***Salmonella* ve *Shigella* Klinik İzolatlarında Azitromisin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin ve Karbapenem Direncinin Araştırılması**

Investigation of Azithromycin Minimum Inhibitory Concentration Values and Carbapenem Resistance in *Salmonella* and *Shigella* Clinical Isolates

Tuğrul HOŞBUL¹(ID), Canset Nur AYDOĞAN¹(ID), Sinem KAYA²(ID), Belkıs LEVENT³(ID), Hilal Türkmen ALBAYRAK²(ID), Fatih ŞAHİNER¹(ID), Ramazan GÜMRAL¹(ID), Bülent BOZDOĞAN^{4,5}(ID)

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ University of Health Sciences, Gülhane Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

² University of Health Sciences, Gülhane Training and Research Hospital, Laboratory of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

³ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara.

³ Turkish Public Health Institution, National Microbiology Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

⁴ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

⁴ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Turkey.

⁵ Adnan Menderes Üniversitesi, Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Araştırma Merkezi (REDPROM), Aydın.

⁵ Adnan Menderes University, Recombinant DNA and Recombinant Protein Research Center (REDPROM), Aydın, Turkey.

Makale Atfı: Hoşbul T, Aydoğan CN, Kaya S, Levent B, Türkmen Albayrak H, Şahiner F ve ark. *Salmonella* ve *Shigella* klinik izolatlarında azitromisin minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin ve karbapenem direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2021;55(4):480-491.

ÖZ

Salmonella ve *Shigella* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılan antibiyotiklere karşı artan direnç görülmektedir. Azitromisin, *Salmonella* ve *Shigella* enfeksiyonları için iyi bir alternatif tedavi seçeneği sunmaktadır. Ancak Türkiye’de azitromisin duyarlılığı konusunda kısıtlı veri bulunmaktadır. Bu çalışmada *Salmonella* ve *Shigella* türlerinin azitromisine olan duyarlılığının değerlendirilmesi, minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri ile disk difüzyon zon çapı değerlerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, izolatlarda meropenem ve birinci basamak antibiyotik seçeneklerine olan duyarlılık da araştırılmıştır. Hastanemizde 2014-2018 döneminde elde edilen toplam 170 *Salmonella* ve 76 *Shigella* klinik izolatının azitromisin, meropenem, ampisilin, pefloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol, seftazidim ve sefotaksim duyarlılıkları test edilmiştir. İzolatlar matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometresi ile tanımlanmıştır. Çalışma izolatları, referans laboratuvar tarafından konvansiyonel lam aglütinasyon yöntemi kullanılarak doğrulanmış ve serotiplendirilmiştir. İzolatların azitromisin ve diğer antibiyotiklere olan duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile değer-

lendirilmiştir. Azitromisinin MİK değerleri, referans yöntem olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretiminin tespiti için kombine disk difüzyon testi kullanılmıştır. Makrolid ve karbapenem direnç genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmış ve saptanan direnç genleri dizi analizi ile doğrulanmıştır. Test edilen 76 *Shigella* izolatının 64 (%84.2)'ü *Shigella sonnei*, 10 (%13.2)'ü *Shigella flexneri*, 1 (%1.3)'i *Shigella boydii* ve 1 (%1.3)'i *Shigella dysenteriae* olarak tanımlanmıştır. *Salmonella* izolatlarının 170'nin 131 (%77)'i *Salmonella enteritidis*, 11 (%6.5)'i *Salmonella* Typhimurium, 8 (%4.7)'i *Salmonella* Kentucky, 5 (%2.9)'i *Salmonella* Paratyphi B, 4 (%2.4)'ü *Salmonella* Infantis, 3 (%1.8)'ü *Salmonella* Choleraesuis ve 8 (%4.7)'i diğer serovarlar olarak tanımlanmıştır (*Salmonella* Agona, *Salmonella* Dabou, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Muenchen, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Paratyphi C, *Salmonella* Senftenberg). GSBL üretimi *Shigella* izolatlarında %7.9 (6/76) ve *Salmonella* izolatlarında %2.9 (5/170) olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda karbapenem dirençli, bla_{OXA-48} direnç geni pozitif bir *Salmonella* Senftenberg izolatı saptanmıştır. İzolatın meropenem MİK değeri gradiyent difüzyon testi ile > 32 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Tüm izolatlar arasında 128 µg/ml MİK değeri ile azitromisine dirençli sadece bir *Shigella boydii* izolatı tespit edilmiştir. İzolat, PCR ile mphA gen varlığı açısından pozitif olarak bulunmuştur. Disk difüzyon testinde, azitromisine dirençli izolat dışında test edilen tüm izolatlarda azitromisin inhibisyon zon çapı ≥ 12 mm olarak bulunmuştur ve azitromisin MİK'leri sıvı mikrodilüsyon ile ≤ 16 µg/ml olarak belirlenmiştir. *Salmonella* ve *Shigella* türlerinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı artan direnç ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda karbapeneme dirençli bir *Salmonella* izolatının saptanması, karbapenem direncinin diğer *Enterobacterales* türlerine yayılmasının küresel sorunlara neden olabileceğini göstermektedir. *Salmonella* ve *Shigella* türleri için azitromisinin antimikrobiyal duyarlılık testinin uygulanması, tüm türler için kabul edilmiş in vitro sınır değerlerinin bulunmaması nedeniyle zordur. Sonuç olarak verilerimiz, azitromisinin *Salmonella* ve *Shigella* türlerinin neden olduğu gastrointestinal hastalıkların tedavisi için iyi bir alternatif terapötik seçenek olduğunu göstermektedir. Klinik verilerle desteklenen uygun in vitro sınır değerlerini sağlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Azitromisin; karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*; *Salmonella*; *Shigella*.

ABSTRACT

Increasing resistance to first-line antibiotics used in the treatment of infections caused by *Salmonella* and *Shigella* species is emerging. Azithromycin presents a good alternative treatment option for *Salmonella* and *Shigella* infections. However, there are limited data regarding the susceptibility of azithromycin in Turkey. In this study, we aimed to evaluate the susceptibility of *Salmonella* and *Shigella* species to azithromycin, to determine and compare the minimum inhibitory concentration (MIC) values and disk diffusion zone diameters. In addition, susceptibility to meropenem and first-line antibiotic options in isolates was also investigated. A total of 170 *Salmonella*, 76 *Shigella* clinical isolates collected between 2014 and 2018 in our hospital were tested for their susceptibility to azithromycin, meropenem, ampicillin, pefloxacin, trimetoprim-sulfamethoxazole, ceftazidime, and cefotaxime. Isolates were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. The isolates were confirmed and serotyped by the reference laboratory using the conventional slide agglutination method. Susceptibility of the isolates to azithromycin and other antibiotics was evaluated by Kirby-Bauer disk diffusion method. MIC values of azithromycin were determined by the reference broth microdilution method. Combined disk diffusion test was used for the detection of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production. Polymerase chain reaction was performed for macrolide and carbapenem resistance genes and the detected resistance genes were confirmed by sequencing. Of the 76 *Shigella* isolates tested, 64 (84.2%) were identified as *Shigella sonnei*, 10 (13.2%) as *Shigella flexneri*, one (1.3%) as *Shigella boydii*, and one (1.3%) as *Shigella dysenteriae*. Among the 170 *Salmonella* isolates, 131 (77%) were identified as *Salmonella enteritidis*, 11 (6.5%) as *Salmonella* Typhimurium, 8 (4.7%) as *Salmonella* Kentucky, 5 (2.9%) as *Salmonella* Paratyphi B, 4 (2.4%) as *Salmonella* Infantis, 3 (1.8%) as *Salmonella* Choleraesuis, and 8 (4.7%) as other serovars (*Salmonella* Agona, *Salmonella* Dabou, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Muenchen, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Paratyphi C, *Salmonella* Senftenberg), respectively. ESBL production was determined as 7.9% (6/76) in *Shigella* isolates and 2.9% (5/170) in *Salmonella* isolates. A carbapenem resistant *S. Senftenberg* isolate positive for the bla_{OXA-48} resistance gene was detected in our study. Meropenem MIC value of the isolate was detected as > 32 µg/ml with gradient

diffusion test. Among all isolates, only one *S.boydii* isolate was detected as resistant to azithromycin with a MIC value of 128 µg/ml. The isolate was positive for the existence of mphA gene by PCR. In the disk diffusion test, azithromycin inhibition zone diameters were ≥ 12 mm in all of the tested isolates, except for the azithromycin-resistant isolate, and the azithromycin MICs were determined as ≤ 16 µg/ml by broth microdilution. Increasing resistance to commonly used antibiotics in *Salmonella* and *Shigella* species is emerging. The detection of a carbapenem-resistant *Salmonella* isolate in our study indicates that the spread of carbapenem resistance to other *Enterobacteriales* species may cause global problems. Antimicrobial susceptibility testing of azithromycin for *Salmonella* and *Shigella* species has been difficult to establish due to the lack of approval in vitro breakpoints for all species. Consequently, our data shows that azithromycin exhibits as a good alternative therapeutic choice for the treatment of gastrointestinal diseases caused by *Salmonella* and *Shigella* species. Further studies are needed to provide appropriate in vitro breakpoints supported by clinical data.

Keywords: Azithromycin; carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; *Salmonella*; *Shigella*.

GİRİŞ

Enterobacteriales ailesi içindeki *Salmonella* ve *Shigella* cinsinin üyeleri, esas olarak enteritten sistemik enfeksiyonlara varan, hafiften ağır formlara kadar değişen klinik tablolara neden olan ve dünyanın çoğu yerinde özellikle yetersiz hijyen ve sanitasyona sahip gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde ciddi morbidite ve mortaliteden sorumlu enterik patojenlerdir¹.

Salmonella cinsi, *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olarak başlıca iki türden oluşur ve 2500'den fazla serotipe ayrılır. *S.enterica* türü çoğunlukla insan enfeksiyonlarından izole edilirken, *S.bongori* ise nadiren insan enfeksiyonlarından izole edilir². *Salmonella enterica* alt tür enterica serovar Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B ve Paratyphi C tifoidal *Salmonella* (TS) olarak gruplanırken, diğer *S.enterica* serovarlara tifoidal olmayan *Salmonella* (NTS) olarak gruplandırılır³. Tifo ateşi ve paratifoid ateş, birlikte enterik ateş olarak adlandırılır. Tifo olgularının yaklaşık %80-90'ı, Güney orta ve Güneydoğu Asya'daki Bangladeş, Hindistan, Pakistan, Vietnam, Endonezya, Laos, Nepal ve Çin gibi ülkelerde ortaya çıkar⁴. Tifoidal ve tifoidal olmayan invaziv *Salmonella* enfeksiyonları yılda yaklaşık 3.4 milyon insanı etkiler ve özellikle yoksul koşullarda 600 000'den fazla ölüme neden olur⁵.

Şigelloz (basilli dizanteri), *Shigella* türlerinin neden olduğu, dışkıda mukus ve kan bulunması ile seyreden ve insanlarda görülen bir akut gastrointestinal sistem hastalığıdır¹. Enfeksiyonların, suşun virülansı ve konağın bağışıklık durumuna bağlı olarak özellikle küçük çocuklarda ve yetişkinlerde ölümcül olabileceği bilinmektedir. *Shigella* cinsi, *Shigella dysenteriae* (grup A), *Shigella flexneri* (grup B), *Shigella boydii*, (grup C) ve *Shigella sonnei* (grup D) olarak dört ana serolojik gruba ayrılmıştır⁶. *Shigella* türlerine bağlı enfeksiyonlarının 2016 yılında tüm yaş gruplarında 212 438 olgunun ve beş yaşından küçük çocuklarda 63 713 olgunun ölümüne neden olduğu tahmin edilmektedir⁷. Şigellozda ölümlerin önlenmesi, semptomların hafifletilmesi, salgınlarda bakterilerin atılım süresinin kısaltılması gibi nedenlerle Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından, kanlı diyaresi olan tüm olgularda antimikrobiyal tedavi önerilmektedir⁶.

Salmonella ve *Shigella* enfeksiyonlarının antibiyotik tedavisi oral veya parenteral yoldan mümkündür. Ampisilin, trimetoprim-sülfametoksazol ve kloramfenikol birinci basamak

antibiyotikler olarak kabul edilir ve bu üç ilaca dirençli suş çoklu ilaç dirençli (ÇİD) olarak adlandırılır. Dirençli suşların yaygın olduğu bölgelerde kinolon kullanımının artmasıyla birlikte, florokinolonlara direnç de artmıştır. Üçüncü kuşak sefalosporinler ve azitromisin, ÇİD izolatlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan alternatif antibiyotiklerdir^{2,3,5}. Üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç henüz yaygın değildir ancak özellikle Güney Asya bölgesinden genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten suşlar bildirilmiştir³⁻⁶. Özellikle karbapenem dirençli *Salmonella* ve *Shigella* izolatları dünyanın bazı bölgelerinde nadiren bildirilmektedir^{8,9}.

Azitromisin, 15 halkalı azalid olup makrolid grubu antibiyotiklerin bir üyesidir ve enterik ateş, şigelloz ve invaziv olmayan *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisinde etkili bir antimikrobiyal seçenek gibi görünmektedir^{3,4,10}. Ancak *Salmonella* ve *Shigella* türleri için azitromisinin antimikrobiyal duyarlılık testi, in vitro ve klinik sınır değerlerinin doğrulanamaması nedeniyle sorun teşkil etmektedir. Türkiye'de *Salmonella* ve *Shigella* türlerinin azitromisine duyarlılığı ile ilgili sınırlı veri bulunmaktadır. Çalışmamızda, bir üçüncü basamak eğitim ve araştırma hastanesinde izole edilen *Salmonella* ve *Shigella* klinik izolatların azitromisin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ve disk difüzyon zon çaplarının değerlendirilmesinin yanı sıra karbapenem duyarlılığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 22.10.2019 ve Karar No: 19/314 ile 19/315).

Klinik İzolatlar ve Tanımlanması

Hastanemiz 2014-2018 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden toplanan 170 *Salmonella* ve 76 *Shigella* izolatı çalışmaya dahil edildi. İzolatlar, standart biyokimyasal testlere ek olarak matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi [matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)] yöntemi ile tanımlandı. Tüm izolatlar, özgül antiserumlar içeren geleneksel lam aglütinasyon yöntemi kullanılarak T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı tarafından doğrulandı ve serotiplendirildi. İzolatlar %20 gliserol içeren beyin-kalp sıvı besiyerinde sonraki aşamalara kadar -20°C'de saklandı.

İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile izolatların antimikrobiyal duyarlılık testleri Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)] kriterlerine göre uygulandı¹¹. İzolatlar ampisilin (10 µg), pefloksasin (5 µg), trimetoprim-sülfametoksazol (1.25/23.75 µg), meropenem (10 µg), azitromisin (15 µg), seftazidim (10 µg) ve sefotaksim (5 µg) için test edildi. Pefloksasin diski florokinolon direnci için tarama amaçlı kullanıldı. Ayrıca, azitromisin MİK'leri sıvı mikrodilüsyon (SMD) ile 0.125-128 µg/ml aralığında tespit edildi. Sefalosporinlere

duyarlılığı azalmış izolatlarda GSBL üretimi, EUCAST tavsiyelerine göre sefotaksim-klavulonat (5/10 µg) ve seftazidim-klavulonat (10/10 µg) diskleri kullanılarak kombine disk testi ile belirlendi. Karbapenemazların tespiti için modifiye Hodge testi (MHT) ve basit karbapenem inaktivasyon yöntemi (sCIM) kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık testlerinde *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 referans suşları kullanıldı.

PCR için DNA Eldesi

Bu amaçla, her bir izolattan triptik soy buyyona tek koloni ekim yöntemi ile ekim yapıldı ve plaklar aerop ortamda 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1 ml süspansiyon 12 000 g'de beş dakika santrifüj edildi PCR4DNA ekstraksiyon kiti (R Tech, Türkiye) ile üreticinin önerileri doğrultusunda elde edilen çökeltiden DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve takiben polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulandı.

Karbapenemaz ve Makrolid Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Azitromisin için MİK değerleri ≥ 4 µg/ml tespit edilen ve ayrıca inhibisyon zon çapı ≤ 12 mm olan izolatlarda *ermB*, *ereA*, *mphA* ve *mefA* makrolid direnç genlerinin varlığı PCR ile araştırıldı¹²⁻¹⁴. Karbapenem direnç genlerinden *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} ve *bla*_{VIM} varlığı PCR ile değerlendirildi¹⁵. PCR amplifikasyonları, 1 µl dNTP karışımı (10 mM), her bir primerden 0.4 µl (100 pmol), Mg ++ içeren enzim tamponundan (10X) 5 µl, 0.5 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl) (ABM, Kanada) ve 2 µl kalıp DNA içeren 50 µl'lik reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Her gen ayrı ayrı amplifiye edildi. Amplifikasyon programı, 94°C'de beş dakika başlangıç denatürasyonu takiben, 35 döngü 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 54-64°C'de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C'de bir dakika uzama basamaklarının ardından 72°C'de yedi dakikalık son uzama döngüsü halinde gerçekleştirildi¹²⁻¹⁵. Ürünler Safeview (ABM, Kanada) ile boyanmış %1'lik agaroz jelde, 100 volt akım altında 30 dakika süreyle yürütüldü ve UV ışık altında görüntüldü. Amplifiye edilmiş ürünler, Tablo I'de belirtilen boyutuna göre tanımlandı. PCR ürünleri, direnç genlerini doğrulamak için saflaştırıldı ve sekans ile doğrulandı. Amplikonların dizi analizi Medsantek firması (İstanbul) tarafından yapıldı. PCR ürünleri EXO-SAP pürifikasyon kiti kullanılarak saflaştırıldı; "Big-Dye cycle sequencing" reaksiyonu ve alkol pürifikasyonu yöntemleri ile ABI 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı kullanılarak dizilendi. Her bir izolat için Bioedit yazılım programı ile düzenlenen sekans dizileri, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi [National Center for Biotechnology Information GenBank (NCBI-Gen Bankası)] veri tabanı üzerinde bulunan BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) dizi eşleştirme analizi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Bir üçüncü basamak eğitim ve araştırma hastanesi 2014-2018 yılları arasında elde edilen 170 *Salmonella* ve 76 *Shigella* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Klinik izolatların enfeksiyon kaynağına göre dağılımı incelendiğinde, *Salmonella* izolatlarından 159'u dışkı, yedisi kan, ikisi apse ve ikisi yara örneklerinden; bir kan kültürü izolatı dışında tüm *Shigella*

Tablo I. Karbapenem ve Makrolid Direnç Genlerine Ait Çalışmada Kullanılan Primerler ve Dizilimleri

Direnç geni	Primer dizilimi (5'-3')	PCR Ürünü (Bp)	Kaynak
<i>mphA</i>	GTG AGG AGG AGC TTC GCG AG TGC CGC AGG ACT CGG AGG TC	403	12
<i>ereA</i>	GCC GGT GCT CAT GAA CTT GAG CGA CTC TAT TCG ATC AGA GGC	420	12
<i>mefA</i>	AGT ATC ATT ATT CAC TAG TGC TCC TCC TGG TAC TAA AAG TGG	346	13
<i>ermB</i>	GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC	639	14
<i>bla_{OXA48}</i>	TGT TTT TGG TGG CAT CGA T GTA AMR ATG CTT GGT TCG C	177	15
<i>bla_{NDM-1}</i>	TTG GCC TTG CTG TCC TTG ACA CCA GTG ACA ATA TCA CCG	82	15
<i>bla_{KPC}</i>	TCG CTA AAC TCG AAC AGG TTA CTG CCC GTT GAC GCC CAA TCC	798	15
<i>bla_{IMP}</i>	GAG TGG CTT AAT TCT CRA TC AAC TAY CCA ATA YRT AAC	120	15
<i>bla_{VIM}</i>	GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG	382	15

Bp: Baz çifti.

suşları dışkı örneklerinden izole edilmiştir.

Serotipleme sonuçlarına göre; 76 *Shigella* izolatından 64 (%84.2)'ü *S. sonnei*, 10 (%13.2)'ü *S. flexneri*, 1 (%1.3)'i *S. boydii* ve 1 (%1.3)'i *S. dysenteriae* olarak bulunmuştur. *Salmonella* izolatlarının 131 (%77)'i *S. Enteritidis*, 11 (%6.5)'i *S. Typhimurium*, 8 (%4.7)'i *S. Kentucky*, 5 (%2.9)'i *S. Paratyphi B*, 4 (%2.4)'ü *S. Infantis*, 3 (%1.8)'ü *S. Choleradis* ve 8 (%4.7)'i diğer serovarlar (*S. Agona*, *S. Dabou*, *S. Gallinarum*, *S. Hadar*, *S. Muenchen*, *S. Newport*, *S. Paratyphi C*, *S. Senftenberg*) şeklinde tespit edilmiştir. Çalışma izolatlarında tespit edilen serovarların dağılımı Tablo II'de sunulmuştur.

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile *Salmonella* izolatlarında ampisilin, pefloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol, sefotaksim, seftazidim ve meropeneme direnç oranları sırasıyla %14.7, %13.5, %2.9, %1.7, %1.2, %0.6 olarak saptanmıştır. *Shigella* izolatları ampisiline %15.8, pefloksasine %34.2, trimetoprim-sülfametoksazole %42.1, sefotaksime %7.9, seftazidime %2.6 dirençli olarak bulunmuş ve meropeneme direnç saptanmamıştır. GSBL üretimi *Shigella* izolatlarında %7.9 (6/76) ve *Salmonella* izolatlarında %2.9 (5/170) olarak bulunmuştur. *Salmonella* ve *Shigella* türleri arasındaki antimikrobiyal duyarlılık dağılımları Tablo III'te gösterilmiştir.

Disk difüzyon testinde yara yerinden soyutlanmış meropeneme dirençli bir *S. senftenberg* izolatı tespit edilmiş, İzolatın MHT ve sCIM ile karbapenemaz aktivitesi pozitif bulunmuş-

Tablo II. Salmonella Serovarylarının ve Shigella Türlerinin Dağılımı

Bakteriler	Sayı (%)
<i>Shigella sonnei</i>	64 (84.2)
<i>Shigella flexneri</i>	10 (13.2)
<i>Shigella boydii</i>	1 (1.3)
<i>Shigella dysenteriae</i>	1 (1.3)
Toplam	76 (100)
<i>Salmonella</i> Enteritidis	131 (77)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	11 (6.5)
<i>Salmonella</i> Kentucky	8 (4.7)
<i>Salmonella</i> Paratyphi B	5 (2.9)
<i>Salmonella</i> Infantis	4 (2.4)
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	3 (1.8)
Diğer <i>Salmonella</i> serovaryları*	8 (4.7)
Toplam	170 (100)

*S. Agona, S. Dabou, S. Gallinarum, S. Hadar, S. Muenchen, S. Newport, S. Paratyphi C, S. Senftenberg.

Tablo III. İzolatların Antibiyotiklere Duyarlılıkları

Antibiyotik	Bakteriler	Duyarlı, standart doz (%)	Duyarlı, yüksek doz (%)	Dirençli (%)
AM	<i>Salmonella</i> spp.	145 (85.3)		25 (14.7)
	<i>Shigella</i> spp.	64 (84.2)		12 (15.8)
PEF	<i>Salmonella</i> spp.	147 (86.5)		23 (13.5)
	<i>Shigella</i> spp.	50 (65.8)		26 (34.2)
SXT	<i>Salmonella</i> spp.	165 (97.1)		5 (2.9)
	<i>Shigella</i> spp.	38 (50)	6 (7.9)	32 (42.1)
CTX	<i>Salmonella</i> spp.	165 (97.1)	2 (1.2)	3 (1.7)
	<i>Shigella</i> spp.	69 (90.8)	1 (1.3)	6 (7.9)
CAZ	<i>Salmonella</i> spp.	155 (91.2)	13 (7.6)	2 (1.2)
	<i>Shigella</i> spp.	70 (92.1)	4 (5.3)	2 (2.6)
MEM	<i>Salmonella</i> spp.	169 (99.4)		1 (0.6)
	<i>Shigella</i> spp.	76 (100)		0

AM: Ampisilin, PEF: Pefloksasin, SXT: Trimetoprim sülfametoksazol, CTX: Sefotaksim, CAZ: Seftazidim, MEM: Meropenem.

*GSBL üretimi *Shigella* türlerinde %7.9 (6/76), *Salmonella* türlerinde %2.9 (5/170) olarak saptanmıştır.

tur. VITEK®2 otomatize sistemi (bio-Mérieux, Fransa) ile karbapenem dirençli olduğu belirlenmiştir ve meropenem MİK değeri gradient testi ile > 32 µg/ml olarak bulunmuştur. PCR analizinde izolat *bla*_{OXA-48} direnç geni için pozitif olarak bulunmuş ve direnç geni varlığı dizi analizi ile doğrulanmıştır.

Tablo IV. Sıvı Mikrodilüsyon ile İzolatlarda Saptanan Azitromisin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerleri Dağılımı

Bakteriler	MİK Aralığı (µg/ml)										
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
<i>Salmonella</i> spp.		1	9	22	113	20	2	3			
<i>Shigella</i> spp.	2	7	8	26	24	8					1

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon.

*Azitromisin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri *Salmonella* izolatlarında 2 ve 4 µg/ml, *Shigella* izolatlarında ise 1 ve 4 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Disk difüzyon testlerinde bir *S.boydii* izolatı dışında tüm *Shigella* ve tüm *Salmonella* izolatları inhibisyon zon çapı ≥ 12 mm olarak tespit edilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon ile azitromisin MİK değeri 128 µg/ml olan bir *S.boydii* izolatı dışında, tüm *Salmonella* ve *Shigella* izolatlarında MİK değerleri ≤ 16 µg/ml olarak belirlenmiştir. Azitromisinin MİK değerleri, *Salmonella* izolatları için 0.25 µg/ml ile 16 µg/ml aralığında ve *Shigella* izolatları için 0.125 µg/ml ile 128 µg/ml aralığında bulunmuştur. Azitromisin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri *Salmonella* izolatlarında 2 ve 4 µg/ml; *Shigella* izolatlarında ise 1 ve 4 µg/ml olarak tespit edilmiştir. İzolatların azitromisin MİK değerleri Tablo IV'te gösterilmiştir. Azitromisine dirençli izolatta PCR ile mphA geni tespit edilmiş ve mphA geninin varlığı dizi analizi ile doğrulanmıştır.

TARTIŞMA

Salmonella türleri; gastroenterit, bakteriyemi, sepsis, enterik ateş, osteomiyelit, menenjit ve endokardit gibi fokal ve sistemik enfeksiyonlara neden olur. *Salmonella*, tüm dünyada insanlarda bakteriyel enterik hastalıkların önemli bir nedenidir^{1,2}. *Shigella* türleri bakteriyel gastroenteritin bir başka önemli bakteriyel nedenidir. Şigelloz mutlak bir insan hastalığıdır ve hastalığın yayılması kontamine yiyecek ve su, yakın temas veya cinsel temas yoluyla olur^{1,6,7}. Bu çalışma, hastanemiz *Salmonella* ve *Shigella* klinik izolatlarının esas olarak azitromisin ve meropenem karşı antimikrobiyal duyarlılıklarını değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Ülkemizde *Salmonella* ve *Shigella* türlerinde azitromisine duyarlılık hakkında literatür verisi sınırlıdır ve bu özellikle çoklu ilaca dirençli bakterilerle enfekte olan olgularda veya pediyatrik popülasyonda antimikrobiyal tedavi endike olduğunda son derece önemlidir.

Salmonella ve *Shigella* cinslerine ait enfeksiyonların endemik olduğu ülkelerde, daha önce enterik patojenler için birinci basamak tedavi seçenekleri ko-trimoksazol, ampisilin veya kloramfenikol antibiyotiklerdir. Bununla birlikte, 1980'lerin sonlarından bu yana yaygın olarak kullanılan bu antibiyotiklere karşı artan direnç nedeniyle, seftriakson veya sefotaksim gibi geniş spektrumlu sefalosporinler ve siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin gibi florokinolonlar hastalıkların tedavisinde bu eski ajanların yerini almıştır^{2,6,16,17}. Ayrıca, dünyanın çeşitli ülkelerinde karbapenemlere dirençli klinik izolatlar bildirilmiştir^{8,9}. Son zamanlarda, makrolid grubu antibiyotiklerden biri olan azitromisin, antibiyotik te-

davisi endike olduğunda ÇİD *Salmonella* ve *Shigella* türlerine bağlı komplike olmayan gastroenterit tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır^{4,10,17}.

Ülkemizde *Salmonella* ve *Shigella* cinslerinin antibiyotiklere olan duyarlılıklarının araştırıldığı çalışmalarda da, çalışmamızdaki bulgulara benzer şekilde, özellikle *Shigella* türlerinde birinci seçenek tedavi edici antibiyotiklere karşı daha yüksek oranlarda direnç bildirilmektedir. Gündoğdu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada¹⁸, 75 *Salmonella* izolatının %55.7'sini ampisiline, %7.6'sını trimetoprim-sülfametoksazole, %7.6'sını siprofloksasine, %6.3'ünü sefotaksime ve %1.3'ü kloramfenikole dirençli saptamıştır. Saran ve arkadaşları, 60 *Shigella* izolatında trimetoprim-sülfametoksazol direncini %91.6 ve ampisilin direncini %26.6 olarak bildirmiştir¹⁹. Cilo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada²⁰, 43 *S. Enteritidis* serotipinde ampisilin, kloramfenikol, trimetoprim-sülfametoksazol ve sefotaksim direncini sırasıyla %3.5, %0.7, %0.7 ve %0 olarak düşük düzeylerde saptamışlardır. Gülmez ve arkadaşları; ampisilin, trimetoprim-sülfametoksazol, nalidiksik asit ve siprofloksasin direncini 171 *Salmonella* izolatı için sırasıyla; %12, %6, %17 ve %4; 18 *Shigella* izolatı için sırasıyla %59, %72, %17 ve %6 şeklinde saptamıştır²¹. Altun ve Gür, 605 *Shigella* izolatını içeren kapsamlı çalışmalarında²² ampisiline %24.3, sefotaksime %3.6, trimetoprim-sülfametoksazole %74.2 ve nalidiksik asite %4.6 direnç oranları bildirmiş ve tüm izolatları siprofloksasine duyarlı olarak bulmuşlardır.

Azitromisinin *Salmonella* ve *Shigella* klinik izolatlarına karşı iyi in vitro aktivite gösterdiği birçok çalışmada bildirilmiştir. McAteer ve arkadaşları, Amerika Birleşik Devletleri'nde 1999-2015 yılları arasında pediatrik yaş grubunda Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi'ne ("Centers for Disease Control and Prevention, CDC") raporlanmış tifo ateşi verilerini derledikleri çalışmalarında, 2003 izolatın %61'nin florokinolonlara duyarlı olmadığını, %22'sinin ÇİD olduğunu ve tüm izolatların seftriakson ve azitromisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir²³. Browne ve arkadaşları 1990 ile 2018 yılları arasında enterik ateş ve antibiyotik direncine yönelik yapılmış çalışmaları derledikleri araştırmalarında²⁴, *S. Typhi* izolatlarında azitromisin direncinin araştırıldığı 22 çalışmanın 14'ünde direncin saptanmadığı, beşinde direncin %10'dan daha düşük saptandığı, diğer üç çalışmada direncin sırasıyla %13 (16 izolat), %34 (80 izolat), %85 (71 izolat) olarak saptandığını belirtmişlerdir. Ezernitchi ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada²⁵, SMD ile azitromisin direncini *S. flexneri* için %6 (26/423) ve *S. sonnei* için %2 (16/747) gibi düşük yüzdelerde bulmuşlardır. Darton ve arkadaşları, gradient testi ile 479 *Shigella* izolatının 22 (%4.8)'sinin azitromisine dirençli olduğunu bildirmiştir²⁶. Pediatrik hasta grubu kan kültürlerinden elde edilmiş 71 tifoidal *Salmonella* izolatını içeren bir diğer çalışmada, agar dilüsyon yöntemi ile azitromisin direnci %1.4 olarak bildirilmiştir²⁷. Azitromisinin klinik başarısı ve yüksek in vitro etkinliği ile ilgili çalışmalar bildirilmiş olmasına rağmen, ÇİD suşlarının endemik olduğu bölgelerde ve özellikle *Shigella* izolatları için aksini bildiren verileri içeren çalışmalar da bulunmaktadır. Zhang ve arkadaşları, 392 *Shigella* izolatının SMD ile 80 (%20.4)'inde azitromisine karşı azalmış duyarlılık ($\geq 32 \mu\text{g/ml}$) olduğunu tespit ederken¹⁶; Hassing ve arkadaşları, SMD yöntemi ile 354 tifoidal *Salmonella* izolatından 57 (%16.1)'sinin azitromisin için artmış MİK değerleri olduğunu bildirmiştir¹⁷. Salimiyan ve arkadaşları, pediatrik yaş grubunda

basilli dizanteri olgularının gaita örneklerinden izole edilmiş 94 *Shigella* türünde disk difüzyon yöntemiyle azitromisin, seftriakson, siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol, ampisilin direncini sırasıyla %25.5, %43.6, %3.8, %82.9, %57.4 olarak saptamışlardır²⁸. Ancak ülkemizde *Salmonella* ve *Shigella* türlerinin azitromisin duyarlılığına ait sınırlı veri bulunmaktadır. Azap ve arkadaşları, 23 *Shigella* ve 35 tifo dışı *Salmonella* izolatında agar dilüsyon yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada, azitromisin $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerlerini *Shigella* izolatları için 8 mg/L; *Salmonella* suşları için sırasıyla 8 mg/L ve > 16 mg/L olarak bildirmişlerdir²⁹. Ülkemizden bildirilmiş bir diğer çalışmada gradient testi ile 33 *Shigella* izolatında azitromisin direnci %3 olarak tespit edilmiştir³⁰. Çalışmaların yürütüldüğü yıllardaki sınır değerler ve yöntemdeki farklılıklar direnç oranlarında değişikliklere neden olmakla birlikte, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yaptığımız çalışmada azitromisin için ülkemizden bildirilmiş bu iki çalışmaya göre daha düşük direnç oranları saptanmıştır.

Salmonella ve *Shigella* izolatlarında azitromisin için, antimikrobiyal duyarlılık testlerinde tüm türler için doğrulanmış in vitro sınır değerlerinin olmaması nedeniyle duyarlılığın değerlendirilmesi bir sorundur. EUCAST kriterlerine göre, *Salmonella* ve *Shigella* türlerinin sokak tipi izolatları için azitromisin $MİK$ değerleri $\leq 16 \mu\text{g/ml}$ ve disk difüzyon inhibisyon zonu çapları $\geq 12 \text{ mm}$ 'dir. Çalışmamızda disk difüzyon testlerinde, inhibisyon zon çapı < 12 mm olan *Salmonella* izolatı tespit edilmemiş ve inhibisyon zon çapı < 12 mm olan sadece bir *Shigella* izolatı saptanmıştır. Verilerimiz, EUCAST kriterlerinde belirttiği gibi, azitromisin $MİK$ değerleri ve disk difüzyon zon çapları açısından belirtilen sınır değerler ile uyumlu bulunmuştur. EUCAST kriterlerinde belirtilen sınır değerlerinin her iki türün sokak tipi izolatları için uygun olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışmada, *Shigella* izolatlarında gastrointestinal sistem hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan antimikrobiyallere *Salmonella* izolatlarına göre daha yüksek direnç oranları tespit edilmiştir. *Shigella* izolatlarında siprofloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazole karşı yüksek direnç oranları, bu antibiyotiklerin gastrointestinal enfeksiyonların ampirik tedavisinde aşırı ve uygunsuz kullanımının bir sonucu olabilir ve artan direnç ampirik tedaviyi sınırlayabilir. Bu çalışma sonuçlarımıza göre, azitromisin bir *S.boydii* izolatı dışında *Salmonella* ve *Shigella* türleri için iyi bir in- vitro aktivite göstermiştir. Verilerimiz, azitromisinin bu türlerin neden olduğu gastrointestinal hastalıkların oral tedavisi için iyi bir seçenek olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmanın bir diğer önemli bulgusu ise, OXA-48 karbapenemaz üreten *Salmonella enterica* serovar Senftenberg izolatının tespit edilmiş olmasıdır. Özellikle *Enterobacterales* ailesinde artan antimikrobiyal direnç, ciddi mortalite ve morbiditeye neden olan küresel halk sağlığı sorunu olmuştur. Son seçenek olarak tedavi edici antibiyotiklerde dahi görülen antimikrobiyal direnç gelişimini önlemek için akılcı antibiyotik kullanımı ilkelerine göre hareket edilmelidir. Enfeksiyonların tedavisinde laboratuvar verilerine dayalı ve hasta kliniği ile uyumlu antibiyotik tedavisi küresel bir antibiyotik politikası olarak uygulanmalıdır. Rehberlerde *Salmonella* ve *Shigella* türlerinde azitromisin için klinik verilerle desteklenmiş, güvenilir duyarlılık sınır değerleri gereklidir. Bu amaçla daha çok sayıda çalışmanın yürütülmesine gereksinim duyulmaktadır ve azitromisin duyarlılığının sürveyansı laboratuvar rutin pratiğinde izlenmelidir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, bir üniversite hastanesinin Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 22.10.2019 ve Karar No: 19/314 ve 19/315).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Dekker J, Frank K. *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. Clin Lab Med 2015; 35(2): 225-46.
2. Wen SCH, Best E, Nourse C. Non-typhoidal *Salmonella* infections in children: Review of literature and recommendations for management. J Paediatr Child Health 2017; 53(10): 936-41.
3. Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. Clin Microbiol Rev 2015; 28(4): 901-37.
4. Akhtar S, Sarker MR, Jabeen K, Sattar A, Qamar A, Fasih N. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi in South Asia-current status, issues and prospects. Crit Rev Microbiol 2014; 41(4): 536-45.
5. Kariuki S, Gordoin MA, Feasey N, Parry CM. Antimicrobial resistance and management of invasive *Salmonella* disease. Vaccine 2015; 33(Suppl 3): 21-9.
6. World Health Organization (WHO). Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. WHO Press 2005. Available from: <https://www.who.int/cholera/publications/shigellosis/en/>
7. Khalil IA, Troeger C, Blacker BF, Rao PC, Brown A, Atherly DE, et al. Morbidity and mortality due to *Shigella* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990-2016. Lancet Infect Dis 2018; 18(11): 1229-40.
8. Ghosh AS, Kar AK, Kundu M. Impaired imipenem uptake associated with alterations in outer membrane proteins and lipopolysaccharides in imipenem-resistant *Shigella dysenteriae*. J Antimicrob Chemother 1999; 43(2): 195-201.
9. Fernández J, Guerra B, Rodicio MR. Resistance to carbapenems in Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars from Humans, Animals and Food. Vet Sci 2018; 5(2): 40.
10. Veeraraghavan B, Pragasan AK, Bakthavatchalam YD, Ralph R. Typhoid fever: issues in laboratory detection, treatment options & concerns in management in developing countries. Future Sci OA 2018; 4(6): FSO312.
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0.2021.
12. Nguyen MCP, Woerther PL, Bouvet M, Andremont A. *Escherichia coli* as reservoir for macrolide resistance genes. Emerg Infect Dis 2009; 15(10): 1648-50.
13. Jacobs MR, Bajaksouzian S, Appelbaum PC. Telithromycin post-antibiotic and post-antibiotic sub-MIC effects for 10 Gram-positive cocci. J Antimicrob Chemother 2003; 52(5): 809-12.
14. Rizzotti L, Simeoni D, Cocconcelli P, Gazzola S, Dellaglio F, Torriani S. Contribution of enterococci to the spread of antibiotic resistance in the production chain of swine meat commodities. J Food Prot 2005; 68(5): 955-65.
15. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother 2012; 67(4): 906-9.
16. Zhang C, Zhang R, Yu Q, Chu X, Sun J, Liu Q. Decreased susceptibility to azithromycin among clinical *Shigella* isolates from China. Microb Drug Resist 2017; 23(5): 596-601.

17. Hassing RJ, Goessens WHF, van Pelt W, Mevius DJ, Stricker BH, Molhoek N, et al. *Salmonella* subtypes with increased MICs for azithromycin in travelers returned to the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(4): 705-8.
18. Gündoğdu A, Kılıç H, Ulu-Kılıç A, Parkan ÖM, Türe Z. Kayseri bölgesinde soyutlanan *Salmonella* serovarlarının dağılımı ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Klinik Derg* 2017; 30(1): 22-6.
19. Saran B, Erdem B, Tekeli FA, Şahin F, Aysev AD. Ankara'da izole edilen *Shigella* kökenlerinin antibiyotik direnç modelleri, plazmid profil analizi ve değişken alanlı jel elektroforezi ile incelenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1): 35-48.
20. Cilo BD, Özmerdiven GE, Efe K, Güleşen R, Levent B, Ağca H, et al. Güney Marmara Bölgesinde izole edilen *Salmonella* serotiplerinin dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2015; 45(3): 122-27.
21. Gülmez D, Gür D, Haşçelik G, Güleşen R, Levent B. Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Süveyans Ağına (UEPLA) dahil olan bir üniversite hastanesinin deneyimleri: Dört yıllık *Salmonella*, *Shigella* ve *Campylobacter* verileri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2012; 42(3): 85-92.
22. Altun B, Gür D. Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesinde 1999-2010 yılları arasında dışkı örneklerinden izole edilen *Shigella* türlerinin antibiyotiklere direnç profilleri. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(4): 609-16.
23. McAteer J, Derado G, Hughes M, Bhatnagar A, Medalla F, Chatham-Stevens K, et al. Typhoid fever in the U.S. pediatric population, 1999-2015: Opportunities for improvement. *Clin Infect Dis* 2020; ciaa914.
24. Browne AJ, Hamadani BHK, Kumaran EAP, Rao P, Longbottom J, Harriss E, et al. Drug-resistant enteric fever worldwide, 1990 to 2018: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* 2020 18(1): 1.
25. Ezernitchi AV, Sirotkin E, Danino D, Agmon V, Valinsky L, Rokney A. Azithromycin non-susceptible *Shigella* circulating in Israel, 2014-2016. *PLoS One* 2019; 14(10): e0221458.
26. Darton TC, Tuyen HT, Chung H, Newton PN, Dance DAB, Phetsouvanh R, et al. Azithromycin resistance in *Shigella* spp. in Southeast Asia. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62(4): e01748-17.
27. Khadka P, Thapaliya J, Thapa S. Susceptibility pattern of *Salmonella enterica* against commonly prescribed antibiotics, to febrile-pediatric cases, in low-income countries. *BMC Pediatrics* 2021; 21: 38.
28. Salimiyan K, Farsiani H, Sasan MS. High rate of resistance to ceftriaxone and azithromycin among *Shigella* spp. isolates at three children's referral hospitals in Northeast Iran. *J Infect Chemother* 2020; 26(9): 955-58.
29. Azap ÖK, Can F, Demirbilek M, Oruç E, Timurkaynak F, Arslan H. *Salmonella* ve *Shigella* suşlarında azitromisin duyarlılığı. *J Ankara Univ Fac Med* 2005; 58: 121-23.
30. Erdoğan H, Erdoğan A. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in Alanya, Turkey. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci* 2015; 85(1): 277-80.