi, herhangi bir etyolojiye bağlı dehidratasyonu düzeltmek için gerekli ilk basamak tedavi olup, diyareden ölümlerin sayısını önemli derecede düşürmüştür. Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından geliştirilmiş olup, yararlılığı ve güvenilirliği kanıtlanmış olan oral rehidratasyon tedavisi, akut dehidratasyonlu sulu diyarenin yaşam kurtarıcı tedavisinin esansiyel bir komponenti ve global diyareik hastalıklar kontrol programının kilit stratejisidir. Şigellozda ciddi dehidratasyon sıklıkla görülmemekle beraber, uygun hidrasyonla şigelloz genel olarak kendi kendini sınırlayan bir hastalık olup, anti mikrobiyal tedavi kararı, hastalık tablosunun ciddiyeti, hastanın yaşı ve enfeksiyonun bulaş ihtimali göz önüne alınarak verilmelidir. Şigellozda efektif oral bir antimikrobiyal 48 saat içerisinde belirgin semptomatik gelişme sağladığı gibi hastalığın ortalama süresini beş ila yedi günden ortalama üç güne düşürmekte, ayrıca hastalık semptomları düzeldikten sonra *Shigella* ekskresyonunu azaltmaktadır (76). Bir *Shigella* epizodu, antimikrobiyal tedavi verilmediğinde ya da efektif olmayan bir antimikrobiyal kullanıldığında iki ila on gün ya da daha uzun sürebilmektedir. Böyle bir durumda, özellikle *S.dysenteria* tip 1 yada *S.flexneri*'nin neden olduğu enfeksiyonlar başta olmak üzere, enfeksiyonun ciddi komplikasyon ya da ölüm riski ciddi bir şekilde artmıştır. Uygun tedavi edilmemiş şigelloz persistan diyarenin en önemli nedenidir (1).

WHO'nun talimatnamesine göre (WHO/CDR/95.3), muhtemel şigelloz tanısı konulduğunda, lokal *Shigella* suşlarının antimikrobiyal duyarlılık paternlerine göre seçilen bir antimikrobiyalle hastalık tedavisi yapılmalıdır. Tedaviden iki gün sonra hastada düzelme başlamışsa beş gün daha tedaviye devam etmelidir. Diğer taraftan hastada düzelme olmazsa, antibiyotik değiştirilmelidir. İki gün sonra gelişme olursa beş gün daha tedaviye devam edilmelidir. İkinci antibiyotik ile de iyileşme belirtileri gözlemlenmezse tanı yeniden düşünülmeli, gaita mikroskobisi, kültür ve duyarlılık testleri yeniden

yapılmalıdır. Bununla birlikte, geniş spektrumlu ilaç rezistansı nedeniyle, WHO'nun şigeloz tedavisindeki klavuzunu uygulamak oldukça güçleşmiştir (1).

Şigeloz tedavisinde pek çok etkili antimikrobiyal ajan mevcuttur ancak, global olarak yayılan ilaç direnci nedeniyle seçenekler giderek azalmaktadır (77). *Shigella*'da sulfonamidler, tetrasiklinler, ampicilin ve trimetoprim-sulfometaksazol rezistansı tüm dünyada görülmekte olup bu ajanlar ampirik tedavi için artık önerilmemektedir (1).

1990'lı yıllarda, kinolon şigeloz tedavisinde tercih edilen bir ajan olarak ön plana çıkmıştır. Pek çok çalışma kinolonların klinik etkinliğini desteklemektedir (78). Pek çok otorite, şüpheli ya da kanıtlanmış şigeloz için oral kinolon (siprofloksasin, levofloksasin ya da norfloksasin) önermektedir. Hafif ya da orta derecede hastalık tabloları için bir ya da iki doz makul olurken, komplike basiller dizanteri ya da kanıtlanmış *S.dysenteria* tip 1 enfeksiyonları için üç beş günlük tedavi yapılmalıdır. Her ne kadar, norfloksasin 800 mg ve siprofloksasin 1 gr.'lık tek dozun efektif olduğu gösterilmiş olsa da, artık *Shigella dysenteria* tip 1 enfeksiyonunda daha az efektif olduğu görülmektedir (84). Yeni florokinolonların hiçbirisi çocuklarda ve hamile kadınlarda kullanılmamaktadır. Bu ilaçların kıkırdak toksisitesini indükleyici potansiyelleri nedeniyle çocuklarda kullanımı oldukça sınırlıdır. Bununla birlikte, güvenilir olabileceklerine dair giderek çoğalan kanıtlar mevcuttur (82,85). Pek çok antibiyotik optimal tedavi süresiyle dikkatlice değerlendirilmiştir. Pek çok kontrollü çalışmada beş günlük tedaviler denenmiş olup, daha kısa süreli tedaviler de araştırılmıştır (76).

Kinolon rezistansının giderek artışı ve çocuklarda kullanımları ile ilgili şüpheler nedeniyle farklı ajanlara yönelik çalışmalar devam etmektedir. Birinci ve ikinci jenerasyon sefalosporinler in vitro aktiftir ancak klinik kullanımda pek yüz güldürücü değildir. Oral üçüncü jenerasyon bir sefalosporin olan sefiksimle yetişkin şigeloz vakalarının tedavisi edildiği bir çalışmada elde edilen %55'lik başarı oranı pek etkileyici olmamıştır (86). Bununla birlikte, İsrail'deki klinik çalışmalar, sefiksim ve seftriaksonun bakteriyolojik ve klinik kürde daha iyi başarı oranlarına sahip olduğunu ve çocuklarda kullanımının güvenli olduğunu göstermiştir (87,88). Son zamanlarda çok iyi intrasellüler penetrasyonu ve ılımlı invitro *Shigella* aktivitesi olan azitromisin şigeloz tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (1). Daha ileri çalışmalara gerek duyulan, diğer bir seçenek, absorbe olmayan bir anti mikrobiyal olan rifampisindir (89). İnvitro antibiyotik duyarlılığı ile klinik etkinlik arasında komplet bir korelasyon yoktur. Enfekte eden mikroorganizmanın kullanılan antibiyotiğe duyarlılığı olsa bile, in vitro aktif olan pek çok antibiyotik klinik olarak etkisiz kalmaktadır. Organizmanın dirençli olduğu ya da klinik olarak etkin olmayan bir

antibiyotik kullanılması risklidir. İlacın potansiyel sistemik yan etkilerinin yanında, normal intestinal flora da etkilenebilmektedir. Normal floranın enfeksiyona neden olan *Shigella* ile savaştığı kanıtlanmıştır; o nedenle, efektif olmayan bir antibiyotik *Shigella*'yı selektif olarak teşvik ederken hastalığın alevlenmesine sebebiyet verebilmektedir (WHO/CDS/CSR/DRS/2001.8). Dahası *Shigella* izolatlarının serogrup prevalanslarındaki kaymalar ve değişen antibiyotik duyarlılıkları şigeloz tedavisinde uygun ilacın belirlenmesinde zorluk oluşturmaktadır. Bir sürveyans sistemi içerisinde *Shigella spp.* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının sürekli gözlemlenmesi şigelozda efektif tedavi ve kontrol ölçütleri için esansiyeldir (90).

Nöbetler, ensefalopati ve intestinal perforasyon gibi komplikasyonlar antimikrobiyal ve sıvı tedavisine ek olarak spesifik tedavi gerektirir (1).

## **II.10. Antimikrobiyal direnç**

Genusun tarihçesine bakarak *Shigella spp.*'nin kolaylıkla antibiyotiklere rezistans kazandığı görülebilir (WHO 2001). Geçen birkaç on yıllık zaman diliminde *Shigella* suşları, geniş kullanım alanı bulan ucuz antimikrobiyallerin çoğuna dirençli hale gelmiş olup bu durum, tedavi yanıtı zıllığı ve artmış mortalite sonuçlarını doğurmuştur (91).

Çoklu ilaç direnci başta *S.dysenteria* tip 1'in neden oluşu enfeksiyonları olmak üzere şigeloz tedavisinde ciddi bir problem olmaktadır. 1940'larda yüksek derecede efektif olan sulfonamidler, 1950'lerde pratik olarak çok az değere sahip hale gelmiştir. 1960'larda, tetrasiklin, arkasından ampisilin ve ko-trimaksazolun oldukça yararlı olduğu bulunmuştur (92). 1960'ların sonlarında başlayarak 1980'lere doğru bu üç ilaca karşı direnç giderek artmıştır (93). 1980'lerin başında, Calcuta'da birinci jenerasyon bir kinolon olan ve başlangıçta *S.dysenteria* tip1 enfeksiyonlarında oldukça yüreklendirici sonuçları olan nalidiksik asitle ilgili raporlar yayınlanmıştır (94). Sonuç olarak, çalışmalar nalidiksik asitin çocukta ve yetişkinde şigeloz tedavisinde oldukça etkili olduğunu göstermiştir (80,95). Bununla birlikte, ilacın geniş çaplı kullanımından kısa bir süre sonra çok hızlı bir şekilde dünyanın bir çok yerinde nalidiksik asit rezistan *S.dysenteriae* tip 1 suşları ortaya çıkmıştır (96,97). Daha sonra norfloksasin, siprofloksasin gibi yeni florokinolonların nalidiksik asite rezistan *Shigella* suşlarının neden olduğu şigeloz vakalarının tedavisinde nalidiksik asite üstün oldukları ortaya çıkmıştır (79,81,98). Sözü geçen antibiyotiklerin maliyeti daha yüksektir ve her geçen gün reçetesi ve yaygın kullanım nedeniyle direnç gelişmeye başlamıştır. Hala etkinliğini koruyan antimikrobiyaller olarak mesillinam,

siprofloksasin ve diğ er florokinolonlar, seftriakson ve azitromisin görülmektedir. Bununla birlikte, 2003 yılında, Hindistan, Bangladeş ve Nepal'de siprofloksasin ve diğ er florokinolonlara dirençli *S.dysenteria* tip 1 enfeksiyonu vakası bildirilmiştir (83,90,99,100). Ayrıca, rezistans hızlarında ciddi olarak göze çarpan coğ rafik farklılıklar da mevcuttur. Antimikrobiyal rezistans paternleri aynı yerleşim biriminin iki farklı bölgesinde dahi farklılık gösterebilmektedir. Bu, antimikrobiyal rezistan klonların varlığı ve yayılım hızlarına bağı olabilen bir durumdur (1).

## **II.11. Aşı**

Epidemiyoloji ve gönüllü çalışmaları *Shigella* için koruyucu immünitinin O-somatik antijenine karşı olduğunu ve kısıtlı bir şekilde tip spesifik olduğunu göstermiştir. Bu durum efektif *Shigella* aşısının gelişimini engellemektedir. Doğal tip enfeksiyon ve deneysel maruziyeti takiben, güçlü bir mukozal IgA anti-O-Antijen antikor yanıtı oluşur (101). Yüksek titre *S.flexneri* 2a antikorları içeren inek sütü immünoglobulin pasif olarak uygulandığında, *S.flexneri* ile deneysel olarak enfekte edilmiş gönüllüleri korurken, düşük titre antikor içeren inek sütü immünoglobulini böyle bir koruma sağlayamamıştır (102). Ayrıca, IFN sekrete eden T hücreleri gibi hücre aracılı immünite mekanizmaları da iyileşme ve immünitede rol oynamaktadır (103). Gelişme aşamasındaki aday aşıl ar, hem polisakkarit konjugatlarını hem de canlı atenüe aşıl arı içermekte olup, çalışmalar çoğ unlukla en sık izole edilen suşlar olan *S.flexneri* 2a, *S.sonnei* ve vakaların ciddiyeti nedeniyle *S.dysenteria* tip 1 (Sd1) üzerinde yoğunlaşmıştır (104,105,106).

### **II.11.1. Polisakkarit konjuge aşıl arı**

Parenteral konjuge aşıl ar, uygun bakteriyel serotiplerden elde edilen pürifiye *Shigella* polisakkaritlerinin tetanus toksoidi, rekombinant *Pseudomonas aeruginosa* ekzotoksin A(PsA) ya da CRM9 mutant difteri toksinine konjuge edilmesiyle üretilmiştir. "National Institutes of Health" (NIH )'de geliştirilmiş bu aşıl ar, İsrail'de askeri gönüllülerle yapılan saha çalışmalarında, hastalıktan korunmada %74 oranında etkin olduğu (107,108) ve 4-7 yaş çocuklarda güvenli ve immünojenik olduğu gösterilmiştir (109,110). İsraili küçük çocuklarda, *S.flexneri* 2a ve *S.sonnei* konjuge aşıl arının Faz III çalışmaları tamamlanmıştır (111). Konjuge polisakkarit aşıl arının indüklediği O-Antijen spesifik IgG antikorları, kültürü yapılmış Caco-2 hücrelerine invitro olarak *Shigella* invazyonunu engellemiştir ve

küratif olabilir (112). O antijeni koruyucu epitoplari taklit eden sentetik oligosakkaritlerinin uygun protein taşıyıcılara konjuge edilmesiyle daha gelişmiş ve ucuz konjuge *Shigella* aşısı jenerasyonu için gelecek vaat etmektedir (113).

### II.11.2. Canlı atenüe aşilar

Canlı oral atenüe *Shigella* aşısı geliştirme sahasında belirgin ilerleme kaydedilmiştir. Ancak özellikle çocuklarda aşırı reaksiyona neden olan yetersiz atenüasyon ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde yetersiz bağışıklamaya sebep olan aşırı atenüasyon arasında kurulması gereken denge hala major bir problem olarak varlığını korumaktadır (114).

Yugoslavya'da seri olarak pasajlanmış streptomisin-bağımlı (SmD) *S.flexneri* 1, 2a, 3a ve *S.sonnei* suşlarının yetişkinlerde, sağlıklı ve hasta çocuklarda atenüe edilebileceği ve oral aşilar olarak kullanıldığında vakaların % 82-100'ünde koruyucu olduğu gösterilmiştir (115,116). Bununla birlikte, mutasyon geninin geri kazanılmasıyla oluşan yan etkiler gözlenmiştir ve bu aşının geliştirilmesine devam edilememiştir (114).

Lanzvou Biyolojik Ürünler Enstitüsü'nde, başlangıç olarak Romanya'da Istrati tarafından geliştirilmiş T32 atenüe *S.flexneri* suşlarını kullanarak, hem *S.flexneri* 2a hem de *S.sonnei* O antijenlerini eksprese eden canlı hibrid atenüe *Shigella* suşu oral aşısı olarak üretilmiştir (FS). Çin'de geniş saha çalışmaları *S.flexneri* 2a'ya karşı %61-65, *S.sonnei*'ye karşı %57-72 koruma oranı göstermiştir. Bu aşının heterolog *Shigella* suşları için de koruyucu etkinliği olduğu iddia edilmiştir (117). Bununla birlikte, canlı aşısı suşlarının yüksek dozlarının (>2x10E10 cfu) 3 doz aşılama yönetiminin kullanımı hala problemlili olabilmektedir. İnfantlarda yapılabilecek ileri saha çalışmaları, bu aşının Çin'de halk sağlığı uygulaması olarak kullanılabilirliğini belirlemeye yardımcı olabilir (114). Paris, Pasteur Enstitüsü'nde canlı, atenüe *S.flexneri* 2a suşu (SC602) ve ics A, iuc, iut ve stx A genlerinde mutasyon taşıyan atenüe *S.dysenteria* tip 1 suşu (SC599) geliştirilmiştir. IcsA, hücresel aktinin çekirdek yapısını oluşturan, böylelikle bakterinin hücreden hücreye yayılımını sağlayan bir dış membran proteindir. Iuc ve Iut, sideroforların (aerobactin) üretimi sırasında ortaya çıkan Fe<sup>+3</sup> iyonlarının temizlenmesinde görevlidir. stx A Shiga toksinin katalitik subunitini kodlar. SC602, ABD'deki gönüllü yetişkinler ve Bangladeş'teki yetişkin ve çocuklarda "Walter Reed Army Research Institute" (WRARI) ve "International Vaccine Institute" (IVI) işbirliği ile denenmiştir. Amerikalı gönüllülerde göze çarpan bir etkinlik gözlenmiştir (118,119). Ancak küçük infantlarda immünojenitenin ümit kırıcı bir şekilde düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu duruma, bağırsak kolonizasyonun yetersizliği belki de anne sütüyle geçen maternal antikorların ya da bu hedef popülasyonun

için aşı suşunun yüksek düzeyde atenüe edilmiş olmasının sebep olmuş olabileceği iddia edilmiştir (114).

Set ve Sen genlerini de içeren virulans genlerinin *S.flexneri* 2a'nın atenüe edilmesini hedefleyen çok sayıda yaklaşım, USA, Maryland'daki "Center for Vaccine Development" (CVD)'de de benzer şekilde yapılmıştır. Sonuç olarak, CVD 1203, CVD 1204, CVD 1207, CVD 1208 ve son olarak CVD 1208 S olmak üzere yakın zamanda Faz 1 klinik denemelere girmiş olan bir dizi aşı suşu elde edilmiştir (120,121) WRAIR'deki araştırmacılar, en son immünojenitesi ve klinik kabul edilebilirliği olan WRSs1 suşu olmak üzere, bir seri atenüe *S.sonnei* suşu tertip etmişlerdir (122). Arkasından stx AB ve vir G/icsA genlerini iptal ederek Sd1'i atenüe edip ve WRSd1 suşunu elde etmişlerdir (123). Ancak muhtemelen gastrointestinal traktusun yetersiz kolonizasyonu nedeniyle, insan gönüllülerde mütevazi bir immünojenite bırakmıştır. Bu defekt, global bir transkripsiyon regülatörü olan fnr geninin (fumarat/nitrat redüktaz) yeniden yerleştirilmesiyle ortaya çıkan Sd1 aşı suşu jenerasyonlarının elde edilmesiyle düzeltilmiştir. Aynı zamanda, icsA, set ve sen genlerinin iptal edilmesiyle yeni bir *S.flexneri* aşı aday suşu olan WRSf2611 yapılandırılmıştır (124).

Tüm bunlara bakılarak, *Shigella spp.* spektrumunu karşılayacak şekilde multivalan bir aşının geliştirilmesindeki ihtiyacın giderilmesinde olduğu kadar, özellikle çocuklarda olmak üzere güçlü immünojenite ile optimal kolonizasyon ve salınım paternleri ile atenüe suşların klinik toleransları arasındaki dengeyi kurmanın zorluğu açıkça görülebilmektedir (114).

### II.11.3. Diğer aday *Shigella* aşıları

USA'de Baltimore John Hopkins Üniversitesinde oral, cansız, tam hücre aşısı (SsWC) geliştirilmiştir ve az sayıda gönüllüde Faz I çalışmaları yakın zamanda gerçekleştirilmiştir (125). Benzer şekilde, *Antex* (USA), *Campylobacter*, *Shigella* ve Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC) antijenlerini içeren oral turist diyaresi aşısı (*Activax* TM) gibi bir inaktive tam hücre *Shigella* aşısı geliştirmektedir. Bu aday aşılar yakın zamanda klinik denemelere tabi tutulacaktır (114).

IVI ve WRAIR' in geliştirdiği parenteral nükleer protein-/ribozom aşısı ve grup B *Neisseria meningitidis*'in dış membran proteininin miçellerine bağlanmış *Shigella* subünit aşıları henüz prelinik evrededir. *S.flexneri* ve *S. Sonnei* 'den *IpaB*, *IpaC* ve *LPS* içeren



"invaplex" isimli bakteriyel invazyon kompleksini kullanan yeni formülasyonun, kobay modelinde koruma sağladığı görülmüştür (126,127).

## II.12. Epidemiyoloji

Toplum sağlığında şigelloz başlıca üç özelliğe sahiptir; i) çoğunlukla pediatrik bir hastalıktır, vakaların büyük çoğunluğu 1-5 yaş arası çocuklardır, ii) bir üçüncü dünya ülkeleri hastalığıdır, endüstrileşmiş toplumlarda çok daha az vaka gözlenmektedir, iii) ölümcül bir hastalıktır, çoğunluğunu infant ve genç çocukların oluşturduğu yaş gruplarında mortalite oranı yüksektir (128).

Kotloff ve ark. (129) literatürdeki yayınları tarayarak *Shigella* infeksiyonlarının dünyadaki etkisini saptamaya çalışmışlardır. Buna göre, dünya genelinde 163,2 milyonu geliştirmekte olan ülkelerde ve 1,5 milyonu gelişmiş ülkelerde olmak üzere her yıl toplam 164,7 milyon şigelloz vakası oluşmaktadır. Bunun 113,6 milyonu 0-4 yaş grubu çocuklarda gözlenmektedir. Geliştirmekte olan ülkelerde her yıl şigelloza bağlı meydana gelen ölümlerin sayısı 1.093.505'dir ve bu sayının %61'ini 5 yaş altı grup oluşturmaktadır. Endüstrileşmiş ülkelerde ise *Shigella* infeksiyonlarına bağlı ölümlerin sayısı sadece 3030'dur.

ABD'de laboratuvara dayalı *Shigella* sürveyansında 2000 yılı verilerine göre 12 732 *Shigella spp.* izolasyonu yapılmıştır. Bunların %28,7'si beş yaş altı çocuklardan, %27,4'ü ise 5-19 yaş grubundaki kişilerden izole edilmiştir. 2000 yılında %83,8 oranında izole edildiği bildirilen *S. sonnei* 1986'dan beri, kayıtlı verilere göre en sık izole edilen türdür (8).

Dünya genelinde gözlenen türlerin dağılımı coğrafik bölgeye ve ülkenin gelişmişliğine göre değişmektedir. Geliştirmekte olan ülkelerde en sık gözlenen tür, ortalama %60 sıklıkla *S.flexneri*'dir, bunu *S.sonnei* (%15), *S.dysenteriae* (%6) ve *S.boydii* (%6) takip etmektedir. *S.dysenteriae* en sık olarak Güney Asya ve sahra altı Afrika'da görülmektedir. İsrail, İspanya, ABD, İngiltere gibi endüstrileşmiş toplumlardaki veriler incelendiğinde *S.sonnei* ortalama %77 sıklıkla en fazla gözlenen serogruttur. Bunu *S.flexneri* %16, *S.boydii* %2, *S.dysenteriae* %1 sıklıkla takip etmektedir (129,130,131).

Bakteriyel izolasyon tekniklerinin tanımlanmasını takiben şigelloza yol açan farklı türlerin 20 ile 30 yıl süren dönüşümlü epidemilere yol açtığı gözlenmiştir. Avrupa'da 20. yüzyılın ilk çeyreğinde *S.dysenteriae* tip 1 salgınları gözlenmiş, bunu 1926 ile 1938 yılları arasında *S.flexneri* artışı takip etmiştir. Günümüzde ise *S.sonnei* Avrupa ve ABD'de

sıklıkla izole edilen türdür. Serotiplerin dönüşümlü epidemileri, toplum genelinde sorumlu türe karşı yıllar sürecektir bir dönemde bağışıklık kazanıldığını ve o serotipin yerini, toplum bağışıklığının düşük olduğu bir başka serotipe bıraktığını düşündürmektedir (132).

*S.dysenteriae* tip 1 diğer türlerden farklı olarak sıklıkla epidemilere yol açmaktadır. Orta Amerika'da 1969-1973, Bangladeş'te 1972-1977 arasında epidemiler gözlenmiştir. Orta ve güney Afrika'da Zaire, Ruwanda ve Burundi'de 1979'dan; Zambiya, Malawi, Mozambik, Zimbabwe gibi güney Afrika ülkelerinde 1990'lardan ve orta Afrika'daki sığınma kamplarında 1994'den beri *S.dysenteriae* tip 1 epidemisi hüküm sürmektedir (132,133).

Hippocrates kurak bir kışı izleyen yağmurlu bahar aylarını takip eden yaz döneminde dizanteri vakalarının sıklığının arttığına dikkat çekmiştir. Dünyanın farklı bölgelerinde hastalık sıklığının arttığı dönemler farklılık gösterir; ABD'de yaz ortası ve sonlarında, Bangladeş'te muson yağmurları sonrası Aralık-Ocak aylarında ve muson öncesi Nisan-Mayıs aylarında, Hindistan'da muson döneminde, Mısır'da Haziran-Temmuz aylarında şigeloz vakalarında artışlar gözlenmiştir. Ilıman iklimlerde yaz aylarındaki artıştan bu dönemde çocukların sosyal aktivitelerinin artışıyla kişiden kişiye geçişin kolaylaşması, tropikal iklimlerde ise su kaynaklarının azalması ile kişisel hijyen şartlarının kötüleşmesi sorumlu tutulmaktadır. Yağışlı dönemden önceki veya yağışlı mevsimdeki artışın ise su kaynaklarının artan kontaminasyonu veya mevsimsel olarak yetersiz beslenme şartları sonucu infeksiyonlara yatkınlıktan kaynaklandığı düşünülmektedir (132,134).

Ülkemizde laboratuvar verilerine dayalı bir sürveyans programı bulunmadığından Türkiye genelini kapsayan epidemiyolojik veriler mevcut değildir. Ankara bölgesi için, Berkman (135) 1982-1989 dönemini kapsayan derlemesinde, bu dönemde en sık izole edilen türün %46,8 ile *S.flexneri* olduğunu, ancak 1989 yılında %58,2 sıklıkta *S.sonnei* izole edildiğini ve *Shigella* türlerinin izolasyon sıklığının Ağustos-Eylül aylarında arttığını belirtmiştir. Ceyhan ve ark. (136) 1980-1994 dönemini kapsayan derlemelerinde 1987 yılından başlayan bir yükselişle *S.sonnei* izolasyon sıklığının arttığına ve 1991'den itibaren %70'leri geçtiğine dikkati çekmişlerdir. Sonraki tarihlerde yapılan çalışmalarda da Ankara bölgesinde en sık izole edilen türün *S.sonnei* olduğu bildirilmektedir (137,138).

*Shigella* cinsi enterik patojenler içinde bulaşıcılığı en yüksek olan cinstir. Gönüllü erişkinlerde yapılan çalışmalarda *S.flexneri* tip 2a'nın 100 ve *S. dysenteriae* tip 1'in 10 canlı bakterisinin bile hastalığa yol açabildiği gösterilmiştir (139). *S.sonnei* için yapılan çalışmalarda ise 500 adet canlı bakteri kullanılmış ve deneklerin %35- %55'inde hastalık

oluşturulabilmiştir. İnfektif dozun düşüklüğü kişiden kişiye hastalığın geçişini, sekonder atak hızının yüksekliğini ve tekrarlayan infeksiyonların sıklığını açıklayabilmektedir (132,139,140).

*Shigella* türlerinin başlıca rezervuarları insanlardır. Bazı primatlar da nadiren konak olarak gözlenmektedir (36). Gelişmiş ülkelerde karakteristik olarak, *Shigella*'lar kişiden kişiye bulaşla yayılır. Çalışmalar bir eve indeks vakanın girmesiyle, ev sakinlerinin ortalama %20' sinin infeksiyonu kazandığını ortaya koymaktadır. Sekonder infeksiyon hızının 5 yaş altı çocuklarda en yüksek olduğu gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada dışkılarından *Shigella* izole edilen bireylerin %10'unda parmak kültürleri de pozitif bulunmuştur (139).

Fekal oral bulaş sıklıkla çocuk bakımevleri, psikiyatri klinikleri ve rehabilitasyon merkezlerinde gözlenmektedir (36,134). Su kaynaklı yayılım sadece kontamine su veya buz kullanımıyla değil, kontamine sularda yüzme ve spor aktiviteleri ile de olabilmektedir (141).

Askeri ve sivil topluluklarda ve gemi çalışanlarında kontamine gıda ve su kaynaklı salgınlar gözlenmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde su ve gıda, *Shigella spp.* yayılımı için önemli vektörlerdir. Su kaynaklı salgınlar en sık fekal materyal ile kontamine kuyu suları ile oluşmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise su ve gıda gibi tek kaynaktan köken alan salgınlar daha nadir izlenmektedir (132). Bu ülkelerde nadiren ortaya çıkan *S.sonnei* salgınlarından yetersiz pişirme ve kontamine sular sorumludur (36). Maydanoz, marul gibi gıdaların kontaminasyonuna bağlı *S. sonnei* salgınları rapor edilmiştir (142,143).

Ev sinekleri (*Musca domestica*) *Shigella* organizmaları için mekanik vektörlerdir. Dizanteri vakalarının artışı ile sinek popülasyonunun artışı birliktelik göstermektedir. İnsan atıklarına afinitesi olan ev sineklerinin yapılan kültürlerinde *Shigella spp.* izole edilmesi, infekte insan dışkısıyla temas sonrası sağlıklı insanlara yayılımda etkili olduklarını göstermiştir (144).

## **II.13. Epidemiyolojik tiplendirme**

Birbiriyle ilişkili bakteriyel izolatları hızlı ve güvenilir bir şekilde ayırt edebilme çabası, epidemiyolojik sürveyans için esansiyel olup bakteriyoloji disiplinin kendisi kadar tarihi bir geçmişe sahiptir (145).

*S.aureus* ve *L.monocytogenes* için yapılan bakteriyofaj tiplendirmesi (146,147), *Salmonella spp.* ve *E.coli* için yapılan serotiplendirme (148,149) ya da *Enterobacteriaceae* için yapılan biyokimyasal tiplendirme gibi uzun süredir kullanılan konvansiyonel tiplendirme metodları, bu suşların neden olduğu enfeksiyonların epidemiyolojisini ve doğal tarihini anlamaya yardımcı, tarihi öneme haiz yöntemler olmuşlardır (145).

Benzer şekilde, yıllardır kullanılan antibiyogram tiplendirme yöntemleri halen klinik mikrobiyoloji sahasında, insan sağlığı merkezlerindeki muhtemel bakteriyel çapraz-transmisyon vakalarının tespitinde birinci sıradaki metod olarak tercih edilmektedir. Bu bakteriyel tiplendirme metodlarının bakterilere bağlı lokal ve ulusal halk salgını vakalarının belirlenmesi ve doğrulanması gibi açık bir hedefi vardır (146). Bununla birlikte, spesifik amaçlar için kullanışlı olmalarına rağmen, bakteriyel popülasyon yapılan ve dinamiklerine dair geniş çaplı çalışmalar için uygulama sınırlamaları olup, bilimsel olarak daha az iddialı olan bu tetkiklerin, enfeksiyon kontrolü ve sürveyans için kritik önemi devam etmektedir. Pek çok fenotipik metod, spesifik bakteri türleri için geliştirilmiş olup genel uygulanabilirliği yoktur. Genel olarak fenotiplendirmenin tek başına yeterli olmayacağı kabul görse de, bazı durumlarda (Ör. *Salmonella* serotiplendirmesinde ) çok önemli bir önkoşul olarak yerini korumaktadır. Ne yazık ki, faj tiplendirmesi ve serotiplendirme yöntemlerinin gelişme, uygulama ve kalite kontrol aşamaları yoğun çaba gerektirici olup, mikrobiyoloji laboratuvarlarında bugünün akreditasyon standartlarını karşılayacak seviyede kaliteyi sağlamak için zor metodolojilere ve kalifiye işçiliğe ihtiyaç duyulmaktadır. Örneğin faj tiplendirmesine göre identik olan iki izolat gerçekte ilişkisiz olabileceği gibi, tam tersi şekilde bir belirteç açısından farklı fenotip gösteren iki izolat arasında yakın ilişki olabilir. Tüm bu nedenlerden ötürü, son yirmi yılda, fenotiplendirmenin yerini genotiplendirme ya da moleküler tiplendirme yöntemleri almıştır (150,151,152).

### **II.13.1. Tiplendirme nedenleri**

Tiplendirme metodları tek bir konaktan global bir ekosisteme kadar değişen bir yelpazede, bakteri ve diğer mikroorganizmaların klinik ve çevresel ortamlarda yayılım ve popülasyon dinamiklerini değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Günümüze kadar bu metodlar konvansiyonel olarak haploid organizmalara uygulanmıştır (153). Ancak, parazitler, mantarlar, bitkiler gibi diploid organizmaların tiplendirilmesi için kullanılan metodlara olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (154). Sonuç olarak da, çevre mikrobiyolojisi

ve biyoterörizmden korunma, mikrobiyal tiplendirme metodlarının kullanım alanları arasına girmiştir. Adli tıp alanında, nükleik asit teknolojileri insandan alınan materyallere uygulanmaktadır (155). Enteresan bir şekilde, adli tıp ve mikrobiyolojik tiplendirme, kriminal kanıt toplama ya da adli tabloların aydınlatılmasına yönelik olarak bakterilerin toplanması noktasında bir araya gelmektedir. Ayrıca, genotipik metodlar mikrobiyal taksonomi alanında da kullanılabilir (145).

#### **II.13.1.1. Enfeksiyon hastalıklarının sürveyansı**

Tiplendirme metodları, sistematik bir şekilde, sürekli bilgi toplanması, analizi, yorumlanması, sonuçların yayımlanması için yapılan her türlü işi kapsayan ve hastalıkların sınırlandırılması amacıyla meydana geliş şekilleri ve klinik gidişatlarını kaydetmek üzere yapılandırılmış olan enfeksiyon hastalıkları sürveyans ağına çok faydalı bilgiler kazandırmaktadır (156). Benzer tipte önemli patojenlerin kümeler halinde tespiti, potansiyel bir salgının erken habercisi olabilmektedir. Kütüphane tipi tiplendirme (serotiplendirme, faj tiplendirmesi, "Pulsed field gel electrophoresis" (PFGE), yada "multilocus sequence typing" (MLST) enfeksiyon hastalıklarının başarılı sürveyansı için zorunludur (157).

#### **II.13.1.2. Salgın değerlendirilmesi**

“Salgın, spesifik bir suşun artmış transmisyonu sonucu belirli bakteri türlerinin enfeksiyon (ya da kolonizasyon) insidansında geçici olarak gözlenen artış” olarak tanımlanmaktadır. Salgınların birden fazla da suşla oluşabileceği akılda tutulmalıdır. O nedenle tek bir suşun görülme sıklığındaki artışların, sporadik vakalardaki tesadüfi akümülyasyonlardan ayırt edilmesi gerekmektedir. Ne yazık ki bu durum sağlık sektörüyle ilişkili enfeksiyonlarda doğruluğunu korurken, besin kaynaklı enfeksiyonlar gibi durumlarda çoklu suş salgınlarının olabileceği akılda tutulmalıdır. Bu durum, tiplendirme sonuçlarının düzenlenmesi ve doğrulanması için doğru epidemiyolojik ve klinik tanımlamaların gerektiği pek çok örnek durumdan birisidir (145).

Tiplendirme artmış insidansa neden olan suş sayısını belirleyerek kontaminasyon kaynaklarının ve transmisyon rotalarının belirlenmesini sağlar. Bakteriyel tiplendirmenin doğru uygulanması, salgınların sınırlandırılması ya da durdurulması noktasındaki kontrol önlemlerinin etkinliğini artırır (158). Ne yazık ki, tiplendirme metodları enfeksiyon kontrol stratejileri arasında henüz hak ettiği kadar yer bulamamaktadır. O nedenle

enfeksiyon kontrolünde bu yöntemlerin kullanılmasına dair eğitici programların yaygınlaştırılması sağlanmalıdır (159). Bu, metodolojinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacak ve klinik alanında epidemiyolojik tiplendirmenin hak ettiği değere ulaşmasına katkıda bulunacaktır (145).

#### **II.13.1.3. Enfeksiyon patogenezinin ve gidişatının araştırılması**

Tiplendirme, tek bir hastada enfeksiyon progresini aydınlatmak amacıyla da kullanılabilir. Örneğin bu şekilde bir enfeksiyonun endojen mikroflora ya da eksojen kaynaklı olup olmadığı ayırt edilebilir (160). Tiplendirme virulan ya da non-virulan suş gruplarını ayırmak için kullanılarak patojenezle ilişkili belirteçler tanımlanabilir. Bu belirteçler klinikte önemli tanı belirteçleri olarak kullanılır hale getirilebilir (145).

#### **II.13.1.4. Bakteriyel popülasyon genetiklerinin araştırılması**

Bazı moleküler tiplendirme sistemleri, tür içi popülasyon yapılarını belirlemek amacıyla, farklı orjinlerden çok sayıda izolatu incelemek için de kullanılabilir ve bu yapıdan filogenetik hipotezler türetilmektedir (161). Örneğin, *Pseudomonas aeruginosa* PFGE analizleri, ilişkisiz suşların genomik patern benzerliklerinin % 20 ile % 60 arasında değişip ortalama % 35 olduğu, tek bir klondan gelen suşların benzerlik seviyesinin % 80'lere ulaştığını göstermektedir (161).

### **II.13.2 Epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri**

Epidemiyolojik tiplendirme, bir tür içerisindeki farklı suşları tanımlayabilen çeşitli laboratuvar yöntemlerini içermektedir. Tiplendirme yöntemleri fenotipik veya genotipik yöntemler olarak iki gruba ayrılabilir. Fenotipik yöntemler organizma tarafından gösterilen çeşitli biyolojik özellikleri tespit ederken, genotipik yöntemler direkt olarak organizmanın genetik içeriğini incelemektedirler (162).

Tiplendirme yöntemleri değerlendirilirken belirli özellikleri gözönüne alınmaktadır. Bunlar tiplendirebilirlik, tekrarlanabilirlik ve ayrıştırma gücü olarak sıralanabilir. *Tiplendirebilirlik*; analiz edilen her izolat için anlamlı bir olumlu sonuç elde edilebilmesidir. Tiplendirilemeyen izolatlarda ise ya hiç sonuç elde edilemez ya da elde edilen sonuç incelenemez niteliktedir. *Tekrarlanabilirlik*; aynı izolatta aynı teknik uygulandığında aynı sonucun elde edilebilmesidir. Tekrarlanabilirlik teknik ve biyolojik

faktörlerden etkilenebilmektedir. Bir izolatin aynı tüpteki örneğine farklı seferlerde belirli bir yöntemin uygulanması, tekrarlanabilirlik üzerine teknik faktörlerin katkısını ortaya koymaktadır. Diğer yandan incelenen bakteriyel özelliğin, birbirinden bağımsız izolatlarda değişkenlikler gösterebilmesi biyolojik faktörlerin katkısını göstermektedir. *Ayrıştırma gücü*; uygulanan yöntemin ilişkisiz izolatları birbirinden ayırabilme kapasitesinin göstergesidir (163).

### **II.13.2.1. Fenotipik Yöntemler**

Fenotiplendirme, koloni morfolojisi, renk, koku ve diğer makroskobik özellikleri içerebilir ancak pek çok tiplendirme metodu dökümantasyon için özelleşmiş teknoloji gerektiren özellikler üzerine kurulmuştur. Örneğin, kalitatif ya da kantitatif olarak izolatların spesifik maddeler (metabolitler, ilaçlar, bakteriyel toksinler ya da bakteriyofajlar) varlığında üreme yeteneklerini spesifik molekül ekspresyonları (yüzey antijenleri gibi) belirleyebilir. Tüm metodlar deney koşullarının kesin standardizasyonunu gerektirmektedir. Çünkü fenotipler çevresel koşullardaki değişikliklerden kolayca etkilenebilmektedir (145).

Basitçe, fenotiplendirme organizmaların genotiplerinin ekspresyonuyla ortaya çıkan karakterlerinin benzerliklerine göre gruplandırılmasıdır. Biyotiplendirme, bir tür içerisinde değişiklik gösterebileceği bilinen biyokimyasal karakteristikleri değerlendirir. Tiplendirme genellikle mükemmeldir. Ayrım gücü değişkendir ve bunu optimize etmek için, test şemasına çok sayıda belirgin karakterisitik özellik eklenmelidir. Stabilite türlere ve incelenen özelliklere bağlıdır. Metodlar genellikle teknik olarak kolay ve ucuz, elde edilen bilginin skorlanması ve yorumlanması basit ve çok küçük laboratuarlarda, çok sayıda izolata çalışılsa dahi testlerin uygulanmasında zorluk oluşmamaktadır. Tekrarlanabilirliği gösterildiğinde, kütüphane tipi tiplendirme metodu olarak da kullanılabilir (164).

Antimikrobiyal duyarlılık testleri (antibiyogram temelli tiplendirme ) solid besiyerinde ilaç difüzyon yöntemi ya da sıvı ortamda ilaç dilüsyon yöntemleri ile yapılabilir. Klinik tedaviyi yönlendirmek amacıyla çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarında antibiyogram tiplendirmesinin bir çeşidi uygulanmaktadır. O nedenle bu metodun klinik sonuçları da sözkonusudur. Antibiyogram tabanlı tiplendirme uygun ilaçların seçimiyle pek çok türe uygulanabilecek bir metoddur. Ayrım gücü, çeşitlilik, stabilite ve suşlarda tespit edilebilen kazanılmış rezistans mekanizmalarının rölatif prevalansına bağlıdır. Ayrıca kullanılan antimikrobiyal sayısı da önemli olmaktadır. Ağır metallere (rezistotiplendirme),

dezenfektanlara ve antiseptiklere karşı direnç tespiti de yararlı bilgiler sunabilmektedir. Metodun yararlılığı rezistans paternlerinin stabilitesine göre değişmektedir. Bazı rezistans paternleri plazmid kaynaklıdır ve selektif koşullar olmadan ortaya çıkmamaktadır. Ayrıca, rezistans ekspresyonu kompleks regülatuvar sistemlerin kontrolünde de meydana geliyor olabilir (165). İnhibasyon zon çapları olarak elde edilen duyarlılık profilleri küme analizleriyle kombine edildiğinde diğer metodlarla elde edilen bilgilere ek olarak yararlı tiplendirme verileri sağlayabilmektedir (166). Halihazırda izolatların coğrafik orjin ve klinik doğasını da içeren, antibiyogram tabanlı uluslar arası çok geniş bir veri tabanı mevcuttur. Her ne kadar bu veri tabanları primer olarak rezistans insidanslarını değerlendirmek amacıyla kullanılsa da, spesifik rezistans belirteçlerinin yayılımını gösteren epidemiyolojik sorgulamalar için de başvuru kaynakları olabilmektedir (167).

Serotiplendirme, mikrobiyolojinin en erken gelişim aşamalarından beri kullanılan geleneksel en önemli fenotipik methodur. *Salmonella* ve *E.coli* izolatları gibi pek çok izolat için karşılaştırmalı tiplendirme sistemleri sağlamıştır. Çoğu tiplendirme serumları yüzey antijenleriyle reaksiyon vermektedir. Bu sistemler, halk sağlığı ya da gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında halen geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Poliklonal ve monoklonal antikör setleri içeren yüksek hızlı tayin gücüne sahip prosedürler mevcuttur (168). Tiplendirebilirlik ve ayırım gücü, çapraz reaksiyonlardan etkilenebileceği için değişkenlik gösterebilmektedir (150). Reaktifler ve metoda uygun kalite kontrolü ile serotiplendirme tekrarlanabilir ve geniş kullanım alanı bulabilen kütüphane tipi tiplendirme metodu haline getirilebilir. Hazırlık aşaması ve test koşullarının standardizasyonu önemlidir. Ayırım gücü, serotiplendirmenin SDS-PAGE ile kombine edilmesiyle güçlendirilebilir (150). Bazı serotiplendirme şemalarında antijenleri eksprese eden gen seviyesinde tespit esasına dayanan genotipik yöntemler kullanılmaktadır (169). Benzer şekilde, amplifiye O-antijeni geni kümesinin restriksiyon analizinin *E.coli* ve *Shigella* izolatlarının klasik serotiplendirmesi için iyi bir alternatif olduğu gösterilmiştir (170). Genetik instabilite, horizontal gen transferi ve doğal ya da aşıyla oluşturulmuş immünite nedeniyle oluşan konverjans, intrinsik olarak serotiplendirme metodlarının gücünü sınırlamaktadır (145).

Faj ve bakteriyosin tiplendirmesi bir takım bakteriyofajlar ya da bakterisidal toksinler (bakteriyosinler)'e maruz bırakılan test izolatlarının litik paternlerini değerlendiren bir methodur. Bu geleneksel tiplendirme metodları sınırlı sayıda tür için uygulanabilmektedir. Çünkü mevcut bakteriyofajlar ve toksinler bu türler için yeterli ayırım gücünü



sağlayabilecek sayıda identifiye edilmiştir. O nedenle, yeni bakteriyel klonlar keşfedildiğinde, tiplendirme şemasına yeni fajların dahil edilmesine gerek duyulacaktır. Tipler uzun dönem sonra değişirler, bu da endemik durumlar açısından çok önemli olmaktadır. O nedenle ayırım gücü değişken, tiplendirebilirlik sıklıkla parsiyel ve reproduktibilite zayıftır. Fajların üretimi ve kesintisiz kalite kontrolü oldukça önemli olup, yoğun tecrübe ve zaman isteyen bir uğraştır. Bununla birlikte, pek çok DNA-fragman temelli tiplendirme metodunda uygulanması mümkün olmayacak kadar çok sayıda izolatu test edebilecek metodlardır. Sonuçların yorumlanması kolay değildir, eğitim ve tecrübe gerektirmektedir (171).

Faj tiplendirmesi, *S.aureus* gibi bazı bakterilerin epidemiyolojik çalışmalarında uzun dönem önemli bir araç olmuştur ancak günümüzde referans bir tiplendirme metodu olarak görülmemektedir (145).

Aynı genin farklı alelleri tarafından kodlanan ve bu şekilde protein büyüklük ve yüklerinde tespit edilebilir varyasyonlara neden olan bir dizi fonksiyonel enzimin elektroforetik varyantlarını identifiye eden "Multilocus enzym electrophoresis" (MLEE)(172), bakteriyel popülasyonlardaki klonal nesillerin filogenetik yapılarını belirlemede referans metod olarak kullanılmaya gelmiştir (160). Bu metodun moleküler varyasyonu olan MLST çok daha pratik ve bu nedenle günümüzde daha geniş kullanım alanı olan bir methodur.

Farklı "-omiks" yaklaşımları modern fenotiplendirme spektrumunu tamamlamıştır. Proteomiksler kolektif olarak bakteriyel hücrenin protein içeriğini çözmek için kullanılan metodları tanımlar. Glikomiksler polisakkaritler, glikonlar, lipopolisakkaritler ve diğer gliko ve lipid komplekslerinin sentezleri, kesin moleküler özellikleri ve çeşitliliklerini analiz ederken, metabolomiksler hücrelerin muhtelif metabolik aktiviteleri ile ilgilenir (145).

### **II.13.2.2. Genotipik Yöntemler**

Fenotipik yöntemlerin sınırlamalarını ortadan kaldıran, tiplendirebilirlikleri, tekrarlanabilirlikleri ve ayırıştırma güçleri yüksek olan ve nispeten daha hızlı sonuç veren DNA temelli genotipik yöntemler epidemiyolojik tiplendirmede tercih edilmeye başlanmıştır (173). Bu yöntemler organizmaların DNA fragmanlarını, tüm kromozomu veya plazmitlerini elektrik alanları içinde ayırıştırarak, özel boyalar veya nükleik asit

probları yardımıyla gözle görülür hale getirerek özgül paternler veya bir nevi parmak izi çıkarırlar. Epidemiyolojik ilişkili izolatlar aynı DNA profili veya parmak izine sahipken, sporadik veya epidemiyolojik ilişkisiz izolatlar farklı paternlere ayrışırlar. Genomik analizlerdeki gelişmeler, oldukça duyarlı ve aynı zamanda çok sayıda örneğin işlenmesine olanak sağlayan sistemleri ortaya çıkarmışlardır (174).

Genotipik tiplendirme yöntemleri ile elde edilen verilerin bir kütüphane sistemi yardımıyla saklanmasıyla, sürveyans için önemli olan organizmaların coğrafik yayılımı, endemik veya epidemik kökenlerin sıklıklarındaki değişimler gibi bilgiler elde edilebilmektedir. Ayrıca hastalarda kolonizasyona veya enfeksiyona neden olan izolatların ayrılmasında, kontaminasyon ve enfeksiyon ayırımının yapılmasında, hastane içinde hastalar arası çapraz enfeksiyonların belgelenmesinde, bir enfeksiyon nedeniyle tedavi edilen hastalarda reenfeksiyon veya relapsın değerlendirilmesinde de başarıyla kullanılmaktadırlar (174).

Plazmit profil analizi epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan ilk DNA temelli sistemdir. Ancak az sayıda veya hiç plazmit içermeyen izolatlar arasında ayırıştırma gücü zayıftır. Bunun yanında süpersarmal veya çembersel moleküler yapıdaki plazmitler her elektroforez sırasında farklı hareketler gösterebildiği için tekrarlanabilirliği de zayıftır. Ayrıca zamanla plazmitlerin kaybedilip kazanılabileceği de unutulmamalıdır (162).

Uzun zaman alan bir test olan "kromozomal restriksiyon endonükleaz analizi" (REA) sonucunda yüzlerce bant elde edildiğinden, değerlendirilmesi zordur ve yorumlanması da deneyim gerektirmektedir (163).

Tüm bakteriler ribozomal operonları taşıdıklarından ribotiplendirme ile tiplendirilebilirler. Ancak *E.coli*, *Klebsiella*, *Haemophilus* ve *Staphylococcus* gibi organizmalarda az sayıda bant elde edilebildiği için ayırıştırma gücü düşmektedir. Bunun yanında, bir tür içersinde ribotipler oldukça sabit karakterler olduklarından ve epidemiyolojik ilişkisiz izolatlar da aynı paterni gösterebildiklerinden ayırıştırma gücü sınırlanmaktadır (162).

PZR, "amplifikasyon fragman uzunluğu polimorfizmi" (AFLP) gibi yöntemlerin kontaminasyona çok duyarlı olması ve tekrarlanabilirliklerinin düşük olması, laboratuvarlar arası standardizasyonun güçlüğü ve elde edilen sonuçların yorumlanması için kabul edilmiş tanımlamaların olmaması bu yöntemlerin kullanımını sınırlamaktadır (163).

"Multilokus VNTR" (Variable number tandem repeat) analizi PCR bazlı bir tiplendirme metodu olup, DNA'nın tekrarlayıcı bölgelerindeki yapısal değişiklikleri tayin etme esasına dayanmaktadır. Genel olarak yüksek performanslı bir yöntemdir (175).

"SLST" (Single locus sequence typing), anlamlı tiplendirme sonuçları sağlayabilmek için tek bir genetik lokusun sekanslandığı, çok çeşitli metodları kapsayan bir terimdir. Tek bir lokusu analiz etmek dizi analizi yapılacak DNA miktarının sınırlı olduğu manasına gelmektedir. Analiz için yüksek değişkenlik gösteren gen sekanslarını seçmek zorunludur (176).

"MLST", "MLEE"nin genotipik uzantısı olup, yapısal genlerin alelleri arasındaki DNA sekans varyasyonlarını değerlendirir. Geçen on yıl içinde geniş kabul görmüş ve tiplendirmede büyük başarı kaydetmiştir. Yeni sekanslama protokolleriyle birlikte, metod muhtemelen bakteriyel popülasyon genetiklerini anlamada gelecek yılların en popüler yöntemi olacaktır (177). Ne yazık ki bu teknik, sınırlı erişebilirlik ve yüksek maliyeti de içeren pratik dezavantajlara sahiptir (178).

### **II.13.2.3. PFGE (Pulse field gel electrophoresis)**

Yeni bir elektroforez tekniği olan PFGE, elektrik akım yönünün periyodik olarak değiştirilmesiyle agaroz jel üzerinde büyük DNA fragmanlarının ayrılmasını mümkün kılan bir methoddur. Bu DNA "makrorestriksiyon" fragmanları 6 ya da daha fazla baz çifti tanıma noktası olan (seyrek kesici), genellikle 30'dan daha az fragman ve 20-600 kbp büyüklüğünde fragman oluşturan restriksiyon endonükleazlarla elde edilir (145).

PFGE ilk kez 1984 yılında Schwartz ve Cantor (179) tarafından tanımlanmıştır. Sundukları yöntemle, önceden mümkün olmayan 50 kb'dan büyük DNA moleküllerinin elektroforezi yapılabilmektedir. Çalışmalarında büyük boyuttaki DNA moleküllerini kırılmalardan korumak için, sıvı haldeki erime sıcaklığı düşük jelle karıştırıp kalıplarda dondurduktan sonra kimyasalların difüzyon yoluyla etkimesini sağlamışlardır. Koordinatları sırasıyla değişen, homojen olmayan, dikey elektrik akımı altında DNA'yı elektroforeze tabi tutmuşlardır.

Chu ve ark. (180) ise 1986 yılında bir altıgen çerçeve etrafında, her kenarında dört elektrot sıraladıkları, homojen elektrik alanı oluşturan, "Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields (CHEF)" adını verdikleri sistemi tanımlamışlardır. CHEF sisteminde

elektrik alanı 120°'lik bir açıda oluşturulmakta ve diğer sistemlerden farklı olarak bantlar daha net ve değerlendirilebilir şekilde ayrılmaktadır.

Mikroorganizmaların genomik yapısının nadir bölgelerini tanıyıp, 20 kadar sınırlı sayıda ve büyük parçalara ayıracak enzimlerin kullanılmasıyla, DNA parçaları elde edilir. Her organizma için spesifik enzimler tercih edilebilir. Genel olarak Gram pozitif bakteriler için *SmaI*, *CspI*, *SgrAI* enzimleri, Gram negatifler için *NotI*, *SfiI*, *SpeI* veya *XbaI* enzimleri kullanılmaktadır. Elde edilen DNA parçalarının PFGE ile elektroforeze tabi tutulmasıyla organizmaların genomik yapılarının birbirleriyle ilişkileri değerlendirilebilmektedir (181).

PFGE ile elde edilen DNA bant paternleri birbirleriyle kolayca kıyaslanabilir ve tekrarlanan testlerde aynen elde edilebilirler. Organizmaya spesifik olmadıklarından kromozomal DNA içeren herhangi bir organizmadan birkaç gün içinde elde edilebilirler (174,181).

Yüksek ayırıştırma gücü ve tekrarlanabilirliğinden dolayı PFGE pek çok nozokomiyal ve toplumda gözlenen patojenin tiplendirilmesi için günümüzde tercih edilen yöntemdir. Stafilkoklar, enterokoklar, *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri, *Acinetobacter* türleri, *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer gram negatif çomaklar, *Mycobacterium avium* gibi nontüberküloz mikobakteriler PFGE ile başarıyla tiplendirilmektedir (162,163,173). Bazı *Clostridium difficile* suşlarının kromozomal DNA'ları hücre duvarı yıkımı basamağında kendiliğinden çözüldüğünden, PFGE ile tiplendirilememektedirler. Metisiline dirençli *S.aureus*, *H.influenzae* tip b, *E.coli* O157:H7 gibi bir tür içerisinde genetik olarak çok yakın ilişkili benzer suşların bulunduğu, epidemiyolojik ilişkisiz izolatların ayrımının mümkün olmadığı bazı organizmaların tiplendirilmesinde, diğer genotipik yöntemler gibi PFGE'nin de kullanımı sınırlıdır (163,181).

PFGE paternlerinin analizinde Tenover ve ark.'nın (182) oluşturduğu yorumlama kriterleri genel kabul görmüş ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesini kolaylaştırmıştır.

Garaizar ve ark. (183), PFGE'nin laboratuvarlar arası standardizasyonunun sağlanabildiğini göstermişlerdir. Elde ettikleri yüksek tekrarlanabilirlik ve ayırıştırma gücü ile, bilgisayar destekli kütüphane sistemi oluşturulup, PFGE'nin *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*'in uzun dönemli epidemiyolojik karşılaştırılması ve sürveyansı için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

ABD'de Hastalıkları Koruma ve Önleme Merkezi (CDC) ve halk sağlığı laboratuvarlarının işbirliği ile kurulan "Pulsenet" bilgisayar ağı sayesinde ülke genelindeki

*E.coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes* ve *Campylobacter jejuni* izolatlarının PFGE tipleri izlenip, kütüphane sistemiyle saklanmaktadır. Elde edilen bilgiler laboratuvara dayalı sürveyans sisteminde başarıyla kullanılmaktadır (184).

PFGE sisteminin ilk kurulum maliyeti 10 ile 20.000 Amerikan doları kadardır. Ancak, küçük modifikasyonlar ile pek çok patojenin tiplendirilmesinde kullanılabilmesi için uzun dönemli maliyeti yüksek olmayabilir. Analizin tamamlanması için iki ile üç günün gerekmesi, işlem basamaklarının fazla olması ve özen gerektirmesi, çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılmasını zorlaştırmaktadır (173).

## **III.MATERYAL VE METOD**

### **III.1.Çalışmada kullanılan izolatlar ve epidemiyolojik özellikleri**

Çalışmamızda 2005 ve 2006 yılları boyunca Fatih üniversitesi Hastanesi'nin merkez ve iki şube laboratuvarlarından toplanarak stoklanmış olan 27 adet *Shigella sonnei* ve 2 adet *Shigella dysenteria* izolatları kullanılmıştır.

**Tablo.6.** Çalışmada kullanılan izolatların dağılımı

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

\*Bu tarihlerde birer adet *S.dysenteria* suşu izole edilmiştir

### **III.2.Stok suşların canlandırılması ve biyokimyasal doğrulama işlemleri**

-80 °C'de saklanmış olan stok suşları Eosin-metilen-blue (EMB) ve *Salmonella-Shigella* Agar'a (S-S) yapılan pasajları 36 °C'de bir gecelik inkübasyona bırakıldıktan sonra besiyeri plaklarında laktoz negatif koloniler ileri identifikasyon işlemlerine tabi tutuldu. Sitrat, Kligler iron agar, üre, arginin ve lizin besiyerlerinde tipik *Shigella* reaksiyonu gösteren suşlar, *Shigella* antiserumları (RSHM) ile slayt aglütinasyonla doğrulandı.

### **III.3. Moleküler doğrulama işlemleri**

#### **III.3.1. DNA ekstraksiyon**

1. Biyokimyasal olarak doğrulanmış *Shigella* suşlarının Nutrient agar plaklara tek koloni ekimleri yapıldı.
2. Bir gecelik inkübasyondan sonra her bir suştan 4-5 koloni alınarak 1,5 ml' lik ependorf tüplerinde, 1'er ml PBS içerisinde bakteri süspansiyonları hazırlandı. Süspansiyonların kısa vortekslleme ile homojenizasyonları sağlandı.
3. Bakteri süspansiyonları beş dakika boyunca 14 °C'de 13.000 rpm'de santifuj edildi. Tüplerdeki süpernatantlar uzaklaştırıldı.
4. Her bir tüpteki "pellet" üzerine 100 ml TE tampon eklendi.
5. Tüpler 95°C'lik blok inkübatörde 10 dakika bekletildi.
6. Elde edilen DNA ekstraksiyon ürünleri PCR da kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edildi.

#### **III.3.2. Shigella ipaH PCR**

##### **III.3.2.1. Kimyasallar**

1. dNTP (10 mM, Fermentas, Litvanya)
2. *Taq Polimeraz* (Fermentas, Litvanya)
3. *IpaH* primer karışımı (RSHM Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.)
4. 0,5X TBE tampon çözeltisi ( Fermentas, Litvanya)
5. "Loading dye" (Fermentas, Litvanya)
6. 100 bp DNA "size marker" (Fermentas, Litvanya)
7. Agaroz (Prona, İspanya)

##### **III.3.2.2. Ekipman**

1. "Thermal cycler" (Rotor –Gene Q- Qiagen)
2. Elektroforez cihazı (ELITE 300 PLUS- WEALTEC)
3. "Gel Logic 2200 Imaging System" (1708x1280 pixel, Kodak Company)

Reaksiyon karışımı Tablo.7 de belirtildiği üzere hazırlandı.

**Tablo.7.** *Shigella ipaH* PCR reaksiyon karışımı

	<i>IX</i>
H2O	15,975 µl
10X "PCR buffer"	2,5 µl
dNTP' ler (10 mM)	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
<i>İpaH</i> primer karışımı*	0,4 µl
<i>Taq</i> Polimeraz	0,125 µl
DNA ekstraksiyon ürünü	2 µl
<b>TOTAL HACİM</b>	<b>25 µl</b>

\*5'- GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG -3' (forward)  
3'- GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA -5' (reverse) (185)

Amplifikasyon profili, Tablo.8 deki gibi düzenlendi.

**Tablo.8.** *Shigella ipaH* PCR amplifikasyon profili

Basamak	Süre	Sıcaklık
1	1 dk 15 sn	94 °C
2* (Denatürasyon)	15 sn	94 °C
3* (Bağlanma)	45 sn	60 °C
4* (Uzama)	45 sn	72 °C
5	10 dk	72 °C

\*2,3,4 basamaklarını içeren siklus sayısı 35 olarak ayarlandı.

Reaksiyon ürünlerinin % 1,5'lük agaroz jel üzerinde 100 bp DNA "size marker" eşliğinde elektroforezi sonucunda elde edilen, ampikon büyüklükleri 620 bp olan izolatların *Shigella spp.* suşları olduğuna karar verildi.



### **III.4. Antimikrobiyal duyarlılık testleri**

Antimikrobiyal duyarlılık testi "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) standartlarına göre disk difüzyon yöntemi ile çalışıldı. Antibiyotik olarak Beckton Dickinson tarafından üretilmiş BBL markalı seftriakson (30 µg), sefazolin (30 µg), cefalotin (30 µg), sefuroksim (5 µg), ampisilin (10 µg), ampisilin sulbaktam (10 µg), amoksisilin klavulonat (30µg), imipenem (10 µg), piperasilin (100 µg), trimetoprim-sulfometaksazol (23.75 /1.25µg), kloramfenikol (30 µg), siprofloksasin (5 µg), amikasin (30 µg), tobramisin (10 µg), gentamisin (10 µg), tetramisin (30 µg), aztreonam (30 µg) kullanıldı. Kalite kontrolü *E.coli* ATTC 25922 suşu ile yapıldı. İzolatlar duyarlılık farklarına göre gruplandırıldı.

### **III.5. PFGE**

#### **III.5.1. Kullanılan malzemeler**

##### **III.5.1.1. Ekipman**

1. BIO-RAD
  - 1.1. "Cooling Module"
  - 1.2. "CHEF-DRII Drive module"
  - 1.3. "CHEF DR II Control module"
  - 1.4. "Electrophoresis Cell"
2. Çalkalamalı su banyosu ( Nüve ST 402 )
3. Etüv ( Nüve N 50 )
4. "Gel Logic 2200 Imaging System" (1708x1280 pixel,Kodak company)
5. "Gel-Compare II" yazılım sistemi ( version 3.0 ; Applied Maths, Sint-Martens- Latem, Belgium )
6. "Plug-mold", "sample CHEF disposable plug mold" ( BIORAD 1703706 )
7. 10,100,1000 mikrolitre kapasiteli otomatik pipetler
8. Isı blok inkübatör (WiseTherm Wisd HB-48P)
9. Vorteks (Vortex V1 plus BOECO-Germany)

### **III.5.1.2. Kimyasallar**

1. "Low Melt Preparative Grade Agaroz" (Ultra pure DNA grade agarose, Prona ,İspanya)
- 2." Pulse field certified agarose" (Prona, İspanya)
3. *Proteinaz K* ( Applichem, Almanya)
4. *Lizozim* (Applichem, Almanya)
5. 0.5 x TBE tampon çözeltisi (Fermentas, Litvanya)
6. FastDigest *XbaI* (Fermentas, Litvanya)
7. FastDigest *NotI* (Fermentas, Litvanya)

### **III.5.2. Test prosedürü**

#### **III.5.2.1. İzolatların hazırlanması**

1. Biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakterilerden her çalışma öncesinde Nutrient agar, S-S agar ve EMB agara tek koloni paralel ekimler yapıldı.
2. Bir gecelik inkübasyondan sonra kültürlerin saflığı kontrol edildi.
3. Ekim plaklarındaki tek kolonilerden tekrar Nutrient agara tek koloni ekimine uygun olacak şekilde pasaj yapılarak 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
4. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) (100 mM Tris-HCL, 100 mm EDTA, ph 8.0) içinde süspansiyon edildi.
5. Hücre süspansiyonu, 2500 x g'de, 4 °C'de, 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki HST atıldı.
6. Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek kısa süreli vorteks karışımından yapıldı.
7. Bakteri yoğunluğu McFarland 4 bulanıklığında olacak şekilde ayarlandı. Bakteri süspansiyonları kırık buz içerisinde bekletildi.

#### **III.5.2.2. İzolatların agaroz gömülmesi**

1. HST içerisinde %2'lik düşük erime ısılı agaroz (LMA) hazırlandı.
  - 0.200 gr agaroz , 100 ml'lik balona konuldu.
  - Üzerine 9 ml HST eklenip yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı.
  - Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında eritildi.

- Agaroz iyice çözüldükten sonra balon 45-50 °C'lik su banyosuna oturtuldu.
- 50 °C'de % 10'luk sodyum dodezil sülfattan (SDS) 1 ml eklenerek iyice karıştırıldı.
- Agaroz-SDS karışımından 200'er µl ependorf tüplere dağıtıldı ve 45-50 °C'deki su banyosunda bekletildi.

2. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenerek buz kabına oturtuldu.

3. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 200'er µl alınarak 50 °C'de tutulan ve içerisinde 200 µl LMA –SDS bulunan ependorf tüplere eklendi. Bir kaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı.

4. Hücre-agaroz-SDS karışımından agaroz kalıbının godelerine (10 mm by 5 mm by 1.5 mm, Bio Rad Laboratories ) 100'er µl dağıtıldı.

5. Kalıplar agaroz katılaşmaya kadar + 4 °C'de 10 dakika bekletildi. Böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen katılaşması sağlandı.

### **III.5.2.3. Agaroz içerisindeki hücrelerin parçalanması**

1. 5 ml'lik steril kapaklı tüplere 0.5'er ml Hücre lizis solüsyonu -1 (HLS-1) (50 mM Tris-Hcl [ pH 8.0], 50 mM EDTA, 2.5 mg/ml *lizozim*, 1,5 mg/ml *proteinaz K* ) konuldu.

2. İçerisinde bakteri bulunan agarozlar kalıplardan çıkarılarak lizis solüsyonlarına yerleştirildi.

3. HLS -1 içerisindeki kalıplar 37 °C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

4. HLS-1 dökülerek yerine 0.5'er ml hücre lizis solüsyonu-2 (HLS-2) (0.5 M EDTA, %1 sarkozil, 400 µg /ml *proteinaz K*) solüsyonu tüplere eklendi.

5. 55 °C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

### **III.5.2.4. Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması**

1. Lizis aşamasından sonra agaroz kalıplarının katılaşması için tüpler buz içerisinde 15 dakika bekletildi.

2. HLS-2 solüsyonu tüplerden dikkatlice uzaklaştırıldı.

3. İçinde agaroz bulunan tüplere 50 °C'ye ısıtılmış olan steril ultra saf sudan (Reagent Grade Type 1) 4'er ml eklenerek 50 °C'deki çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletildi.

4. Tüplerdeki sular tamamen aspire edildikten sonra üçüncü maddede belirtilen su ile yıkama işlemi iki defa daha tekrarlandı. Tüplerdeki sular tamamen aspire edildi.

5. Daha sonra agaroz kalıpları her biri 50 °C’de 15 dakika olmak üzere üç kez 4 ml TE ( 10 mM Tris-HCL, 0.1 mm EDTA, pH 7.6 ) tamponuyla yıkandı.

6. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz kalıplar, restriksiyon (RE) enzimleriyle kesime hazır hale getirilmiş oldu.

### III.5.2.5. Agaroz kalıpları içindeki DNA ’nın restriksiyonu

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla ¼ oranında kesildi. Parçalardan biri 100 µl 1x FastDigest tampon konularak çalkalamalı su banyosunda 37 °C’de 10 dakika bekletildi. (Diğer parçalar TE tamponu içinde saklandı.)

2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı:

**Tablo.9** FastDigest *XbaI* (*NotI*) Restriksiyon enzim karışımı

Enzim	5 µl FastDigest <i>XbaI</i> ( <i>NotI</i> ) enzim
Tampon	10 µl 10 x FastDigest <i>XbaI</i> ( <i>NotI</i> ) tampon
H <sub>2</sub> O	85 µl steril ultra saf su (Reagent Grade Type 1)
Total volum	100 µl

3. Tüplerdeki enzim tamponları uzaklaştırılıp 2 numarada hazırlanmış olan karışımdan her bir tüpe 100’er µl eklendi. 37 °C’de 2 saat inkübasyon yapıldı.

4. İnkübasyon sonlanınca tüpler + 4 °C’de 15 dakika bekletildi.

5. Böylece kalıplar elektroforeze hazır hale getirildi.

### II.5.2.6. Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi

1. 0.5 TBE (44.5 mM trisma base, 44.5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8.0) içinde 100 ml olacak şekilde % 1’lik agaroz ("pulse-field certified agarose", Prona, İspanya) hazırlandı.

i. 1 g "pulsed- field certified agarose" 200 ml’lik balona konularak üzerine 100 ml 0.5x TBE eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı.

ii. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında iyice çözülmesi sağlandı.

iii. Agaroz iyice çözüldükten sonra balon 45-50 °C’lik su banyosunda bekletildi.

2. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş olan bir zemine konuldu.
3. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısımlarına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde ) yerleştirildi. Tarağın baş ve sondaki dişleri boş bırakıldı. Kalan dişlerin ilk orta ve son kısımlarına kontrol suşları (*S.sonnei* Pasteur Enstitute 6462) yerleştirildi.
4. Kurutma kağıdı ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı. En fazla 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi.
5. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50 °C olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturmadan kaset içine döküldü.
6. Agaroz oda ısısında katılaşmaya bırakıldı. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarıldı.
7. 20-30 dakika sonra agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılarak tabla kenarları ve altındaki jel parçaları bir kağıt havlu yardımıyla temizlendi ve üzerindeki agaroz, içerisinde 2000 ml 0.5 x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

### III.5.2.7. Elektroforez

Elektroforez CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) gerçekleştirildi.

Elektroforez koşulları Tablo.10'daki gibi ayarlandı.

**Tablo.10.** PFGE koşulları

Restriksiyon enzimi	Başlangıç vuruş süresi	Bitiş vuruş süresi	Vuruş açısı	Alana düşen akım	Sıcaklık	Süre
FastDigest <i>XbaI</i>	5 sn	30 sn	120 <sup>0</sup>	6 V/cm <sup>2</sup>	14 °C	20 sa
FastDigest <i>NotI</i>	5 sn	33 sn	120 <sup>0</sup>	6 V/cm <sup>2</sup>	14 °C	22 sa

### III.5.2.8. Sonuçların gözlemlenmesi ve analizi

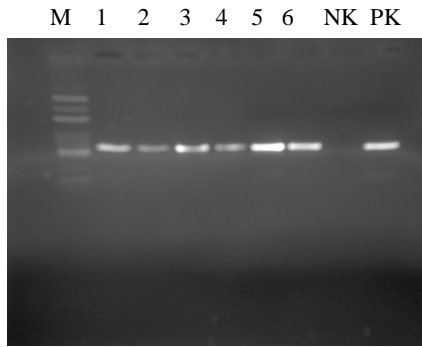
1. Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alındı. Yirmi dakika boyunca boyanmaya bırakıldı.
2. Boyanan jel "Gel logic 2200 imaging system" ( ayırım gücü: 1780x1280 pixel, Kodak Company, NY, ABD) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler "TIFF" formatında kayıt edildi.
3. "GelCompare II" yazılım sistemi (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belçika) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart (1,7,15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. "*Unweighted pair group method with mathematical averaging*" (UPMA) kullanılarak PFGE profillerinin dendogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizleri yapıldı. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, % 1-1,5 olarak alındı.
4. Tenover ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirildi.

Tenover kriterleri:

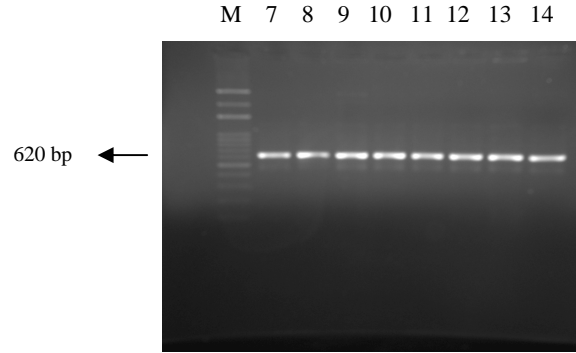
- Aynı izolatlar: Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlar için kullanılır. Bu izolatlar, genetik olarak farksız kabul edilir. Epidemiyolojik olarak ilişkilidir.
- Yakın ilişkili izolatlar: Salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı vardır. Büyük olasılıkla salgınla ilişkili suşlardır.
- Muhtemel ilişkili izolatlar: Salgın suşları ile aralarında 4-6 bant farkı vardır. Muhtemelen salgınla ilişkilidirler.
- İlişkisiz izolatlar: Aralarında  $\geq 7$  bant farkı vardır. Salgınla ilişkileri bulunmayan suşlardır.

## **IV.BULGULAR**

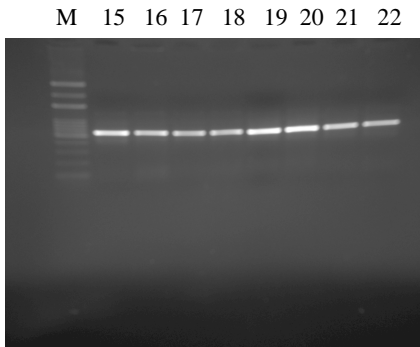
Ankara ilinden 2005 yılında izole edilen 20 *Shigella* suşu ile, 2006 yılında izole edilen 9 *Shigella* suşu konvansiyonel yöntemlerle identifiye edildikten sonra *ipaH* PCR tekniğiyle moleküler doğrulama işlemlerine tabi tutuldu. İzolatların PCR jel görüntüleri elde edildi. (Şekil 2, 3 ve 4 ve 5)



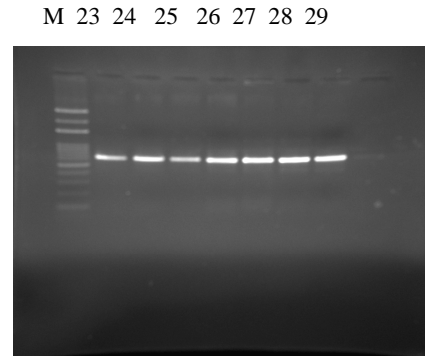
Şekil 2. PCR jel görüntüsü [1-6] No'lu suşlar



Şekil 3. PCR jel görüntüsü [7-14]No'lu suşlar



Şekil 4. PCR jel görüntüsü [15-22] No'lu suşlar



Şekil 5. PCR jel görüntüsü [23-29] No'lu suşlar

M:Marker (100 bp), NK:Negatif kontrol, PK:Pozitif kontrol

PCR jel görüntülerinde amplicon büyüklükleri 620 bp olarak tespit edilen izolatların *Shigella* suşları olduğuna karar verildi.

PCR ile moleküler düzeyde doğrulanmış olan *Shigella* izolatları antimikrobiyal duyarlılık ve PFGE yöntemleriyle tiplendirildi.

Çalışılan izolatların tümü siprofloksasin, amikasin, imipenem, tobramisin, gentamisin, kloramfenikol ve aztreonama duyarlı idi. Ampisiline 5(%17,2), ampisilin sulbaktama 1 (%3,4), piperasiline 5(%17,2), tetrasikline 19 (%65,5), trimetoprim-sulfometaksazole 21 (%72,4) izolat dirençliydi. Antimikrobiyal duyarlılıkları gruplandırıldığında beş farklı patern elde edildi (Tablo. 11).

**Tablo. 11.** Antimikrobiyal duyarlılık paternleri ve sıklıkları

Direnç fenotipi	Direnç paterni	İzolat No.	%
S	Tüm antibiyotiklere duyarlı	1,8,12,13,14,18,19,20,27	27,5
RI	SXT,TET	2,3,5,6,10,11,17,21,22,23,24,28,29	44,8
RII*	CRO,CZ,CF,CFM,AMP,PIP,SXT,TET	4,7,9,15	13,7
RIII	AMP,SAM,PIP,SXT,TET	16	3,4
RIV	SXT	18,25,26	10,3

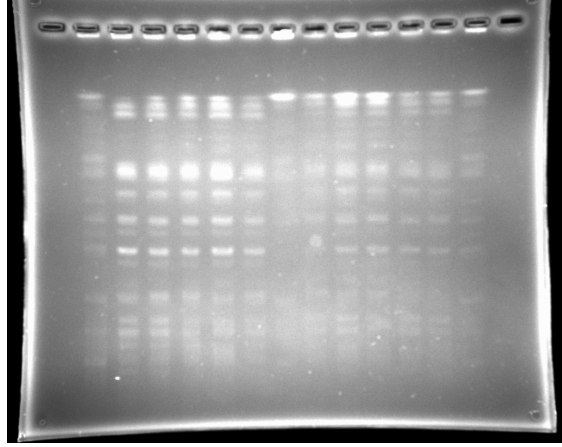
CRO:seftriakson, CZ:sefazolin, CF:sefalotin ,CFM:Sefuroksim, AMP:Ampisilin, SAM:Ampisillin-sulbaktam PIP:piperasilin, SXT:trimetoprim-sulfometaksazol, TET:tetrasiklin

\*ESBL+

Antibiyogram tiplendirmesi gerçekleştirilen 29 *Shigella* izolatının genomik DNA'ları FastDigest *XbaI* enzimiyle kesildikten sonra PFGE yapılarak jel görüntüleri elde edildi. (Şekil 6, 7, 8)

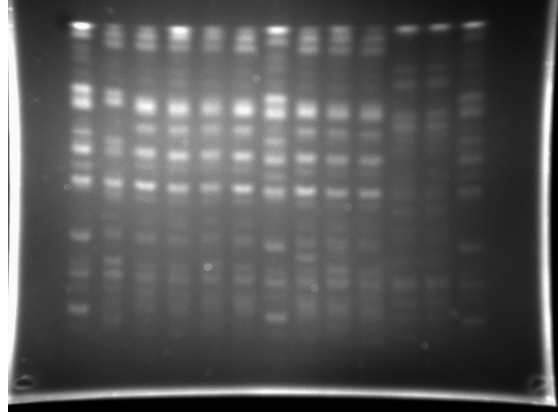


S 1 2 3 4 5 S 6 7 8 9 10 S



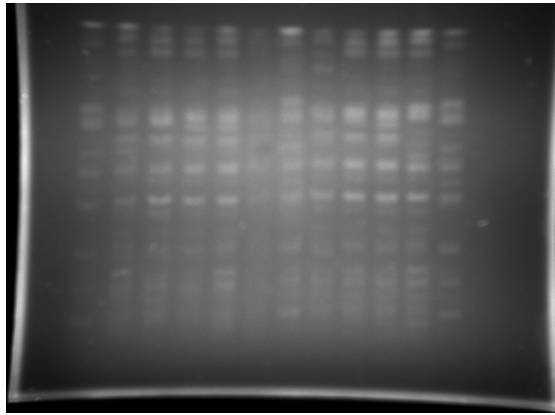
Şekil 6. FastDigest *XbaI* PFGE görüntüsü, 2005-1.grup [1-10] S:Standart suş

S 11 12 13 14 15 S 16 17 18 19 20 S



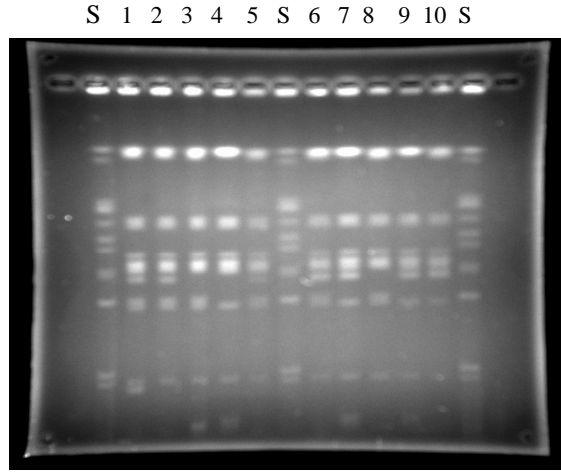
Şekil 7. FastDigest *XbaI* PFGE görüntüsü, 2005-2.grup[11-20]

S 21 22 23 24 S 25 26 27 28 29 S



Şekil 8. FastDigest *XbaI* PFGE görüntüsü, 2006 [21-29]

FastDigest *XbaI* enzim kesim profilinin suşlar arasında yeteri kadar heterojenite sağlamadığı gözlenince ikinci bir enzim olan FastDigest *NotI* ile seçilmiş suşlar üzerinde denemeler yapıldı. Bu enzimle yapılan denemelere ait jel görüntüleri Şekil 9, 10 ve 11' de görülmektedir.

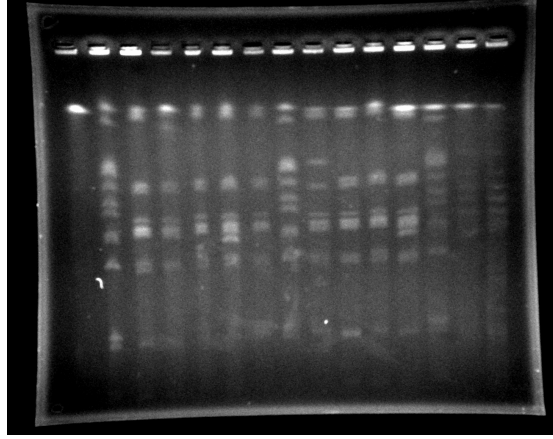


Şekil 9. FastDigest *NotI* PFGE görüntüsü, 2005-1.grup[1-10]



Şekil 10. FastDigest *NotI* PFGE görüntüsü, 2005-2.grup[11-20]

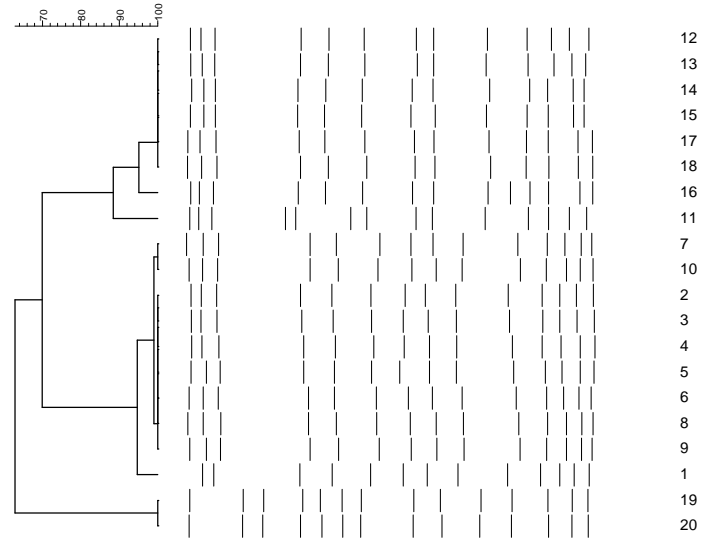
S 21 22 23 24 25 S 26 27 28 29 S



Şekil 11. FastDigest *NotI* PFGE görüntüsü, 2006 [20-29]

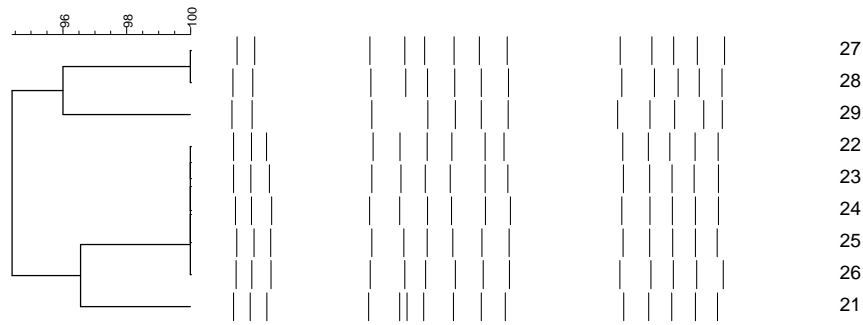
Her iki enzimle kesilen bant profilleri karşılaştırıldığında ortak profil olan suşların enzimlere göre farklılık göstermediğine ve böylece dendogram analizlerinin yalnızca *XbaI* ile elde edilen jeller üzerinden olmasına karar verildi.

"Gel-Compare-II" kullanılarak yapılan bant profil analizinden sonra PFGE profil dendogramları oluşturularak Dice benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişkiler belirlendi.



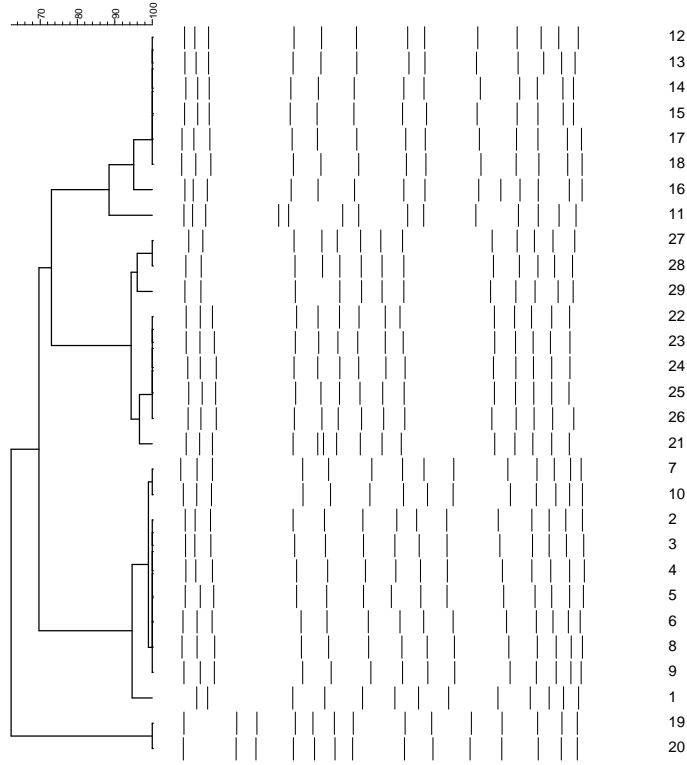
Şekil 12. *Shigella* FastDigest *XbaI* PFGE profili, 2005 [1-20]

PFGE profil tiplendirmesi yapılan, 2005 yılına ait 20 *Shigella* suşundan 3 major PFGE profili elde edildi. Bu profillerden birincisi 6 identik suş ile bunlardan tek bant farkıyla ayrılan bir suş ve bir yakın ilişkili suş içermektedir. İkinci major profil grubunda 2 ve 7 identik suş içeren iki küme ve bunlardan tek bant farkı ile ayrılan bir suş yer almaktadır. Üçüncü major profil grubunda ise tamamen identik olan iki *Shigella dysenteriae* suşu görülmektedir ( Şekil 12 ).



**Şekil 13.** *Shigella* FastDigest *XbaI* PFGE profili, 2006 [21-29]

PFGE profil tiplendirmesi yapılan 2006 yılına ait 9 *Shigella* suşundan 2 major PFGE profili elde edildi. Bu profillerden biri, iki identik suş ile bunlardan bir bant farkı gösteren bir suş içermektedir. İkinci major profil ise beş identik suş ile bunlardan bir bant farkı gösteren bir suş içermektedir ( Şekil 13 ).



**Şekil 14.** *Shigella* FastDigest *XbaI* PFGE profili, 2005-2006 [1-29]

PFGE profil tiplendirmesi yapılan 2005 ve 2006 yıllarına ait 29 *Shigella* suşundan 4 major PFGE profili elde edildi. Birinci profilde 6 identik suş ile bunlardan tek bant farkıyla ayrılan bir suş ve yakın ilişkili bir suş görülmektedir. İkinci profil 2 identik suş ve bunlardan tek bant farkıyla ayrılan bir suş, 5 identik suş içeren bir küme ile bunlardan tek bant farkı ile ayrılan bir suş içermektedir. Üçüncü profil iki ve yedişer identik suş içeren iki küme ve bunlardan tek bant farkı ile ayrılan bir izolat içermektedir. Dördüncü profil ise identik iki *S.dysenteriae* suşunu içermektedir ( Şekil 14 ).

Çalışılan izolatların epidemiyolojik bilgileri, antimikrobiyal duyarlılık paternleri ve PFGE tipleri Tablo 12’de görülmektedir.

**Tablo. 12.** İzolatların antimikrobiyal duyarlılık paternleri (ADP) ve PFGE paternleri

<b>İzolasyon yeri,tarihi</b>	<b>İzolot No.</b>	<b>ADP</b>	<b>PFGE tipi</b>
Ankara, Eylül, 2005	1	S	VI
Ankara, Eylül, 2005	2	RI	V
Ankara, Eylül, 2005	3	RI	V
Ankara, Eylül, 2005*	4	RII	V
Ankara, Eylül, 2005	5	RI	V
Ankara, Eylül, 2005	6	RI	V
Ankara ,Ekim, 2005*	7	RII	IV
Ankara, Ekim, 2005	8	S	V
Ankara, Ekim, 2005*	9	RII	V
Ankara, Ekim, 2005	10	RI	IV
Ankara, Ekim, 2005	11	RI	Ia
Ankara, Ekim, 2005	12	S	I
Ankara, Ekim, 2005	13	S	I
Ankara, Ekim, 2005	14	S	I
Ankara, Ekim, 2005*	15	RII	I
Ankara, Kasım, 2005	16	RIII	I
Ankara, Kasım, 2005	17	RI	I
Ankara, Kasım, 2005	18	RIV	I
Ankara, Temmuz, 2005	19	S	VII
Ankara, Kasım, 2005	20	S	VII
Ankara, Ağustos, 2006	21	RI	III
Ankara, Eylül, 2006	22	RI	III
Ankara, Eylül, 2006 <sup>k</sup>	23	RI	III
Ankara, Eylül, 2006 <sup>k</sup>	24	RI	III
Ankara, Eylül, 2006	25	RIV	III
Ankara,Eylül, 2006	26	RIV	III
Ankara, Eylül, 2006	27	RI	II
Ankara, Ekim, 2006	28	RI	II
Ankara, Ekim, 2006	29	RI	II

\* ESBL+ , k: kardeş

Çalışmaya dahil edilen 29 *Shigella* izolatından elde edilen 7 PFGE tipinden en sık görülen ikisi eşit sayıda izolata sahip olan (n=7) I ve V numaralı paternler olarak tespit edilmiştir. Ayrıca I No'lu paternle yakın ilişkili olan bir *Shigella* izolatı için de Ia alt tipi tanımlanmıştır. V No'lu PFGE paterni gösteren izolatların tümünde RI (SXT,TET) direnci mevcutken bu grupta yer alan ESBL+ 3 *Shigella sonnei* izolatı bahsi geçen antibiyotiklerin dışında AMP, PIP ve sefalosporinlere de dirençli suşlardır. Bu grupta sadece 1 adet tüm antibiyotiklere duyarlı izolat bulunmaktadır. I No'lu PFGE paterni gösteren izolatlar arasında 3 adet tüm antibiyotiklere duyarlı suş, 1 adet ESBL+ *Shigella sonnei* suşu olup diğer izolatlar farklı ADP' leri göstermektedir. II No'lu PFGE paternine sahip üç izolat mevcut olup üçü de aynı ADP' ni göstermektedir (RI). IV No'lu PFGE paternini gösteren iki suştan bir tanesi ESBL+ *Shigella sonnei* izolatı iken diğerinde sadece RI direnci gözlemlenmiştir. VI No'lu PFGE paterni tek bir izolat tespit edilmiş olup tüm antibiyotiklere duyarlı bir suştur. VII No'lu PFGE paterni ise 2 adet *Shigella* izolatında gözlemlenmiş olup bu iki suş çalışmada kullanılan tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu tespit edilmiş olan *Shigella dysenteriae* izolatlarıdır.

## **V.TARTIŞMA VE SONUC**

Şigellozlar infektif dozlarının düşük olması nedeni ile kişiden kişiye bulaşın kolay ve sekonder atak hızının yüksek olduğu, zaman zaman büyük epidemilere yol açan infeksiyonlar olup, özellikle beş yaş altı çocuklarda ve dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olarak güncelliğini korumaktadır (129,132).

İnfeksiyon hastalıkları etkenlerinin alttıplere sınıflandırılması; toplumsal veya nozokomiyal salgınlara ve infeksiyon kaynağının saptanması ile yayılımının takibi, organizmaların virülan suşlarının belirlenmesi, bir infeksiyon nedeniyle tedavi edilen hastalarda reinfeksiyon veya relapsın değerlendirilmesi ve aşılama programlarının izlenebilmesini mümkün kılmaktadır (173).

Fenotipik tiplendirme yöntemleri; ayırıştırma güçlerinin zayıf olması ve farklı zamanlarda uygulandıklarında değişik sonuçlar elde edilmesinden dolayı tekrarlanabilirliklerinin düşük olması, ayrıca değişkenliklerinin fazla ve sonuçlarının geç elde edilmesi gibi nedenlerle, 1980'li yıllardan itibaren yerlerini genotipik yöntemlere bırakmaktadır (186).

İlk kez 1984 yılında Schwartz ve Cantor (179) tarafından tanımlanmış olan PFGE, genotipik yöntemler içinde ayırıştırma gücü ve tekrarlanabilirliği yüksek olduğu için günümüzde pek çok etyolojik ajan için altın standart olarak kabul edilmektedir (173,181). *Shigella* türlerinin PFGE ile tiplendirilebildiğini ise ilk kez Soldati ve Piffaretti (187) 1991'de bildirmişlerdir.

Ülkemizde görülen ishallerin insidansı kesin olarak bilinmemekle birlikte, her yıl 1 ile 1,5 milyon kişinin ishale yakalandığı ve büyük çoğunluğunu çocukların oluşturduğu 30.000 kadar ishale bağlı ölüm olduğu tahmin edilmektedir (188). Çeşitli çalışmalarda ishal şikayetiyle başvuranların dışkılarından *Shigella spp.* izolasyon sıklığının %2 ile %11,4 arasında ve *Salmonella* izolasyon sıklığının ortalama dört katı kadar olduğu bildirilmiştir (137,189). Türkiye genelini kapsayan ayrıntılı epidemiyolojik veriler mevcut değildir. Ankara bölgesinde 80'li yılların sonundan başlayarak *S.sonnei* izolasyon sıklığında artış gözlenmiştir (136). Son yıllarda yapılan yayınlarda da Ankara bölgesinde artık *S.sonnei*'nin en sık izole edilen tür olduğu bildirilmektedir (137,190,191).

Enterik bakteriyel patojenlere bağlı salgınlara kişiden kişiye bulaşması, gıda veya su ile kolayca yayılması mümkün olduğundan, salgınlara saptanması ve yayılımlarının takibi



toplum sağlığının korunması açısından büyük önem taşıtmaktadır. Bu gibi salgınlarn kaynağının belirlenmesi ve yasal yaptırımlar uygulanarak yayılımlarının önlenmesi için ağdaş ve güvenilir yöntemlerin kullanılması gereklidir. *Shigella* enfeksiyonu için salgın kaynaklarının ve salgın suşlarının arasındaki klonal ilişkilerin belirlenmesinin önemine binaen bu suşlar için moleküler benzerlik araştırması yapmak temel amacımız oldu. Çalışmanın moleküler ayağını gerçekleştirmiş olduğumuz Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı'na bağlı olan Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı, enfeksiyon hastalıkları alanında epidemiyolojik veri tabanına yurt ve dünya çapında önemli katkı sağlamakta olan bir referans bir laboratuvar konumundadır. *Shigella* enfeksiyonu tedavisinde geçmiş duyarlılıklara dair epidemiyolojik verinin hızlı sağaltım açısından çok önemli olduğu kanaatiyle çalışma programımıza elimizdeki *Shigella* suşları için Fatih Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirmiş olduğumuz antibiyotik duyarlılık çalışmalarını da ekledik.

Çalışmamızda 2005 yılı Eylül Ekim ve Kasım aylarında izole edilmiş 18 *Shigella sonnei* suşu ile Temmuz ve Kasım aylarında izole edilmiş 2 *S.dysenteriae* suşu; 2006 yılı Ağustos, Eylül ve Ekim aylarına ait 9 *Shigella sonnei* suşunu içeren vaka kümelenmeleri değerlendirilip birbirleriyle kıyaslandırılması yapıldı. İzolatlar 17 farklı antibiyotiğe duyarlılıkları açısından değerlendirildi. İzolatların antibiyotik duyarlılık tablolarına göre beş farklı antimikrobiyal direnç paterni elde edildi. *XbaI* enzimiyle gerçekleştirilen restriksiyon işlemi sonrasında yapılan PFGE analizi sonucunda 2005 ve 2006 yıllarına ait 29 *Shigella spp.* izolatından 4 major PFGE profili elde edildi.

Ankara bölgesinde yapılan çalışmalarda; Ceyhan ve ark. (136) 1994 yılında izole ettikleri 150 *S.sonnei* suşunun %58'inde SXT direnci, %10'unda ampisilin direnci bildirmişlerdir. Aysev ve Giriz (190) 1993-1996 döneminde izole edilen 217 *S.sonnei* izolatında SXT direncini %55,3, ampisilin direncini %11,5 olarak tespit etmişlerdir. Kuzucu ve ark. (189) 1998-1999 yılları arasında izole ettikleri 28 *S.sonnei* izolatında SXT direncini %69,4 ve ampisilin direncini %8,3 rapor etmişlerdir. Akçalı ve ark. (192) 1997-2000 ve 2001 yıllarında Ankara'da izole ettikleri 17 *S.sonnei* izolatında SXT'ye direnç oranını % 70,5 bulurken, ampisiline direnç % 23,5 tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, izolatların tümü gentamisin, seftriakson, imipenem, nalidiksik asit ve siprofloksasine duyarlı bulunmuş, kloramfenikole karşı % 3,3 direnç tespit edilmiş olup bu direnç Adapazarı'nda izole edilen suşlarda görülmüştür. Karacan ve ark. 'nın (193) 2002 Haziran ve Kasım ayları arasında Dr. Sami Ulus ocuk Hastanesi'ne başvuran 198 şigellozlu hastayı kapsayan çalışmalarında 165 hastada *S.sonnei* izole edilmiş, ampisilin direnci %

13.6 iken, SXT direnci % 86,4 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada siprofloksasin duyarlılığı %100 bulunurken sefotaksim ya da seftriaksona duyarlılık % 98 olarak hesaplanmıştır. Özmert ve arkadaşlarının (194) 1987-1994 ve 1995-2002 yıllarını içeren periyotları kıyaslayan çalışmasında her iki periyotta da *S.sonnei* hakimiyeti saptanmış, suşların sxt direncinin %39'dan % 70'e çıktığı ampisilin direnç oranlarının da arttığı tespit edilmiştir. 1995-2000 yılları arasındaki suşlarda SXT' ye %71.1, ampisiline % 22.6, ampisilin-sulbaktama % 16.8, kloramfenikole % 20.6, gentamisine %1.9, seftriaksona % 1.4 direnç belirlenmiştir. Bu çalışmada direnç oranlarını yükselten suşların genel olarak *S.flexneri* izolatları olduğu göze çarpmaktadır. Ülkemizde bu bulguyu destekleyen farklı çalışmalar da mevcuttur (195,196,197). Kloramfenikol direncinin iki periyot arasında değişmediğini bulmuşlardır. Aynı çalışmada siprofloksasine karşı direnç saptanmamıştır.

Bahsedilen çalışmalardaki sonuçlarla benzer şekilde bizim çalışmamızda da *S.sonnei* hakimiyeti gözlenmiştir.(n=27 %93,1) Mevcut iki *S.dysenteria* izolatı kullanılan tüm antibiyotikler açısından duyarlı tespit edilmiştir. 27 *S.sonnei* izolatının %72,4'ü SXT'ye dirençli iken ampisiline %17,2'si dirençli bulunmuştur. SXT direncindeki bu yüksek oranlar Ankara çevresinde artmış direncin kanıtları olabilir. Ampisiline karşı dirençli suşların tespiti de şigellozun ampirik tedavisinde bu antimikrobiyalle tedavinin başarısız olabileceğini göstermektedir. Ampisilinle tedavinin başarısız olduğu durumlarda sefalosporinler tedavi seçeneği olabilir (194). Çalışmadaki tüm *Shigella* izolatları siprofloksasine duyarlı bulunmuştur. Bu sonuç siprofloksasinin şigelloz tedavisinde hali hazırda iyi bir seçenek olduğunun bir göstergesi olabilir.

Üstün ve ark. (138) Ankara ilindeki özel bir hastanede 2001 yazında *S.sonnei* izolasyon sıklığının arttığını, 54 izolatın tamamının ampisilin, kloramfenikol, siprofloksasine duyarlı ve SXT'ye dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Tez çalışmamıza dahil edilen üç izolat bahsi geçen bu antibiyogram direnç profili ile uyumluluk sergilemektedir. Ancak bu izolatların genotipik yapıları hakkında bilgi sahibi olmadığımız için devam eden bir klonun varlığı hakkında fikir yürütememekteyiz. ABD'de CDC tarafından yapılandırılmış olan PulseNet (184) gibi laboratuvar veri tabanlı bir sürveyans ağına benzer bir sistem olan UEPLA (Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı )'na bağlı hastane ve laboratuvar sayısı arttıkça ve salgın etkeni suşların genotipik yapılarını araştırmaya yönelik çalışmalar yaygınlaştıkça, salgın hastalıklar açısından güvenilir ve güncel bir epidemiyolojik veri tabanı sağlanacağına inanmaktayız.

Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar (ESBL), sefamisin ve karbapenemler dışında hemen tüm beta laktam antibiyotikleri inaktive ederek ciddi terapötik problemler

oluşturmaktadırlar (198). 1999 yılında Hindistan'dan ESBL üreten *S.dysenteriae* izolatları rapor edilene kadar henüz ESBL+ *Shigella* suşlarının olduğu bilinmemekteydi (200). Bu yayını takiben Fransa, Kore, Arjantin, Tayvan, Bangladeş, İsrail, İzlanda gibi pek çok ülkeden ESBL üreten suşların raporları yayınlandı (199) Açıkgöz ve arkadaşları 2003 yılında Türkiye'den ilk ESBL pozitif *Shigella sonnei* raporunu yayınladılar (198). 5 sene sonra Açıkgöz ve arkadaşları 163 *Shigella* izolatını içeren çalışmalarında 122 (%79.7) *Shigella sonnei* suşu arasından 5 ESBL + izolat tespit etmişlerdir (199). Çalışmamızda 2005 yılı *Shigella sonnei* izolatları içinde 4 tane ESBL+ suş bulunmaktaydı. Bu suşların tespiti sefotaksim, seftazidim ve amoksisilin klavulonat disklerini kullanarak çift-disk sinerji testi ile tespit edilmiştir.

Houang ve arkadaşları (201), 1986-1987 ve 1994-1995 yılı *Shigella flexneri* ve *Shigella sonnei* izolatlarını içeren iki zaman periyodunu karşılaştıran çalışmalarında *S.flexneri* için ampisilin, amoksisilin-klavulonat, kloramfenikol, tetrasiklin ve trimetoprim-sulfometaksazol direnç oranlarında artış tespit ederken, dört ve daha fazla antimikrobiyal ajana dirençli *S.sonnei* suşlarının direnç oranları açısından iki yıl grubu arasında istatistiksel fark bulamamışlardır. *XbaI* enzimi kullanılarak yapılan restriksiyon işlemi sonrası gerçekleştirdikleri PFGE analiz çalışmalarında on yıl sonra genetik yapının oldukça değiştiği kanısına varmışlardır. *S.sonnei* için ilk zaman periyodunda tespit edilmiş olan yedi pulsotipin ikinci periyotta ortadan kalktığını ve bu periyotta önceki periyotta olmayan üç yeni pulsotipin ortaya çıktığını ve bir pulsotipte de artış olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ardışık iki yıl boyunca toplanan izolatlarda genotipik homojenitenin çok büyük ölçüde korunduğu gözlenmiştir. Bahsi geçen çalışmada gözlenen genotipik heterojenite aradan geçen zaman periyodunun uzunluğundan kaynaklanmış olabilir.

Liu ve arkadaşları (202), 1987-1994 yılları arasında altı farklı enfeksiyon vakasından izole ettikleri 20 *S.sonnei* izolatıyla yaptıkları çalışmada *XbaI* enzimini kullanarak birisi kullanılan standart suşa ait olmak üzere yedi adet makrorestriksiyon paterni elde etmişlerdir. Altı vaka grubunu epidemiyolojik ilişkilerine göre başarı ile ayırmışlardır. İzolasyon 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 düşünmüşlerdir. Çalışmamızda da ayırt edilemez yada yakın ilişkili pek çok suşun olması bu dönemde gerçekleşen vaka kümelenmelerinin aynı bakteriyel kökenden olabileceğini düşündürmektedir.

Lin ve arkadaşları (203), 1996-1997 yıllarını kapsayan dönemdeki 7 *Shigella* salgınından izole edilmiş 22 *S.flexneri* 3a suşu üzerinde yaptıkları PFGE çalışmasında

*XbaI*, *SfiI* ve *NotI* enzimlerinin üçünü de kullanmışlardır. *XbaI* ve *SfiI* tüm izolatlar için aynı PFGE paternlerini ortaya çıkarırken *NotI* 'da farklılıklar gözlemlenmiştir. Her üç enzimle kesim işlemleri sonucu aynı vaka gruplarında aynı paternler elde edilmiştir. Üç enzim kombinasyonu ile yedi vakada yedi karşılaştırmalı patern elde etmişlerdir. Sonuçta kapalı coğrafik alanlardan aynı zaman periyodunda izole edilmiş bazı suşların aynı kaynaktan orjin aldığı kanaatine varmışlardır. Bizim çalışmamızda da *XbaI* ve *NotI* ile, aynı vaka gruplarında aynı genotipik profiller ortaya çıkmıştır. Lin ve arkadaşlarının çalışmasında aynı vaka gruplarında farklı enzimlerle DNA restriksiyonu yapılmasına rağmen aynı genotipik paternlerin elde edilmesi, *XbaI* enziminin diskriminatif gücünde bir sorun olmadığını bir göstergesi gibi görünmektedir.

Malezya'nın endemik şigeloz görülen değişik kesimlerindeki sporadik vakalardan elde edilen 1997-2000 yıllarına ait 62 *S.sonnei* suşuyla yapılan bir çalışmada suşların yaklaşık % 29'u kullanılan tüm antimikrobilyallere duyarlı bulunmuş, streptomisine % 62.9, trimetoprim-sulfometaksazole % 37.1, tetrasikline % 35.5, ampisiline % 6.5 ve kloramfenikole % 4.8 direnç saptanmıştır. Çalışmada elde edilen direnç yüzdeleri bizim çalışmamıza kıyasla düşük oranlarda gözükmektedir. Ancak bu çalışmada saptanan kloramfenikol direncine karşılık bizim çalışmamızda kloramfenikol direnci gözlemlenmemiştir. Bu çalışmanın moleküler tiplendirme ayağı için *NotI* ve *XbaI* enzimleri ile restriksiyon yapılarak genomik DNA'lar elde edilmiş, PFGE sonuçlarına göre her iki küme analizinde ortak pek çok bulgu elde edilmesine karşın, *XbaI* enzimiyle restriksiyonun, çalışmanın diskriminatif gücünü hafifçe daha arttırdığı kanaatine varılmıştır (204). Tez çalışmamızda da *XbaI* enzimiyle izolatlar arasında yeteri kadar heterojenite sağlanmadığı kanaatiyle *NotI* ile denemeler yapılmış, *NotI*'nin seçilen suşlar için *XbaI* enziminden daha ayırt edici bir profil oluşturmadığı görülmüştür.

Hindistan'ın değişik bölgelerindeki salgınlardan ve hospitalize edilmiş sporadik vakalardan izole edilen 60 *Shigella* suşu (20 *S.dysenteria*, 16 *S.flexneri*, 7 *S.boydii*, 17 *S.sonnei*) ile yapılan başka bir çalışmada 16 *S.sonnei* izolatının trimetoprim-sulfometaksazol, tetrasiklin, nalidiksik asit ve streptomisine dirençli olduğu, bir *S.sonnei* izolatının da bu antibiyotiklere ilaveten ampisiline de dirençli olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal rezistans sıklığının ve determinantlarının geniş yayılım alanı bulan spesifik klonların varlığına bağlı olup olmadığının cevabını bulmak amacıyla yapılan *XbaI* PFGE sonuçlarının analizinde bizim bulgularımızla benzer şekilde 11 *S.sonnei* suşu arasında yüksek oranda genotipik homojenite olduğu tespit edilmiştir (205).

Japonya'da 2004 yılı ağustos ayında Hawaii'de şigeloz saptanmıştır. Tüm vakalardan *S. sonnei* izole edilmiştir. 15 izolatin *XbaI* restriksiyon enzimi ile elde edilen genomik DNA larının PFGE sonrası analizlerinde ikisi tek bantla ayrılan üçüncüsü de diğer ikisinden 2 bant farkı gösteren 3 PFGE paterni gözlemlemiştir. 1 ay sonra "Centers For Disease Control and Prevention" (CDC)'den gelen, Hawaii uçak yolcularında görülen şigeloz salgını haberi ve izolatların PFGE "tiff" görüntüleri Japonya'daki çalışmayı doğrulamıştır (206).

Akçalı ve arkadaşlarının (192) 1999 Marmara bölgesi depremi sonrası izlemde İzmit Adapazarı ve Yalova'da izole edilen 13; 1997, 2000 ve 2001 yıllarında Ankara'da izole edilen 17 *S. sonnei* suşu ile yaptıkları çalışmada *XbaI* enzimiyle restriksiyonu yapılarak elde edilen genomik DNA'ların PFGE analiz sonuçlarında A(n=24) ve B(n=6) olmak üzere iki ana grup ve ana grupla yakın ve ya olası ilişkili alt tiplerinin oluşturduğu 15 PGFE paterni elde edilmiştir. Ankara'da A ve A alt tipleri görülürken, B ana PFGE profilinin Marmara bölgesinde yoğunlaştığını tespit etmişlerdir Bu sonuca göre farklı şehirlerde farklı dönemlerde farklı *S. sonnei* alt tiplerinin dolaştığı kanaatine varmışlardır. Aynı çalışmada iki kardeşten izole edilen iki suş arasında tek bant farklılığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda *Shigella* enfeksiyonu geçirmekte olan iki kardeşin dışkılarından izole edilen iki *Shigella sonnei* suşu için aynı antibiyotik direnç profili ve PFGE profili elde edilmiştir. Bu sonuç enfeksiyon etkeni olan klonun aile içi bulaşını düşündürmektedir. Ankara ili ya da Türkiye'nin diğer illerinde dolaşan *Shigella spp.* suşlarının PFGE tiplerinin bölgelere göre dağılımını değerlendirmek ve doğrulamak için daha çok sayıda ve uzun süreli çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Ülkemizde salgınlarının saptanması ve bu enfeksiyonlara neden olan etyolojik ajanlar için güncel bir epidemiyolojik veri ağına sürekli eklenebilecek bilginin toplanması ve bu verilerin ışığında gerekli kontrol önlemlerinin alınması için laboratuara dayalı ajan bildirim sisteminin geliştirilmesinin çok önemli olacağı kanaatindeyiz.

Ayrıca bu çalışmalara ilave olarak toplanan suşların klonal ilişkilerinin ortaya konulması; olası salgınların doğrulanması, *Shigella spp.* gibi önemli bir enterik patojenin bulaş yolları ve kaynağının tanımlanması ve bu bilgilere bağlı olarak daha etkili kontrol önerilerinin geliştirilmesi açısından yararlı olacaktır.

## **VI. ÖZET**

Bu çalışmada *Shigella spp.* tiplendirmesinde antibiyotik duyarlılığı yanında PFGE'nin tiplendirmedeki etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlandı. Çalışmaya birbirleriyle karşılaştırmak üzere 2005 ve 2006 yıllarında Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda izole edilmiş ikisi *Shigella dysenteriae* 27'si *S. sonnei* olmak üzere toplam 29 *Shigella* izolatu dahil edildi. İzolatlar 17 farklı antibiyotiğe duyarlılıkları açısından değerlendirildi. İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre 4 farklı direnç paterni elde edildi. *XbaI* enzimiyle elde edilen genomik DNA'ların PFGE analizleri sonucunda 4 major PFGE paterni belirlendi.

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

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

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

**Anahtar kelimeler:** *Shigella spp.*, antibiyotik duyarlılığı, "pulsed field gel electrophoresis" (PFGE) , epidemiyoloji

## **VII. SUMMARY**

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of PFGE for typing *Shigella spp.* isolates as well as antibiotic susceptibility. A total of 29 *Shigella* strains isolated in Fatih University Microbiology Laboratory during 2005 and 2006, two of them were *S.dysenteria* and the the rest was *S.sonnei* were included in the study to compare with each other. Isolates were assessed for the susceptibility of 17 different antimicrobials. According to the antimicrobial susceptibility results, 4 different resistance pattern were obtained. As a result of the PFGE analysis of the genomic DNA's obtained by the restriction of *XbaI* enzyme, four major PFGE patterns were determined.

According to data obtained by PFGE; comparison made between the *Shigella spp.* isolates of the years 2005 and 2006 showed that the genotypic homogeneity was largely protected. The presence of many indistinguishable or closely related strains among the isolates suggest that the cluster of cases occurred in this period is originated from the same source and there is a continuous clone. Because there is a big number of strains different for the antimicrobial susceptibility but identical or closely related for PFGE patterns, it could be considered that PFGE is more sensitive than antimicrobial susceptibility testing for epidemiologic typing. However, it should be kept in mind that performing the antimicrobial susceptibility tests is always a good pathfinder for the empiric therapy of *Shigella spp.* infections.

In our country, we believe that long term studies covering large number of patients should be performed to evaluate the distribution of *Shigella spp.* isolates causing sporadic cases or outbreaks by region.

In addition to this studies, displaying the clonal relationship of the strains by genotypic methods will provide reliable information to confirm the outbreaks; the identification of sources and transmission routes in this way will make a significant contribution to the development of effective methods for infection control and treatment.

**Keywords:** *Shigella spp.*, antibiotic susceptibility, "pulsed field gel electrophoresis"(PFGE), epidemiology

## **VIII.KAYNAKLAR**

1. SK Niyogi. Shigellosis. *J Microbiol* 2005;43:133-143
2. Trofa AF, Ueno-Olsen H, Oiwa R, Yoshikawa M. Dr. Kiyoshi Shiga: Discoverer of the dysentery bacillus. *Clin.Infect. Dis.* 1999;29:1303-1306.
3. Lee JC, Jeong YS, Oh JY, Kang HY, Kim KH, Kim J, Lee YC, Cho DT, Seol SY. Epidemiology of Shigellosis in Korea. *J Bacteriol Virol* 2006; 36:41-49
4. Keusch GT. The rediscovery of Shiga toxin and its role in clinical disease. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 1998;51:S5-S22.
5. *Shigella* In: Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, 10.baskı. Fakülteler Kitabevi, İzmir 2000;17-29.
6. Mahon CR, Manuselis G. Enterobacteriaceae. In: Mahon CR, Manuselis G(eds). Textbook of diagnostic microbiology, 2<sup>nd</sup> ed. W.B. Saunders Company, 2000;484-486.
7. Facultatively anaerobic gram-negative rods In: Holt JG, Krieg NR, Sneath PH et al eds. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>th</sup> ed, WilliamsWilkins, Maryland. 1994;175-190.
8. CDC. *Shigella* surveillance: Annual Summary, 2000. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2001.
9. Enterobacteriaceae: *Salmonella* and *Shigella*, Intestinal Pathogens. In: Joklik KW, Willet HP, Amos DB, Wilfret CM eds. Zinsser Microbiology 20<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall, 1992:556-559.
10. Lindberg AA, Kaernell A, Weintraub A. The lipopolysaccharide of *Shigella* bacteria as a virulence factor. *Rev Infect Dis* 1991;13:279-284.
11. The Enterobacteriaceae. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM et al eds. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed, Lippincott-RavenPublishers, Philadelphia. 1997:171-252.
12. B.H. Edwards, *Salmonella* and *Shigella* species, *Clin Lab Med* 1999;19: 469–487.
13. S. Ashkenazi, *Shigella* species In: V.L. Yu, R. Weber and D. Raoult, Editors ((ed 2)), Antimicrobial therapy and vaccines vol 1, Apple Tree Production, New York 2002;615–621
14. Sansonetti PJP. Rupture, invasion and inflammatory destruction of intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *Microbiol Rev* 2001;25:3-14,
15. Raqib R, Wretling B, Andersson J, Lindberg AA. Cytokine secretion in acute shigellosis is correlated to disease activity and directed more to stool than to plasma. *J Infect Dis* 1995;171:376-384
16. Zychlinsky A, Thirumalai K, Arondel J, Cantey JR, Alipirantis AO, Sansonetti PJ. In vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infections. *Infect Immun* 1996;64:5357-5365
17. Buchrieser C, Glaser P, Rusniok C, Nedjari H, D'Hauteville H, Kunst F, Sansonetti F, Parsot C. The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 2000;38:760-771
18. Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 1999;284:1322–1328.
19. Ingersoll M, Groisman EA, Zychlinsky A. Pathogenicity islands of *Shigella*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002;264:49–65.
20. Sasakawa C, Kamata K, Sakai T, Makino S, Yamada M, Okada N, Yoshikawa M. Virulence-associated genetic regions comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in *Shigella flexneri* 2a. *J Bacteriol* 1988;170: 2480–2484.
21. Fernandez MI, Sansonetti PJ. *Shigella* interaction with intestinal epithelial cells determines the innate immune response in shigellosis. *Int J Med Microbiol* 2003;293:55–67.
22. Maurelli AT, Baudry B, d'Hauteville H, Hale TL, Sansonetti PJ. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 1985;49:164–171
23. Blocker A, Gounon AP, Larquet E, Niebuhr K, Cabiliaux V, Parsot C, Sansonetti P. The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* 1999;147:683–693.
24. Page AL, Ohayon H, Sansonetti PJ, Parsot C. The secreted IpaB and IpaC invasions and their cytoplasmic chaperone IpgC invasins and their cytoplasmic chaperone IpgC are required for intercellular dissemination of *Shigella flexneri*. *Cell Microbiol* 1999;1:183–193.



25. Bernardini ML, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ. Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3867–3871.
26. Goldberg MB, Theriot JA. *Shigella flexneri* surface protein IcsA is sufficient to direct actin-based motility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 6572–6576.
27. Nakata N, Sasakawa C, Okada N, Tobe T, Fukuda I, Suzuki T, Komatsu K, Yoshikawa M. Identification and characterization of *virK*, a virulence-associated large plasmid gene essential for intercellular spreading of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 1992;6:2387–2395.
28. Steinhauer J, Agha R, Pham T, Warga AW, Goldberg MB. The unipolar *Shigella* surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole. IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface. *Mol Microbiol* 1999; 32:367–377.
29. Adler B, Sasakawa C, Tobe T, Makino S, Komatsu K, Yoshikawa M. A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 1989; 3: 627–635.
30. Maurelli AT, Sansonetti PJ. Identification of a chromosomal gene controlling temperature regulated expression of *Shigella* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2820–2824.
31. Rolfe AD, Acheson DWK, Keusch GT. Shiga toxin: Purification, Structure and function. *Rev Infect Dis* 1991;13:293-297.
32. Bartlett AV, Prado D, Cleary T et al. Production of shiga toxin and other cytotoxins by serogroups of *Shigella*. *J Infect Dis* 1986;154:996-1002.
33. Beutin L, Strauch E, Fischer I. Isolation of *Shigella sonnei* lysogenic for a bacteriophage encoding gene for production of Shiga toxin. *The Lancet* 1999; 353:1498.
34. Sandvig K. Shiga toxins. *Toxicon* 2001;39:1629-1635.
35. Keusch GT. Shigellosis. In: Gorbach S, Bartlett JG, Blacklow NR eds. Infectious Diseases, 2<sup>nd</sup> ed W.B Saunders Company, 1998;694-698.
36. Hale L, Keusch GT. *Shigella*. In: Baron S ed. Medical Microbiology. 4<sup>th</sup> ed, 1996 University of Texas Medical Branch at Galveston, Chapter 22 at <http://gsbs.utmb.edu/microbook/>
37. Raqib R, Lindberg AA, Wretling B, Bardhan PK, Andersson U, Andersson J. Persistence of local cytokine production in shigellosis in acute and convalescent stages. *Infect Immun* 1995;63:289–296.
38. Nonaka T, Kuwabara T, Mimuro H, Kuwae A, Imajoh-Ohmi S. *Shigella*-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. *Microbiology* 2003;149:2513–2527.
39. Adam T, Arpin M, Prevost MC, Gounon P, Sansonetti PJ. Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J Cell Biol* 1995;129:367–381.
40. Hall A, Rho GT. Pases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279: 509–514.
41. Goldberg MB, Barzu O, Parsot C, Sansonetti PJ. Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella flexneri* protein involved in intracellular movement. *Infect Agents Dis* 1993;2:210–211.
42. Adam T. Exploitation of host factors for efficient infection by *Shigella*. *Int J Med Microbiol* 2001;291:287–298.
43. Hilbi J, Moss J, Hersh Y, Chen J, Arondel S, Banarjee RA, Flavell J, Yuan P, Sansonetti PJ, Zychlinsky A. *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* 1998;273:32895–32900.
44. Cario E, Brown D, McKee M, Lynch-Devaney K, Gerken G, Podolsky DK. Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am J Pathol* 2002;160:165–173.
45. Zhang Z, Jin L, Champion G, Seydel KB, Stanley SL Jr. *Shigella* infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model: role for neutrophils in containing bacterial dissemination in human intestine. *Infect Immun* 2001;69:3240–3247.
46. Taylor D, Echeverria P, Pal T, Sethabutr O, Saiborisuth S, Sricharmorn S, Rowe B, Cross J. The role of *Shigella spp.*, enteroinvasive *Escherichia coli* and other enteropathogens as cause of childhood dysentery in Thailand. *J Infect Dis* 1986;153:1132-1138.

47. Cohen D, Ashkenazi S, Green MS, Gdalevich M, Robin G, Slepon R, Yavzori M, Orr N, Block C, Ashkenazi I, Shemer J, Taylor DN, Hale TL, Sadoff JC, Pavliakova D, Schneerson R, Robbins JB. Double-blind vaccine-controlled randomized efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. *Lancet* 1997;349:155-159.
48. Ferreccio C, Prado V, Ojeda A, Cayyazo M, Abrego P, Guers L, Levine MM. Epidemiologic patterns of acute diarrhoea and endemic *Shigella* infections in a poor periurban setting in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.* 1991;134:614-627.
49. Herrington DA, Van DeVerg L, Formal SB, Hale TL, Tall BD, Cryz SJ, Tramont EC, Levine MM. Studies in volunteers to evaluate candidate *Shigella* vaccine: further experience with a bivalent *Salmonella typhi-Shigella sonnei* vaccine and protection conferred by previous *Shigella sonnei*. *Microbiol. disease.* 1990;8:353-357.
50. Kotloff KL, Noriega FR, Samandari T, Sztein MB, Losonsky GA, Nataro JP, Picking WD, Barry EM, Levine MM. *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1207, with specific deletions in, virG, sen, set, and gua BA, is highly attenuated in humans. *Infect Immun* 2000;68:1034-1039.
51. Robbins JB, Chu CY, Schneerson R. Hypothesis for vaccine development : Protective immunity to enteric diseases caused by non-typhoidal *Salmonella* and *Shigellae* may be conferred by serum IgG antibodies to the O-specific polysaccharide of their lipopolysaccharides. *Clin Infect Dis* 1992;15:346-361.
52. Levine MM, DuPont HL, Formal SB, Hornick RB, Takeuchi A, Gangarosa EJ, Snyder MJ, Libonati JP. Pathogenesis of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) dysentery. *J Infect Dis* 1973;127:261-270.
53. DuPont HL, Hornick RB, Dawkins AT, Snyder MJ, and Formal SB. The response of man to virulent *Shigella flexneri* 2a. *J Infect Dis.* 1969;119:296-299.
54. Mathan VI, Mathan MM. Intestinal manifestations of invasive diarrhoeas and their diagnosis. *Rev Infect Dis.* 1991;13:S311-313.
55. Butler T, Speelman P, Kabir I, Banwell J. Colonic dysfunction during shigellosis. *J Infect Dis* 1986;154:817-824.
56. Strulens MJ, Patte D, Kabir I, Salam A, Nath SK, Butler T. *Shigella* septicemia: prevalence, presentation, risk factors and outcome. *J Infect Dis* 1985;152:784-790.
57. Greenberg D, Marcu S, Melamed R, Lifshitz M. *Shigella* bacteremia: a retrospective study. *Clin Pediatr (Phila)* 2003;42:411-415.
58. Baer JT, Vugia DJ, Reingold AL, Aragon T, Angulo FJ, Bradford WZ. HIV infection as a risk factor for shigellosis. *Emerg Infect Dis* 1999;5:820-823.
59. Miron D, Sohotnick I, Yardeni D, Kawar B, Siplovich L: Surgical complications of shigellosis in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:898-900.
60. Khan WA, Dhar U, Salam MA, Griffiths JK, Rand W, Bennish ML. Central nervous manifestations of childhood shigellosis: prevalence, risk factors, and outcome. *Pediatrics* 1999;103:E18.
61. Ozuah PO. *Shigella* update. *Pediatr Rev* 1998;19:100.
62. Perles Z, Bar-Ziv J, Granot E. Brain edema: an underdiagnosed complication of *Shigella* infection. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:1114-1115.
63. Plotz FB, Arets HG, Fleer A, Gemke RJ. Lethal encephalopathy complicating childhood shigellosis. *Eur J Pediatr* 1999;158:550-552.
64. Goren A, Freier S and Passwell J. Lethal toxic encephalopathy due to childhood shigellosis in a developed country. *Pediatrics* 1992;89:1189-1193.
65. Yuhas Y, Shulman L, Weizman A, Kaminsky E, Vanichkin A, Ashkenazi S. Involvement of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta in enhancement of pentylentetrazole-induced seizures caused by *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun* 1999;67:1455-1460.
66. Balter-Seri J, Yuhas Y, Weizman A, Nofech-Mozes Y, Kaminsky E, Ashkenazi S. Role of nitric oxide in the enhancement of pentylentetrazole-induced seizures caused by *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun* 1999;67: 6364-6368.
67. Yuhas Y, Weizman A and Ashkenazi S. Bidirectional concentration-dependent effects of tumor necrosis factor alpha in *Shigella dysenteriae*-related seizures. *Infect Immun* 2003;71:2288-2291.

68. Anatoliotaki M, Galanakis E, Tsekoura T, Schinaki A, Stefanaki S, Tsilimiqaki A, Urinary tract infection caused by *Shigella sonnei*, *Scand J Infect Dis* 2003;35:431–433.
69. Baiulescu M, Hannon PR, Marcinak JF, Janda WM, Schreckenberger PC. Chronic vulvovaginitis caused by antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in a prepubertal child. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:170–172.
70. Viner Y, Miron D, Gottfried E, Seqal D, Luder A. Neonatal shigellosis, *Isr Med Assoc J* 2001;3:964–966.
71. Gomez HF, Ochoa TJ, Carlin LG, Cleary TG. Human lactoferrin impairs virulence of *Shigella flexneri*. *J Infect Dis* 2003;187:87–95.
72. Levine MM. Shigellosis. In: Strickland GT, Hunters Tropical Medicine. 1991 7th Edition. Philadelphia, WB Saunders Co., 340-344.
73. Ackerman BH and Dello Buono FA. In vitro testing of antibiotics. *Pharmacotherapy*. 1996;16:201-221.
74. Olsson-Liljequist B. E-test as a routine MIC tool for reference work. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992;15:479-482.
75. McKee Jr KT, Shields TM, Jenkins PR, Zenilman JM, Glass GE. Application of a geographic information system to the tracing and control of an outbreak of shigellosis. *Clin Inf Dis* 2000;31:728-733.
76. Salam MA, Bennish ML. Antimicrobial therapy for shigellosis. *Rev Infect Dis* 1991;13:S332-S341.
77. Sack RB, Rahman M, Yunus M, Khan EH. Antimicrobial resistance in organisms causing diarrhoeal disease. *Clin Infect Dis* 1997;24:S102-105.
78. Murphy G, Bodhidatta L, Echeverria P, Tansuphaswadikul S, Hoge CW, Imlarp S, Tamura K. Ciprofloxacin and loperamide in the treatment of bacillary dysentery. *Ann Intern Med* 1993;118:582-586
79. Bhattacharya MK, Nair GB, Sen D, Paul M, Debnath A, Nag A, Dutta D, Dutta P, Pal SC, Bhattacharya SK. Efficacy of norfloxacin for shigellosis: A double-blind randomized clinical trial. *J Diarrhoeal Dis Res* 1992;10:146-150.
80. Bhattacharya SK, Dutta P, Dutta D, Bhattacharya MK, Sen D, Saha MR, Nair GB, Das P, Sikdar SN, Bose R, Pal SC. Relative efficacy of trimethoprim-sulfamethoxazole and nalidixic acid for acute invasive diarrhoea. *Antimicrob Agent Chemother* 1987;31:837.
81. Bhattacharya SK, Bhattacharya MK, Dutta P, Sen D, Rasaily R, Moitra A, and Pal SC. Randomized clinical trial of norfloxacin for shigellosis. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45:683-687.
82. Bhattacharya SK, Bhattacharya MK, Dutta D, Dutta S, Deb M, Deb A, Das KP, Koley H, Nair GB. Double blind, randomized clinical trial for safety and efficacy of norfloxacin for shigellosis in children. *Acta Paediatr* 1997; 86:319-320.
83. Bhattacharya SK, Sur D. An evaluation of current shigellosis treatment. *Expert Opin Pharmacother* 2003;4:1315-1320.
84. Bhattacharya SK, Sarkar K, Nair GB, Faruque ASG, and Sack DA. A regional alert of multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 in South Asia. *The Lancet Inf Dis* 2003;3:751.
85. Gendrel, D. and F. Moulin. Fluoroquinolones in paediatrics. *Paediatr Drugs* 2001;3:365-377.
- 86-102. Salam MA, Seas C, Khan WA, Bennish ML. Treatment of shigellosis: IV cefixime is ineffective in shigellosis in adults. *Ann Intern Med* 1995;123:505-508.
87. Varsano I, Elditz-Marcus T, Nussinovch M, Elian I. Comparative efficacy of ceftriaxone and ampicillin for treatment of severe shigellosis in children. *J Pediatr* 1991;118:627-632.
88. Ashkenazi S, Amir J, Waisman Y, Rachmel A, Garty BZ, Samra Z, Varsano I, Nitzan MM. A randomized, double-blind study comparing cefixime and trimethoprim-sulphamethoxazole in the treatment of childhood shigellosis. *J Paediatr* 1993;123:817-821.
89. DuPont HL, Ericsson CD, Mathewson JJ, Palazzini E, DuPont MW, Jiang ZD, Mosavi A, de la Cabada FJ. Rifaximin, a nonabsorbed antimicrobial, in the therapy of travelers diarrhoea. *Digestion* 1998;59:708-714.
90. Niyogi SK, Mitra U, Dutta P. Changing pattern of serotypes and antimicrobial susceptibilities of *Shigella* species isolated from children in Calcutta, India. *Jpn J Infect Dis* 2001;54:121-122.
91. Levine, M.M. Antimicrobial therapy for infectious diarrhoea. *Rev. Infect. Dis.* 1986;8:S207-S216.

92. Nelson, J.D., H. Kusmiesz, and L.H. Jackson. Comparison of trimethoprim/ sulphamethoxazole and ampicillin therapy for shigellosis in ambulatory patients. *J Pediat* 1976;89:491.
93. Ross, S., G. Controno, and W. Khan. Resistance of shigellae to ampicillin and other antibiotic. *J Am Med Assoc* 1972;221:45.
94. Bose R, Nashipuri JN, Sen PK, Dutta P, Bhattacharya SK, Dutta D, Sen D, and Bhattacharya MK. Epidemic of dysentery in West Bengal: clinicians enigma. *Lancet* 1984;2:1160.
91. Salam, M.A. and M.L. Bennish. Therapy for shigellosis I randomized double-blind trial of nalidixic acid in childhood shigellosis. *J Pediatr* 1988; 113:901-907.
96. Panhotra BR, Desai B, Sharma PL. Nalidixic acid resistant *Shigella dysenteriae* type 1. *Lancet* 1985;1:763.
97. Munshi MH, Sack DA, Halder K, Ahmed ZU, Rahaman MM, Murshed MO. Plasmid-mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type 1. *Lancet* 1987;2:419-421.
98. Bennish ML, Salam MA, Haider R, Barza M. Therapy for Shigellosis. II. Randomized, double-blind comparison of ciprofloxacin and ampicillin. *J Infect Dis* 1990;162:711-716.
99. Sarkar K, Ghosh S, Niyogi SK, Bhattacharya SK. *Shigella dysenteriae* type 1 with reduced susceptibility to fluoroquinolone. *Lancet* 2003;361:785.
100. Sur D, Niyogi SK, Sur S, Datta KK, Takeda Y, Nair GB, Bhattacharya SK. Multi-drug resistant Shigella dysenteriae type 1: Forerunners of a new epidemic strain in eastern India? *Emerg Inf Dis* 2003;9:404-405.
101. Levine MM, Kotloff KL, Barry EM, Pasetti MF, Sztein MB. Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:540-553.
102. Tacket CO, Binion SB, Bostwick E, Losonsky G, Roy MJ, Edelman R. Efficacy of bovine milk immunoglobulin concentrate in preventing illness after *Shigella flexneri* challenge. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47:276-283.
103. Samandari T, Kotloff KL, Losonsky GA, Picking WD, Sansonetti PJ, Levine MM, Sztein MB. Production of IFN-gamma and IL-10 to *Shigella* invasins by mononuclear cells from volunteers orally inoculated with a Shiga toxin-deleted *Shigella dysenteriae* type 1 strain. *J Immunol* 2000;164:2221-2232.
104. Jennison AV, Verma NK. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol Rev* 2004;28:43-58.
105. World Health Organ. Future needs and directions for *Shigella* vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2006;81:51-58.
106. Kweon MN. Shigellosis: the current status of vaccine development. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:313-318.
107. Cohen D, Ashkenazi S, Green M, Lerman Y, Slepon R, Robin G, Orr N, Taylor DN, Sadoff JC, Chu C, Shiolach J, Schneerson R, Robbins JB. Safety and immunogenicity of investigational *Shigella* conjugate vaccines in Israeli volunteers. *Infect Immun* 1996;64:4074-4077.
108. Cohen D, Ashkenazi S, Green MS, Gdalevich M, Robin G, Slepon R, Yavzori M, Orr N, Block C, Ashkenazi I, Shemer J, Taylor DN, Hale TL, Sadoff JC, Pavliocova D, Schneerson R, Robbins JB. Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. *Lancet* 1997;349:155-159.
109. Ashkenazi S, Passwell JH, Harlev E, Miron D, Dagan R, Farzan N, Ramon R, Majadly F, Bryla DA, Karpas AB, Robbins JB, Schneerson R. Safety and immunogenicity of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* 2a O-specific polysaccharide conjugates in children. *J Infect Dis* 1999;179:1565-1568.
110. Passwell JH, Ashkenazi S, Harlev E, Miron D, Ramon R, Farzan N, Lerner-Geva L, Levi Y, Chu C, Shiloach J, Robbins JB, Schneerson R, Israel Shigella Study Group. Safety and immunogenicity of *Shigella sonnei*-CRM9 and *Shigella flexneri* type 2a-rEPA<sub>succ</sub> conjugate vaccines in one- to four-year-old children. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:701-706.
111. Passwell JH, Harlev E, Ashkenazi S, Chu C, Miron D, Ramon R, Farzan N, Shiloach J, Bryla DA, Majadly F, Roberson R, Robbins JB, Schneerson R. Safety and immunogenicity of improved *Shigella* O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccines in adults in Israel. *Infect Immun* 2001;69:1351-1357.

112. Chowers Y, Kirschner J, Keller N, Barshack I, Bar-Meir S, Ashkenazi S, Schneerson R, Robbins J, Passwell JH. O-specific [corrected] polysaccharide conjugate vaccine-induced [corrected] antibodies prevent invasion of *Shigella* into Caco-2 cells and may be curative. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:2396-2401.
113. Phalipon A, Costachel C, Grandjean C, Thuizat A, Guerreiro C, Tanguy M, Nato F, Vulliez-Le Normand B, Belot F, Wright K, Marcel-Peyre V, Sansonetti PJ, Mulard LA. Characterization of functional oligosaccharide mimics of the *Shigella flexneri* serotype 2a O-antigen: implications for the development of a chemically defined glycoconjugate vaccine. *J Immunol* 2006;176:1686-1694.
114. Initiative for Vaccine Research, Infectious disease, Shigellosis, Vaccine. [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/diarrhoeal/en/index6.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index6.html)
115. Mel D, Gangarosa EJ, Radovanovic ML, Arsic BL, Litvinjenko S. Studies on vaccination against bacillary dysentery. 6. Protection of children by oral immunization with streptomycin-dependent *Shigella* strains. *Bull World Health Organ* 1971;45:457-464.
116. Levine MM, Gangarosa EJ, Barrow WB, Weiss CF. Shigellosis in custodial institutions. V. Effect of intervention with streptomycin-dependent *Shigella sonnei* vaccine in an institution with endemic disease. *Am J Epidemiol* 1976;104:88-92.
117. Venkatesan M, Fernandez-Prada C, Buysse JM, Formal SB, Hale TL. Virulence phenotype and genetic characteristics of the T32-ISTRATI *Shigella flexneri* 2a vaccine strain. *Vaccine* 1991;9:358-363.
118. Katz DE, Coster TS, Wolf MK, Trespalacios FC, Cohen D, Robins G, Hartman AB, Venkatesan MM, Taylor DN, Hale TL. Two studies evaluating the safety and immunogenicity of a live, attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine (SC602) and excretion of vaccine organisms in North American volunteers. *Infect Immun* 2004;72:923-930.
119. Sadorge C, Ndiaye A, Beveridge N, Frazer S, Giemza R, Jolly N, Johnson J, Liddy H, Cosgrove CA, Allavena P, Mantovani A, Bechet S, Fontaine-Thompson A, Griffin GE, Dupont F, Sansonetti PJ, Lewis DJ. Phase 1 clinical trial of live attenuated *Shigella dysenteriae* type-1 DeltaicsA Deltaent Deltaefp DeltastxA: HgR oral vaccine SC599 in healthy human adult volunteers. *Vaccine* 2008;26:978-987.
120. Kotloff KL, Pasetti MF, Barry EM, Nataro JP, Wasserman SS, Sztein MB, et al. Deletion in the *Shigella* enterotoxin genes further attenuates *Shigella flexneri* 2a bearing guanine auxotrophy in a phase 1 trial of CVD 1204 and CVD 1208. *J Infect Dis* 2004;190:1745-1754.
121. Kotloff KL, Simon JK, Pasetti MF, Sztein MB, Wooden SL, Livio S, Nataro JP, Blackwelder WC, Barry EM, Picking W, Levine MM. Safety and immunogenicity of CVD 1208S, a live, oral DeltaguaBA Deltasen Deltaset *Shigella flexneri* 2a vaccine grown on animal-free media. *Hum Vaccin* 2007;3:268-275.
122. Orr N, Katz DE, Atsmon J, Radu P, Yavzori M, Halperin T, Sela T, Kayouf R, Klein Z, Ambar R, Cohen D, Wolf MK, Venkatesan M, Hale TL. Community-based safety, immunogenicity, and transmissibility study of the *Shigella sonnei* WRSS1 vaccine in Israeli volunteers. *Infect Immun* 2005;73:8027-8032.
123. McKenzie R, Venkatesan MM, Wolf MK, Islam D, Grahek S, Jones AM, Bloom A, Taylor DN, Hale TL, Bourgeois AL. Safety and immunogenicity of WRSd1, a live attenuated *Shigella dysenteriae* type 1 vaccine candidate. *Vaccine* 2008;26:3291-3296.
124. Ranallo RT, Thakkar S, Chen Q, Venkatesan MM. Immunogenicity and characterization of WRSF2G11: a second generation live attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain. *Vaccine* 2007;25:2269-2278.
125. McKenzie R, Walker RI, Nabors GS, Van De Verg LL, Carpenter C, Gomes G, Forbes E, Tian JH, Yang HH, Pace JL, Jackson WC, Bourgeois AL. Safety and immunogenicity of an oral, inactivated, whole-cell vaccine for *Shigella sonnei*: preclinical studies and a Phase I trial. *Vaccine* 2006;24:3735-3745.
126. Kaminski RW, Turbyfill KR, Oaks EV. Mucosal adjuvant properties of the *Shigella* invasin complex. *Infect Immun* 2006;74:2856-2866.
127. Oaks EV, Turbyfill KR. Development and evaluation of a *Shigella flexneri* 2a and *S. sonnei* bivalent invasin complex (Invaplex) vaccine. *Vaccine* 2006;24:2290-2301.

128. Sansonetti PJ. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G319-G323.
129. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ* 1999;77:651-666.
130. Bennish M, Griffiths J, Salam A, Bhan M. Clinical Update: Shigellosis. *Dialogue on Diarrhoea* Supplement. 1991;44:4
131. Newman CPS. Surveillance and control of *Shigella sonnei* infection. *Comm Dis Rep Rev* 1993; 3:R6368.
132. Levine MM. Shigellosis. In: Hunter W, Strickland G, Kersey R eds. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. 8<sup>th</sup> ed. W.B Saunders Company 2000;319-323.
133. Kaplan PJ, Hughes MJ, Cohen ML, Samba EM, Kabore AB. In: Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, 1999.
134. Keusch GT, Bennish LM Shigellosis. Evans AS, Brachman PS eds. In: Bacterial Infections of Humans Epidemiology and Control. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Plenum Medical, 1991:593-615.
135. Berkman E. Ankara'da izole edilen *Shigella*'ların epidemiyoloji, serotipleri ve antibiyotiklere dirençlilikleri. *Türk Hij Den Biyol Derg* 1991;48:171-179.
136. Ceyhan M, Akan Ö, Kanra, Ecevit Z, Seçmeer G, Berkman E. Changing patterns of the prevalence of different *Shigella* species and their antibiotic susceptibilities in Ankara, Turkey. *J Diarrhoeal Dis Res* 1996;14:187-189.
137. Yurdakök K, Şahin N, Özmert E, Berkman E. [abstract] *Shigella* gastroenteritis: clinical and epidemiological aspects, and antibiotic susceptibility. *Acta Paediatr Jpn* 1997;39:681-684.
138. 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.
139. DuPont HL, Levine MM, Hornick RB, formal SB. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis* 1989;159:1126-1128.
140. Munoz C, Baqar S, Verg L, Thupari J, Goldblum S, Olson JG, Taylor DN, Heresi GP, Murphy JR. Characteristics of *Shigella sonnei* infection of volunteers: signs, symptoms, immune responses, changes in selected cytokines and acute-phase substances. *Am J Trop Hyg* 1995;53:47-54.
- 141-158. Lohff CJ, Nissen GM, Magnant ML, Quinlisk MP, Tieskoetter PL, Kowalsky PL, Buss PA, Link TA, Corrigan MR, Viner JP, Behnke AJ, Demartino MS, Houston AK. Shigellosis outbreak associated with an unchlorinated fill-and-drain wading pool-Iowa, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001;50:797-800.
142. Crowe L, Lau W, McLeod L, Anand JM, Ciebin B, Leber C, McCartney S, Easy R, Clark J, Rodgers F, Ellis A, Thomas A, Shields L, Tate P et al. Outbreaks of *Shigella sonnei* infection associated with eating fresh parsley United States and Canada, July-August 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48:285-289.
143. Kapperud G, Rorvik LM, Hasseltvedt V, Hoiby EA, Iversen BG, Stavelant K, Johnsen G, Leitao J, Herikstad H, Andersson Y. Outbreak of *Shigella sonnei* infection traced to imported iceberg lettuce. *J Clin Microbiol* 1995;33:609-614.
144. Levine OS, Levine MM. Houseflies (*Musca domestica*) as mechanical vectors of shigellosis. *Rev Infect Dis* 1991;13:688-696.
145. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M; *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:1-46.
146. Wentworth BB. Bacteriophage typing of the staphylococci. *Bacteriol Rev* 1963;7:253-272.
147. Audurier A, Martin C. Phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 1989;8:251-257.
148. Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesus J, Platt DJ, Olsen JE. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect* 2000;125:229-255.

149. Wolf MK. Occurrence, distribution and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 569–584.
150. Maslow JN, Ellis J, Mulligan M, Arbeit R. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993;17:153–164.
151. Owen RJ. Chromosomal DNA fingerprinting: a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens. *J Med Microbiol* 1989;30:89–99.
152. Van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:174–184.
153. Tibayrenc M. Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:401–429.
154. De Gruijter JM, Gasser RB, Polderman AM, Asigri V, Dijkshoorn L. High resolution DNA fingerprinting by AFLP to study the genetic variation among *Oesophagostomum bifurcum* (Nematoda) from human and nonhuman primates from Ghana. *Parasitology* 2005;130:229–237.
155. Lessig R, Zoledziwska M, Fahr K, Edelman J, Kostrzewa M, Dobosz T, Kleeman WJ. Y-SNP-genotyping: a new approach in forensic analysis. *Forensic Sci Int* 2005;154:128–136.
156. Van Belkum A. High-throughput epidemiological typing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:86–100.
157. Pitt TL. Bacterial typing systems: the way ahead. *J Med Microbiol* 1994; 40:1–2.
158. Bernards AT, Harinck HI, Dijkshoorn L, Van der Reijden T, Van den Broek PJ. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:1002–1004.
159. Harbarth S, Albrich W, Goldmann DA, Huebner J. Control of multiply resistant cocci: do international comparisons help? *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 251–261.
160. Mermel LA, McCormick RD, Springman SR, Maki DG. The pathogenesis and epidemiology of catheter-related infection with pulmonary artery Swan-Ganz catheters: a prospective study utilizing molecular subtyping. *Am J Med* 1991;91:197S–205S.
161. Grothues D, Tummler B. New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *P. aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1991;5:2763–2776.
162. Maslow NJ, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993;17:153–164.
163. Maslow NJ, Mulligan ME. Epidemiologic typing systems. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17:595–604.
164. Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987;138:569–578.
165. Tenover F, Arbeit RD, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hebert GA, Hill B, Hollis R. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *S. aureus*. *J Clin Microbiol* 1994;32: 407–415.
166. Sloos JH, Horrevorts AM, Van Boven CP, Dijkshoorn L. Identification of multiresistant *Staphylococcus epidermidis* in neonates of a secondary care hospital using pulsed field gel electrophoresis and quantitative antibiogram typing. *J Clin Pathol* 1998;51:62–67.
167. Fluit AC, Van der Bruggen JT, Aarestrup FM, Verhoef J, Jansen WT. Priorities for antibiotic resistance surveillance in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:410–417.
168. Frasch CE. Serogroup and serotype classification of bacterial pathogens. *Methods Enzymol* 1994;235:159–174.
169. Gimenez DF. Serological classification and typing of *Clostridium botulinum*. *Dev Biol Stand* 1976;32:175–183
170. Coimbra RS, Grimont F, Grimont PA. Identification of *Shigella* serotypes by restriction of amplified O-antigen gene cluster. *Res Microbiol* 1999; 50: 543–553.
171. Weller TM. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? *J Hosp Infect* 2000;44:160–172.

172. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser J, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986;51:873–884.
173. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-Based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1661-1669.
174. Pfaller M .Molecular epidemiology in the care of patients. *Arch Pathol Lab Med.*1999;123:1007-1010.
175. Schouls LM, Van der Ende A, Damen M, Van de Pol I. Multiple locus variable number of tandem repeat analysis of *Neisseria meningitidis* yields groupings similar to those obtained by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2006;44:1509–1518.
176. Facklam R, Beall B, Efstratiou A, Fischetti V, Johnson D, Kaplan E, Kriz P, Lovgren M, Martin D, Schwartz B, Totolian A, Bessen D, Hollingshead S, Rubin F, Scott J, Tyrell G. emm Typing and validation of provisional M types for group A *Streptococci*. *Emerg Infect Dis* 1999;5:247–253.
177. Chan MS, Maiden MC, Spratt BG. Database driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics* 2001;17:1077–1083.
178. Sullivan CB, Jefferies JM, Diggle MA, Clarke SC. Automation of MLST using third generation liquid handling technology. *Mol Biotechnol* 2006;32: 219–226.
179. Schwartz D, Cantor C. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984;37:67-75.
180. Chu G, Vollrath D, Davis R. Separation of large DNA molecules by contour- clamped homogeneous electric fields. *Science* 1986;234:1582-1585.
181. 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.
182. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-2239.
183. Garaizar J, Molina N, Laconcha I, Lau Baggasen D, Rementeria A, Vivanco A, Audicana A, Perales I. Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:5273-5281.
184. <http://www.cdc.gov/pulsenet>
185. Sethabutr O, Venkatesan M, Murphy GS, Eampokalap B, Hoge CW, Echeverria P. Detection of *Shigellae* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *J infect Disease* 1993;167:458-461
186. Pfaller M. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerg Infect Dis* 2001;7:312-318.
187. Soldati L, Piffaretti JC. Molecular typing of *Shigella* strains using pulsed field gel electrophoresis and genome hybridization with insertion sequences *Res Microbiol* 1991;142:489-498.
188. Kanra G, Akalın HE. Akut gastrointestinal infeksiyonlar. In: Kanra G ed.İnfeksiyon Hastalıkları, 2. Baskı. Ankara: *Güneş Kitabevi* 1993:127-151.
189. Kuzucu Ç, Baktır E, Acar N. 1998-1999 yılları arasında izole edilen *Salmonella* ve *Shigella* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2001;58:11-14.
190. Aysev AD, Giriz H. Drug resistance of *Shigella* strains isolated in Ankara, Turkey, 1993-1996. *Scand J InfectDis* 1998; 30: 351-353.
191. Kılıç D, Tülek N, Tuncer G, Doganci L, Willke A. Antimicrobial susceptibilities and ESBL production rates of *Salmonella* and *Shigella* strains in Turkey. *Clin Micr and Infect* 2001;7:341-342.
192. Akçalı A, Levent B, Akbaş E, Esen B. Türkiye'nin bazı illerinde izole edilen *Shigella sonnei* suşlarının antimikrobiyal direnç ve "Pulsed Field" jel elektroforezi yöntemleri ile tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2008;42:563-572.
193. Karacan C, Tavıl B, Topal Y, Zorlu P, Tayman C. Evaluation of shigellosis in a Turkish children's hospital. *Pediatr Int* 2007;49:589-592



194. Özmert, E. N., Göktürk B., Yurdakök K., Yalçın S. S., Gür D. *Shigella* Antibiotic Resistance in Central Turkey: Comparison of the Years 1987-1994 and 1995-2002. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:359-362
195. Doğancı L, Baylan O, Albay A, Gün H. Bacterial pathogens in childhood diarrhea in Turkey. *Ped Infect Dis J* 1997; 16: 1097-9.
196. Wilke A, Arman D, Cokca F, Sümerkan B, Söyletir G, Bakir M, Sirmatel F, Leblebicioglu H, Kijlijç S. Resistance of *Salmonella* and *Shigella* in Turkey. *Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 5: 588-90.
197. Ceyhan M, Akan Ö, Kanra G, Ecevit Z, Seçmeer G, Berkman E. Changing patterns of the prevalence of the different *Shigella* species and their antibiotic susceptibilities in Ankara Turkey. *J Diarrhoeal Dis Res* 1996; 14:187-9
198. Acikgöz ZC, Gülay Z, Biçmen M, Gocer S, Gamberzade S. CTX-M-3 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a *Shigella sonnei* clinical isolate: first report from Turkey *Scand J Infect. Dis* 2003;35:503-505
199. Acikgöz ZC, Koseoğlu Eser O, Kocagöz S. CTX-M-3 Type beta-lactamase Producing *Shigella sonnei* Isolates from pediatric bacillary Dysentery Cases, *Jpn J Infect Dis* 2008;61:135-137
200. Ahamed J. And Kurdu M. Molecular characterization of the SHV-11 beta-lactamase of *Shigella dysenteriae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2081-2083
201. Houang ET, Chu Y, Ng T, Cheng AF. Study of the relatedness of isolates of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* obtained in 1986 and 1987 and in 1994 and 1995 from Hong Kong. *J Clin Microbiol* 1998,36:2404-2407
202. Liu PY, Lau YJ, Hu BS, Shyr JM, Shi ZY, Tsai WS, Lin YH and Tseng CY. Analysis of clonal relationship among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *J Clin Microbiol* 1995;33:1779-1783
203. Lin CS, Wang TK, Tsai JL, Ho SI, Lee CL, Lu CH. Molecular subtyping of *Shigella flexneri* 3a isolates by plasmid profile analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2001;34:103-108.
204. Hoe CH, Yasin RM, Koh YT, Thong KL. Antimicrobial susceptibility and pulsed-field gel electrophoresis of *Shigella sonnei* strains in Malaysia (1997-2000) *J Appl Microbiol* 2004-2005;99:133-140.
205. Pazhani GP, Niyogi SK, Singh AK, Sen B, Taneja N, Kundu M, Yamasaki S, Ramamurthy T. Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* species isolated from epidemic and endemic cases of shigellosis in India. *J Med Microbiol* 2008;57:856-863
206. Gaynor K, Park SY, Kanenaka R, Colindres R, Mintz E, Ram PK, Kitsutani P, Nakata M, Wedel S, Boxrud D, Jennings D, Yoshida H, Tosaka N, He H, Ching-Lee M, Effler PV. International foodborne outbreak of *Shigella sonnei* infection in airline passengers. *Epidemiol Infect* 2009;137:335-341