

Perbandingan agar MacConkey, *Salmonella-Shigella*, dan *xylose lysine deoxycholate* untuk isolasi *Shigella* dari usap dubur penderita diare

Julius E. Surjawidjaja*, Oktavianus Ch. Salim**, Paul Bukitwetan* dan Murad Lesmana*

ABSTRAK

LATAR BELAKANG

Umumnya media untuk isolasi *Shigella* dari tinja terdiri dari media diferensial seperti MacConkey (MAC) dan media selektif seperti agar *Salmonella-Shigella* (SS), *xylose-lysine-deoxycholate* (XLD), dan Hektoen enteric (HEA). Untuk isolasi kuman enterik digunakan kombinasi media dengan selektivitas sedang dan sangat selektif, tetapi belum ada keseragaman mengenai media atau kombinasi media yang baik. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan media MAC, SS, dan XLD serta mengetahui media mana yang paling sensitif untuk isolasi *Shigella*.

METODE

Usap dubur dari penderita diare ditanamkan pada agar MAC, SS dan XLD. Lempeng- agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni tersangka (*non-lactose fermenting*) diambil dan ditanamkan ke media biokimia untuk identifikasi *Shigella*. Uji serologi dilakukan untuk konfirmasi dengan menggunakan serum anti spesifik (Difco laboratories, Detroit, MI). Program Epi Info versi 6 (*Center for Disease Control and Prevention*) digunakan untuk analisis statistik.

HASIL

Sebanyak 1027 usap dubur dari penderita diare dibiakkan pada agar MAC, SS, dan XLD. Hasil isolasi untuk *Shigella* secara keseluruhan adalah 8,4%, terdiri dari *S. flexneri* 6,2%, *S. sonnei* 1,9%, *S. boydii* 0,2% dan *S. dysenteriae* 0,2%. Derajat isolasi *Shigella* pada agar MAC adalah sebesar 5,1%, pada SS 4,8%, dan pada XLD 7,1%. Kombinasi dari media biakan menunjukkan bahwa 6,5% dari isolat *Shigella* diperoleh dari MAC+SS, 8,1% dari MAC+XLD, dan 7,9% dari SS+XLD. Dari 86 usap dubur yang positif untuk *Shigella*, 20 (22,7%) isolat berasal dari lempeng agar XLD saja, 5 (5,8%) dari SS saja, dan 6 (7,0%) dari MAC saja.

KESIMPULAN

Untuk isolasi *S. flexneri* dan *S. sonnei*, XLD adalah media yang paling sensitif. MAC+XLD merupakan kombinasi media diferensial dan selektif yang paling sensitif untuk isolasi kuman *Shigella*.

Kata kunci: Media biakan, *Shigella*, diare

*Bagian Mikrobiologi dan
**Bagian Ilmu Kedokteran
Komunitas
Fakultas Kedokteran
Universitas Trisakti

Korespondensi

*Prof. dr. Julius E.
Surdjawidjaja, Sp.MK
Bagian Mikrobiologi
Fakultas Kedokteran
Universitas Trisakti
Jl. Kyai Tapa No.260, Grogol
Jakarta 11440
Telp. 5672731 eks.2601
Email: fkusakti@indosat.net.id

Universa Medicina 2007; 26: 57-63.

Comparison of MacConkey, Salmonella-Shigella, and xylose lysine deoxycholate agar for isolation of *Shigella* from rectal swab of diarrheal patients

Julius E. Surjawidjaja^a, Oktavianus Ch. Salim^{}, Paul Bukitwetan^{*} and Murad Lesmana^{*}**

ABSTRACT

^{*}Department of Microbiology and ^{**} Department of Community Medicine, Medical Faculty, Trisakti University

Correspondence

^aProf. Julius E. Surjawidjaja, dr, Sp.MK
Department of Microbiology, Medical Faculty
Trisakti University
Jl. Kyai Tapa No.260, Grogol
Jakarta 11440
Telp. 5672731 eks.2402
Email: fkusakti@indosat.net.id

Universa Medicina 2007; 26: 57-63.

BACKGROUND

Generally, isolation of *Shigella* from stool specimen required differential and selective media such as MacConkey (MAC), Salmonella-Shigella (SS), xylose-lysine-deoxycholate (XLD), and Hektoen enteric (HEA). To obtain high recovery rate of enteric pathogens, a combination of moderately inhibitive and highly selective media is used. Unfortunately, none of these media were chosen as the best media by clinical laboratories. The objective of this study was to compare MAC, SS, and XLD media to determine its sensitivity for isolating *Shigella*.

METODE

Rectal swab from diarrheal patients was cultured on MAC, SS and XLD agar and the plates were incubated at 37°C, for 24 hr. Suspected *Shigella* colonies appeared as non-lactose fermenting were selected and subcultured in biochemical media for the identification. Serologic test for confirmation of *Shigella* identification was performed by using specific anti-sera from DIFCO (Difco laboratories, Detroit, MI). A software package, Epi Info version 6, (Center for Disease Control and Prevention) was used for statistical analysis.

RESULTS

A total of 1027 rectal swabs from diarrheal patients were obtained and cultured on MAC, SS, and XLD agar. Overall, *Shigella* was isolated from 8.4% specimens, comprised of *S. flexneri*, 6.2%, *S. sonnei*, 1.9%, *S. boydii*, 0.2% and *S. dysenteriae*, 0.2%. The isolation rate for *Shigella* on MAC was 5.1%, on SS was 4.8%, and on XLD was 7.1%. Combination of media showed that MAC+SS yield 6.5% of *Shigella* isolates, MAC+XLD 8.1%, and SS+XLD 7.9%. Out of 86 positive rectal swab samples for *Shigella*, 20 (22.7%) isolates were recovered from XLD only, 5 (5.8%) from SS only and 6 (7.0%) from MAC only.

CONCLUSION

For isolation of *S. flexneri* and *S. sonnei*, XLD was the most sensitive media. Results of the MAC+XLD was the best differential combination and selective media for maximum isolation of *Shigella*.

Keywords: Culture media, *Shigella*, diarrhea

PENDAHULUAN

Spesies *Shigella* merupakan kuman yang telah dikenal menyebabkan diare yang serius dan setiap tahunnya menyebabkan sekitar 164,7 juta

kasus shigellosis di seluruh dunia.⁽¹⁾ Di antara kuman-kuman patogen enterik penyebab diare, *Shigella* dikenal berperan dalam kejadian diare inflamatorik dan disenteri serta menyebabkan problem kesehatan global dengan morbiditas dan

mortalitas yang tinggi di negara-negara berkembang.⁽¹⁾

Masalah shigellosis di Indonesia menjadi menarik oleh karena pada lima tahun terakhir *Shigella* menduduki urutan pertama sebagai penyebab diare bakterial diikuti *Salmonella* di tempat kedua dan *Vibrio cholerae* di tempat ketiga, padahal sebelumnya *V. cholerae* adalah patogen enterik predominan yang menduduki tempat teratas sebagai etiologi diare.⁽²⁾ Angka isolasi *Shigella* di Indonesia berkisar antara 4-6%,^(2,3) angka ini lebih kecil bila dibandingkan dengan yang dilaporkan dari negara berkembang lain seperti Bangladesh, Afrika dan Malaysia.⁽⁴⁻⁶⁾ Mungkin angka isolasi ini harusnya lebih tinggi dari yang dilaporkan mengingat bahwa upaya biakan bakteriologi tidak dilakukan secara optimal di Indonesia karena biayanya yang mahal. Di samping itu, ada banyak faktor lain yang berperan di dalam sistem biakan seperti misalnya prosedur pengambilan sampel, penanganan dan transportasi sampel ke laboratorium. Semuanya itu menentukan hasil isolasi bakteri.

Pada dasarnya, konfirmasi diagnosis klinis shigellosis memerlukan isolasi dan identifikasi kuman patogen enterik tersebut. Sistem ini melibatkan penggunaan media biakan, baik media diferensial maupun media selektif.⁽⁷⁾ Selama bertahun-tahun ada banyak variasi media biakan yang dirancang untuk isolasi *Shigella* dan berbagai kombinasi telah dilaporkan dari berbagai laboratorium.⁽⁸⁻¹⁰⁾ Namun demikian, beberapa di antara media tersebut ternyata justru menyebabkan hambatan terhadap pertumbuhan dari *Shigella* sedangkan media non-selektif acapkali memungkinkan tumbuhnya mikroorganisme nonpatogen sehingga menekan kuman-kuman patogen enterik.⁽¹¹⁾

Secara tradisional media untuk isolasi *Shigella* dari tinja atau usap dubur terdiri dari media yang bersifat diferensial seperti

MacConkey (MAC) dan media selektif seperti agar *Salmonella-Shigella* (SS), agar *xylose-lysine-deoxycholate* (XLD), dan agar *Hektoen enteric* (HEA). Umumnya digunakan kombinasi media biakan dengan selektivitas sedang dan sangat selektif untuk isolasi *Shigella* dari penderita diare. Meskipun telah banyak dilaporkan penggunaan media biakan tersebut, tetapi masih belum ada kesepakatan mengenai media atau kombinasi media mana yang paling sensitif dan memberikan hasil paling tinggi serta relatif murah untuk isolasi *Shigella*.⁽⁷⁻¹⁰⁾ Untuk suatu daerah atau laboratorium, pilihan penggunaan media isolasi primer *Shigella* dapat berbeda dari daerah atau laboratorium lainnya dan sangat tergantung pada tipe spesies yang prevalen di tempat tersebut.⁽¹¹⁾ Seharusnya variasi penggunaan media ini tidak terjadi, dan ada lempeng agar media biakan yang optimal untuk seluruh tipe *Shigella* secara universal. Ini akan dapat mengurangi penggunaan media secara berlebihan yang menyebabkan mahalnya biaya untuk memproses tinja atau usap dubur dalam upaya mendeteksi adanya kuman-kuman enterik seperti *Shigella*. Beberapa studi melaporkan bahwa performa agar SS untuk isolasi spesies *Shigella* lebih inferior dibandingkan dengan MAC dan XLD,^(11,12) namun demikian SS agar digunakan di banyak tempat dan merupakan media yang telah mapan di dalam sistem biakan untuk isolasi *Shigella*.⁽⁷⁾ Agar SS ini untuk waktu lebih dari 10 tahun tidak pernah dievaluasi efektifitasnya terhadap *Shigella* meskipun dari hasil-hasil laboratorium frekuensi isolasi *Shigella* tetap rendah saja.^(11,12)

BAHAN DAN CARA

Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *xylose-lysine-deoxycholate* (XLD) agar (DIFCO, Becton Dickinson, Sparks, MD), MacConkey (MAC) agar (DIFCO, Becton

Dickinson, Sparks, MD), dan *Salmonella-Shigella* (SS) agar (DIFCO, Becton Dickinson, Sparks, MD). MAC, SS, dan XLD dibuat berdasarkan petunjuk pabrik, yang dicantumkan di masing-masing botol media tersebut.

Bahan pemeriksaan dan proses biakan

Sampel berupa usap dubur diperoleh dari penderita diare yang datang ke Puskesmas Mampang dan Tebet. Sampel diambil tanpa melihat beratnya penyakit (ringan, sedang atau berat). Usap dubur diambil pada saat penderita datang berobat dan sebelum diberi pengobatan antibiotika. Usap dubur dimasukkan ke dalam media transpor Cary Blair dan disimpan di lemari es sampai dikirimkan ke Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti. Transportasi bahan pemeriksaan (Cary Blair yang mengandung usap dubur) dilakukan dengan menggunakan kotak pendingin (termos). Segera setelah sampai di laboratorium, usap dubur ditanamkan pada lempeng agar MAC, SS and XLD. Lempeng-lempeng agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni-koloni tersangka (*non-lactose fermenting*) dipilih untuk diambil dan ditanamkan ke media biokimia untuk identifikasi dan karakterisasi.⁽⁷⁾ Uji serologi dilakukan untuk konfirmasi spesies *Shigella* dengan menggunakan serum anti spesifik (Difco laboratories, Detroit, MI). Biakan persemaian

tidak dilakukan terhadap *Shigella* oleh karena tidak banyak memberikan isolat tambahan dibandingkan dengan metode biakan langsung.^(3,7)

Analisis data

Perbedaan derajat isolasi *Shigella* pada masing-masing lempeng agar secara sendiri-sendiri atau dalam gabungan (kombinasi) ditentukan kemaknaannya dengan menggunakan *chi-square* untuk membandingkan proporsi sampel positif. Program Epi Info versi 6 (*Center for Disease Control and Prevention*) digunakan di dalam perhitungan statistik.

HASIL

Sebanyak 1.027 usap dubur telah dikumpulkan dari penderita diare yang datang berobat pada dua puskesmas di wilayah Jakarta Selatan (Mampang dan Tebet) antara bulan Oktober 2004 sampai dengan Juni 2006. *Shigella* spp. berhasil diisolasi sebesar 86 (8,4%) dari media MAC+SS+XLD, sedangkan media SS menghasilkan isolat *Shigella* paling rendah (4,8%) (Tabel 1). Mayoritas isolat yang paling banyak dan menonjol adalah *S. flexneri* (6,2%), diikuti oleh *S. sonnei* (1,9%), dan *S. dysenteriae* (0,2%) serta *S. boydii* (0,15%) dalam jumlah yang sama besarnya (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil isolasi *Shigella* dari 1.027 usap dubur pada agar MacConkey, agar *Salmonella-Shigella*, dan agar *xylose-lysine-deoxycholate* serta kombinasinya

Media biakan	Jumlah positif isolat <i>Shigella</i> (% dari sampel)				
	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. boydii</i>	Semua spesies
MAC	2 (0,2)	38 (3,7)	10 (1,0)	2 (0,2)	52 (5,1)
SS	1 (0,1)	39 (3,8)	8 (0,8)	1 (0,1)	49 (4,8)
XLD	1 (0,1)	53 (5,2)	18 (1,8)	1 (0,1)	73 (7,1)
MAC+SS	2 (0,2)	51 (5,0)	12 (1,2)	2 (0,2)	67 (6,5)
MAC+XLD	2 (0,2)	61 (6,0)	18 (1,8)	2 (0,2)	83 (8,1)
SS+XLD	1 (0,1)	60 (5,8)	18 (1,8)	1 (0,1)	81 (7,9)
MAC+SS+XLD	2 (0,2)	64 (6,2)	20 (1,9)	2 (0,2)	86 (8,4)

MAC = MacConkey, SS = *Salmonella-Shigella*, XLD = *xylose lysine deoxycholate*

Jumlah terbesar dari bahan pemeriksaan yang positif untuk *S. flexneri* didapatkan dari lempeng agar XLD dengan angka sebesar 5,2% (53/1027) yang secara bermakna lebih besar dari pada hasil isolasi dari lempeng agar lainnya ($p < 0,0001$) yaitu agar MAC (3,7%) dan SS (3,8%). Derajat isolasi untuk *S. flexneri* pada lempeng agar MAC dan SS tidak berbeda bermakna, namun, secara nominal, jumlah *S. flexneri* yang didapatkan dari lempeng agar SS (39 isolat) sedikit lebih besar dari pada di MAC (38 isolat). Dari 86 usap dubur yang positif untuk *Shigella*, 20 (22,7%) isolat diperoleh dari lempeng agar XLD, 5 (5,8%) dari SS dan 6 (7,0%) dari MAC. Derajat isolasi dari *S. flexneri* pada kombinasi agar MAC+XLD (6,0%) and SS+XLD (5,8%) secara bermakna lebih besar ($p < 0,01$) dari pada derajat isolasinya pada kombinasi MAC+SS (5,0%), tetapi pada MAC+XLD dan pada SS+XLD tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$).

Derajat isolasi dari *S. sonnei* pada agar XLD adalah 1,8%. Ini secara bermakna lebih besar ($p < 0,0001$) dari pada yang ditunjukkan oleh MAC (1,0%) dan SS (0,8%) dan sama baiknya dengan kombinasi MAC+SS, untuk isolasi *S. sonnei*. Untuk agar MAC dan SS, tidak ada perbedaan bermakna dalam isolasi *S. sonnei* ($p > 0,05$). Kombinasi lempeng agar manapun yang mengandung XLD (MAC+XLD or SS+XLD) memperlihatkan derajat isolasi yang lebih tinggi dari *S. sonnei* (1,8%) dari pada kombinasi lainnya seperti MAC+SS (1,2%) ($p < 0,001$).

Derajat isolasi dari *S. boydii* dan *S. dysenteriae* pada agar MAC (masing-masing 0,2%) lebih besar dari pada di agar XLD dan SS (masing-masing 0,1%). Kecuali perbedaan bermakna ($p < 0,05$) derajat isolasi dari *S. boydii* dan *S. dysenteriae* pada SS dan XLD dengan MAC, perbedaan antara lempeng agar lain tidak bermakna ($p > 0,05$) (Tabel 1). Untuk isolasi *S. boydii* dan *S. dysenteriae*, kombinasi dari MAC+SS dan MAC+XLD hanya sedikit lebih

baik dari pada kombinasi SS+XLD. Tabel 1 juga menunjukkan bahwa di antara ketiga media biakan tersebut, XLD adalah yang paling superior dan secara bermakna lebih baik ($p < 0,0001$) dari pada MAC dan SS dalam total isolasi semua jenis spesies *Shigella*. Derajat isolasi keseluruhan dari *Shigella* pada XLD adalah 7.1% (73/1027), sedangkan pada MAC dan SS, masing-masing secara berurutan adalah 5,1% dan 4,8%. Kepekaan kombinasi MAC+XLD dalam isolasi *Shigella* (8,1%) hampir tidak berbeda dari kombinasi lempeng biakan MAC+SS+XLD yang memberikan hasil isolasi sebesar 8,4%, sedangkan MAC+SS dengan 6,5% derajat isolasi untuk semua *Shigella* adalah yang terburuk ($p < 0,001$) kepekaannya dibandingkan dengan kepekaan kombinasi lempeng agar lainnya.

PEMBAHASAN

Altwegg *et al*⁽¹²⁾ melaporkan bahwa derajat isolasi untuk *Shigella* secara keseluruhan pada lempeng agar MAC dan XLD, masing-masing adalah sebesar 86% dan 91% sedangkan pada SS sebesar 77%. Ini sesuai dengan yang kami dapatkan pada penelitian ini di mana XLD menempati urutan efisiensi biakan paling tinggi sebesar 85% (73/86) dari seluruh isolat *Shigella* yang didapatkan, disusul dengan MAC (60%) dan terakhir SS (57%).

Pilihan media biakan untuk isolasi *Shigella* mungkin tidak sama untuk suatu tempat atau daerah, tergantung dari jenis *Shigella* yang prevalen untuk daerah tersebut. Suatu media yang baik dan mendukung pertumbuhan suatu galur *Shigella* tertentu, tidak selalu efektif untuk jenis galur *Shigella* lainnya.⁽¹¹⁻¹³⁾ Ketidakterbiasaan ini sering kali menimbulkan keraguan apabila sebuah laboratorium harus memilih dan menentukan jenis media yang akan digunakan di dalam mengerjakan bahan pemeriksaan untuk isolasi *Shigella*. Akan sangat

ideal bilamana perbedaan di dalam pemilihan dan penggunaan media untuk *Shigella* dapat dihilangkan dan suatu media atau kombinasi media yang umum, dapat digunakan secara seragam. Hal ini akan menyederhanakan kebutuhan bahan biakan dan waktu pemeriksaan laboratorium yang pada akhirnya juga menurunkan biaya. Meskipun demikian, dianjurkan agar untuk melakukan biakan *Shigella* dari tinja atau usap dubur, selalu disertakan agar MAC dalam sistem isolasi tersebut karena beberapa galur *Shigella* mungkin mengalami hambatan pada media yang lebih selektif.⁽¹²⁾

Echeverria *et al*⁽¹¹⁾ melaporkan bahwa derajat isolasi dari *S. flexneri* secara bermakna lebih tinggi pada agar MAC dari pada agar SS, sedangkan untuk *S. sonnei*, agar MAC dan SS memberi hasil yang tidak berbeda. Berbeda dengan yang mereka⁽¹¹⁾ laporkan, hasil yang kami peroleh adalah agar MAC dan agar SS hampir sama dalam mendeteksi *S. flexneri*, akan tetapi untuk *S. sonnei*, MAC memberikan derajat isolasi yang sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan agar SS, meskipun perbedaan ini tidak bermakna ($p > 0,05$). Sayangnya, Echeverria *et al*⁽¹¹⁾ tidak memberikan data mengenai performa XLD meskipun dikatakannya bahwa XLD telah digunakan secara memuaskan untuk isolasi *Shigella*.

Bopp, *et al*⁽⁷⁾ juga mengingatkan supaya berhati-hati menggunakan media SS terutama untuk isolasi *S. dysenteriae* tipe I, karena agar SS terbukti menghambat dan menekan pertumbuhan galur *Shigella* ini. Kecuali itu, juga dilaporkan bahwa galur *Shigella* pembawa *R-factor* mengalami hambatan pada lempeng agar SS. Efisiensi lempeng media biakan yang rendah juga diperlihatkan oleh agar SS terhadap isolasi *S. sonnei*. Keadaan ini sesuai dengan yang kami temukan pada penelitian ini yaitu bahwa dari seluruh media biakan yang

digunakan, SS hanya memberikan hasil isolasi untuk *S. sonnei* sebesar 0,8% saja (Tabel 1).

Semua laporan mengenai efisiensi lempeng agar biakan untuk *Shigella* menunjukkan bahwa XLD adalah yang paling atas urutannya sedangkan SS adalah yang paling rendah. Di dalam prosedur pengerjaan bahan pemeriksaan tinja atau usap dubur untuk deteksi kuman-kuman *Enterobacteriaceae*, agar SS tidak lagi dicantumkan sebagai media yang direkomendasikan untuk digunakan karena nilainya tidak memadai seperti yang pernah dilaporkan selama ini.^(7,14) Media SS dianggap sangat menghambat pertumbuhan dan dilaporkan bahwa tiga perempat dari galur *Shigella* yang diuji pada lempeng agar SS mengalami tekanan atau hambatan⁽¹¹⁾ sehingga banyak yang tidak dapat tumbuh pada lempeng agar biakan ini.

Penelitian kami juga menunjukkan bahwa untuk isolasi *S. flexneri* dan *S. sonnei*, agar XLD adalah yang paling sensitif dibandingkan agar MAC dan SS, sedangkan untuk *S. boydii* and *S. dysenteriae*, MAC adalah yang terbaik. Akan tetapi kesimpulan ini tidaklah pasti mengingat bahwa jumlah kedua tipe *Shigella* yang didapatkan tersebut (*S. dysenteriae* dan *S. boydii*) hanya sedikit, masing-masing dua untuk *S. dysenteriae* dan *S. boydii*.

Kebanyakan laboratorium menggunakan baik media biakan diferensial maupun media selektif dalam upaya isolasi kuman *Shigella* atau kuman dari famili *Enterobacteriaceae* lainnya. Media biakan yang paling umum digunakan adalah MAC, SS dan XLD. Dengan penggunaan kombinasi dua media biakan diharapkan akan dapat diperoleh derajat isolasi yang cukup tinggi. Pada penelitian ini, kombinasi MAC+XLD merupakan sistem kombinasi media biakan yang paling sensitif untuk isolasi *Shigella*, di mana derajat isolasi yang didapatkan untuk *Shigella* adalah 96,5% (63/86) (Tabel 1). MAC+XLD adalah kombinasi media biakan yang dianjurkan

digunakan untuk mendapatkan hasil isolasi *Shigella* secara optimal dan menjadi kombinasi media biakan baku untuk isolasi *Shigella* dari bahan pemeriksaan tinja atau usap dubur.

KESIMPULAN

Biakan XLD merupakan media yang paling sensitif untuk isolasi *S. Flexneri* dan *S. Sonnei*. MAC+XLD merupakan kombinasi media biakan yang paling sensitif untuk isolasi kuman *Shigella*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Pimpinan Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti yang telah memberikan dana sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan. Terima kasih juga kami sampaikan kepada Staf Puskesmas Tebet dan Mampang, Jakarta Selatan, atas bantuan dalam pengumpulan bahan pemeriksaan dari penderita diare.

Daftar Pustaka

1. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull WHO 1999; 77: 651-66.
2. Oyoyo BA., Lesmana M, Subekti D, Tjaniadi P, Larasati W, Putri M, et al. Surveillance of bacterial pathogens of diarrhea disease in Indonesia. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 44: 227-34.
3. Subekti D, Oyoyo BA, Tjaniadi P, Corwin AL, Larasati W, Putri M, et al. *Shigella* spp. surveillance in Indonesia: the emergence or reemergence of *S. dysenteriae*. Emerg Infect Dis 2001; 7: 1-4.
4. Khan AI, Huq S, Malek MA, Hossein MI, Talukder KA, Faruque AS, et al. *Shigella* serotypes among hospitalized patients in urban Bangladesh and their antimicrobial resistance. Epidemiol Infect 2004; 132: 773-7.
5. Shapiro LR, Kumar L, Phillips-Howard P, Wells JG, Adcock P, Brooks J, et al. Antimicrobial resistant bacterial diarrhea in rural western Kenya. J Infect Dis 2001; 183: 1701-4.
6. Lee WS, Puthuchery SD. Bacterial pathogens isolated in childhood diarrhea in Kuala Lumpur - the changing trend. Med J Malaysia 2002; 57: 1-2.
7. Bopp CA, Brenner FW, Fields PJ, Wells JG, Strockbine NA. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover JC, Editors. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. Manual of Clinical Microbiology 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 2003, p. 654-71.
8. El-Gendy A, El-Ghorab N, Lane EM, Elyazeed RA, Carlin NIA, Mitry MM, et al. Identification of *Shigella flexneri* subserotype 1c in rural Egypt. J Clin Microbiol 1999; 37: 873-4.
9. Bogaerts J, Verhaegen J, Munyabikali JP, Mukantabana B, Lemmens P, Vandeven J, et al. Antimicrobial resistance and serotypes of *Shigella* isolates in Kigali, Rwanda (1983-1993): increasing frequency of multiple resistance. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 28:165-71.
10. Khalil K, Khan SR, Mazhar K, Kauser B, Lindblom G-B. Occurrence and susceptibility to antibiotics of *Shigella* species in stool of hospitalized children with bloody diarrhea in Pakistan. Am J Trop Med Hyg 1998; 58: 800-3.
11. Echeverria P, Sethabur O, Pitarangsi C. Microbiology and diagnosis of infections with *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia coli*. Rev Infect Dis 1991; 13 (suppl 4): S220-5.
12. Altwegg M, Buser J, von Graevenitz A. Stool cultures for *Shigella* spp.: improved specificity by using MacConkey agar with xylose. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 24: 121-4.
13. Maddocks S, Olma T, Chen S. Comparison of CHROM agar *Salmonella* media and xylose-lysine desoxycholate and *Salmonella-Shigella* agars for isolation of *Salmonella* strains from stool samples. J Clin Microbiol 2002; 40: 2999-3003.
14. Farmer JJ. Enterobacteriaceae: introduction and identification. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover JC, Editors. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology 2003. p. 654-71.