



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ**  
**ANKARA BİLKENT ŞEHİR HASTANESİ**  
**SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ KLİNİĞİ**

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN ELDE EDİLEN**  
***STREPTOCOCCUS PYOGENES* İZOLATLARINDA**  
**QUADRİPLEKS GERÇEK ZAMANLI PCR YÖNTEMİ İLE**  
**BELİRLENEN *emm* SEROTİP DAĞILIMININ HASTALARIN**  
**KLİNİK DURUMUYLA İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

**Dr. Bűőra SAYGIN**

**(TIPTA UZMANLIK TEZİ)**

**ANKARA/2024**





**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ**

**ANKARA BİLKENT ŞEHİR HASTANESİ**

**SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ KLİNİĞİ**

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN ELDE EDİLEN**

***STREPTOCOCCUS PYOGENES* İZOLATLARINDA**

**QUADRİPLEKS GERÇEK ZAMANLI PCR YÖNTEMİ İLE**

**BELİRLENEN *emm* SEROTİP DAĞILIMININ HASTALARIN**

**KLİNİK DURUMUYLA İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

**Dr. Büşra SAYGIN**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. Bedia DİNÇ**

**(TIPTA UZMANLIK TEZİ)**

**ANKARA/2024**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tüm yoğunluğuna rağmen her zaman ve her yerde ulaşabildiğim, her an desteğini hissettiğim ve bundan sonraki hayatımda da hissetmeye devam edeceğimi bildiğim çok kıymetli tez hocam Prof. Dr. Bedia Dinç'e,

Tez konumun belirlenmesinden sonuçlanmasına kadar, çalışma sürecini büyük bir ilgiyle takip eden ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Gülay Korukluoğlu'na,

Mikrobiyoloji uzmanlığının inceliklerini öğretmesinin yanında kendimi tanıma sürecime de büyük katkısı olan, her zaman ufkumu açan fikirler sunan kıymetli hocam Başasistan Dr. Alparslan Toyran'a,

Eğitimim süresince akademik bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım saydığım hocalarıma ve uzman doktorlarımıza,

Tek başına değil de birlikte hareket etmenin, beraber öğrenmenin ve öğrendiklerini öğretmenin, hep beraber gülmenin, bazen de ağlarken yanında bulmanın değerini gösteren, Ankara'da bana aile olan sevgili asistan arkadaşlarıma,

Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda birlikte çokça vakit geçirdiğimiz, tez sürecimin en yakından gözlemcisi ve destekçisi olan laboratuvar teknisyeni arkadaşlarıma,

İstanbul Tıp Fakültesi'nin bana kazandırdığı kıymetli dostlarım Dr. Ayşe Gülseren'e, Dr. Rumeysa Doğruyol'a ve Dr. Sena Namlı'ya,

Yurtta oda arkadaşı olarak başlayan tanışıklığımızı iyi ve kötü gün dostu olarak devam ettirdiğimiz değerli arkadaşım Dr. Muhlise Özkan'a,

Beni her zaman destekleyen, hayatım boyunca varlıklarından güç aldığım sevgili aileme; annem Ayşegül Saygın, babam Nejdet Saygın, kardeşlerim Osman Saygın ve Vildan Saygın'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Büşra Saygın

ANKARA-2024

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
KISALTMALAR.....	i
TABLO LİSTESİ .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. STREPTOKOKLAR.....	3
2.1.1. Streptokokların Tarihçesi .....	3
2.1.2. Streptokokların Genel Özellikleri .....	3
2.1.3. Streptokokların Sınıflandırılması.....	4
2.2. <i>STREPTOCOCCUS PYOGENES</i> .....	6
2.2.1. Yapısı.....	6
2.2.2. Virülans Faktörleri .....	7
2.2.2.1. Kapsül .....	7
2.2.2.2. M proteini.....	8
2.2.2.3. Lipoteikoik asit (LTA).....	8
2.2.2.4. Fibronektin bağlayıcı proteinler (FBP'ler).....	8
2.2.2.5. Serum opasite faktörü (SOF) .....	9
2.2.2.6. Streptolizin O ve S .....	9
2.2.2.7. Pirojenik (Eritrojenik) ekzotoksinler.....	10
2.2.2.8. C5a peptidaz.....	10
2.2.2.9. Nikotinamid adenin dinükleotidaz (NADaz) .....	10
2.2.2.10. Hyaluronidaz .....	11
2.2.2.11. Streptodornaz (DNaz) .....	11

2.2.2.12. Streptokinaz.....	11
2.2.3. Patogenez .....	11
2.2.3.1. Adezyon ve kolonizasyon .....	11
2.2.3.2. İnternalizasyon ve invazyon.....	12
2.2.3.3. Konağın bağışıklık sistemine direnç .....	13
2.2.3.4. Poststreptokokal hastalıkların patogenezini .....	13
2.2.4. Epidemiyoloji.....	14
2.2.4.1. Risk faktörleri.....	15
2.2.4.2. Taşıyıcılık ve bulaşma .....	16
2.2.5. <i>Streptococcus pyogenes</i> Enfeksiyonları .....	16
2.2.5.1. Yüzeysel enfeksiyonlar .....	17
2.2.5.1.1. Farenjit .....	17
2.2.5.1.2. Kızıl.....	17
2.2.5.1.3. İmpetigo .....	17
2.2.5.1.4. Erizipel .....	18
2.2.5.1.5. Vulvovajinit.....	18
2.2.5.2. İnvaziv enfeksiyonlar .....	19
2.2.5.2.1. Nekrotizan Fasiit (NF) .....	19
2.2.5.2.2. Streptokokal Toksik Şok Sendromu (STŞS) .....	19
2.2.5.2.3. Selülit .....	20
2.2.5.2.4. Bakteriyemi .....	20
2.2.5.3. Poststreptokokal hastalıklar .....	20
2.2.5.3.1. Akut Romatizmal Ateş (ARA) ve Romatizmal Kalp Hastalığı (RKH).....	20
2.2.5.3.2. Akut poststreptokokal glomerülonefrit (APSGN).....	21
2.2.5.3.3. Streptokok Enfeksiyonlarıyla İlişkili Pediatrik Otoimmün Nöropsikiyatrik Bozukluklar (Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections, PANDAS).....	22
2.2.6. Tanı.....	22
2.2.6.1. Mikroskopi .....	22
2.2.6.2. Kültür .....	23
2.2.6.2.1. Katalaz testi.....	23

2.2.6.2.2. Pyrrolidonyl Arylamidase (PYR) Testi .....	24
2.2.6.2.3. Basitrasin duyarlılığı .....	24
2.2.6.2.4. Lancefield antijeninin belirlenmesi.....	24
2.2.6.2.5. Otomatize sistemlerde tanımlama .....	25
2.2.6.3. Hızlı antijen testleri .....	25
2.2.6.4. Serolojik tanı .....	26
2.2.6.4.1. Anti-streptolizin O (ASO).....	26
2.2.6.4.2. Anti-deoksiribonükleaz B (Anti-DNaz B) .....	27
2.2.6.5. Nükleik asit testleri .....	27
2.2.7. Tedavi .....	28
2.2.7.1. Antibiyotik direnci .....	29
2.2.8. Korunma.....	30
2.2.8.1. Aşı çalışmaları .....	30
2.3. M PROTEİNİ .....	31
2.3.1. M proteini Gen ( <i>emm</i> ) Tiplendirmesi .....	32
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>35</b>
3.1. <i>Streptococcus pyogenes</i> İzolatlarının Toplanması ve Saklanması .....	35
3.1.1. İzolatların identifikasyonu .....	36
3.1.2. MALDI-TOF MS .....	38
3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi (ADT).....	38
3.2.1. İnokulum hazırlanması.....	38
3.2.2. Besiyeri plaklarına ekim ve disklerin yerleştirilmesi.....	39
3.2.3 Besiyeri plaklarının inkübasyonu ve değerlendirilmesi.....	39
3.2.4. Steril vücut sıvısı ve kan izolatlarının VITEK 2 otomatize sistem ile Antibiyotik Duyarlılık Testi (ADT) .....	40
3.3. Quadripleks Gerçek Zamanlı PCR ile <i>emm</i> Geni Tiplerinin Belirlenmesi .....	40
3.3.1. DNA İzolasyonu.....	40
3.3.1.1. Hızlı nükleik asit ekstraksiyon kit içeriği.....	41
3.3.1.2. DNA izolasyon aşamaları.....	41
3.3.2. <i>emm</i> Geni Tiplerinin Belirlenmesi .....	41
3.3.2.1. Kit içeriği .....	43
3.3.2.2. PCR aşamaları.....	43

3.3.2.3. Sonuçların değerlendirilmesi .....	46
3.4. Dizi Analizi ile <i>emm</i> Geni Tiplerinin Belirlenmesi.....	47
3.4.1. Primer Tasarımı ve PCR Çalışması .....	47
3.4.2. Yeni Nesil Dizileme ve Biyoinformatik Analiz.....	48
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>49</b>
4.1. İzolatlara ait Demografik Özellikler .....	49
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi (ADT) Sonuçları .....	53
4.3. qPCR Sonuçları .....	54
4.4. Dizi Analizi Sonuçları .....	58
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>59</b>
<b>6. SONUÇLAR .....</b>	<b>74</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>76</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>84</b>



## KISALTMALAR

ABCs: Active Bacterial Core surveillance

ADT: Antibiyotik duyarlılık testi

AHA: American Heart Association

APSGN: Akut poststreptokokal glomerülonefrit

ARA: Akut romatizmal ateş

ASO: Antistreptolizin O

BOS: Beyin omurilik sıvısı

Bp: Base pair

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CGRP: Calcitonin gene-related peptide

DİK: Dissemine intravasküler koagülasyon

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

*erm*: erythromycin resistant methylase

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FBP: Fibronektin bağlayıcı proteinler

GBS: Grup B streptokok

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit

IDSA: Infectious Diseases Society of America

IGV: Integrative Genomics Viewer

IU: International unit

IVIG: Intravenous immunoglobulin

iGAS: İnvaziv grup A streptokok

İYE: İdrar yolu enfeksiyonu

KKA: Koyun kanlı agar

LTA: Lipoteikoik asit

MALDI-TOF MS: Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight mass spectrometry

MHC: Majör doku uygunluk kompleksi

MH-F: Mueller Hinton Fastidious

MLST: Multilocus sequence typing

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

MRG: Manyetik rezonans görüntüleme  
MSCRAMM: Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules  
NF: Nekrotizan fasiit  
NK: Negatif kontrol  
PANDAS: Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections  
PBP: Penisilin bağlayıcı proteinler  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PFGE: Pulsed-field gel electrophoresis  
PK: Pozitif kontrol  
PMNL: Polimorfonükleer lökositler  
PYR: Pyrrolidonyl Arylamidase  
qPCR: quantitative polymerase chain reaction  
RKH: Romatizmal kalp hastalığı  
rRNA: ribozomal RNA  
RSV: Respiratuar Sinsiyal Virus  
Sfbp: Streptokokal fibronektin bağlayıcı protein  
SLO: Streptolizin O  
SLS: Streptolizin S  
SNP: Single nucleotide polymorphism  
SOF: Serum opasite faktörü  
SPE: Streptokokal pirojenik ekzotoksin  
SSA: Streptokokal süperantijen A  
STŞS: Streptokokal toksik şok sendromu  
SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol  
WGS: Whole genome sequencing  
µl: Mikrolitre  
ng/µl: Nanogram/mikrolitre  
°C: Santigrad derece

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1. İnsanlardan sıklıkla izole edilen streptokokların sınıflandırılması .....	5
Tablo 2. <i>S. pyogenes</i> enfeksiyonları için risk faktörleri .....	15
Tablo 3. Modifiye Jones Kriterleri .....	21
Tablo 4. <i>S. pyogenes</i> aşılı adaylarına ait klinik çalışmalar .....	31
Tablo 5. Dizi analizi ile emm tiplendirme yönteminde kullanılan primerler .....	33
Tablo 6. Klinik örneklerin kültür özellikleri .....	36
Tablo 7. Gerçek zamanlı PCR ile emm tiplendirmede kullanılan oligonükleotidler..	42
Tablo 8. PCR Reaktiflerinin içeriği ve miktarları .....	44
Tablo 9. PCR termal döngü basamakları.....	45
Tablo 10. PCR ile araştırılan gen bölgeleri .....	46
Tablo 11. emm geni amplifikasyonunda kullanılan primer çifti.....	48
Tablo 12. Dizi analizi PCR çalışmasının termal protokolü.....	48
Tablo 13. Çalışmaya dahil edilen hastaların temel özellikleri .....	49
Tablo 14. Boğaz dışı izolatların örnek tipine göre dağılımı.....	51
Tablo 15. Çalışmaya dahil edilen hastaların tanıları .....	52
Tablo 16. İzolatların disk difüzyon yöntemiyle elde edilen ADT sonuçları .....	53
Tablo 17. Tetrasiklin dirençli izolatların örnek tipine göre dağılımı.....	54
Tablo 18. qPCR panel kiti ile izolatların emm tipi tespit oranları .....	55
Tablo 19. qPCR panel kiti ile boğaz dışı izolatların emm tip tespit oranı .....	55
Tablo 20. qPCR panel kiti ile tiplendirilen izolatların emm tip dağılımı .....	56
Tablo 21. qPCR panel kiti ile tiplendirilen boğaz izolatlarının emm tip dağılımı.....	56
Tablo 22. qPCR panel kiti ile tiplendirilen boğaz dışı izolatların emm tip dağılımı..	57
Tablo 23. Dizi analizi verileri dahil edildiğinde izolatların emm tip dağılımı .....	58

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Mukoid (solda) ve non-mukoid (sağda) <i>S. pyogenes</i> kolonileri .....	6
Şekil 2. <i>S.pyogenes</i> 'in virülans faktörleri ve patogenezdaki rolleri.....	7
Şekil 3. M proteininin yapısı .....	32
Şekil 4. Otomatize örnek işleme ve inkübasyon cihazı.....	37
Şekil 5. MALDI-TOF MS metal slayt .....	38
Şekil 6. MH-F besiyerine antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi.....	39
Şekil 7. PCR reaksiyonu kurulumu .....	45
Şekil 8. PCR sonuçlarının değerlendirilmesi .....	47
Şekil 9. Boğaz ve boğaz dışı izolatların hastaların başvuru yerine göre dağılımı .....	50
Şekil 10. Çalışmaya dahil edilen izolatların örnek tipine göre dağılımı .....	50
Şekil 11. Klinik örnek tiplerinin çocuk ve erişkin hastalardaki dağılımı.....	51
Şekil 12. D-test yöntemi uygulanarak saptanan indüklenebilir klindamisin direnci .	54

## ÖZET

### Çeşitli Klinik Örneklerden Elde Edilen *Streptococcus pyogenes* İzolatlarında Quadripleks Gerçek Zamanlı PCR Yöntemi ile Belirlenen *emm* Serotip Dağılımının Hastaların Klinik Durumuyla İlişkilendirilmesi

**Amaç:** Dünya çapında yaygın olarak görülen *S. pyogenes* enfeksiyonları, insanları etkileyen bakteriyel patojenler arasında önemini korumaktadır. Bu çalışmada; boğaz ve boğaz dışı klinik örneklerden elde edilen *S. pyogenes* izolatlarında *emm* tip dağılımının belirlenmesi ile yerel epidemiyolojik verilere güncel katkı sağlanması, *emm* tipleri ile klinik tablolar arasındaki ilişkinin incelenmesi ve mevsimsel aşı kapsayıcılığının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, olası bir *S. pyogenes* kaynaklı salgın durumunda hem hızlı sonuç alma hem de maliyet etkin bir yaklaşım sağlaması nedeniyle quadripleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) yöntemi ile *emm* tiplendirmenin kapsayıcılığı araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Şubat 2024-Mayıs 2024 tarihleri arasında gerçekleştirilen çalışmada; 68 boğaz ve 38 boğaz dışı klinik örnekten elde edilen toplam 106 *S. pyogenes* izolatında, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) protokolüne göre tasarlanan kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) kiti ile *emm* tiplendirme yapıldı ve yaygın görülen 20 *emm* tipinin varlığı araştırıldı. Moleküler tiplendirmeyi temsilen qPCR ile saptanan her *emm* tipinden birer izolatta ve PCR yöntemi ile *emm* tipi belirlenemeyen 31 izolatta dizi analizi yapıldı. Çalışmaya dahil edilen izolatların penisilin, eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, levofloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlendi.

**Bulgular:** Hastaların %81,1'i pediatrik yaş grubundayken, invaziv grup A streptokok (iGAS) enfeksiyonlarının %64,8'i erişkin hastalarda saptandı. Tüm izolatlar penisiline duyarlı iken; tetrasikline %12,3, eritromisine %2,8 ve klindamisine %1,9 oranında direnç tespit edildi. qPCR yöntemi ile *S. pyogenes* izolatlarının %70,8'inde *emm* tipi belirlendi. Tiplendirmeyi temsilen yapılan dizi analizi sonuçları qPCR sonuçları ile uyumlu bulundu. Dizi analizi verileri de dahil edildiğinde; *S. pyogenes* izolatlarının

%16'sında *emm* tipi belirlenemedi. Tespit edilen 12 farklı *emm* tipinin tamamı 30 valanlı aşıda mevcut olup *emm* tipi belirlenen 89 *S. pyogenes* izolatı için bu aşının kapsayıcılığı %100 olarak saptandı. *S. pyogenes* izolatlarındaki baskın *emm* tipi *emm3* iken; *emm2*, *emm6* ve *emm89* da diğer sık tespit edilen *emm* türlerini oluşturdu.

**Sonuç:** Hızlı, maliyet etkin ve pek çok laboratuvar alt yapısına uygun bir yöntem olan qPCR ile *emm* tiplendirmenin güvenilir bir şekilde gerçekleştirileceği ve bu yöntemin olası *S. pyogenes* salgınlarının yönetimine katkı sağlayacağı belirlenmiştir. Primer ve prob tasarımlarının ülkemizde dolaşımda olan *S. pyogenes* izolatlarına yönelik yapılmasıyla qPCR kitinin tiplendirme duyarlılığının artacağı öngörülmüştür. Yerel epidemiyolojik verilerimizin sürekliliğinin sağlanması için laboratuvar temelli aktif bir sürveyans sisteminin geliştirilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Streptococcus pyogenes*, streptokokkal M proteini, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, *emm* tiplendirme

## ABSTRACT

### **Correlation of emm Serotype Distribution Determined by Quadriplex Real-Time PCR Method with the Clinical Status of Patients in Streptococcus pyogenes Isolates from Various Clinical Samples**

**Objective:** *S. pyogenes* infections, widely prevalent globally, remain significant among bacterial pathogens affecting humans. This study aimed to contribute updated epidemiological data by determining the *emm* type distribution in *S. pyogenes* isolates obtained from throat and non-throat clinical samples, to examine the relationship between *emm* types and clinical presentations, and to investigate seasonal vaccine coverage. Additionally, the coverage of *emm* typing through the quadriplex real-time PCR method, which provides rapid results and cost-effective approaches, was assessed for its potential use in the event of an *S. pyogenes* outbreak.

**Materials and Methods:** In our study conducted between February 2024 and May 2024, *emm* typing was performed on a total of 106 *S. pyogenes* isolates obtained from 68 throat and 38 non-throat clinical samples using a qPCR kit designed according to the CDC protocol. The presence of 20 commonly seen *emm* types was investigated. Sequence analysis was performed on one isolate from each *emm* type identified by qPCR to represent molecular typing, as well as on 31 isolates where the *emm* type could not be determined by PCR. The antibiotic susceptibility of the isolates included in the study to penicillin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, levofloxacin, and SXT was assessed using the disk diffusion method.

**Results:** While 81.1% of the patients were from the pediatric age group, 64.8% of invasive GAS infections were detected in adult patients. All isolates were susceptible to penicillin, with resistance observed to tetracycline (12.3%), erythromycin (2.8%), and clindamycin (1.9%). The *emm* type was determined in 70.8% of *S. pyogenes* isolates using the qPCR method. The results of sequence analysis were found to be consistent with those obtained from qPCR. When including sequence analysis data, *emm* typing could not be determined in 16% of *S. pyogenes* isolates. All 12 different *emm* types identified were present in the 30-valent vaccine, and the vaccine coverage

for the 89 *S. pyogenes* isolates with identified *emm* types was determined to be 100%. The dominant *emm* type among the *S. pyogenes* isolates was *emm3*, followed by *emm2*, *emm6*, and *emm89* as the other frequently detected *emm* types.

**Conclusion:** The study concluded that *emm* typing could be reliably performed using qPCR, a rapid, cost-effective method applicable across various laboratory infrastructures, and that this approach could contribute to the management of potential *S. pyogenes* outbreaks. It is further anticipated that the typing sensitivity of the qPCR assay could be improved by designing primers and probes specifically targeting the circulating *S. pyogenes* isolates within the country. Additionally, the study emphasized the need for establishing an active laboratory-based surveillance system to ensure the continuity and accuracy of local epidemiological data.

**Keywords:** *Streptococcus pyogenes*, streptococcal M protein, real-time polymerase chain reaction (PCR), *emm* typing



# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Streptococcus pyogenes* veya Grup A Streptokok (GAS), dünya çapında yol açtığı morbidite ve mortalite ile insanları etkileyen bakteriyel patojenler arasında önemini korumaktadır. Farenjit, impetigo gibi hafif seyirli enfeksiyonların yanı sıra nekrotizan fasiit (NF), streptokokal toksik şok sendromu (STŞS) gibi invaziv hastalıklar ve akut romatizmal ateş (ARA) ile akut poststreptokokal glomerülonefrit (APSGN) gibi enfeksiyon sonrası immünolojik sekellere de neden olan çok yönlü bir bakteridir (1, 2).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Aralık 2022’de Avrupa ülkelerinde hem invaziv grup A streptokok (iGAS) enfeksiyonları hem de kızıl vakalarında artış görüldüğünü ve bazı ülkelerde iGAS ilişkili ölümlerin arttığını bildirmiştir. Benzer dönemdeki solunum yolu virüslerinin Avrupa’daki artışı da göz önünde bulundurularak, *S. pyogenes* enfeksiyonlarının erken tanınması, bildirilmesi ve hızla tedavinin başlanması için tüm ülkeler uyarılmıştır (3). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 2023 yılı verilerine göre ise; *S. pyogenes* kaynaklı ciddi enfeksiyonların sayısı son 20 yılın en yüksek seviyesine ulaşmıştır (4).

*Streptococcus pyogenes*’in temel epidemiyolojik belirteci, suşların tanımlanmasında önemli rol oynayan M proteindir. *S. pyogenes* suşları, *emm* geni tarafından kodlanan M proteinindeki yapısal farklılıklara göre M serotiplerine ayrılmıştır. M protein tiplendirmesi ilk olarak serolojik yöntemlerle yapılmış, *emm* geninin N-terminal bölgesinin serotipe spesifik olduğunun saptanmasıyla da moleküler yöntemlere dayalı hale gelmiştir. *emm* tipi; suşun epidemiyolojisi, genetik yapısı ve patogenezi hakkında önemli bilgiler vermektedir (5, 6).

Moleküler yöntemle *emm* tiplendirmesi, *emm* geninin serospesifik bölgesinin sekans analizi ile yapılmaktadır (7). Yakın zamanda, CDC’nin Aktif Bakteriyel Çekirdek sürveyansı (Active Bacterial Core surveillance, ABCs) programı kapsamında toplanan iGAS izotlarının yaklaşık %93’ünü kapsayan, en sık görülen 20 *emm* tipinin tanımlanması için bir PCR yöntemi geliştirilmiştir. Bu PCR şeması, her bir tipteki bilinen alt tipleri içeren 20 *emm* tipini, beş tane dörtlü reaksiyon (quadripleks) ile saptamaktadır. PCR sonrası basamaklar içermeyen bu yöntem, hem

zaman hem de maliyet açısından avantajlı olduğundan ve birçok laboratuvarında mevcut olan gerçek zamanlı PCR teknolojisini kullandığından özellikle salgın araştırmalarında faydalı olacağı öngörülmüştür (8).

Lisanslı bir aşı henüz olmadığından, *S. pyogenes* enfeksiyonlarının yönetiminin temeli antibiyotik tedavisidir. CDC, ABCs ile antibiyotik direnç verilerini takip etmektedir ve 2019 Antibiyotik Direnci Tehditleri Raporu'nda; her beş iGAS enfeksiyonunun birden fazlasında eritromisin ve klindamisine dirençli suşların etken olduğu belirtilirken, eritromisin dirençli *S. pyogenes* endişe verici tehditler listesinde yer almıştır. *S. pyogenes*,  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere duyarlı olmaya devam etse de, özellikle penisiline alerjisi olanlarda ve ciddi seyirli invaziv hastalıklarda tercih edilen eritromisin ve klindamisin gibi antibiyotiklere karşı artan direnç tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu direnç, ribozomal hedef bölge modifikasyonunun sonucudur ve farklı *emm* tipleri ile ilişkilendirilmiştir (4, 6, 9). Bununla birlikte 2018'deki DSÖ raporunda; *S. pyogenes* ilişkili hastalıkların sıklığını azaltmak ve bu sayede daha az antibiyotik kullanımı yoluyla antibiyotik direncinde azalmaya katkı sağlamak için, güvenli ve etkili bir *S. pyogenes* aşısının geliştirilmesi öncelikli araştırma alanlarından biri olarak ilan edilmiştir (10). *S. pyogenes* izolatlarının *emm* tiplerinin belirlenmesi, aşı çalışmalarına yön vermesi açısından da önemlidir (5).

Dünya genelinde *S. pyogenes*'in ciddi enfeksiyon etkeni olarak tekrar ortaya çıkışı, özellikle de ruhsatlı bir aşısının bulunmaması ve bakterinin penisilin direnci kazanmasına dair endişelerle birlikte, küresel düzeyde epidemiyolojik çalışmaların yapılmasının önemini arttırmıştır. Bu araştırmaların yürütülmesi, başarılı önleme stratejilerinin geliştirilmesi açısından değerlidir (5, 11).

Bu çalışmada; boğaz ve boğaz dışı klinik örneklerden elde edilen *S. pyogenes* izolatlarında *emm* tip dağılımını belirleyerek yerel epidemiyolojik verilere güncel katkı sağlanması, *emm* tipleri ile klinik tablolar arasındaki ilişkinin incelenmesi ve mevsimsel aşı kapsayıcılığının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, olası bir *S. pyogenes* kaynaklı salgın durumunda hem hızlı sonuç alma hem de maliyet etkin bir yaklaşım sağlanması nedeniyle dizileme yöntemine alternatif bir seçenek olan quadripleks gerçek zamanlı PCR yöntemi ile *emm* tiplendirmenin kapsayıcılığı araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. STREPTOKOKLAR

#### 2.1.1. Streptokokların Tarihçesi

Streptokok türlerinin ilk tanımlanması, 1874 yılında Avusturyalı cerrah Theodor Billroth'un hasta örneklerini incelenmesi ile yapılmıştır. Billroth, yara ve erizipel lezyonlarındaki zincir yapmış kok şeklindeki bu bakterileri *Streptococcus* olarak adlandırmıştır (12, 13). Friedrich Julius Rosenbach ise 1884'de yılında, pürülan lezyonlardan izole ettiği streptokok türlerine *Streptococcus pyogenes* adını vermiştir (14).

Streptokokların sınıflandırılması ve farklı türlerin tanınması 1903 yılında Hugo Schottmuller'in kanlı agarı keşfiyle mümkün olmuştur (15). Kanlı agar plaklarında üretilen streptokok türleri, kolonilerin etrafındaki hemoliz zonlarına göre alfa ( $\alpha$ -yeşil hemoliz zonu), beta ( $\beta$ -şeffaf hemoliz zonu) ve gama ( $\gamma$ -hemoliz zonu yok); hücre yüzeyi antijenlerindeki farklılıklara göre ise A, B, C, D ve E gibi harflerle gruplandırılmıştır (16, 17).

#### 2.1.2. Streptokokların Genel Özellikleri

Streptokoklar; gram pozitif boyanan, 2  $\mu$ m'den küçük, ikili veya zincir şeklinde sıralanmış, kok morfolojisinde bakterilerdir. Biyokimyasal olarak katalaz ve oksidaz negatif, glikoz fermentasyonu ile gaz oluşturmadan sadece laktik asit üreten homofermentatif mikroorganizmalardır. Hem aerobik hem de anaerobik ortamda üreyebilen fakültatif anaerob bakteriler olsalar da, bazı suşların büyümesi anaerobik ortamda artmaktadır. Streptokok türlerinin çoğunluğunun ürettiği ideal sıcaklık 37°C'dir. Viridans streptokoklar ve *Streptococcus pneumoniae* başta olmak üzere birçok türün üremesi %5 CO<sub>2</sub> varlığından olumlu etkilenmektedir. Beslenme konusunda seçici davranış gösteren streptokoklar, besiyerlerinde kan gibi zenginleştiricilere ihtiyaç duymaktadır (18-20).

Streptokok cinsi, heterojen dağılım gösteren büyük bir gruptur. Bu grup içerisinde normal flora elemanı olan patojen olmayan streptokoklar yer almakla birlikte; pnömoni, menenjit, endokardit, fasiit gibi ciddi klinik tablolar oluşturan virülans yüksek streptokoklar da bulunmaktadır (19, 21). Tipik gram pozitif bakteri

hücre duvarı yapısında olduğu gibi teikoik asit, yüzey proteinleri ve karbonhidratlar hücre duvarına bağlanmıştır ve streptokoklar arasındaki farklılıkları bu moleküller belirlemektedir (18).

### 2.1.3. Streptokokların Sınıflandırılması

Streptokoklar taksonomik olarak; *Lactobacillales* takımı, *Streptococcaceae* ailesinde yer almaktadır. Streptokok türlerinin ilk sınıflandırması hemolitik reaksiyonlar, Lancefield antijeni ve koloni boyutu gibi özelliklere dayanarak yapılmıştır (18, 19). Lancefield,  $\beta$ -hemolitik streptokokları hücre duvarı antijenlerine göre sınıflandırmış; Sherman ise streptokokların fenotipik özelliklerini dikkate alarak piyojenik, viridans, laktik ve enterokok gruplarını oluşturmuştur (17, 22).

Klasik sınıflandırma temel olarak  $\beta$  hemoliz yapan ve yapmayan streptokokları ayırmaktadır. Başlangıçta  $\beta$  hemoliz yapan *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equalsimilis* gibi patojenlerin piyojenik enfeksiyonlar yapması nedeniyle  $\beta$  hemoliz yapan streptokokların piyojenik,  $\beta$  hemoliz yapmayanların ise non-piyojenik özellikte olduğu çıkarımı yapılmış; ancak *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* gibi  $\beta$  hemoliz yapmayan istisnai türlerin de piyojenik enfeksiyonlara yol açtığı belirtilmiştir. Diğer bir istisna olarak, *S. anginosus* grubunun  $\beta$  hemoliz yapan suşları piyojenik grupta yer almamaktadır. Piyojenik streptokok türleri içerdikleri Lancefield antijenlerine göre kısmen karakterize edilebilmektedir. Grup B antijeni *S. agalactiae*'ya spesifikken; A antijeni sadece *S. pyogenes*'te değil, *S. anginosus* grubundaki bazı türlerde ve *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*'te de bulunmuştur (18). Geleneksel sınıflandırma yöntemleri çeşitli kısıtlamalar içerse de hâlâ klinik laboratuvarlar için önemini korumaktadır (18, 19).

Çeşitli moleküler yöntemlerin kullanılması ve katalaz negatif olan yeni gram pozitif kokların tanımlanmasıyla streptokok taksonomisi yeniden şekillenmiştir (20). 16S ribozomal RNA (rRNA) sekanslarına dayanan son çalışmalarla birlikte streptokok cinsi bakteriler; piyojenik, mitis, anginosus, mutans, salivarius ve bovis olmak üzere altı gruba ayrılmıştır (18, 21). İnsanlardan sıklıkla izole edilen streptokok türleri ve bu türleri içeren gruplar Tablo 1'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** İnsanlardan sıklıkla izole edilen streptokokların sınıflandırılması (19, 20)

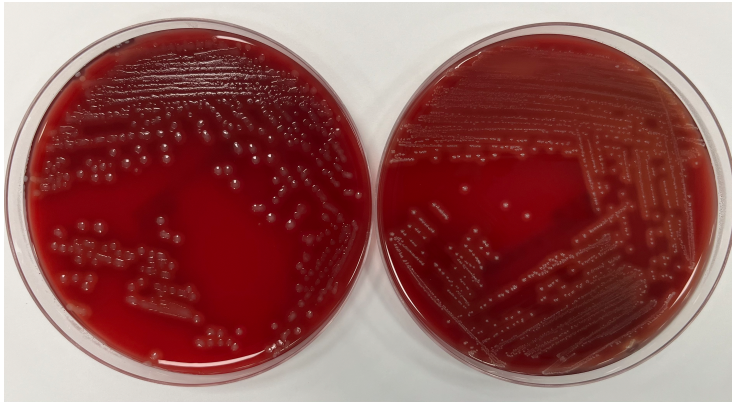
<b>Grup</b>	<b>Tür</b>	<b>Lancefield antijeni</b>	<b>Hemoliz</b>	<b>İlişkili hastalıklar</b>
<b>Piyojenik</b>	<i>S. pyogenes</i>	A	$\beta$	Farenjit, kızıl, selülit, NF, STŞS ve süpüratif olmayan sekeller
	<i>S. agalactiae</i>	B	$\beta, \gamma$	Neonatal sepsis ve menenjit
	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	A, C, G	$\beta$	Farenjit, selülit, nekrotizan fasiit, sepsis
<b>Mitis</b>	<i>S. pneumoniae</i>	Tanımlanmamış/ Sınıflandırmada kullanılmayan	$\alpha$	Pnömoni, menenjit, akut otitis media
	<i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. sanguinis</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. pseudopneumoniae</i>	Tanımlanmamış/ Sınıflandırmada kullanılmayan	$\alpha$	Subakut bakteriyel endokardit, nötropenik bakteriyemi
<b>Anginosus</b>	<i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. intermedius</i>	A, C, F, G veya saptanabilir antijen yok	$\alpha, \beta, \gamma$	Süpüratif enfeksiyonlar
<b>Mutans</b>	<i>S. mutans</i>	Sınıflandırmada kullanılmayan	$\alpha, \gamma$ , nadiren $\beta$	Diş çürüğü, endokardit
<b>Salivarius</b>	<i>S. salivarius</i> <i>S. vestibularis</i>	Sınıflandırmada kullanılmayan	$\alpha, \gamma$	Endokardit, nötropenik bakteriyemi
<b>Bovis</b>	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	D	$\alpha, \gamma$	Menenjit, endokardit

## 2.2. STREPTOCOCCUS PYOGENES

### 2.2.1. Yapısı

*Streptococcus pyogenes*, diğer gram pozitif bakteriler gibi teikoik asit içeren kalın bir peptidoglikan tabakalı hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarının kompleks yapısında çeşitli antijenik maddeler bulunur. A grubuna spesifik antijenik madde, yaklaşık 2:1 oranında ramnoz ve N-asetilglukozamin içeren bir polisakkarit olup, peptidoglikan tabakaya kovalent bağlanan bu antijenin virülans faktörü olarak bilinen bir rolü yoktur. Ancak peptidoglikan tabakanın kendisi ateşin tetiklenmesi, eritrosit ve trombositlerin lizisi gibi biyolojik aktivitelere sahiptir (19, 20, 23).

Hyaluronik asit yapısındaki kapsül, bakteriyi polimorfonükleer lökositler (PMNL) ve makrofajlar tarafından fagositoza karşı koruyan yüksek moleküler ağırlıklı bir polimerdir. Hyaluronik asidin kimyasal yapısı insan bağ dokusuna benzerlik gösterdiği için enfekte konakta bu maddeye karşı immün yanıt oluşmamaktadır. Kapsüller genleri yüksek düzeyde eksprese eden streptokok suşları yoğun kapsül ürettiğinden, koyun kanlı agardaki (KKA) kolonileri mukoid görünümündedir. (19, 20). %5 KKA'da üremiş mukoid ve non-mukoid *S. pyogenes* izolatlarına ait plak görüntüleri Şekil 1'de gösterilmiştir.



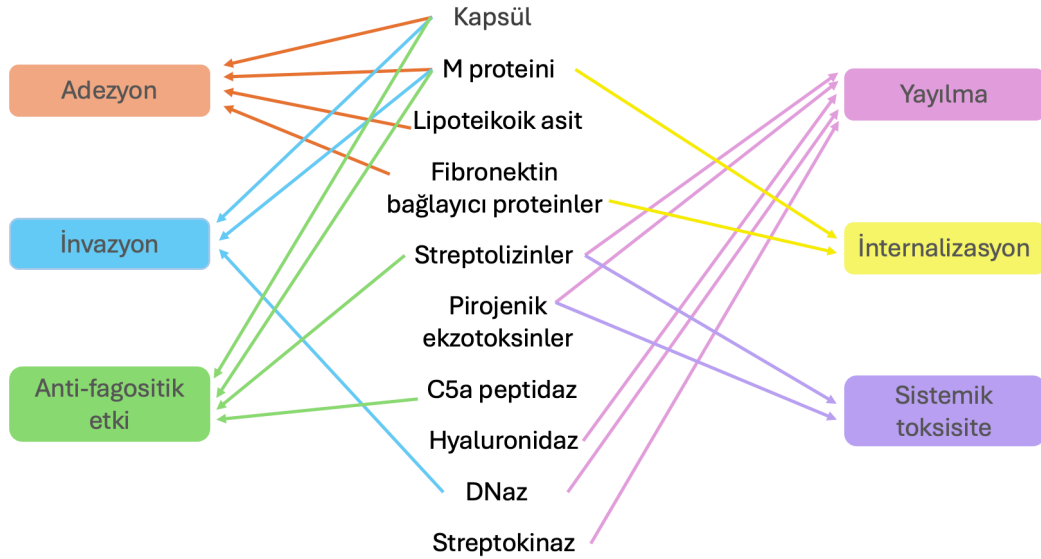
Şekil 1. Mukoid (solda) ve non-mukoid (sağda) *S. pyogenes* kolonileri

*Streptococcus pyogenes*'in yüzeyinde, mikroorganizmanın enfekte dokularda kalmasını sağlayan çeşitli moleküller bulunur. Bunlardan M proteini, gram pozitif bakterilerde en iyi tanımlanmış yüzey moleküllerinden biridir ve sıkı bir fibriler tabaka

şeklindedir (23). *S. pyogenes*, M proteinindeki antijenik değişimlere göre 150'den fazla serotipe ayrılmıştır. M proteinini kodlayan *emm* genindeki nükleotid dizilim farklılıklarına dayanılarak da 220'den fazla genotip tanımlanmıştır. M proteini dışında, *emm* gen süper ailesi genleri (*enn*, *arp*, *mrp*, *fcrA* gibi) tarafından kodlanan M ilişkili proteinler de bakterinin yüzey molekülleri olarak tanımlanmıştır. Bu proteinler yapı olarak M proteinine benzese de özellikle insan proteinleriyle etkileşim kapasiteleri açısından farklılık gösterirler (19).

### 2.2.2. Virülans Faktörleri

*Streptococcus pyogenes*, eksprese ettiği virülans faktörleri ile konağın immün yanıtından kaçarak doku hasarına neden olmakta ve bu faktörlerin çeşitliliği bakterinin çok yönlülüğünü sağlamaktadır. Üretilen proinflamatuvar toksinler ve diğer virülans faktörleri inflamasyonun şiddetini artırarak ciddi invaziv enfeksiyonlara, poststreptokokal otoimmün hastalıklara ve toksik şok sendromunun gelişimine direkt katkı sağlamaktadır (24, 25). *S. pyogenes*'in ürettiği virülans faktörleri ve bu faktörlerin patogenezdaki temel rolleri Şekil 2'de özetlenmiştir.



Şekil 2. *S. pyogenes*'in virülans faktörleri ve patogenezdaki rolleri (19, 20, 24, 26)

**2.2.2.1. Kapsül:** Bazı *S. pyogenes* suşları, (1-3)- $\beta$ -D-N-asetilglukozamin ve D-glukuronik asit'in  $\beta$  (1-4) bağlı disakkarit birimlerinden oluşan hyaluronik asit yapıda kapsüle sahiptir. Kapsül, mikroorganizmanın komplemana bağlı fagositozunu engelleyici fiziksel bir bariyer işlevi görmektedir (20).

**2.2.2.2. M proteini:** *S. pyogenes*'in yüzeyinde en fazla bulunan molekül M proteini olup, insan kanında M-negatif mutantların yaşayamadığı gösterildiğinden bakterinin temel virülans faktörü olarak kabul edilmiştir. Bu protein; aside ve ısıya dayanıklı, tripsine duyarlı,  $\alpha$ -helikal sarmal yapıda, fibriler bir makromoleküldür ve peptidoglikan tabakası boyunca uzanmaktadır. Molekülün karboksi ucu (C-terminal) *S. pyogenes* suşları arasında yüksek düzeyde korunmuş epitopları içerirken amino ucu (N-terminal) tipe spesifik olup serolojik sınıflandırmaya temel oluşturmaktadır (19, 20, 23, 24).

M proteini; Faktör H, Faktör H benzeri protein ve C4b gibi kompleman kontrol proteinlerine ve ayrıca fibrinojene bağlanarak alternatif kompleman yolunu inhibe etmekte ve opsonofagositoz sürecini engellemektedir. Çok miktarda M proteini içeren *S. pyogenes* suşları PMNL fagositozuna karşı dirençli, virülansı yüksek mikroorganizmalardır. M proteininin antifagositik parçasına karşı oluşan antikorlar streptokok enfeksiyonlarına yönelik immüniteyi oluşturmaktadır (19, 25). M proteini, lipoteikoik asit (LTA) ve fibronektin bağlayıcı proteinler (FBP) gibi iyi bilinen adezin moleküllerinden biridir. M proteininin değişken N-terminal bölgesi ile çeşitli konak faktörlerine bağlanması bakterinin virülansını artırmaktadır (19, 24). Süperantijen özelliği gösteren bazı M proteinleri ise T hücre çoğalması ve sitokin salınımına neden olarak çeşitli memeli hücreleriyle çapraz reaksiyon veren antikorların oluşmasına neden olmaktadır (20).

**2.2.2.3. Lipoteikoik asit (LTA):** Bakterinin hücre duvarındaki yüzeye ilişkili moleküllerden biri de LTA'dır. LTA, hidrofobik etkileşimler yoluyla streptokokun insan epitel hücrelerine ve konakçı proteinlerine bağlanmasında başlangıç adezini olarak görev almaktadır (19, 20).

**2.2.2.4. Fibronektin bağlayıcı proteinler (FBP'ler):** LTA'lar dışında FBP'ler de streptokokal adezin moleküllerindedir. Fibronektin; konakçı hücreler tarafından salgılanan, hücre yüzeyinde çeşitli proteinleri ve integrinleri bağlayabilen hücre dışı matriks glikoproteinidir. *S. pyogenes*, fibronektini bağlayabilen SfbI (streptokokal fibronektin bağlayıcı protein I), SfbII, FBP54 ve PFBP gibi yüzey bağlayıcı proteinlere sahiptir (20, 27). FBP54 gibi bazı FBP'ler, farklı serotiplerdeki geniş dağılımları ve



güçlü antikor oluşturma etkilerinden dolayı potansiyel bir aşı adayı olarak görülmektedir (27).

**2.2.2.5. Serum opasite faktörü (SOF):** SOF; M proteiniyle ilişkili, memeli serumunu opaklaştırma yeteneğine ve  $\alpha$ -lipoproteinaz aktivitesine sahip bir yüzey antijenidir. Bu faktöre karşı oluşan antikor yanıtının spesifik M proteinleriyle ilişkili olması nedeniyle SOF, *S. pyogenes*'in tiplendirilmesinde kullanılabilir (19, 20).

**2.2.2.6. Streptolizin O ve S:** *S. pyogenes*, Streptolizin O (SLO) ve Streptolizin S (SLS) adında iki hemolizin üretmektedir (20).

Streptolizin O (SLO): Adını oksijene duyarlı olmasından alan SLO, *S. pyogenes*'te tanımlanmış ilk virülans faktörlerinden biridir ve patojenik etkisini hedef hücre membranlarında porlar oluşturarak göstermektedir. Eritrositler dışında lökositler, trombositler, endotel hücreleri, kardiyomyositler gibi çeşitli hücre tipleri üzerine etki gösteren bu toksin; PMNL degranülasyonunu ve proinflamatuvar sitokin salınımını indüklerken, makrofajların fagositoz aktivitesini ve lenfositlerin mitojenlere yanıtını engellemektedir. Antijenik özellikteki SLO'ya karşı oluşan antistreptolizin O (ASO) antikor titreleri, geçirilmiş streptokok enfeksiyonunu göstermekte ancak streptokokal cilt enfeksiyonları sonrasında ASO yanıtı zayıf olmaktadır (19, 20, 24).

Streptolizin S (SLS): SLO'nun aksine antijenik olmayan, oksijene dayanıklı ve hücre membranında porlar oluşturmayan SLS, streptokokların serum varlığında ürettikleri hemolizindir ve bundan dolayı "S" olarak isimlendirilir. SLS'nin toksik etki gösterdiği hücre tipleri SLO'da olduğu gibi çeşitlidir (19, 20). Özellikle keratinositlerin SLS kaynaklı lizisi dokunun yapısını bozarak lezyonun yayılmasına yol açabilmekte ve bu da NF patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca SLS etkisiyle tetiklenen kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) salınımı, ağrıyı indükleyerek NF'nin şiddetini artırmaktadır (24, 25).

*Streptococcus pyogenes* suşlarının çoğunluğu hemolizinlerin her ikisini de üretmektedir. Kanlı agar plaklarındaki kolonilerin yüzeyindeki hemolize genellikle SLS neden olurken; oksijenle inaktive olan SLO, daha çok plakların derininde ya da anaerobik kültürlerde  $\beta$ -hemoliz oluşturmaktadır (19, 20).

**2.2.2.7. Pirojenik (Eritrojenik) ekzotoksinler:** Streptokokal pirojenik ekzotoksinler (SPE'ler), *S. pyogenes* tarafından üretilen hücre dışı ürünlerdir. İmmünolojik olarak farklı tipleri bulunan SPE'lerin en iyi tanımlananları A, B ve C tip SPE'lerdir. Bunlardan SPE B'yi kodlayan gen kromozomal iken, SPE A ve C ekzotoksinleri bakteriyofaj tarafından kodlanmaktadır (20). Fibronektin, vitronektin, immünglobulin ve konağa ait diğer proteinleri parçalayabilen SPE B, *S. pyogenes*'in salgıladığı bir sistein proteazdır. Oklüdin, desmoglein ve E-kadherin gibi yapıları parçalayarak doku invazyonunu artırabilmektedir. Ayrıca histamin, kinin ve IL-1 gibi bakterinin konak hücrede yayılmasını kolaylaştıran aktif peptitlerin üretimine neden olmaktadır (24, 25). APSGN tanılı hastaların glomerüler membranında SPE B bulunması bu ekzotoksinin patogeneizde tartışılan bir diğer rolü olmuştur (19).

Streptokokal pirojenik ekzotoksin A ve C, STŞS başta olmak üzere NF ve diğer önemli enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiş süperantijenlerdir. Bu ekzotoksinler tarih boyunca kızıl hastalığı ile bağlantılı bulduklarından kızıl toksinleri olarak da adlandırılmıştır (19, 25). Günümüzde *S. pyogenes*'te tanımlanmış 13 farklı süperantijen bulunmakla birlikte; SPE A, SPE C ve streptokokal süperantijen A (SSA) invaziv hastalıklar ve kızıl hastalığında bakterinin artan virülansı ile daha yoğun ilişkilendirilmiştir. Süperantijenler, majör doku uygunluk kompleksinin (MHC) sınıf II moleküllerine bağlanarak T hücre aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktive olan T lenfositlerden kontrolsüz sitokin salınımının ortaya çıkardığı sistemik inflamatuvar yanıt, STŞS'de karakteristik olan hipotansiyon ve çoklu organ yetmezliğine yol açmaktadır. Farklı M tipindeki streptokokların süperantijen üretimi de farklılık göstermektedir (6, 20, 25).

**2.2.2.8. C5a peptidaz:** Kemotaktik etkili kompleman bileşiği C5a'ya spesifik proteaz olan C5a peptidaz, *S. pyogenes* yüzeyinde bulunmakta ve C5a'nın indüklediği enfeksiyon bölgesine PMNL kemotaksisini inhibe ederek bakteriyi fagositoza dirençli hale getirmektedir (20, 25, 28).

**2.2.2.9. Nikotinamid adenin dinükleotidaz (NADaz):** NADaz, hipervirülan *S. pyogenes* izolatları ile ilişkilendirilmiş virülans faktörlerinden biridir. NADaz'ın keratinositlere geçişi SLO'nun hücre zarında açtığı porlar aracılığıyla

kolaylaşmaktadır. NADaz ve SLO'nun birlikte etkisi bakterinin virülansını artırmaktadır (19, 25).

**2.2.2.10. Hyaluronidaz:** *S. pyogenes* NF ve selülit gibi klinik tabloları oluştururken bakterinin doku içinde yayılmasını kolaylaştıran ekstraselüler maddelerden biri hyaluronidazdır. Hyaluronidaz, bağ dokusundaki hyaluronik asidi parçalayarak patogeneze katkıda bulunmaktadır (19).

**2.2.2.11. Streptodornaz (DNaz):** Hyaluronidaz gibi DNaz da bakterinin ekstraselüler alanda yayılmasına yardımcı olarak deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının oluşumunda rol almaktadır. Hücre dışı DNA'nın parçalanmasını sağlayan DNaz; A, B, C ve D olmak üzere dört farklı varyant içermektedir. Bunlardan DNaz B, tüm *S. pyogenes* suşlarında bulunmasa da en sık görülen izoenzimdir (19, 29).

**2.2.2.12. Streptokinaz:** Güçlü bir plazminojen aktivatörü protein olan streptokinaz, invaziv *S. pyogenes* hastalıklarının patogenezinde önemli bir rol almaktadır. Plazminojenin plazmine dönüşümünü katalize ederek pıhtıların çözünmesini sağlayan etkisi, konak savunma proteinlerinin proteoliziyle bakteriyel yayılımı kolaylaştırır (6, 19).

### **2.2.3. Patogeneze**

**2.2.3.1. Adezyon ve kolonizasyon:** Boğaz ve cilt *S. pyogenes*'in en çok kolonize olduğu vücut bölgeleridir ve başka konaklara bakterinin bulaşmasını sağlayan rezervuarlardır. *S. pyogenes*, immün yanıtı kaçırmayı sağlayacak çeşitli virülans faktörleri ile boğazda ve ciltte kalıcı olma yeteneği kazanmaktadır. Kolonizasyonun ilk adımı streptokokal ligandların konak hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanmasıdır. Bu aşamadaki güçlü adezyon mekanizmaları olmadığında mukozal salgılar ve epitelin dökülmesi yoluyla mikroorganizma konaktan uzaklaştırılır (1, 30).

M protein, LTA'lar ve FBP'ler gibi çeşitli moleküller streptokokal adezyonda rol oynamaktadır. Adezyon mekanizmaları ile ilgili yapılan çalışmalarda iki aşamalı bir adezyon modeli açıklanmıştır. İlk aşamada daha zayıf, LTA aracılı bir etkileşim görülürken, adezyonun ikinci aşaması M proteini, FBP54, SOF ve protein F gibi çeşitli adezinlerin görev aldığı daha spesifik ve yüksek afiniteli bir süreçtir (1, 25, 30). Adezinlerin ekspresyonu çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Yüzeysel enfeksiyonların patogeneğinde oksijenden olumlu etkilenen Protein F1 ekspresyonu belirginleşirken, yüzeysel olmayan enfeksiyon bölgelerindeki yüksek CO<sub>2</sub> düzeyleri M proteininin virülanstaki rolünü artırmaktadır. Benzer işleve sahip adezinlerin üretilmesi, enfeksiyon sürecinde bakterinin farklı dokularda kolonize olabilmelerini sağlayan bir adaptasyon mekanizması olarak kabul edilmektedir (1, 19). Buna paralel olarak suşlardaki adezin çeşitliliği artan virülansla ilişkilendirilmiştir. *S. pyogenes*'in adezyon mekanizmalarının araştırılması hastalığın patogenezinin anlaşılması ve kolonizasyonu önleyici tedavi ya da aşuların geliştirilmesi için önemlidir (30).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, farklı *emm* tiplerinin boğazda ya da ciltte enfeksiyon oluşturmasını sağlayan doku tropizmini göstermiştir. A'dan E'ye beş gruba ayrılan *emm* paternleri *S. pyogenes*'in enfeksiyon bölgesi seçiminin genetik bir göstergesidir (1).

**2.2.3.2. İnternalizasyon ve invazyon:** İnternalizasyon terimi bakterinin hücre içine girişini ifade eder. Adezyonda rol alan moleküllerin birçoğu bakterinin epitel hücrelerine internalizasyonunda da görev almaktadır. *S. pyogenes* hücre içine girerken, yapışkan matriks moleküllerini tanıyan mikrobik yüzey bileşenlerine (Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMM) bağlı olan ekstraselüler matriks proteinlerini kullanır ve konağın hücre yüzeyindeki integrinlere bağlanır. Bu etkileşimle aktive olan hücresel sinyal yolları, konağın hücre iskeleti aktininin yeniden düzenlenmesine ve bakterilerin alımına yol açmaktadır (1). Hücre içi invazyonu tetikleyen ise, fibronektin ve FBP'ler aracılığıyla  $\alpha 5\beta 1$  integrin reseptörlerinin epitel hücrelere bağlanmasıdır. Streptokokların epitel hücrelerinin iç kısımlarına uzanan çeşitli yollar geliştirmesi invazyonun patogenezdaki önemini göstermektedir (30).

Selülit ve NF gibi klinik tablolarda, streptokokların dokular arasında yayılmasını kolaylaştıran DNaz, hyaluronidaz ve streptokinaz gibi çeşitli ekstraselüler moleküller bulunmaktadır (19). İnvaziv cilt enfeksiyonlarının patogenezindeki bir diğer önemli faktör olan ciddi sistemik inflamasyon, artan mortaliteyle ilişkilidir. İnflamasyonun etkisiyle mikrovasküler tromboz, doku hemorajisi ve hücresele infiltrasyon tetiklenir. Sonuçta sepsis, çoklu organ yetmezliği ve dissemine intravasküler koagülasyon (DİK) gelişimi yoluyla ölüme sonuçlanır. Ayrıca antibiyotiklerin perfüzyonunun kısıtlanması ve mikroorganizmaya makrofaj içinde koruyucu bir hücre içi niş sağlanması tedavi başarısızlığına yol açmaktadır (24).

**2.2.3.3. Konağın bağışıklık sistemine direnç:** *S. pyogenes*, içerdiği çeşitli virülans faktörlerinin etkisiyle konağın bağışıklık yanıtından korunur ve insanlarda patojen etkisini gösterir. Bakterinin immün yanıtı kaçışını sağlayan en önemli faktör, opsonofagositoza ve antimikrobiyal peptidlere karşı gösterilen dirençtir (1).

Lokal invazyon ve sistemik yayılmanın kolaylaşması için *S. pyogenes*'in konağın fagositozuna karşı direnç göstermesi gerekmektedir. M proteini ve kapsül gibi kompleman inhibitörleri, SLO ve SLS gibi lökosit toksinleri, FBP'ler gibi immünglobulin bağlayıcı proteinler ve SPE B gibi immünglobulin parçalayıcı enzimler bu dirençte rol oynamaktadır (1). M proteininin C-terminal bölgesine faktör H bağlanmasıyla inhibe olan kompleman aktivasyonu, M proteininin antifagositik etkilerinin temel mekanizmalarından biridir. M proteinin yüzeyine fibrinojen bağlanmasıyla, alternatif yol aktivasyonu engellenir ve opsonizasyonda görev alan C3b miktarı azalarak PMNL'ler tarafından mikroorganizmanın fagositozu önlenir. Tip spesifik M protein antikorları varlığında ise; M proteininin N-terminal uçlarına bağlanan antikorlar, komplemanın klasik yolunun aktivasyonu ile C3b miktarını artırır ve fagositoza neden olur. Antifagositik özellikler bakterinin hayatta kalması için önemli olduğundan fagositoza direnç yolu açan mekanizmaların anlaşılması önemlidir (30).

**2.2.3.4. Poststreptokokal hastalıkların patogenezi:** *S. pyogenes*'i diğer bakteriyel patojenler arasında önemli hale getiren; mikroorganizma vücuttan uzaklaştırılmış olsa bile devam eden, anormal immün yanıt kaynaklı poststreptokokal süperatif olmayan komplikasyonların görülebilmesidir. *S. pyogenes* kaynaklı

ölümlerin büyük bir kısmı bu komplikasyonlar nedeniyle gerçekleştiğinden, bu hastalıkların patogenezindeki inflamatuvar mekanizmaları bilmek önemlidir (24, 29).

Streptokoka karşı ortaya çıkan bağışıklık yanıtının oluşturduğu antikorlar, insan doku proteinleriyle çapraz reaksiyona girerek otoimmün reaksiyonlara yol açmaktadır. Bu antikorlar kalpte miyozin, tropomiyozin, vimentin, keratin ve laminin gibi konağın  $\alpha$ -sarmal proteinleri ve beyinde tübülün, lizogangliozitler ve dopamin reseptörleri gibi doku proteinleri ile çapraz reaksiyon vermektedir. Akut romatizmal ateş (ARA) ve romatizmal kalp hastalığı (RKH) patogenezinin dair yapılan çalışmalarda M proteininin çapraz reaktif özelliği vurgulanmıştır. 1982 yılında yapılan bir çalışma; M5 proteini üzerindeki antijenik bir belirleyicinin, insanlarda miyokard dokusuyla çapraz reaksiyona neden olan antikorları uyardığını göstermiştir. İlk ARA atağı sonrasında romatizmal ateş nüksü olan hastalardaki çalışmalar ise, kalp dokularına reaksiyon gösteren antikor titrelerinin yüksek olmasının nüks ile ilişkili olduğunu göstermiştir. RKH'de antikorların kalp kapak endoteliliyle reaksiyona girmesi, kapak yüzeyinde inflamasyona ve T hücrelerinin infiltrasyonuna yol açmaktadır. Antikorlar dışında, T hücreleri de konağın protein antijenleri ile çapraz reaksiyona girebilir. T hücreleri, endotel aktivasyonu ile kalp kapağına ekstrasvaze olur ve burada kapak skarına neden olan CD4+ Th1 hücrelerine farklılaşır (24, 31-33).

Çapraz reaksiyon, poststreptokokal hastalıklardan bir diğeri olan APSGN'de de patogenezindeki temel mekanizmadır ve glomerüller ile M protein arasındaki moleküler taklit sonucu ortaya çıkmaktadır. Glomerüllerde biriken immün kompleksler; bağışıklık hücrelerinin toplanması, sitokinlerin ve kimyasal mediatörlerin üretilmesi, kompleman ve koagülasyon kaskadlarının aktivasyonu yollarıyla lokalize bir inflamatuvar yanıtı neden olur (34).

#### **2.2.4. Epidemiyoloji**

*Streptococcus pyogenes* kaynaklı enfeksiyonlar dünya çapında yaygın olduğundan küresel düzeyde sağlık endişesi oluşturan hastalıklardandır (2). Özellikle gelişmiş ülkelerde yaşam şartlarının iyileşmesiyle hastalığın sıklığı yıllar içinde azalmış olsa da, suşlardaki genetik değişiklikler ve konağın duyarlılık durumunun farklılaşmasıyla birlikte spesifik hastalıklarda dönem dönem artışlar dikkat çekmektedir. Örneğin; 20. yüzyılda görülme sıklığı dramatik şekilde düşen kızıl

hastalığının son yıllarda artış gösterdiğine dair çeşitli ülkelerden vakalar bildirilmiştir. Kızıl hastalığı artık hayatı tehdit eden bir durum olmasa da, hızla yayılabilir olması ciddi toplumsal risk oluşturur. Bu artan hastalık oranları, patojenitesi artmış yeni *S. pyogenes* izolatlarıyla ilişkilendirilmiştir (5, 11).

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi verilerine göre; Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) her yıl yaklaşık 20.000 - 27.000 iGAS vakası ortaya çıkmaktadır. iGAS sebebiyle yılda 1.800 - 2.400 kişinin öldüğü bildirilmiştir. İnvaziv hastalık tanımıyla; kan dolaşımı enfeksiyonları, NF, selülit, pnömoni ve STŞS gibi mikroorganizmanın normalde bulunmadığı vücut bölgelerine yerleştiği klinik tablolar ifade edilmektedir. *S. pyogenes* kaynaklı ciddi enfeksiyonların sayısının son 20 yılın en yüksek seviyesine ulaştığı, 2023 yılına ait ön verilerle gösterilmiştir. CDC, popülasyon odaklı ve laboratuvar tabanlı bir sürveyans sistemi olan ABCs yoluyla iGAS enfeksiyonlarını takip etmektedir (4).

Farenjit, kızıl ve impetigo gibi yüzeysel hastalıklar CDC takip sisteminde yer almamasına rağmen, hem sağlık sistemine ciddi bir yük oluşturmaları hem de invaziv hastalıklar için rezervuar görevi görmeleri nedeniyle önemlidir. Ayrıca yılda yaklaşık 500.000 yeni vakaya yol açan ARA, *S. pyogenes* ilişkili morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerindedir. DSÖ raporunda, 2018 yılına kadar yaklaşık 30 milyon kişinin ARA ilişkili RKH'den etkilendiği belirtilmiştir (4, 5, 10, 24).

**2.2.4.1. Risk faktörleri:** Mikroorganizmanın çeşitli virülans faktörleri, konağın özellikleri ve çevresel değişkenler farklı popülasyonlardaki dağılımı etkileyerek *S. pyogenes* enfeksiyonlarının epidemiyolojik özelliklerini şekillendirmektedir (2). Tablo 2'de *S. pyogenes* kaynaklı enfeksiyonlara zemin hazırlayan başlıca risk faktörleri gösterilmiştir.

**Tablo 2.** *S. pyogenes* enfeksiyonları için risk faktörleri (11)

Risk Grubu	Risk Faktörü
<b>Ortak yaygınlık alanları</b>	Gelişmekte olan ülkeler Gelişmiş ülkelerdeki yerli topluluklar Sosyoekonomik düzeyi düşük topluluklar
<b>Ortak maruziyet alanları</b>	Okullar, kreşler Hastaneler Bakım evleri Askeri kamplar

(Tablo 2 devamı)

Risk Grubu	Risk Faktörü
Risk altındaki kişiler	Çocuklar Yaşlılar Hamile ve post-partum dönemde olan kadınlar Erkek cinsiyet Eşlik eden hastalığı olanlar Altta yatan cilt lezyonu olanlar Suçiçeği enfeksiyonu geçiren çocuklar
Çevresel faktörler	Kötü barınma şartları Yetersiz hijyen Enfeksiyon kontrol önlemlerinin yetersizliği Mevsimsel değişim
Riskli temaslar	Solunum damlacıklarının solunması Enfekte kişilerle veya yüzeylerle temas Kontamine gıda tüketimi

İnvaziv *S. pyogenes* enfeksiyonlarının yaklaşık %20-30'unda tanımlanmış bir risk faktörünün olmaması dikkat çekicidir. Cilt lezyonları, bakterinin giriş kapısını oluşturduğundan en iyi bilinen risk faktörüdür. İnfluenza virüsleri başta olmak üzere viral solunum yolu enfeksiyonları invaziv hastalık gelişme riskini artırırken, SARS-CoV-2 pandemisinde böyle bir ilişki saptanmamıştır. Çocuklarda ise geçirilmiş su çiçeği enfeksiyonu risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (5).

**2.2.4.2. Taşıyıcılık ve bulaşma:** Vücudun farklı bölgelerindeki taşıyıcılık durumunun ve bulaşma yollarının bilinmesi başarılı kontrol tedbirlerinin alınmasını sağlayacaktır. Orofarenks, deri (genellikle lezyon bölgesinde), genital mukoza ve rektum *S. pyogenes*'in kolonize olduğu vücut alanlarıdır. Yetişkinlerde farengeal ve vajinal/rektal taşıyıcılık oranlarının sırasıyla %5 ve %1'den az olduğu gösterilirken, çocuklarda tahmini %2-17 arasında farengeal taşıyıcılık olduğu bildirilmiştir (5). Bakterinin insan dışında bilinen bir konağı olmadığı için enfekte kişiyle doğrudan ya da dolaylı temas enfeksiyonun kaynağını oluşturur. Bulaş daha çok damlacık yolu ya da enfekte kişinin tükürük ve yara akıntısı gibi vücut sıvılarıyla temas yoluyla olsa da, kontamine eşyalar ve gıdalar aracılığıyla da meydana gelebilmektedir (30, 35, 36).

### 2.2.5. *Streptococcus pyogenes* Enfeksiyonları

*Streptococcus pyogenes*; farenjit, impetigo ve kızıl gibi hafif seyirli enfeksiyonlardan NF, STŞS, pnömoni ve bakteriyemi gibi daha ciddi enfeksiyonlara



kadar değişen çeşitli klinik tablolara neden olmaktadır. Ayrıca *S. pyogenes* enfeksiyonları sonrasında APSGN ve ARA gibi otoimmün hastalıklar ortaya çıkabilmektedir (1).

### 2.2.5.1. Yüzeyel enfeksiyonlar

2.2.5.1.1. Farenjit: *S. pyogenes*, akut farenjitin en sık bakteriyel etkenidir ve farenjit tanılı çocukların %20-40'ında, yetişkinlerin ise %5-15'inde *S. pyogenes* enfeksiyonu tanısı konulmaktadır. Boğaz ağrısı en sık belirti olup, poliklinik başvurularının da önemli bir kısmını oluşturur. Sıklıkla 5-15 yaş aralığındaki çocuklarda görülen akut GAS farenjiti, ılıman iklim bölgelerinde genellikle kış ve ilkbahar aylarında ortaya çıkar ve okullar, askeri tesisler gibi kalabalık ortamlarda salgınlara neden olabilir (30, 35, 36).

Farenjit gelişen hastaların ani başlayan boğaz ağrısı dışında en sık başvuru şikâyeti ateştir. Pediatrik hastalarda bulantı, kusma, baş ağrısı ve karın ağrısı da mevcut olabilir. Fizik muayenede tonsillerde hipertrofi (eksudalı ya da eksudasız) ve eritem, hassas servikal lenfadenopati, damakta peteşiler, uvulada hiperemi ve şişlik, döküntü saptanabilir. Ancak bu semptom ve bulguların hiçbiri GAS farenjitine özgü değildir (36).

2.2.5.1.2. Kızıl: Kızıl, çoğunluğu farenjit olmak üzere streptokokal bir enfeksiyona döküntünün eşlik ettiği klinik tablodur. *S. pyogenes*'in aynı zamanda süperantijen olan eritrojenik toksinleri, döküntü ve çilek dili gibi semptomlara neden olan ekzotoksinlerdir. Kızıl döküntüsü, *S. pyogenes* enfeksiyonu başlangıcından 1-2 gün sonra gövde veya boyunda başlayıp yüze ve ekstremitelere yayılır. Koltuk altı gibi vücut kıvrımlarında döküntünün belirginleştiği alanlara Pastia çizgileri adı verilir. Ciltte küçük papüllerin oluşturduğu "zımpara kâğıdı" görünümü mevcuttur. Ağız çevresinde solukluk ve irileşmiş papillaların neden olduğu "çilek dili" diğer belirtilerdendir. Döküntü yaklaşık bir hafta sonra kaybolurken avuç içleri ve ayak tabanlarında soyulmalar gözlenir. Ayırıcı tanıda Kawasaki hastalığı, stafilokokal toksik şok sendromu, viral hastalıklar ve alerjik döküntüler akla getirilmelidir (30, 35, 37).

2.2.5.1.3. İmpetigo: Birçok streptokok türü gastrointestinal sistemde, cilt ve mukozada normal flora elemanı olarak bulunsa da *S. pyogenes*, yüksek patojenite

yeteneği ile farklı deri katmanlarına ulaşabildiğinden deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının en önemli bakteriyel etkenlerinden biri haline gelmiştir (38, 39). Enfeksiyon, geliştiği deri tabakasına göre; dış keratin katmanda impetigo, yüzeysel epidermiste erizipel, deri altı dokuda selülit, fasyada NF ve kasta ise miyozit veya miyonekroz adını almaktadır (38).

İmpetigo, cildin yaygın yüzeysel enfeksiyonudur ve en sık etkenler *Staphylococcus aureus* ile *S. pyogenes*'tir. *S. aureus*, çoğunlukla büllöz lezyonlardan sorumluyken *S. pyogenes* büllöz olmayan impetigoya neden olmaktadır (37, 38). Streptokok suşunun deride kolonize olmasından yaklaşık 10 gün sonra lezyonlar ortaya çıkmakta ve bunu izleyen 14-20 günde bakteri üst solunum yollarına geçebilmektedir (38, 39). Enfeksiyon farenjitin aksine yaz aylarında daha yaygındır ve en sık 2-5 yaş aralığında görülmektedir (30, 37).

Yüz gibi vücudun daha çok açıkta kalan bölgelerinde ortaya çıkan streptokokal impetigo lezyonu, eritemli papülden veziküle ve vezikülün patlamasıyla da püstül haline dönüşür. Püstüller kalın kabukludur ve tipik olarak "bal rengi" eksüda içerir. Ateş, lokalize ödem ve lenfadenopati kliniğe eşlik edebilir. İmpetigo, hayati bir tehlike oluşturmamasına rağmen, glomerülonefrit gelişimine neden olabilmektedir (37-39).

2.2.5.1.4. Erizipel: Erizipel; genellikle yüz ve ekstremitelerde görülen, sınırları belirli, deriden kabarık, ağrılı ve eritemli deri lezyonudur. Bu enfeksiyonun nedeni çoğunlukla *S. pyogenes* olsa da daha az sıklıkla C ve G grubu  $\beta$  hemolitik streptokoklar da etken olabilmektedir. Bebekler, küçük çocuklar ve yaşlılar hastalığın sık görüldüğu yaş gruplarıdır. Yüz erizipelinin cilde yayılma yolu net bilinmemekle birlikte, hastaların genellikle öncesinde streptokokal farenjit geçirmiş olması dikkat çekicidir. Ekstremitte lezyonlarında ise, deri bütünlüğünü bozan travma ve enfeksiyonlar hastalığa zemin hazırlamaktadır (37, 38).

2.2.5.1.5. Vulvovajinit: Vulvovajinit, ergenlik dönemi öncesindeki kız çocuklarında sık görülen bir jinekolojik şikâyettir. Tanı için alınan vajen kültürlerinde çoğunlukla polimikrobiyal üreme gözlenirse de en net belirlenmiş etken *S. pyogenes*'tir ve diğer mikroorganizmaların aksine normal flora elemanı olarak kabul edilmemektedir. Hastalar vulvar kaşıntı, ağrı ve eritem, seröz ya da pürülan vajinal

akıntı şikayetleriyle başvurmaktadır. *S. pyogenes* vulvovajiniti öncesinde geçirilmiş bir farengeal enfeksiyon ya da GAS taşıyıcılığı bu klinik tabloyla ilişkilendirilirken, kesin tanı için vajen sürüntü kültürü önerilmektedir (37).

**2.2.5.2. İnvaziv enfeksiyonlar:** İnvaziv enfeksiyonlar, *S. pyogenes*'in steril bir vücut bölgesinden saptandığı, ciddi ve agresif bir seyirle mortaliteye neden olabilen enfeksiyonlardır. SPE'ler bu klinik tabloların patogeneğinde rol almaktadır (40, 41).

2.2.5.2.1. Nekrotizan Fasiit (NF): Derin deri altı dokuların enfeksiyonu olan NF, fasyada hızlı yayılan hasarla karakterizedir. Enfeksiyonun başlangıcı çoğunlukla belirgin olmayan bir travma bölgesinde ya da ameliyat yarasında hafif bir eritem şeklinde olmaktadır. Bundan 24-72 saat sonra yaygın inflamasyonun eşlik ettiği cilt ekimozu ve ardından hemorajik ya da seröz büller ortaya çıkmaktadır. Yaygın doku nekrozu ve ölü dokuların dökülmeye başlaması ile dokularda gangren gelişir. Klinik tabloya genellikle bakteriyeminin eklenmesiyle metastatik apseler görülebilir ve kontrol altına alınmayan enfeksiyon geniş bir vücut bölgesine hızla yayılabilir (19, 41). Fizik muayenede en çok eritem, ağrı, şişlik ve ateş görülürken, enfeksiyonun deri altında hızla yayılması nedeniyle ağrı muayene bulgularıyla orantısız derecede şiddetlidir. Dokuda gaz oluşum ya da kutanöz anestezi gelişmesi sık karşılaşılmayan ancak tespit edildiğinde acil cerrahi müdahale gerektiren belirtilerdir (42).

2.2.5.2.2. Streptokokal Toksik Şok Sendromu (STŞS): Herhangi bir streptokok enfeksiyonunun neden olduğu ani gelişen çoklu organ yetmezliği, hipotansiyon ve şok STŞS olarak adlandırılırken, kesin vaka tanımı için *S. pyogenes*'in vücutta steril bir bölgeden izole edilmesi gerekmektedir. Vakaların çoğunluğu sporadik olsa da; diyabet, maligniteler, konjestif kalp yetmezliği, immünsupresyon ve alkolizm gibi eşlik eden durumlar raporlanmıştır. Bakterinin ana giriş yerleri farenks, vajen, cilt ve mukozalar olmakla birlikte, streptokokal farenjit sonrası STŞS nadiren ortaya çıkmaktadır. Ayrıca vajinal doğum, histerektomi, vazektomi, fitik onarımı gibi cerrahi işlemler de enfeksiyona zemin hazırlayan faktörlerdendir (19, 37, 41).

Tüm yaş gruplarında en sık primer enfeksiyon bölgesi yumuşak doku olmakla birlikte pnömoni, menenjit, peritonit, miyokardit, eklem enfeksiyonları da

tanımlanmış diğer kaynaklardır. Ateş, miyalji, bulantı ve kusma gibi non-spesifik semptomların görüldüğü prodromal bir dönemden sonra, taşipne ve taşikardinin eşlik ettiği yüksek ateş ve şiddetli ağrı görülmektedir (19, 41). STŞS'nin son evresinde ise *S. pyogenes* tarafından üretilen ekzotoksinlerin indüklediği sitokin fırtınası ani başlangıçlı hipotansiyon, şok ve çoklu organ yetmezliği ortaya çıkarmakta, bu klinik tabloların progresyonu kısa sürede mortalite ile sonuçlanmaktadır (37, 41).

2.2.5.2.3. Selülit: Selülit, deri ve deri altı dokuların enfeksiyonu olup *S. pyogenes*'in en sık görülen invaziv enfeksiyonlarından. Ciltte eritem, şişlik, hassasiyet ve lokal ağrı gibi klinik bulgular ile başlayıp daha geniş bölgeleri etkileyecek şekilde yayılabilir. Deriden kabarık olmayan, sınırları belirsiz lezyonların görülmesiyle erizipelden ayrılrsa da, klinik olarak ayırıcı tanı çoğu zaman yapılamamaktadır. Deri bütünlüğünü bozan yaralar, bacak ülserleri, yanıklar enfeksiyon için risk oluşturmaktadır (1, 38).

2.2.5.2.4. Bakteriyemi: *S. pyogenes*'in kan dolaşımına geçmesiyle oluşan bakteriyemi tablosu; güçlü bir sitokin yanıtının oluşturduğu ani başlangıçlı ateş, halsizlik, bulantı ve kusma gibi semptomlarla karakterizedir (1, 19). Çocuklarda yanıklar ve su çiçeği lezyonları gibi cilt bütünlüğünü bozan durumlar bakterinin vücuda giriş yolunu oluştururken, yaşlılarda kaynak yine çoğunlukla kutanöz lezyonlardır ve kronik hastalıklar predispozan faktörlerdendir. İmmüsupresyon ve maligniteler tüm yaş grupları için risk barındırır. Yapılan farklı çalışmalarda bakteriyeminin mortalitesi %27-38 arasında bildirilmiştir (19).

### **2.2.5.3. Poststreptokokal hastalıklar**

2.2.5.3.1. Akut Romatizmal Ateş (ARA) ve Romatizmal Kalp Hastalığı (RKH): ARA; karakteristik olarak *S. pyogenes* farenjitinden 2-4 hafta sonra ortaya çıkan, çeşitli organları etkileyebilen otoimmün bir hastalıktır (37). ARA kaynaklı kalp kapakçıklarındaki kronik hasar RKH olarak adlandırılmaktadır. RKH, morbidite ve mortaliteye neden olduğundan ARA'nın uzun vadede en ciddi sekelidir (43, 44).

Akut romatizmal ateşin kesin bir tanısı olmamakla birlikte, klinik tanıda Jones Kriterleri kullanılmaktadır. Amerikan Kalp Derneği (American Heart Association, AHA), 2015 yılında ARA ve RKH gelişimi açısından düşük ve orta-yüksek riskli popülasyonların farklılıklarını dikkate alarak Jones Kriterleri'ni güncellemiştir. Modifiye Jones Kriterleri Tablo 3'te gösterilmiştir. Bu kriterlere göre; geçirilmiş *S. pyogenes* enfeksiyonun kanıtlanmasıyla birlikte iki majör kriter ya da bir majör ve iki minör kriterin mevcut olması ARA tanısını gösterirken, tekrarlayan ARA vakalarında majör kriter olmadan üç minör kriterin bulunması da tanı için yeterli kabul edilmiştir (43-45).

**Tablo 3.** Modifiye Jones Kriterleri (44, 45)

	<b>Tüm popülasyonlar</b>	<b>Düşük riskli popülasyonlar</b>	<b>Orta-yüksek riskli popülasyonlar*</b>
<b>Majör kriterler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardit (Klinik/subklinik)</li> <li>• Kore</li> <li>• Eritema marginatum</li> <li>• Subkutan nodüller</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artrit (Poliartrit)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artrit (Monoartrit/poliartrit)</li> </ul>
<b>Minör kriterler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ateş (<math>\geq 38,5</math>)</li> <li>• EKG'de PR aralığının uzaması (Kardit majör kriter değilken)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poliartralji</li> <li>• Akut faz reaktanlarında artış (ESH <math>\geq 60</math> mm/h ve/veya CRP <math>\geq 3,0</math> mg/dl)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monoartralji</li> <li>• Akut faz reaktanlarında artış (ESR <math>\geq 30</math> mm/h ve/veya CRP <math>\geq 3,0</math> mg/dl)</li> </ul>

\*Orta-yüksek risk; ARA insidansının her 100.000 okul çağındaki çocuk başına 2'den büyük ya da RKH prevalansının yılda 1.000 kişide 1'den büyük olduğu popülasyonlar

EKG: Elektrokardiyografi, ESH: Eritrosit Sedimentasyon Hızı, CRP: C-Reaktif Protein

2.2.5.3.2. Akut poststreptokokal glomerülo nefrit (APSGN): APSGN; streptokok enfeksiyonu sonrası ortaya çıkan, immün kompleks aracılı süpüratif olmayan bir komplikasyondur. Çoğunlukla *S. pyogenes* olmak üzere nadiren C ya da G grubu streptokokların da etken olduğu enfeksiyonlarla ilişkilidir (34, 37). Hastalık ağırlıklı olarak 3-15 yaş aralığında görülse de, immünite değişimleri ve ek komorbiditelerin varlığı yaşlıları da APSGN'ye yatkın hale getirmektedir (34, 46).

Akut romatizmal ateşten farklı olarak APSGN, nefritojenik *S. pyogenes* suşları ile ilişkilendirilmiştir. Üst solunum yolu enfeksiyonlarına sekonder gelişen APSGN, *emm* tip 1, 2, 4 ve 12 ile bağlantılı bulunurken; *emm* tip 47, 49 ve 55 primer enfeksiyon bölgesininin deri olduğu vakalarda öne çıkmaktadır. Glomerüller ile M proteini arasındaki moleküler taklitin antiglomerüler antikörlerin üretilmesine yol açan çapraz reaksiyonun temeli olduğu düşünülmektedir (1, 31, 34).

Genellikle üst solunum yolu enfeksiyonlarından 7-10 gün, cilt enfeksiyonlarından 2-4 hafta sonra APSGN tablosu ortaya çıkmaktadır. Çoğunlukla hastalarda akut nefritik sendrom gelişirken, nadiren nefrotik sendrom ya da hızlı ilerleyen glomerülo nefrit de görülebilmektedir. En sık semptomlar; hematüri, ödem, proteinüri, hipertansiyondur (34, 37).

2.2.5.3.3. Streptokok Enfeksiyonlarıyla İlişkili Pediatrik Otoimmün Nöropsikiyatrik Bozukluklar (Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections, PANDAS): *S. pyogenes* enfeksiyonları sonrasında obsesif kompulsif bozukluklar, koreiform hareketler, tikler ve davranış değişikliklerinin görüldüğü ani başlangıçlı nöropsikiyatrik sendrom PANDAS olarak isimlendirilmiştir. Hastalığın patogenezi tartışmalı olsa da streptokok enfeksiyonunun yol açtığı bazal gangliyon antijenlerini hedef alan otoimmünite suçlanmıştır (1, 30, 37).

## 2.2.6. Tanı

*Streptococcus pyogenes*'in neden olduğu enfeksiyonların laboratuvar tanısı hâlâ büyük oranda bakteri kültürüne dayanmaktadır. Bakterinin yaptığı  $\beta$  hemolizin kanlı agar plaklarında saptanması kolay bir ön tanı sağlar. Şüpheli kolonilerin *S. pyogenes* olarak tanımlanması birkaç hızlı ve kolay laboratuvar testi ya da otomatize sistemler kullanılarak yapılmaktadır. ARA ve APSGN gibi poststreptokokal hastalıkların tanısında ise serolojik yöntemler kullanılır (47).

**2.2.6.1. Mikroskopisi:** Akut farenjit tanısında boğaz kültürlerinin gram boyalı mikroskopisi, normal flora elemanı olan streptokokların varlığı nedeniyle önerilmemektedir. Beyin omurilik sıvısı (BOS), kan gibi steril örneklerde ise

mikroskopik inceleme daha değerlidir. *S. pyogenes*, gram boyalı preparatlarda zincir yapmış gram pozitif kok şeklinde görülür (18, 47, 48).

**2.2.6.2. Kültür:** Streptokokların üremesi, kan gibi zenginleştiricilerin eklendiği besiyerlerinde kolaylaşmaktadır. Bu besiyerlerinde  $\beta$  hemolizin tespit edilebilmesi tanımlama için ilk basamağı oluştururken, besiyerinde bulunan katalaz bakterinin üremesini artırmaktadır. Columbia agar gibi gram pozitif bakteriler için seçici besiyerleri de kültür için optimal şartları sağlamaktadır. Streptokok türlerinin birçoğu anaerobik şartlarda daha iyi ürese de, yapılan çalışmalar *S. pyogenes* izolasyonu için aerobik inkübasyonun yeterli olduğunu göstermiştir. Klinik örneklerin kültürlerinde *S. pyogenes* varlığı, 35-37 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiş KKA plaklarında  $\beta$  hemolitik kolonilerin tespiti ile değerlendirilir. Tipik *S. pyogenes* kolonileri; beyaz-gri renkte, kubbe şekilli, belirgin kenarları olan ve etrafında koloni boyutunun 2-4 katı büyüklükte  $\beta$  hemoliz zonu bulunan,  $\geq 0,5$  mm çaplı kolonilerdir (47-49).

Duyarlılık ve özgülüğünün yüksek olması nedeniyle GAS farenjitinin tanısında boğaz kültürü altın standart yöntem olmaya devam etmektedir. Ancak boğaz kültüründe *S. pyogenes* üremesinin akut enfeksiyon ile asemptomatik taşıyıcılık ayırımı yapamadığı unutulmamalıdır. Normal boğaz florası elemanlarının plakta aşırı çoğalması, toplanan örnek miktarının yetersizliği, inkübasyon şartlarının optimal olmaması, kültürün yanlış değerlendirilmesi gibi durumlar ve nadiren de SLS gen delesyonları taşıyan ve klinik önemi henüz bilinmeyen non-hemolitik *S. pyogenes* suşlarının üremesi nedeniyle yanlış negatif kültür sonuçları raporlanabilmektedir (19, 30, 47, 48).

Kültürde üremiş tipik *S. pyogenes* morfolojisine sahip  $\beta$  hemolitik kolonilere ilk önce katalaz testi yapılmalıdır. Katalaz negatif kolonilerde pozitif pyrrolidonyl arylamidase (PYR) testi ve basitrasin duyarlılığının saptanması *S. pyogenes* için ön tanımlama sağlar. Kesin tanı ise Lancefield A grubu antijen testi pozitifliği ya da otomatize sistemlerle tür düzeyinde tanımlama ile yapılmaktadır (30, 47).

2.2.6.2.1. Katalaz testi: Katalaz testi; sitokrom oksidaz enzimlerinin varlığını gösteren, stafilokok ve mikrokoklar (pozitif) ile streptokok ve enterokok türlerinin

(negatif) ayrımını yapan temel testtir. Lam üzerine alınan bakteri kolonisine %3 hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) damlatılmasıyla kabarcıklanmanın görülmesi testin pozitif olduğunu gösterir. Bakterinin sentezlediği katalaz enzimi  $H_2O_2$ 'yi su ve gaz kabarcıklarını oluşturan oksijene çevirir (20, 48).

2.2.6.2.2. Pyrrolidonyl Arylamidase (PYR) Testi: PYR testi; pirolidonil amonipeptidaz enziminin varlığını gösteren, hızlı sonuç veren, kolorimetrik bir yöntemdir. Bu enzime sahip bakteriler, L-pirolidonil- $\beta$ -naftilamid'i bir sinnamaldehit reaktifinin eklenmesiyle  $\beta$ -naftilamide hidrolize eder ve böylece kırmızı renk değişimi gözlenir. PYR emdirilmiş test stripleri çeşitli ticari firmalardan temin edilebilir (47).

Laboratuvarlardaki standart tanımlama prosedürleri ile tipik morfoloji sergileyen, PYR testi pozitif  $\beta$  hemolitik streptokoklar *S. pyogenes* olarak tanımlanabilir. Ancak *Streptococcus porcinus* ve *Streptococcus iniae* gibi  $\beta$  hemolitik streptokokların da PYR pozitif olduğu unutulmamalıdır (47).

2.2.6.2.3. Basitrasin duyarlılığı: *S. pyogenes*'in PYR testi pozitif olan *S. porcinus* ve *S. iniae* gibi  $\beta$  hemolitik streptokoklardan ayrımının yapılmasında basitrasin duyarlılık testi kullanılır. Lancefield grup A antijenini taşıyan *S. pyogenes* dışındaki  $\beta$  hemolitik streptokokların basitrasine dirençli olması tanımlamada kolaylık sağlamaktadır. Ancak C ve G grubu streptokoklardaki yalancı pozitif sonuçlar, *S. pyogenes* tanımlanmasında basitrasin duyarlılığının güvenilirliğini azaltabilir. Ayrıca bazı Avrupa ülkelerinden basitrasine dirençli bazı *S. pyogenes* suşları raporlanmıştır (47, 50).

2.2.6.2.4. Lancefield antijeninin belirlenmesi: İnsanlarda patojen olabilen streptokoklar Lancefield A, B, C, D, F ve G gruplarında yer almaktadır. Bu sınıflandırma ile sadece  $\beta$  hemolitik streptokoklar ve D grubu streptokokların non-hemolitik ya da  $\alpha$  hemoliz yapan türleri sınıflandırabilir. Ekstrakte edilen antijenin tespitini sağlayan çeşitli yöntemler mevcut olsa da  $\beta$  hemolitik streptokokların gruplandırılmasında, lateks aglütinasyon yöntemi Lancefield'in kapiller presipitasyon yönteminin yerini alarak referans metot olmuştur. Bu yöntemde, polistiren lateks boncuklardaki gruba spesifik antiserumların ekstrakte edilmiş antijenler ile reaksiyonu



incelenir. Piyasada mevcut olan çeşitli lateks aglütinasyon kitlerinde, farklı mikroorganizmalarla çapraz reaksiyonlar bildirilmiştir (20).

Antijen gruplarıyla streptokok türleri arasındaki korelasyon iyi olsa da, özellikle A, C ve G gruplarında istisnalar mevcuttur. *S. pyogenes* suşlarının tamamı nadir görülen mutasyonlar dışında A grubu antijenini bulundurmamakla birlikte, bazı *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ve *Streptococcus anginosus* grup izolatlarında da bu antijen saptanabilir. Dolayısıyla *S. pyogenes*'in identifikasyonunda Lancefield antijeninin belirlenmesi tek başına yeterli olmamaktadır (47).

2.2.6.2.5. Otomatize sistemlerde tanımlama: Son yıllarda klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteri tanımlamasında otomatize sistemlerin kullanımı giderek daha yaygın hale gelmiştir. Koloni morfolojisi ve çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar gibi fenotipik özelliklere dayalı geleneksel tanımlama yöntemleri birden fazla işlemi gerektiren, zaman alıcı metotlardır. Matriks ile desteklenmiş lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (Matriks assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS); konvansiyonel yöntemlerin bu dezavantajlarını ortadan kaldıracı, mikroorganizmaların protein bileşimine dayalı tür tanımlaması yapan bir sistemdir. Bu yöntemle tanımlamanın doğruluğu artarken, tanımlama süresi de önemli ölçüde azalmaktadır. Başlangıçta, özellikle *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*'in *S. pyogenes* olarak yanlış identifikasyonu gibi, bazı  $\beta$  hemolitik streptokok türlerinde kısıtlılıklar olmakla birlikte, zaman içerisinde veritabanındaki değişimlerle MALDI-TOF yöntemi ile *S. pyogenes* tanımlaması iyi performans gösterir hale gelmiştir. Bu nedenle klinik laboratuvarlarda kullanımı giderek yaygınlaşmakta ve konvansiyonel yöntemlerin yerini almaya başlamaktadır. Doğrudan pozitif kan kültürü şişesinden tanımlama yapabilen ticari sistemler, özellikle *S. pyogenes* ve *S. agalactiae* gibi önemli patojenlerin etken olduğu invaziv hastalıklarda hızlı tanı ve tedavi imkânı sağlamaktadır (47, 51).

**2.2.6.3. Hızlı antijen testleri:** Streptokokal farenjitli hastalarda antibiyotik tedavisinin hemen başlatılması için kullanılan hızlı antijen testleri, en az bir gecelik inkübasyon gerektiren boğaz kültürünün aksine birkaç dakikada sonuçlanabilir (19,

47). Hızlı antijen testleri, boğaz sürüntüsü örneklerinde lateks aglütinasyon yöntemi ya da immünolojik yöntemlerle A grubu antijeninin doğrudan saptanmasını sağlar. Bu testlerin duyarlılıkları %58 ile %96 arasında değişirken, özgüllükleri oldukça yüksektir. Dolayısıyla *S. pyogenes* için hızlı antijen testleriyle pozitif sonuç alınması boğaz kültürü gerekliliğini ortadan kaldırır. Buna karşın, *S. pyogenes* ile ortak karbonhidrat antijeni taşıyan diğer streptokok türlerinin normal boğaz florasında bulunması, testlerde yanlış pozitif sonuca yol açabilir. Boğaz kültüründe olduğu gibi hızlı antijen testleri de GAS taşıyıcılığı ile GAS farenjiti arasında ayırım yapamamaktadır (52, 53).

**2.2.6.4. Serolojik tanı:** *S. pyogenes*'in sahip olduğu virülans faktörlerinin bir kısmı, antijenik özellikleri ile serolojik tanının temelini oluşturmuştur. ARA ve APSGN gibi hastalıklarda, geçirilmiş bir enfeksiyonun ispatı serolojik testlerle yapılabilmektedir. Ayrıca boğaz kültüründe *S. pyogenes* üremiş hastalarda enfeksiyon ve taşıyıcılık ayırımının yapılmasında da bu testler kullanılabilir. Diğer taraftan serolojik test sonuçlarının yorumlanmasındaki farklılıklar nedeniyle hastaların klinik ve epidemiyolojik özelliklerinin dikkate alınması gerekmektedir (29).

İki-dört hafta arayla alınmış iki serum örneğinde antikor titresinin dört kat artması geçirilmiş enfeksiyon göstergesidir. Buna rağmen akut streptokokal enfeksiyonlarda bu sürenin beklenmesi pratik olmayacağı için serolojik yöntemler sadece araştırma amaçlı ya da atipik seyirli invaziv enfeksiyonu olan hastaların tanısında kullanılabilir. ASO ve anti-Dnaz B serolojik tanıda en yaygın kullanılan antikorlardır (29, 47).

**2.2.6.4.1. Anti-streptolizin O (ASO):** ASO antikorlarını ölçebilen nötralizasyon testi, SLO'nun oluşturduğu  $\beta$  hemolizin farklı dilüsyonlardaki hasta serumu ile inhibe edilmesi esasına dayanır ve hemolizin görülmediği en yüksek serum dilüsyonunun tersi olan Todd birimi ASO titresini vermektedir. Daha güncel testler ise lateks aglütinasyon, nefelometrik ve türbidimetrik metotlarla ölçüm yapmaktadır (29, 47).

Cilt enfeksiyonlarına kıyasla boğaz enfeksiyonları sonrasında oluşan ASO yanıtı daha güçlüdür. ASO titresi klasik olarak enfeksiyondan bir hafta sonra yükselmeye başlar ve normal seviyelere inmesi yaklaşık sekiz ayı bulur. *S.*

*disgalactiae* subsp. *equisimilis* gibi SLO üreten başka türler de bulunduğundan, ASO yüksekliğinin *S. pyogenes* enfeksiyonlarına spesifik olmadığı unutulmamalıdır (29, 47).

2.2.6.4.2. Anti-deoksiribonükleaz B (Anti-DNaz B): DNaz B, *S. pyogenes*'in ekstraselüler matrikste yayılmasını kolaylaştırarak deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının patogeneğinde rol oynar ve bu faktöre karşı oluşan antikor titreleri, ASO'dan farklı olarak cilt enfeksiyonları sonrasında da belirgin yükselmektedir. Enfeksiyon başlangıcından iki hafta sonra yükselmeye başlayan titreler, 12 ayda normale dönmektedir. Ayrıca DNaz B'nin *S. pyogenes*'e spesifik olması, anti-DNaz B titreleri değişmeksizin sadece ASO yüksekliğinin görüldüğü durumlarda *S. pyogenes* enfeksiyonlarını dışlamaktadır (29, 47).

**2.2.6.5. Nükleik asit testleri:** Nükleik asit testlerinin doğrudan hasta örneklerinde çalışılması, tanı için gerekli süreyi kısaltarak özellikle NF gibi hızlı kötüleşen durumlarda tedaviye erken başlama imkânı sağlamaktadır (50).

Boğaz örneklerinden doğrudan *S. pyogenes* tanısını sağlamak amacıyla geliştirilen ilk nükleik asit testi olan GASDirect (Hologic [Gen-Probe], San Diego, CA), DNA hibridizasyon probu ile *S. pyogenes*'in spesifik rRNA dizilerini tespit eder. Bu testin duyarlılığı kültüre yakın bulunmuştur ve özellikle negatif sonuçlanan hızlı antijen testlerine alternatif olarak kullanılabilir. Ancak penisilin alerjisi olan ve antibiyotik tedavisine yanıt vermeyen hastalarda antibiyotik duyarlılık testinin (ADT) çalışılabilmesi için kültür yapılması gerekmektedir. (47, 48) Nükleik asit temelli testlerden bir diğeri olan hasta başı moleküler testler de PCR teknolojisini kullanarak *S. pyogenes* varlığını hızlı bir şekilde saptamaktadır (47).

Nükleik asit testlerinde kültüre kıyasla sonuç verme süresinin kısalması dışında en önemli avantaj, bakteri yükü düşük enfeksiyonlarda ve poststreptokokal hastalıklarda *S. pyogenes*'i tespit edebilme başarısıdır. Ancak artan bu duyarlılık, asemptomatik *S. pyogenes* taşıyıcılarında yalancı pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Kontaminasyonun ve canlı olmayan bakterilerin saptanabilmesi de, gereksiz antibiyotik reçete edilmesine yol açmaktadır. Nükleik asit testlerinin bir diğer dezavantajı maliyet yüksekliği ve geri ödeme sorunlarıdır (47, 49).

### 2.2.7. Tedavi

Lisanslı bir aşı henüz olmadığından, enfeksiyonun tedavisi ve bulaşın önlenmesi için antibiyotik tedavisi, *S. pyogenes* kaynaklı hastalıkların yönetiminin temelini oluşturmaktadır (6). GAS farenjiti genellikle hafif ve kendi kendini sınırlayan bir klinik durumdur. Antimikrobiyal tedavi semptomların iyileşmesine katkı sağlamakla birlikte, asıl hedef komplikasyonların engellenmesidir. Antibiyotik tedavisi; peritonsiller apse, mastoidit ve servikal lenfadenit gibi süpüratif komplikasyonlarla birlikte ARA gibi non-süpüratif komplikasyonların gelişimini de önlemektedir (19, 49, 54).

Streptokokal farenjit tedavisinde dar spektrumu, ARA'yı önlemedeki etkinlik ve güvenliği, düşük maliyeti sebebiyle önerilen ilaç penisilindir. Boğaz ağrısı başladıktan sonraki dokuz gün içerisinde tedaviye başlanması ARA gelişiminin engellenmesinde hâlâ etkili görülmektedir. Penisilin alerjisi olanlarda birinci kuşak sefalosporinler, makrolidler ve klindamisin tercih edilebilir. Hastanın penisiline karşı anafilaktik tipte aşırı duyarlılık öyküsü varsa sefalosporinlerden de kaçınılmalıdır. Antibiyotik tedavi süresi genellikle 10 gündür. Peritonsiller apse gibi süpüratif komplikasyonlar geliştiğinde drenaj yapılması gerekmektedir. Yakın temaslılara bulaştırma ve komplikasyon geliştirme riski çok düşük olduğundan GAS taşıyıcılarına tedavi verilmesi önerilmemektedir. Ayrıca tonsillektomi yapılmasının ARA insidansını azalttığına dair bir kanıt yoktur (19, 36).

*Streptococcus pyogenes* ilişkili cilt enfeksiyonlarının tedavisinde daha lokalize lezyonlar için topikal mupirosin ya da retapumulin kullanılmaktadır. Yaygın ve çoklu lezyonlar için ise oral tedavi uygulanmalıdır. Büllöz olmayan impetigo vakalarında *S. aureus*'un izolasyon sıklığının artması ve raporlanan penisilin başarısızlıklarından dolayı, penisilinaz dirençli penisilinler ya da birinci kuşak sefalosporinler tercih edilmelidir. Derin yerleşimli enfeksiyon şüphesi olduğunda ise, agresif ve hızlı cerrahi eksplorasyon ve debridman yapılmalıdır. Nekrozlu bölgelere kapsamlı debridman yapılması cansız doku kaynaklı şok ve çoklu organ yetmezliğinin engellenmesi açısından önemlidir. STSS geliştiğinde şok tablosunun tedavisi büyük miktarda intravenöz sıvı ve gerekli durumlarda albümin replasmanını içermektedir. Antibiyotik tedavisine hemen ampirik olarak başlanmalı, streptokokal etken doğrulandıktan sonra yüksek doz penisilin ve klindamisin verilmelidir. Penisilin bağlayıcı proteinler (PBP)

*S. pyogenes*'in durağan faz büyümesi sırasında eksprese edilmediğinden, çok miktarda bakteri içeren derin enfeksiyonlarda penisilin etkisizdir. Klindamisin, bakterinin ekzotoksin ve M protein üretimini baskılayan daha uzun yarı ömürlü bir antibiyotiktir. İn vitro koşullarda penisilin ve klindamisin kombinasyonunun antagonistik etkisine rastlanmamıştır (19, 37). STŞS'de yardımcı bir tedavi olan intravenöz immünglobulin (intravenous immunoglobulin, IVIG), hem bakteriyi hem de ekzotoksinleri nötralize ederek morbidite ve mortaliteyi azaltmaktadır (55).

**2.2.7.1. Antibiyotik direnci:** CDC, ABCs ile antibiyotik direnç verilerini takip etmektedir ve 2019 Antibiyotik Direnci Tehditleri Raporu'nda; her beş iGAS enfeksiyonunun birden fazlasında eritromisin ve klindamisine dirençli suşların etken olduğu belirtilirken, eritromisin dirençli *S. pyogenes*, endişe verici tehditler listesinde yer almıştır. *S. pyogenes*,  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere duyarlı olmaya devam etse de, özellikle penisiline alerjisi olanlarda ve ciddi seyirli invaziv hastalıklarda tercih edilen eritromisin ve klindamisin gibi antibiyotiklere karşı artan direnç tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu direnç, ribozomal hedef bölge modifikasyonunun sonucudur ve farklı *emm* tipleri ile ilişkilendirilmiştir. Eritromisin direnci metilaz (erythromycin resistant methylase, *erm*) genleri tarafından 23S rRNA'nın metilasyonu, *MLS<sub>B</sub>* direnci fenotipine yol açarak makrolidlere, linkozamidlere ve streptogramin B'ye dirence neden olmaktadır. *S. pyogenes*'te tetrasiklin direnci ise ribozomal koruma genleri *tetM* ve *tetO* ile efluks pompa sistemi genleri *tetK* ve *tetL*161 aracılığıyla ortaya çıkmaktadır (4, 6, 9).

*Streptococcus pyogenes* izolatlarında subklinik  $\beta$ -laktam direnci, endişe oluşturan durumlardan diğeridir (6). Yakın zamanda iki *emm* tip 43.4 izolatında ampisilin ve amoksisilin için minimum inhibitör konsantrasyonda (MİK) direnç seviyelerine ulaşmayan sekiz kat artış saptanmış ve PBP2x olarak tanımlanan PBP'lerdeki sessiz mutasyon tespit edilmiştir (56). PBP2x mutasyonu taşıyan başka izolatların da bildirilmesi  $\beta$ -laktam direnci gelişimi açısından uyarıcıdır ve *S. pyogenes* sürveyansına yönelik çalışmaların yapılmasını desteklemektedir (47, 57).

### 2.2.8. Korunma

*Streptococcus pyogenes* bulaşının önlenmesi ve kontrolün sağlanması için erken tanı ve tedavi önemli bir adımdır. Kişisel hijyenin geliştirilmesi, tükürük ile kontamine olabilecek bardak gibi eşyaların ortak kullanılmaması, barınma şartlarının iyileştirilmesi ve sağlık eğitiminin artırılması temel korunma tedbirlerindedir. Antibiyotik tedavisi başladıktan 24 saat sonra boğazda canlı *S. pyogenes* bakterilerinin bulunmadığı gösterildiğinden, bu süre okuldan/işten minimum uzaklaşma süresi kabul edilmiştir. Cilt enfeksiyonlarının ve yanıkların zamanında ve etkili tedavisi invaziv enfeksiyonlara ilerleyişi önlemektedir. Mikroorganizma %1 sodyum hipoklorit, %70 etanol, %4 formaldehit ve %3-6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye duyarlıdır (5, 6, 11).

**2.2.8.1. Aşı çalışmaları:** *S. pyogenes*, insan bakteriyel patojenleri arasında üzerinde en çok çalışılardan birisi olmasına rağmen lisanslı bir aşısının hâlâ bulunmaması dikkat çekicidir (58). Çok sayıda serotipin ve aynı serotipe ait çeşitli antijenik varyasyonların mevcut olması, aşı geliştirme süreçlerini zorlaştırmıştır (11). Ayrıca etkenin potansiyel otoimmün epitoplalarının bulunabilmesi ve sadece insanlarda patojen etki gösterdiği için hayvanlardaki çalışmaların kısıtlılıkları da küresel düzeyde etkili bir *S. pyogenes* aşısı geliştirilmesindeki engellerdendir (6). Bununla birlikte 2018'deki DSÖ raporunda; *S. pyogenes* ilişkili hastalıkların sıklığını azaltmak ve bu sayede daha az antibiyotik kullanımı yoluyla antibiyotik direncinde azalmaya katkı sağlamak için, güvenli ve etkili bir *S. pyogenes* aşısının geliştirilmesi öncelikli araştırma alanlarından biri olarak ilan edilmiştir (10).

Meakins'in 1900'lü yıllarda yaptığı streptokoklara yönelik aşı çalışmasında, mevcut enfeksiyonun etkeni olan bakteriden hazırlanmayan aşılardan faydasının kısıtlı olacağı öngörülmüş ve aşının serotipe spesifik bağışıklık yanıtını uyardığı vurgulanmıştır (59). Son yıllardaki araştırmalarda ise; aşı içeriğinde bulunmayan serotiplerin çapraz reaksiyonu yoluyla aşı kapsamının arttırabileceği tahmin edilse de, bazı popülasyonlarda içeriğin yine de yetersiz kalacağı belirtilmiştir (6). Günümüze kadar yapılan aşı çalışmalarından klinik aşamaya geçen tüm aşı adayları M proteinini hedef almakta olup (60), *S. pyogenes* aşı çalışmaları Tablo 4'te özetlenmiştir.

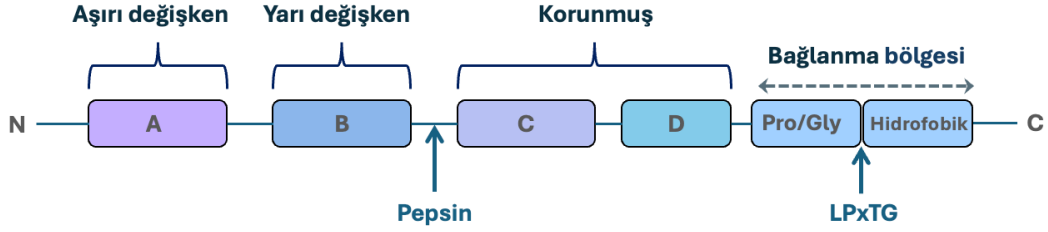
**Tablo 4.** *S. pyogenes* aşı adaylarına ait klinik çalışmalar (6, 60)

Aşı Adayı	Faz	Yıl	Hedef Antijen	Adjuvan	Sonuçlar
Altı valanlı aşı	I	2004	6 değerlikli N terminal M protein polipeptidi	Alüminyum hidroksit	Aşılama sonrası tüm aşı antijenlerine karşı antikor titrelerinde artış
StreptAvax	I	2005	26 değerlikli N terminal M protein polipeptidi ve Spa N terminal peptidi	Alüminyum hidroksit	Aşılama sonrası 27 antijenin 26'sına karşı antikor titrelerinde artış
	II	2006			
MJ8VAX	I	2018	SpyCEP'ten K4S2 ile konjuge edilmiş M protein C terminal bölgesi J8 epitopu	Alüminyum hidroksit	Aşılama sonrası aşı antijenine spesifik antikor titrelerinde artış
StreptAnova	I	2020	30 değerlikli N terminal M protein polipeptidi ve Spa N-terminal peptidi	Alüminyum hidroksit	Aşılama sonrası 31 antijenin 25'sine karşı antikor titrelerinde artış

### 2.3. M PROTEİNİ

M proteini;  $\alpha$ -sarmal yapıda iki polipeptit zincirinden oluşan stabil dimer yapısında, filamentli bir hücre yüzey molekülüdür. C-terminal bölgesinde bulunan LPxTG (x; herhangi bir amino asit) motifi, M proteininin hücre duvarındaki peptidoglikan tabakaya doğru şekilde bağlanmasını sağlayan bir sıralama sinyalidir. Amino asit dizilimi ve boyutu değişken, A'dan D'ye dört tekrar bölgesinden oluşur. Bu tekrar bölgeleri arasındaki rekombinasyonun, M proteinleri farklılıklarına yol açtığı gösterilmiştir. C ve D tekrar bölgeleriyle birlikte C-terminal bölgesi, *S. pyogenes* suşları arasında yüksek düzeyde korunmuştur ve mikroorganizmanın Faktör H ve albümine bağlanmasında rol oynar. Yarı değişken olan B tekrar bölgesi, fibrinojene bağlanma alanı içermektedir. A tekrar bölgesini içeren N-terminal kısım ise çoğunlukla

tipe özgü epitoplari içermektedir ve *S. pyogenes*'in serotip spesifikliğini oluşturur. Bu yerleşimde M proteininin daha distalinde bulunan N-terminal bölge, hücre yüzeyinden çıkıntı yapan fibrillerin uçlarında lokalize olmuştur. Ayrıca prolin (proline, Pro) ve glisinden (glycine, Gly) zengin hidrofobik bir alan C-terminal bölgede bulunmaktadır (Şekil 3) (1, 19, 23, 32).



**Şekil 3.** M proteininin yapısı (23, 60)

M proteinleri C-terminal bölgelerindeki immün belirleyicilere göre iki sınıfa ayrılmıştır. Sınıf I M proteinlerini içeren *S. pyogenes* suşları, C-terminal bölgeye karşı oluşan antikorlarla reaksiyona girebilen bir yüzey alanı içerirken, sınıf II M proteinine sahip suşlar bu antikorlarla reaksiyona girmemektedir. Bu sınıflandırmadaki M protein sınıflarının poststreptokokal sekellerle ilişkisi saptanmıştır. Sınıf I M protein serotipleri ARA ile ilişkiliyken, sınıf II M protein serotipleri daha çok APSGN ile ilişkilendirilmiştir (32).

### 2.3.1. M proteini Gen (*emm*) Tiplendirmesi

*Streptococcus pyogenes*'in temel epidemiyolojik belirteci, suşların tanımlanmasında önemli rol oynayan M proteindir. *emm* geni tarafından kodlanan M proteinindeki yapısal farklılıklara göre, *S. pyogenes* suşları M serotiplerine ayrılmıştır. M protein tiplendirmesi ilk olarak serolojik yöntemlerle yapılmış ve *emm* geninin N-terminal bölgesinin serotipe spesifik olduğunun saptanmasıyla moleküler yöntemlere dayalı hale gelmiştir. Bu sayede, *emm* tiplendirmesi *S. pyogenes*'in sürveyansında en sık kullanılan tiplendirme şekli olmuştur (5, 6).

Moleküler yöntemle *emm* tiplendirmesi, *emm* geninin serospesifik bölgesinin sekans analizi ile yapılmaktadır. CDC'nin belirlediği *emm* tiplendirme protokolünde; ilk aşamada Tablo 5'te nükleotid dizisi gösterilen iki primer kullanılarak *emm* gen



bölgeleri PCR ile çoğaltılmakta, ardından primer *emm* seq2 ile dizileme reaksiyonu gerçekleştirilmektedir (7).

**Tablo 5.** Dizi analizi ile *emm* tiplendirme yönteminde kullanılan primerler

<b>PCR primerleri</b>	Primer 1	TATT(C/G)GCTTAGAAAATTAA
	Primer 2	GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT
<b>Sekans primeri</b>	<i>emm</i> seq2	TATTCGCTTAGAAAATTAAAAACAGG

Yakın zamanda, CDC'nin 2015 yılındaki ABCs programı kapsamında toplanan iGAS izotlarının yaklaşık %93'ünü kapsayan, en sık görülen 20 *emm* tipinin tanımlanması için gerçek zamanlı bir PCR yöntemi geliştirilmiştir. Bu PCR şeması, her bir tipteki bilinen bütün alt tipleri içeren 20 *emm* tipini, beş tane dörtlü reaksiyon (quadripleks) ile saptamaktadır. PCR sonrası basamaklar içermeyen bu yöntem, hem zaman hem de maliyet açısından avantajlı olduğundan ve birçok laboratuvarında mevcut olan gerçek zamanlı PCR teknolojisini kullandığından özellikle salgın araştırmalarında faydalı olacağı öngörülmüştür (8).

*emm* geninin bulunduğu Mga regulonundaki gen içeriği ve düzeni, *emm* modellerinin temelini oluşturmuştur. Bu kümeler M protein dizilerini çeşitli özelliklere dayanarak gruplandırılmış ve klasik olarak AC modeli, D modeli ve E modeli oluşturulmuştur. Bazı istisnalar dışında her *emm* tipinin sıklıkla belirli bir *emm* modeliyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (5).

*emm* tipi; suşun epidemiyolojisi, genetik yapısı ve patogenezi hakkında önemli bilgiler vermektedir. Son yıllarda yapılan büyük ölçekli *emm* tiplendirme çalışmaları ile küresel epidemiyolojik veriler elde edilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda, gelişmekte olan ülkelerde bulunan *emm* tiplerinin, gelişmiş ülkelerdekilerden hem farklı hem de daha fazla tür çeşitliliğine sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca belirli *emm* tiplerinin belirli klinik tablolarla ilişkili olduğu saptanmış; modern *emm1* (MIT1) klonu başta olmak üzere *emm3*, *emm12*, *emm28* ve *emm89* gibi hipervirülan klonlar invaziv *S. pyogenes* izolatlarında baskın olarak tespit edilmiştir (5, 32).

Dünya genelinde *S. pyogenes*'in ciddi enfeksiyon etkeni olarak tekrar ortaya çıkışı, özellikle de ruhsatlı bir aşısının bulunmaması ve bakterinin penisilin direnci kazanmasına dair endişelerle birlikte, küresel düzeyde epidemiyolojik çalışmaların yapılması önem kazanmıştır. Klinik örneklerden izole edilen *S. pyogenes* izolatlarının *emm* tiplerinin belirlenmesi, aşı çalışmalarına yön vermesi açısından da önemlidir. Ayrıca *emm* tipleri ile epidemiyolojik veriler arasındaki korelasyon değişiklik gösterse bile, gen bazlı *emm* tiplendirmelerinin yerel ve kısa zamanlı araştırmalarda başarılı olduğu kanıtlanmıştır. *emm* dışında SOF ve T proteine dayalı tiplendirme metotları da moleküler epidemiyolojik yöntemlerdendir (5).

Diğer bulaşıcı hastalıklara kıyasla *S. pyogenes* enfeksiyonlarında sürveyans çalışmaları zayıf kalmış olsa da, birçok ülkenin iGAS enfeksiyonlarını bildirim zorunlu hastalıklar arasına almasıyla giderek daha da iyileşmektedir (11). Bu çalışmaların yürütülmesi başarılı önleme stratejilerinin geliştirilmesi açısından değerlidir (5).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız, tek merkezli laboratuvar çalışması olarak tasarlandı. Çalışma, Ankara Bilkent Şehir Hastanesi 2 No'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'nın 07.02.2024 tarih ve E2-24-6459 sayılı kararı ile onaylandı (Ek-1). Çalışmamız rutin laboratuvar işleyişini etkilemeyecek şekilde gerçekleştirildi.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Şubat 2024-Mayıs 2024 tarihleri arasında gelen çeşitli klinik örneklerden elde edilen ve rutin bakteriyolojik yöntemlerle *S. pyogenes* olarak tanımlanan 106 izolata quadripleks gerçek zamanlı PCR yöntemi ile *emm* tiplendirme çalışıldı. Moleküler tiplendirmeyi temsilen her *emm* tipinden bir izolat (n=11) ve quadripleks PCR yöntemi ile *emm* tipi belirlenemeyen 31 izolata dizi analizi yapıldı. Çalışmaya dahil edilen tüm izolatların penisilin, eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, levofloksasin ve SXT antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile çalışıldı. Ek olarak; steril vücut sıvıları (plevra, eklem) ve kan kültürlerinden elde edilen *S. pyogenes* izolatları için disk difüzyon testi sonuçları, bu izolat tipleri için rutin olarak çalışılan VITEK 2 (BioMérieux, Fransa) ticari otomatize sistem verileri ile karşılaştırıldı.

#### 3.1. *Streptococcus pyogenes* İzolatlarının Toplanması ve Saklanması

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Şubat 2024-Mayıs 2024 tarihleri arasında gelen çoğunluğu boğaz olmak üzere, çeşitli klinik örneklerin kültürlerinden MALDI-TOF MS (VITEK® MS, BioMérieux, Fransa) yöntemi ile *S. pyogenes* olarak tanımlanan 106 izolat çalışmaya dahil edildi. Çalışma yapılanaya kadar 68 boğaz, 38 boğaz dışı olmak üzere toplam 106 bakteri izolatu boncuklu suş saklama besiyerinde (Alkim Sağlık Hizmetleri, Türkiye) -80 ° C'de saklandı.

İzolatlar hastaların yaşı, cinsiyeti, bulunduğu klinik ve örnek tipi ayrımı yapılmadan toplandı. Her hastanın tek bir örneğine ait izolat çalışmaya dahil edildi. Hastaların demografik verilerine laboratuvar işletim sistemi üzerinden ulaşıldı.

### 3.1.1. İzolatların identifikasyonu

Boğaz sürüntüsü ve idrar dışındaki örneklerin Gram boyası, Gram boyama cihazında (BioMérieux, Fransa) yapıldı. Boyalı preparatlar immersiyon yağı damlatılarak, PMNL ve gram pozitif zincir yapan kok varlığı açısından 100X objektifte değerlendirildi.

Klinik örnekler, Tablo 6’da belirtilen besiyerlerine ekildi ve WASPLab® (Walk Away Specimen Processor, Copan, İtalya) cihazında, örnek tipine göre seçilen şartlarda inkübe edildi (Şekil 4). İstisna olarak; BACT-ALERT kültür şişelerine (bioMérieux, Fransa) alınarak laboratuvara gönderilmiş kan örnekleri, BACT/ALERT 3D (bioMerieux, Fransa) cihazında 120 saat inkübe edildi. Bu süre içerisinde pozitif sinyal veren şişelerden gram boyama yapıp, kliniğe panik bildirim yapıldı ve ekim yapılan plaklar manuel etüvde inkübasyona bırakıldı. Tıbbi Mikrobiyoloji uzman doktorları tarafından tabloda belirtilen saatlerde yapılan değerlendirmede, *S. pyogenes* açısından şüpheli β hemolitik koloniler MALDI-TOF MS (VITEK® MS, BioMérieux, Fransa) yöntemiyle tanımlandı.

**Tablo 6.** Klinik örneklerin kültür özellikleri

Klinik örnek	Besiyeri*	İnkübasyon			Değerlendirme saatleri
		Sıcaklık	Ortam	Süre	
Boğaz sürüntüsü	KKA	37 °C	%5 CO <sub>2</sub>	24-48 saat	24. saatte üreme yoksa 48. saatte
İdrar	KKA/ UTI agar	37 °C	Aerobik	18-36 saat	18. saatte koloniler küçükse 36. saatte
Yara	KKA, Mac** Conkey agar	37 °C	Aerobik	48 saat	24. saat 48. saat
Apse, Doku	KKA, Mac Conkey agar	37 °C	Aerobik	48 saat	24. saat 48. saat
	Çikolata agar	37 °C	%5 CO <sub>2</sub>		
Kan	KKA/ Çikolata agar	37 °C	%5 CO <sub>2</sub>	24-48 saat	24. saatte üreme yoksa 48. saatte

(Tablo 6 devamı)

Klinik örnek	Besiyeri*	İnkübasyon			Değerlendirme saatleri
		Sıcaklık	Ortam	Süre	
Eklem sıvısı	KKA, Mac Conkey agar	37 °C	Aerobik	72 saat	24. saat 48. saat 72. saat
	Çikolata agar	37 °C	%5 CO <sub>2</sub>		
Plevral sıvı	KKA, Mac Conkey agar	37 °C	Aerobik	72 saat	24. saat 48. saat 72. saat
	Çikolata agar	37 °C	%5 CO <sub>2</sub>		
Balgam	KKA, Mac Conkey agar	37 °C	Aerobik	48 saat	24. saat 48. saat
	Çikolata agar	37 °C	%5 CO <sub>2</sub>		
SVS	KKA, SDA	37 °C	Aerobik	36 saat	18. saat 36. saat
	Thayer-Martin Agar	37 °C	%5 CO <sub>2</sub>		

\*Biocell, Türkiye \*\*Aklab Group, Türkiye

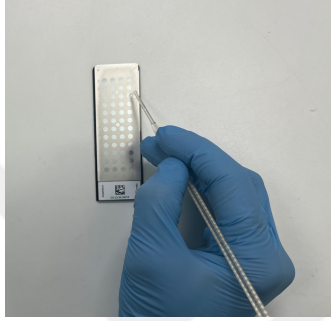
KKA: % 5 Koyun Kanlı Agar, UTI: Urinary Tract Infections, SVS: Servikovajinal sürüntü, SDA: Sabouraud Dekstroz Agar



Şekil 4. Otomatize örnek işleme ve inkübasyon cihazı

### 3.1.2. MALDI-TOF MS

Besiyeri plaklarında *S. pyogenes* açısından şüpheli  $\beta$  hemolitik saf bakteri kolonisi steril öze ile alındı ve MALDI-TOF MS metal slaytlarındaki kuyucuğa sürüldü (Şekil 5). Koloninin üzerine 1 ml  $\alpha$ -siyano-4-hidroksisinamik asit matriks solüsyonu damlatıldı ve yaklaşık 15 dakika kuruması için beklendi. Kuruyan slaytlar VITEK® MS (bioMérieux, Fransa) cihazına yerleştirildi. Tanımlamada kontrol olarak *E. coli* ATCC 8739 suşu kullanıldı. İki saat sonra değerlendirilen sonuçlarda bakteri tanımlaması cins ve tür düzeyinde yapıldı.



Şekil 5. MALDI-TOF MS metal slayt

## 3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi (ADT)

Çalışmaya dahil edilen tüm izolatların ADT'leri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıldı ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) kriterlerine (61) göre değerlendirildi. Ek olarak; steril vücut sıvıları (plevra, eklem) ve kan kültürlerinden elde edilen *S. pyogenes* izolatları için disk difüzyon testi sonuçları, bu izolat tipleri için rutin olarak çalışılan VITEK 2 (BioMérieux, Fransa) ticari otomatize sistemi verileri ile karşılaştırıldı.

### 3.2.1. İnokulum hazırlanması

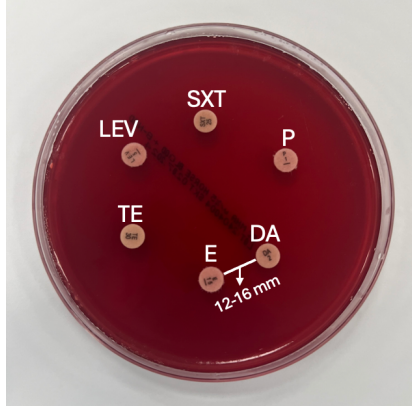
Boncuklu suş saklama besiyerinde  $-80$  °C'de saklanmış izolatların boncuk pasajı, %5 KKA plağına tek koloni düşürme ekimi yapıldıktan sonra, plaklar  $37$  °C %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası taze kültürden izole edilen *S. pyogenes* kolonisi, steril öze ile alındı, steril şeffaf bir tüp içinde steril salin ile karıştırılıp vortekslendi. Elde edilen homojen bakteri süspansiyonunun yoğunluğu, 0,5

Mc Farland standardına eşdeğer olarak DensiChek Plus (bioMérieux, Fransa) cihazında ayarlandı.

### 3.2.2. Besiyeri plaklarına ekim ve disklerin yerleştirilmesi

*Streptococcus pyogenes* izolatlarının ADT'si, %5 oranında defibrine edilmiş at kanı ve 20 mg/L  $\beta$ -NAD (nikotinamid adenin dinükleotid) eklenmiş Mueller Hinton agarda (Mueller Hinton Fastidious, MH-F [Biocell, Türkiye]) yapıldı. Ekim öncesinde MH-F plakları oda sıcaklığına getirildi. Steril pamuk uçlu eküvyon bakteri süspansiyonuna daldırılıp, tüpün kenarına bastırma/çevirme hareketi yapılmadan çıkarıldı ve ekim çizgileri arasında boşluk kalmayacak şekilde üç yönde sürülerek ekim yapıldı.

Benzilpenisilin (1U), eritromisin (15  $\mu$ g), klindamisin (2  $\mu$ g), tetrasiklin (30  $\mu$ g), levofloksasin (5  $\mu$ g) ve SXT (25  $\mu$ g) diskleri (Bioanalyse, Türkiye) plakların üzerine yerleştirilip hafifçe bastırıldı. İndüklenebilir klindamisin direncinin saptanabilmesi için eritromisin ve klindamisin diskleri uçtan uca 12-16 mm arayla yerleştirilerek D-test yöntemi uygulandı (Şekil 6).



**Şekil 6.** MH-F besiyerine antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi

DA:Klindamisin, E: Eritromisin, LEV: Levofloksasin, P: Penisilin, SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, TE: Tetrasiklin

### 3.2.3 Besiyeri plaklarının inkübasyonu ve değerlendirilmesi

Antibiyotik diskleri yerleştirilmiş plaklar 37 °C %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 24 saat inkübe edildi. İnhibisyon zonu çapları, yansıyan ışıkta plağın ön yüzünden kapak açık olarak

kumpas yardımıyla ölçüldü ve EUCAST güncel sınır değer tablosuna (61) göre değerlendirildi.

Klindamisin diskinin etrafındaki inhibisyon zonunda, eritromisin diski yönünde düzleşme görüldüğünde indüklenebilir klindamisin direnci pozitif olarak kabul edildi.

#### **3.2.4. Steril vücut sıvısı ve kan izolatlarının VITEK 2 otomatize sistem ile Antibiyotik Duyarlılık Testi (ADT)**

- Bulanıklığı 0,5 Mc Farland standardına eşdeğer olacak şekilde hazırlanan bakteri inokulümlarından 280 µl alınarak, içinde 3 ml %0,45 salin bulunan steril şeffaf tüplere eklendi ve vortekslendi.
- VITEK® AST ST03 kartları oda sıcaklığına getirilip hazırlanan şeffaf tüplere yerleştirildi ve VITEK® 2 Compact (BioMérieux, Fransa) cihazına konuldu. Çalışılan izolatlar VITEK sistemine kaydedildi.
- Cihaz tarafından her kuyucuktaki üreme izlenirken, inkübasyon döngüsü tamamlandığında kartta bulunan tüm antimikrobiyaller için MİK değeri belirlendi. ADT sonucu EUCAST kriterlerine (61) göre değerlendirildi.

### **3.3. Quadripleks Gerçek Zamanlı PCR ile *emm* Geni Tiplerinin Belirlenmesi**

Tıbbi Mikrobiyoloji Bakterioloji Laboratuvarı'nda yeniden canlandırılan bakteri izolatlarının saf kültürlerinden, vNAT® transfer tüpüne (Bioeksen, Türkiye) 1-2 koloni alındı ve vortekslendi. Bu işlem ile DNA izolasyonu öncesinde ön ekstraksiyon basamağı oluşturulması ve transfer sırasında ortaya çıkabilecek olası bir kontaminasyonun engellenmesi amaçlandı. Transfer tüplerindeki bakteri izolatları Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na taşındı ve DNA izolasyonunun ardından quadripleks gerçek zamanlı PCR çalışıldı.

#### **3.3.1. DNA İzolasyonu**

Kültürden DNA izolasyonu, Hızlı Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak Zybion EXM3000 Nükleik Asit İzolasyon Sistemi'nde (Zybion, Çin) gerçekleştirildi.



### 3.3.1.1. Hızlı nükleik asit ekstraksiyon kit içeriği

1. Ekstraksiyon kartuşu
2. Manyetik çubuk kılıfı
3. Proteinaz-K
4. STL-B
5. Wash buffer
6. Elution buffer

### 3.3.1.2. DNA izolasyon aşamaları

- Ekstraksiyon kartuşları, kartuş içeriğinin kuyu diplerine toplanması için sertçe sallandı.
- Kartuşların bir numaralı kuyusu sol tarafta yer alacak şekilde plastik kartuş standına yerleştirildi ve kartuş folyosu açıldı.
- Kartuşların bir numaralı kuyularına 15 µL Proteinaz K pipetlendi.
- Transfer tüpündeki örneklerden 200 µL alınarak bir numaralı kuyuya pipetlendi.
- Kartuş standı, Zymio EXM3000 cihazına (Zymio, Çin) yerleştirildi.
- Manyetik çubuk kılıfları her dört kartuş için bir tane olacak şekilde cihaza takıldı ve sabitlendi.
- ZYBIO-B-200 izolasyon programı seçilerek cihaz çalıştırıldı.
- İzolasyon işlemi 9 dakikada tamamlandı ve kartuşun altı numaralı kuyusunda DNA izolatu elde edildi.

### 3.3.2. *emm* Geni Tiplerinin Belirlenmesi

Yaygın görülen 20 *emm* tipinin analizi, gerçek zamanlı PCR yöntemiyle, CDC protokolüne göre tasarlanan (8) kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) Panel kiti (Bioeksan, Türkiye) kullanılarak CFX96

Touch Real-Time PCR (BIO-RAD, ABD) cihazında gerçekleştirildi. PCR reaksiyonunda kullanılan oligonükleotidler Tablo 7’de gösterilmiştir.

**Tablo 7.** Gerçek zamanlı PCR ile *emm* tiplendirmede kullanılan oligonükleotidler

<i>emm1</i> -F <i>emm1</i> -P FAM <i>emm1</i> -R	GTGATGGTARTCCTAGGRAAGTT FAM/TRCGGGA-BHQ1dT-TGTTTGCTGCAAGADR/Spc6 CATTGCATTCTAATCTCGCTTT
<i>emm2</i> -F <i>emm2</i> -P Cy5 <i>emm2</i> -R	CAGTTAAGGCGAACAGTAAGAACCC AAATTAAG-BHQ2dT-GAAGCAGAATTACATGACAAA/Spc6 GCTCTTCTCAACTTATCTAATTTCTCGAATA
<i>emm3</i> -F <i>emm3</i> -P ROX <i>emm3</i> -R	GCAGACAGTAAAGGCAGATG TRGGAGTGT-BHQ2dT-AATGVAGAGTTTYCTAGRCA/Spc6 CCTGATHTAACAAGTTCTCAGTTTC
<i>emm4</i> -F <i>emm4</i> -P Cy5 <i>emm4</i> -R	CTGRITCAGCGYGGAACT CTRAARAA-BHQ2dT-ATAACGYGTTASTTVASGAAAATGAGG/Spc6 TYCACGTTCTACCTTGARC
<i>emm6</i> -F <i>emm6</i> -P Cy5 <i>emm6</i> -R	TATTCGCTTAGAAAATTA AAAACAGG TGAAGTTAG-BHQ2dT-GCAAGAGYGTTTYCTRGGG/Spc6 TGTTAASYTGTCATTATTAGCTT
<i>emm11</i> -F <i>emm11</i> -P HEX <i>emm11</i> -R	GGCTTTGCAAAYCAAACAGAAG TYCTAAAGS-BHQ1dT-AMAAACGTGAKCGCA/Spc6 TTCATCCCATAGCGAATTATATAGG
<i>emm12</i> -F <i>emm12</i> -P ROX <i>emm12</i> -R	AGATCATAGTGATTTAGTCGCAGAA TTTGVAAGAC-BHQ2dT-GAAACRGCDDTTTCAG/Spc6 ATAGTATTGCTGAAGGTAGDDTT
<i>emm28</i> -F <i>emm28</i> -P FAM <i>emm28</i> -R	GRCTTYTGCTAATGGARCTGRT AGYTGM-BHQ1dT-GYATAACAACATTGCTTACTG/Spc6 ACTCATWCYAGTTTCTCATGTT
<i>emm49/151</i> -F* <i>emm49/151</i> -P HEX <i>emm49/151</i> -R	TGCGGAGAATAACGTGTMTA CGTATAGY-BHQ1dT-CTTTTTCTCTTCTTGCAACGC/Spc6 CCTATTCTTTCTAGATATTCTCCGT
<i>emm59</i> -F <i>emm59</i> -P FAM <i>emm59</i> -R	CTTTGCAAACCAAACAGAAGTTAAG AAATACGA-BHQ1dT-GYATTGACTAATGAGAATAAGTCT/Spc6 TAATTTAAATAGTTATCTCTCTCTCTCTAA
<i>emm75</i> -F <i>emm75</i> -P FAM <i>emm75</i> -R	TATGAAGCAYRATACAAAGCATGG AATA-BHQ1dT-AGAARGACCTTAGATAAGTTAATAC/Spc6 CTAATCTCGTAGTCTTACCTTGCTCA
<i>emm76</i> -F <i>emm76</i> -P ROX <i>emm76</i> -R	TGCAAACCAAACAGAAGTTAAGG TGASCTACAGGC-BHQ2dT-GAACATGATAAGYT/Spc6 GTTTCAGYCAATAGCTCMTYAT
<i>emm77</i> -F <i>emm77</i> -P ROX <i>emm77</i> -R	TGCAAACCAAACAGAAGTTARGG AGTGATGCA-BHQ2dT-CTGAACCTACAGAAACCC/Spc6 AAGGTCTGTAATGCGGTTATGT
<i>emm81</i> -F <i>emm81</i> -P HEX <i>emm81</i> -R	TGCAAACCAAACAGAAGTTAAGG TGCGGG-BHQ1dT-YCAGAAGARAATGTACYG/Spc6 TTSAAGTTTGGCTATGTATKTCGG

(Tablo 7 devamı)

<i>emm82-F</i> <i>emm82-Cy5</i> <i>emm82-R</i>	ATCACTGAGGCAGGTGTATCTA TGGAAGAG-BHQ2dT-ARGTTTGATGCAGAGCA/Sp6 TTTCAAGCTCGTTTGCTCTATTC
<i>emm83-F</i> <i>emm83-P Cy5</i> <i>emm83-R</i>	CCAGACAGAAGTTAAGGCTGATAAC CAATGCAG-BHQ2dT-AACACAAGRGRRC/Sp6 TCCATTTTCATGTAACAAATTCTGAAGC
<i>emm87-F</i> <i>emm87-P FAM</i> <i>emm87-R</i>	CYAGAGAAGTARCCARCGAA TTGGYTGC-BHQ1dT-TCARTGYGGAAGAAA/Sp6 CTTTCCTTCTATTTTCAGAGTAATCC
<i>emm89-F</i> <i>emm89-P HEX</i> <i>emm89-R</i>	TAAGGCGGACAGTGACAAT TGTCTCTG-BHQ1dT-CRAAGATAATGAAARAGAATTACATAACAVA/Sp6 CATCTATTTTGTCTAGATGTTCTCCT
<i>emm92-F</i> <i>emm92-P HEX</i> <i>emm92-R</i>	GATGACCGGAGCGTTTCTAC AATAGTGG-BHQ1dT-AGCGTGAGCACAYCA/Sp6 AGCTACCATGTTTAGCCAATA
<i>emm118-F</i> <i>emm118-P ROX</i> <i>emm118-R</i>	GCGGACAGTAACGCG TCTAGCGT-BHQ2dT-GCAAAGCTATAACAACCAAAT/Sp6 CTCCGTTTTATCTGTAAGATCG

\* *emm49/151* tek tip olarak kabul edilmiştir.

### 3.3.2.1. Kit içeriği

- 2X qPCR Mix
- Oligo Mix 1 (*emm1*, *emm89*, *emm12*, *emm82*)
- Oligo Mix 2 (*emm28*, *emm92*, *emm77*, *emm4*)
- Oligo Mix 3 (*emm59*, *emm11*, *emm3*, *emm2*)
- Oligo Mix 4 (*emm87*, *emm81*, *emm118*, *emm6*)
- Oligo Mix 5 (*emm75*, *emm49/151*, *emm76*, *emm83*)
- Negatif Kontrol (NK)
- Pozitif Kontrol (NK)

### 3.3.2.2. PCR aşamaları

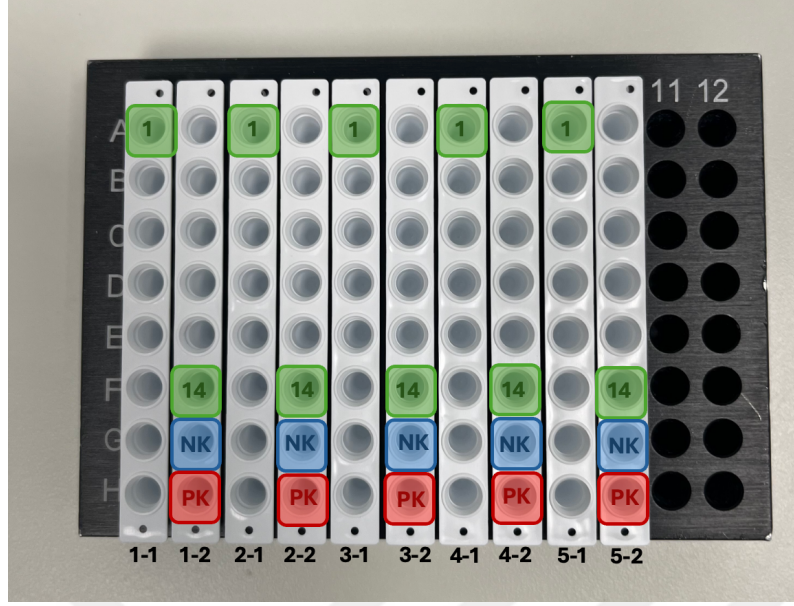
- Reaksiyon karışımının hazırlanması için temiz odaya geçildi ve tüm test bileşenleri oda sıcaklığına getirildi.
- Test bileşenleri vortekslendi ve 6800 x g hızında üç saniye santrifüj edildi.

- Beyaz 0,2 ml'lik sekiz şeritli PCR reaksiyon kuyucukları soğuk blok üzerine yerleştirildi.
- Master karışımı çalışılacak örnek sayısına uygun hacimde (15X=10X buffer + 5X oligo mix) steril ependorflar içine pipetlendi ve beş saniye vortekslendi. Her örnek için beş farklı oligo mix kullanıldığından, beş ayrı ependorfta master karışımı hazırlandı. Reaksiyon içeriği Tablo 8'de gösterildi.

**Tablo 8.** PCR Reaktiflerinin içeriği ve miktarları

Reaktif	Miktar
2X qPCR mix	10 µl
Oligo mix	5 µl
Nükleik asit / NK / PK	5 µl
Toplam	20 µl

- Sekiz şeritli PCR reaksiyon kuyucuklarının her birine 15 µl master karışımı pipetlendi. Beş farklı oligo mix kullanıldığından, master karışımı her örnek için beş ayrı kuyucuğa dağıtıldı.
- Her oligo mix için 5'er µl NK, ilgili kuyucuğa pipetlendi.
- İzolasyon işlemi bitmiş olan kartuşun son kuyucüğundan 5 µl DNA izolatu alınıp reaksiyon kuyucüğuna pipetlendi.
- Her oligo mix için 5'er µl PK, ilgili kuyucuğa pipetlendi.
- İşlem sonunda toplam 20 µl reaksiyon hacmine ulaşıldı (Şekil 7).



Şekil 7. PCR reaksiyonu kurulumu

Pipetleme yapılan kuyucuklar; 1-1 ve 1-2: Oligo mix 1, 2-1 ve 2-2: Oligo mix 2, 3-1 ve 3-2: Oligo mix 3, 4-1 ve 4-2: Oligo mix 4, 5-1 ve 5-2: Oligo mix 5, 1: 1 no'lu örnek, 14: 14 no'lu örnek, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol

- PCR reaksiyon kuyucuklarının kapakları kapatılıp spin cihazında (Frontier, Ohaus, ABD) bir dakika hızlı santrifüj işlemi yapıldı.
- CFX96 Touch Real-Time PCR (BIO-RAD, ABD) cihazındaki bloklara yerleştirilen reaksiyon kuyucukları, üretici firmanın önerdiği termal döngü basamaklarında çalışmaya alındı (Tablo 9).

Tablo 9. PCR termal döngü basamakları

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Enzim Aktivasyonu	1 döngü	52 °C	3 dk
Pre-İnkübasyon	1 döngü	95 °C	10 sn
Denatürasyon	12 Touchdown Döngüsü: Döngü başına bağlanma sıcaklığında 1°C azalma	95 °C	1 sn
Bağlanma/Uzama		67-56 °C	15 sn
Denatürasyon	30 döngü	95 °C	1 sn
Bağlanma/Uzama		55 °C	15 sn
Tespit (Okuma)		FAM/ HEX/ ROX/ CY5	

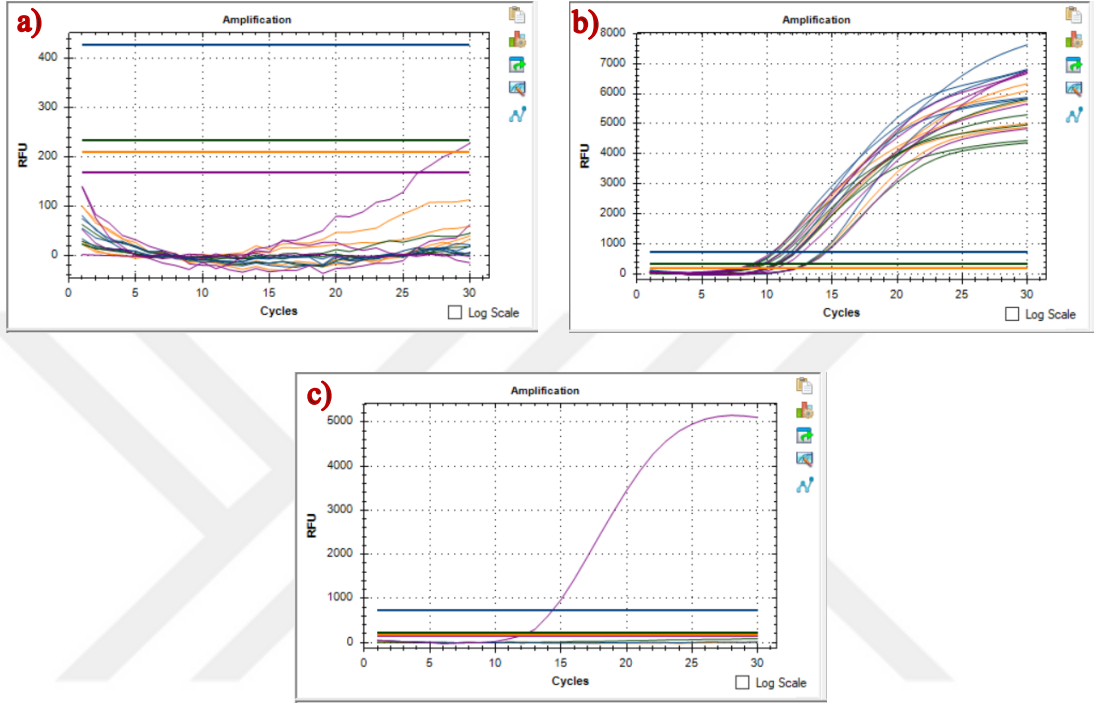
- Reaksiyon 45 dakikada tamamlandı ve *emm1*, *emm89*, *emm12*, *emm82*, *emm28*, *emm92*, *emm77*, *emm4*, *emm59*, *emm11*, *emm3*, *emm2*, *emm87*, *emm81*, *emm118*, *emm6*, *emm75*, *emm49/151*, *emm76*, *emm83* genleri varlığı PCR ile tarandı.
- FAM, HEX, ROX, Cy5 floresan boya ları prob olarak kullanılarak amplikon analizi yapıldı (Tablo 10).

**Tablo 10.** PCR ile araştırılan gen bölgeleri

PCR Kuyuları	Kanal	Araştırılan Gen Bölgesi
1.Kuyu	FAM	<i>emm1</i>
	HEX	<i>emm89</i>
	ROX	<i>emm12</i>
	CY5	<i>emm82</i>
2.Kuyu	FAM	<i>emm28</i>
	HEX	<i>emm92</i>
	ROX	<i>emm77</i>
	CY5	<i>emm4</i>
3.Kuyu	FAM	<i>emm59</i>
	HEX	<i>emm11</i>
	ROX	<i>emm3</i>
	CY5	<i>emm2</i>
4.Kuyu	FAM	<i>emm87</i>
	HEX	<i>emm81</i>
	ROX	<i>emm118</i>
	CY5	<i>emm6</i>
5.Kuyu	FAM	<i>emm75</i>
	HEX	<i>emm49/151</i>
	ROX	<i>emm76</i>
	CY5	<i>emm83</i>

**3.3.2.3. Sonuçların değerlendirilmesi:** Öncelikle NK eğrileri değerlendirildi. Çalışmada herhangi bir kontaminasyon olmadığı görüldükten sonra PK'ler

değerlendirildi. Daha sonra tüm amplifikasyon eğrileri incelendi. Eşik değerinin üzerindeki sigmoidal eğriler “pozitif” olarak kabul edilirken, sigmoidal olmayan eğriler “negatif” olarak kaydedildi (Şekil 8).



Şekil 8. PCR sonuçlarının değerlendirilmesi, a) NK eğrileri b) PK eğrileri c) Pozitif sonuç eğrisi

### 3.4. Dizi Analizi ile *emm* Geni Tiplerinin Belirlenmesi

Transfer tüpüne alınan *S. pyogenes* izolatlarının nükleik asit ekstraksiyonu, Zybio EXM3000 Nükleik Asit İzolasyon Sistemi'nde (Zybio, Çin) manyetik boncuk teknolojisi ile gerçekleştirildi. Elde edilen izolatlar çalışma zamanına kadar alikotlanarak -80 °C'de saklandı.

#### 3.4.1. Primer Tasarımı ve PCR Çalışması

CDC tarafından önerilen primerler (7) *emm* genini amplifiye etmek için kullanıldı (Tablo 11).

**Tablo 11.** *emm* geni amplifikasyonunda kullanılan primer çifti

Primer İsmi	Primer Dizisi	Tm	Hedef Gen
emmF:	TATTCGCTTAGAAAATTA AAAACAGG	55.37° C	M protein
emmR2:	GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT	55.01° C	

PCR çalışması toplam 20 µl'lik hacimde Tablo 12'de gösterilen termal protokol kullanılarak gerçekleştirildi.

**Tablo 12.** Dizi analizi PCR çalışmasının termal protokolü

Reaksiyon Kurulumu		PCR Programı				
Reaktif	Miktar		Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman	
PCR Master Mix	12.5 µL	Bio-Rad CFX96 TouchTM	1	95°C	30 sn	
Primer	2.5 µL		35	95°C	15 sn	
					55°C	1 dk
Nükleik asit	5 µL		1	4°C	1 dk	
Reaksiyon hacmi	20 µL					

### 3.4.2. Yeni Nesil Dizileme ve Biyoinformatik Analiz

PCR çalışması sonrasında izolatların yeni nesil dizilemesi, Oxford Nanopore Technologies® MinION™ (Oxford, İngiltere) sekans sisteminde Rapid Barcoding kit (SQK-RBK110.96) ile gerçekleştirildi. Cutadapt programı kullanılarak 200 bp (base pair, baz çifti) altındaki ve 2000 bp üstündeki sekans okumaları filtrelendi. Filtrelenen veriler Minimap2 (v2.26) yazılımı kullanılarak hizalama işlemi gerçekleştirildi ve elde edilen “.bam” dosyası IGV (Integrative Genomics Viewer) yazılımı kullanılarak kontrol edildi. Ivar yazılımı ile okumalardan konsensus dizilim elde edildi. Dizileme yapılan izolatlarda konsensus dizilim minimum 20 coverage'tan oluşturuldu. Elde edilen konsensus sekans verilerinden CDC Blast *emm* veritabanı kullanılarak *S. pyogenes* izolatlarının *emm* tipleri belirlendi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. İzolatlara ait Demografik Özellikler

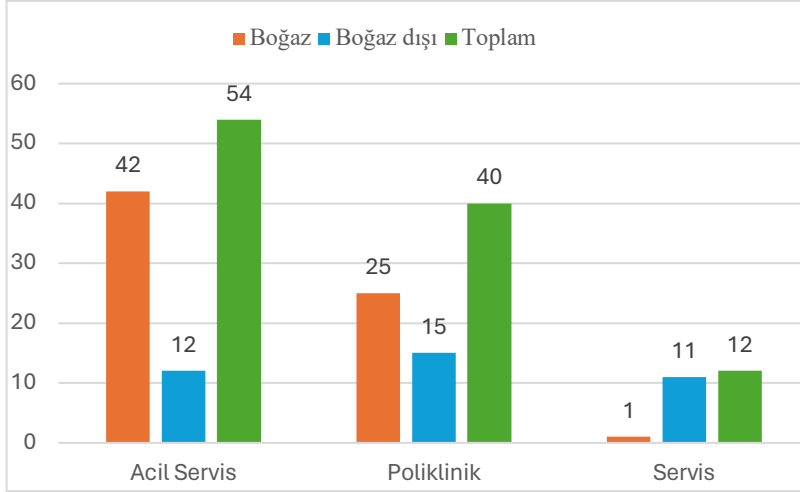
Şubat 2024-Mayıs 2024 tarihleri arasında, Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden elde edilen ve rutin bakteriyolojik yöntemlerle *S. pyogenes* olarak tanımlanan 106 izolat çalışmaya alındı. Araştırmaya dahil edilen hastaların %59,4'ü (n=63) kadın, %40,6'sı (n=43) erkek olup, yaşları 2-81 (yaş ortalaması 14,7) arasında değişirken, %81,1'i (n=86) pediatrik yaş grubundaydı.

Çalışılan klinik örneklerin %51'i (n=54) acil servisler, %37,7'si (n=40) çeşitli poliklinikler ve %11,3'ü (n=12) ise yatan hasta servislerindeki hastalara aitti. Farklı örnek türlerinden *S. pyogenes* izolatlarının dahil edildiği çalışmada, tüm bakteri izolatlarının %64,1'i (n=68) boğaz kültürlerinden elde edilmiş olup, çalışmaya alınan hastaların temel özellikleri Tablo 13'te gösterilmiştir.

**Tablo 13.** Çalışmaya dahil edilen hastaların temel özellikleri

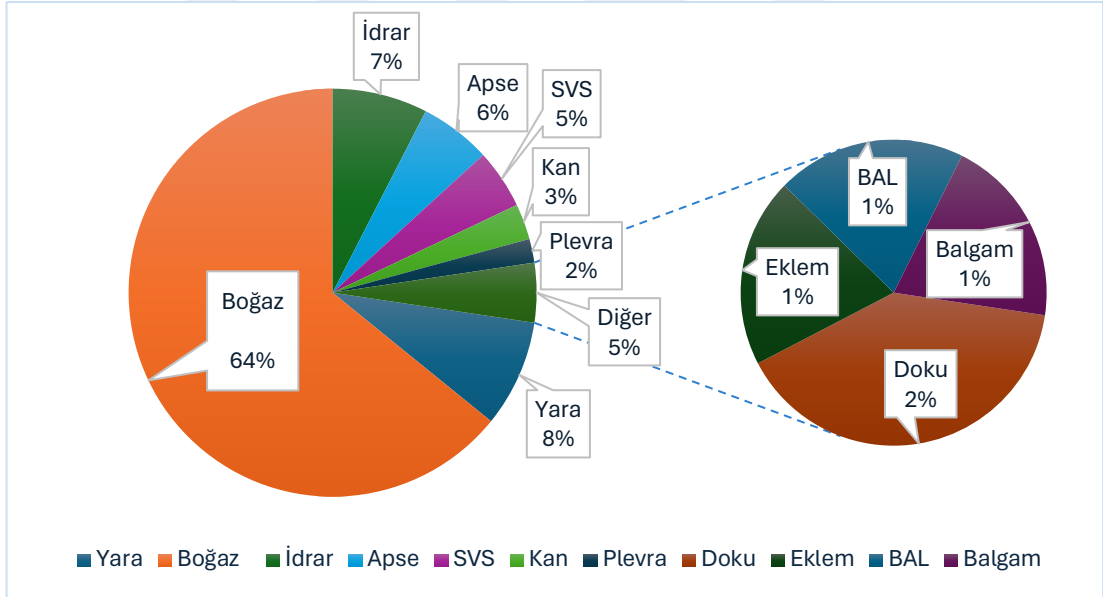
Değişken Tipi		N	%
<b>Yaş</b>	Çocuk (2-18)	86	81,1
	Erişkin (19-81)	20	18,9
<b>Cinsiyet</b>	Kadın	63	59,4
	Erkek	43	40,6
<b>Başvuru yeri</b>	Acil servis	54	51
	Poliklinik	40	37,7
	Servis	12	11,3
<b>İzolat tipi</b>	Boğaz	68	64,1
	Boğaz dışı	38	35,9

Boğaz ve boğaz dışı örneklerin, hastaların hastaneye başvuru yerlerine göre dağılımına bakıldığında; 68 boğaz izolatının %98,6'sının (n=67) acil servislere ve polikliniklere ayaktan başvuran hastalara ait olduğu görüldü (Şekil 9).



**Şekil 9.** Boğaz ve boğaz dışı izolatların hastaların başvuru yerine göre dağılımı

Çalışmaya dahil edilen *S. pyogenes* izolatlarının %64,1'i boğaz kültürlerinden elde edilirken, yara örnekleri %8,5 oranıyla ikinci sıklıkta yer almıştır (Şekil 10).



**Şekil 10.** Çalışmaya dahil edilen izolatların örnek tipine göre dağılımı

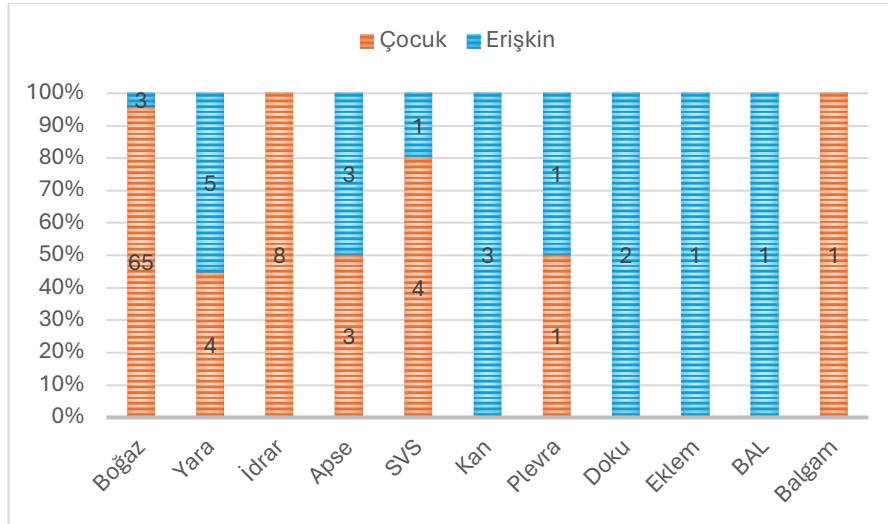
Boğaz dışı 38 izolatın örnek tipine göre dağılımı incelendiğinde; *S. pyogenes*'in en çok izole edildiği boğaz dışı klinik örneklerin yara (n=9), idrar (n=8), ve apse (n=6) olduğu tespit edildi (Tablo 14).

**Tablo 14.** Boğaz dışı izolatların örnek tipine göre dağılımı

Boğaz dışı izolatlar	N	%
Yara	9	23,7
İdrar	8	21,1
Apse	6	15,8
SVS	5	13,2
Kan	3	7,9
Plevral sıvı	2	5,3
Doku	2	5,3
Eklemler sıvısı	1	2,6
BAL	1	2,6
Balgam	1	2,6
<b>Toplam</b>	<b>38</b>	<b>100</b>

BAL: Bronkoalveolar lavaj, SVS: Servikovajinal sürüntü

İdrar (n=8) ve balgam (n=1) örneklerinin tamamı ile boğaz sürüntüsü örneklerinin (n=68) %95,6'sı (n=65) pediatrik yaş grubuna ait iken; kan (n=3), doku (n=2), eklem (n=1) ve BAL (n=1) örneklerinin tümü erişkin hastalara aitti (Şekil 11).



**Şekil 11.** Klinik örnek tiplerinin çocuk ve erişkin hastalardaki dağılımı

Çalışmaya dahil edilen izolatların alındığı 106 hasta, çeşitli klinik tablolarla hastaneye başvurdu (Tablo 13). Bunlar arasında en sık akut farenjit (%63,2) ile karşılaşılrken; idrar yolu enfeksiyonu (İYE, n=8), yüzeysel deri enfeksiyonu (n=6), peritonsiller apse (n=5) ve vulvovajinit (n=5) de sık görülen diğer *S. pyogenes* ilişkili hastalıklardı. Bir hastada STŞS, bir hastada ise kızıl görüldü. Tablo 15'te belirtilen tanıları olan hastaların 17'sinde (%16) iGAS enfeksiyonu mevcuttu. iGAS tanısı konulan hastaların %53'ü (n=9) kadındı ve %64,8'i (n=11) erişkin yaş grubundaydı. STŞS tanısı alan bir hasta ve bakteriyemi tanılı hastalardan biri, ilerleyen süreçte hayatını kaybetti.

**Tablo 15.** Çalışmaya dahil edilen hastaların tanıları

Tanı	N	%
Akut farenjit	67	63,2
İYE	8	7,6
Yüzeysel deri enfeksiyonu	6	5,7
Peritonsiller apse	5	4,7
Vulvovajinit	5	4,7
Bakteriyemi	2	1,9
Septik artrit	2	1,9
Ampiyem	2	1,9
Pnömoni	2	1,9
İmpetigo	2	1,9
STŞS	1	0,9
Selülit	1	0,9
Kızıl	1	0,9
Preseptal selülit	1	0,9
Perianal apse	1	0,9
<b>Toplam</b>	<b>106</b>	<b>100</b>

## 4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi (ADT) Sonuçları

Disk difüzyon yöntemiyle çalışılan ve güncel sınır değerler tablosu (61) kapsamında değerlendirilen ADT sonuçlarına göre; 106 *S. pyogenes* izolatının tamamı penisiline standart dozda duyarlı (S) bulunurken, levofloksasin için tüm izolatlar yüksek dozda duyarlılık (I) gösterdi. Tetrasiklin ve eritromisin direnç (R) oranlarına bakıldığında; izolatların %12,3'ünde (n=13) tetrasiklin, %2,8'inde (n=3) eritromisin direnci saptandı. Tetrasiklin dirençli bir doku izolatında eritromisin ve klindamisin direnci, eritromisin dirençli bir yara izolatında ise SXT direnci olmak üzere toplam iki izolatta çoklu direnç tespit edildi (Tablo 16). Tüm izolatların %14,2'si (n=15) en az bir antibiyotiğe karşı dirençliydi. Disk difüzyona ek olarak VITEK 2 ticari otomatize sisteminde de çalışılan kan, plevral sıvı ve eklem sıvısı örneklerinin ADT sonuçları, disk difüzyon yöntemiyle uyumlu bulundu.

**Tablo 16.** İzolatların disk difüzyon yöntemiyle elde edilen ADT sonuçları

<b>Antibiyotik</b>		<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Penisilin</b>	S	106	100
	R	0	0
<b>Levofloksasin</b>	S	0	0
	I	106	100
	R	0	0
<b>Eritromisin</b>	S	104	98,1
	R	3	<b>2,8</b>
<b>Klindamisin</b>	S	105	99,1
	R	2	<b>1,9</b>
<b>Tetrasiklin</b>	S	93	87,7
	R	13	<b>12,3</b>
<b>SXT</b>	S	105	99,1
	R	1	<b>0,9</b>

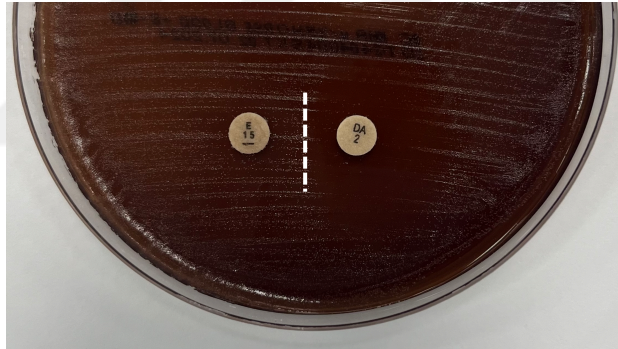
Tetrasiklin dirençli 13 izolatın 5'i (%38,5) boğaz kültürlerinden elde edilmiş olup, yine 5 (%38,5) yara izolatında tetrasiklin direnci saptandı (Tablo 17). Tüm boğaz izolatlarının (n=68) %7,4'ünde (n=5) tetrasiklin direnci saptanırken, yara örneklerinde (n=9) bu oran %55,6'ydı (n=5). iGAS izolatlarının (n=17) ise %11,8'inde (n=2)

tetrasiklin direnci tespit edildi. Eritromisin dirençli olarak saptanan üç izolat apse, doku ve yara örneklerine aitti.

**Tablo 17.** Tetrasiklin dirençli izolatların örnek tipine göre dağılımı

Tetrasiklin dirençli izolatlar (n=13)	N	%
Boğaz	5	38,5
Yara	5	38,5
Doku	1	7,7
İdrar	1	7,7
BAL	1	7,7

Eritromisin dirençli üç izolattan ikisinde; biri yapısal, diğeri ise indüklenebilir olmak üzere klindamisin direnci pozitif olarak tespit edildi. İndüklenebilir klindamisin direnci Şekil 12’de gösterildiği gibi, klindamisin diskinin etrafındaki inhibisyon zonunda eritromisin diski yönünde düzleşme olarak görüldü.



**Şekil 12.** D-test yöntemi uygulanarak saptanan indüklenebilir klindamisin direnci

### 4.3. qPCR Sonuçları

Yaygın görülen 20 *emm* tipinin analizi, CDC protokolüne göre tasarlanan (8) qPCR Panel kiti kullanılarak yapıldı. Çalışmaya alınan 106 izolatta quadripleks gerçek zamanlı PCR yöntemiyle; *emm1*, *emm89*, *emm12*, *emm82*, *emm28*, *emm92*, *emm77*, *emm4*, *emm59*, *emm11*, *emm3*, *emm2*, *emm87*, *emm81*, *emm118*, *emm6*, *emm75*, *emm49/151*, *emm76*, *emm83* varlığı araştırıldı ve izolatların %70,8’i (n=75) bu yöntemle tiplendirildi. Tablo 18’de gösterildiği gibi boğaz ve boğaz dışı örneklerin

qPCR ile *emm* tip tespit oranları sırasıyla %83,8 (n=57) ve %47,4 (n=18) olmak üzere farklılık gösterdi.

**Tablo 18.** qPCR panel kiti ile izolatların *emm* tipi tespit oranları

<b>İzolat tipi</b>		<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Boğaz (n=68)</b>	Tiplendirilen	57	<b>83,8</b>
	Tiplendirilmeyen	11	16,2
<b>Boğaz dışı (n=38)</b>	Tiplendirilen	18	<b>47,4</b>
	Tiplendirilmeyen	20	52,6
<b>Toplam (n=106)</b>	Tiplendirilen	75	<b>70,8</b>
	Tiplendirilmeyen	31	29,2

Boğaz dışı izolatların qPCR panel kiti ile *emm* tipi tespit oranları incelendiğinde; yara (n=9), doku (n=2) ve BAL (n=1) izolatlarının hiçbirinin bu yöntemle tiplendirilmediği görüldü. Diğer taraftan, apse izolatlarının %83,3'ünün (n=5) *emm* tipi gerçek zamanlı PCR metodu ile belirlenebildi (Tablo 19).

**Tablo 19.** qPCR panel kiti ile boğaz dışı izolatların *emm* tip tespit oranı

<b>Boğaz dışı izolatlar (n=38)</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Eklem sıvısı (n=1)	1	100
Balgam (n=1)	1	100
Apse (n=6)	5	83,3
Kan (n=3)	2	66,7
İdrar (n=8)	5	62,5
SVS (n=5)	3	60
Plevral sıvı (n=2)	1	50
Yara (n=9)	0	0
Doku (n=2)	0	0
BAL (n=1)	0	0

Bu çalışmada; qPCR yöntemiyle *S. pyogenes* izolatlarında 20 *emm* tipinin varlığı araştırıldı ve tip tayini yapılan toplam 75 izolatta 11 farklı *emm* tipi saptanırken, en sık *emm3* (%29,3) tespit edildi. Baskın olarak görülen diğer tipler sırasıyla; *emm2* (%21,3), *emm89* (%16) ve *emm6*'ydı (%14,7) (Tablo 20).

**Tablo 20.** qPCR panel kiti ile tiplendirilen izolatların *emm* tip dağılımı

<i>emm</i> tipi	N	%
<i>emm3</i>	22	29,3
<i>emm2</i>	16	21,3
<i>emm89</i>	12	16
<i>emm6</i>	11	14,7
<i>emm1</i>	3	4
<i>emm87</i>	3	4
<i>emm4</i>	2	2,7
<i>emm28</i>	2	2,7
<i>emm77</i>	2	2,7
<i>emm12</i>	1	1,3
<i>emm118</i>	1	1,3
<b>Toplam</b>	<b>75</b>	<b>100</b>

Boğaz izolatlarındaki dağılım, tüm izolatların *emm* tipi dağılımıyla benzer şekildeydi ve en sık saptanan *emm3*'tü. *emm2* (%17,5), *emm89* (%17,5) ve *emm6* (%15,8) tipleri de boğaz izolatlarında sıklıkla tespit edildi (Tablo 21).

**Tablo 21.** qPCR panel kiti ile tiplendirilen boğaz izolatlarının *emm* tip dağılımı

<i>emm</i> tipi	N	%
<i>emm3</i>	18	31,6
<i>emm2</i>	10	17,5
<i>emm89</i>	10	17,5
<i>emm6</i>	9	15,8
<i>emm1</i>	2	3,5
<i>emm87</i>	2	3,5



(Tablo 21 devamı)

<b>emm tipi</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<i>emm28</i>	2	3,5
<i>emm4</i>	1	1,8
<i>emm12</i>	1	1,8
<i>emm77</i>	1	1,8
<i>emm118</i>	1	1,8
<b>Toplam</b>	<b>57</b>	<b>100</b>

Boğaz dışı izolatlar incelendiğinde ise; en sık *emm2* (%33,3) tipi saptanırken, *emm3* (%22,2), *emm6* (%11,1) ve *emm89* (%11,1) yüksek oranlarda saptanan *emm* tipleriydi (Tablo 22).

**Tablo 22.** qPCR panel kiti ile tiplendirilen boğaz dışı izolatların *emm* tip dağılımı

<b>emm tipi</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<i>emm2</i>	6	33,3
<i>emm3</i>	4	22,2
<i>emm6</i>	2	11,1
<i>emm89</i>	2	11,1
<i>emm1</i>	1	5,6
<i>emm4</i>	1	5,6
<i>emm77</i>	1	5,6
<i>emm87</i>	1	5,6
<b>Toplam</b>	<b>18</b>	<b>100</b>

Çalışmamıza dahil edilen hastalardan kızıl tanılı hastanın *S. pyogenes* izolatında qPCR yöntemi ile *emm1* tipi saptanırken, bakteriyemi tanısı olan iki hastadan elde edilen izolatlarda *emm1* ve *emm2* tipleri tespit edildi. Peritonsiller apse kliniği mevcut olan beş hastanın ikisinde *emm2* ve ikisinde de *emm6* tipleri saptanmış olup, bir izolatta qPCR yöntemi ile *emm* tipi belirlenemedi.

#### 4.4. Dizi Analizi Sonuçları

Quadripleks gerçek zamanlı PCR yöntemi ile *emm* tipi belirlenemeyen 31 izolatta ve PCR ile tespit edilen 11 farklı *emm* tipine ait rastgele seçilen birer izolatta olmak üzere, toplam 42 *S. pyogenes* izolatında dizi analizi çalışması gerçekleştirildi. Tiplendirmeyi temsilen sekans çalışması yaptığımız 11 izolatın tamamında sonuçlar qPCR ile %100 uyumluydu. qPCR ile *emm* tipi belirlenemeyen 31 izolatın 17'sinde elde edilen DNA miktarı yetersiz olduğu için yeterli sekans verisi alınamadı ve *emm* tipi belirlenemedi. Sekans verileri de dahil edildiğinde; toplamda 106 *S. pyogenes* izolatının %16'sında (n=17) *emm* tipi saptanamazken, bu oran boğaz izolatlarında %7,4 (n=5), boğaz dışı izolatlarda ise %31,6 (n=12) olarak tespit edildi.

Dizi analizi yöntemiyle *emm* tipi belirlenen 14 izolatın 6'sında *emm4* tipi saptanırken; *emm6*, *emm12* ve *emm118* ikişer izolatta, *emm2* ve *emm82* ise birer izolatta tespit edildi. Dizi analizi verileri de dahil edildiğinde, tip tayini yaptığımız toplam 89 izolatta en sık saptanan *emm* tipi *emm3*'tü (Tablo 23). qPCR yöntemiyle *emm* tipi belirlenemeyen 9 yara izolatının 5'inde dizi analizi ile *emm* tip tayini yapıldı. İmpetigo tanılı iki hasta izolatında *emm4* ve *emm82*; yüzeysel deri enfeksiyonu tanılı hastalardan birinde *emm4*, diğer ikisinde ise *emm118* tipi tespit edildi. STŞS tanılı hasta izolatının *emm* tipi dizi analizi yöntemi ile belirlenemedi.

**Tablo 23.** Dizi analizi verileri dahil edildiğinde izolatların *emm* tip dağılımı

<i>emm</i> tipi	N	%
<i>emm3</i>	22	24,7
<i>emm2</i>	17	19,1
<i>emm6</i>	13	14,6
<i>emm89</i>	12	13,5
<i>emm4</i>	8	9
<i>emm1</i>	3	3,4
<i>emm12</i>	3	3,4
<i>emm87</i>	3	3,4
<i>emm118</i>	3	3,4
<i>emm28</i>	2	2,2
<i>emm77</i>	2	2,2
<i>emm82</i>	1	1,1
<b>Toplam</b>	<b>89</b>	<b>100</b>

## 5. TARTIŞMA

Dünya çapında yaygın olarak görülen *S. pyogenes* enfeksiyonları, küresel düzeyde endişe oluşturmaktadır (2). Farenjit ve impetigo gibi yüzeysel enfeksiyonlardan, daha ciddi ve hayatı tehdit eden NF, STŞS, bakteriyemi gibi invaziv enfeksiyonlara kadar değişen geniş hastalık spektrumunda, ARA ve APSGN gibi enfeksiyon sonrası immün sekeller de yer almaktadır (1). DSÖ verilerine göre; yüzeysel olmayan *S. pyogenes* hastalıkları her yıl yaklaşık 1,78 milyon yeni vakaya neden olurken, 500.000'den fazla ölüme yol açmaktadır (62). *S. pyogenes* ilişkili morbidite ve mortalitenin azaltılması için, bu hastalıklara ait güncel epidemiyolojik verilerin sağlanması kritik öneme sahiptir (63).

*Streptococcus pyogenes* enfeksiyonları her yaş grubundaki insanı etkileyebilirken, okul ve kreş gibi ortamlardaki çoklu maruziyetler ve konağın immün yanıtı gibi nedenlerle çocuklarda prevalans daha yüksektir (5). İngiltere'de yapılan bir *S. pyogenes* salgını araştırmasında; çalışmaya dahil edilen 113 hastanın %86'sı pediatrik yaş grubundayken (64), bizim çalışmamızda da araştırmaya dahil edilen hastaların çoğunluğunu (%81,1) 18 yaş altındaki pediatrik hastalar oluşturmaktadır.

Erkeklerde *S. pyogenes* enfeksiyonlarının insidansı, kadınlara kıyasla daha yüksek olarak raporlanmaktadır (11). Villalón ve arkadaşlarının (65) iGAS izolatları üzerinde yaptıkları epidemiyolojik çalışmada; hastaların %52,5'inin erkek olduğu ancak farklı klinik durumların her iki cinsiyette de benzer olarak dağıldığı saptanmıştır. Çalışmamızda; hasta popülasyonunun %59,4'ünü, iGAS tanımlı hastaların ise %53'ünü kadınlar oluşturmuştur. Bu durumun literatürle çelişme nedeni, kısa dönemde elde ettiğimiz izolatların araştırmaya dahil edilmesi olabilir.

*Streptococcus pyogenes* enfeksiyonlarının yaygın görülen belirtisi olan boğaz ağrısı, ayaktan muayenelerde sık görülen bir şikayettir ve antibiyotik reçete edilmesinin temel nedenlerinden birisidir (35). Arabacı ve arkadaşlarının (66) yaptığı çalışmada; boğaz örneklerinin tamamına yakını ayaktan başvuru yapan hastalara aitken, çalışmamızda da benzer şekilde boğaz izolatlarının %98,6'sı acil servislere ve polikliniklere yapılan ayaktan başvurulardan elde edilmiştir.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *S. pyogenes* kaynaklı yüzeysel enfeksiyonlar geri planda kalmış olsa da, DSÖ yılda 600 milyondan fazla GAS

farenjiti ve 100 milyondan fazla da impetigo vakası görüldüğünü bildirmektedir. Bu hastalıklar göreceli olarak daha iyi seyir göstermesine rağmen, sağlık sistemine ciddi bir yük getirmektedir. Antibiyotik kullanımı ve okula/işe gidememe gibi nedenlerle ekonomik yük oluşturmalarının yanında, şiddetli *S. pyogenes* enfeksiyonları için rezervuar görevi gördüklerinden, üzerinde durulması gereken klinik durumlardır (5, 62). Yeni Zelanda'da *S. pyogenes* enfeksiyonlarının ekonomi ve sağlık hizmetleri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada; en yaygın *S. pyogenes* ilişkili hastaneye başvuru nedenlerinin yüzeysel boğaz ve cilt enfeksiyonları olduğu tespit edilmiş, bu hastalıkların önlenmesinin yerel ve küresel düzeyde fayda sağlayacağı öngörülmüştür (67). Lübnan'da yapılan bir çalışmada; 103 *S. pyogenes* izolatının %91,3'ü boğaz örneklerinden elde edilirken (68), Almanya'da yapılan ve altı yıl süren bir çalışmada; pediatrik hastalardan izole edilen tüm *S. pyogenes* izolatları araştırmaya dahil edilmiş, toplam 566 izolata ait hastaların %71,6'sında farenjit, %6'sında ise cilt enfeksiyonu saptanmıştır (69). Türkiye'de yapılan ve farklı klinik örnekleri içeren çalışmalarda; Dündar ve arkadaşları (70) %81, Arabacı ve arkadaşları (66) ise %72,2 oranlarıyla boğaz örneklerinin en yaygın izolat tipi olduğunu belirtmişlerdir. Bu verilerle uyumlu olarak, çalışmamızdaki *S. pyogenes* izolatlarının %64,1'i boğaz kültürlerinden elde edilirken, yara sürüntüsü örnekleri %8,5 oranıyla ikinci sıklıkta yer almıştır.

*Streptococcus pyogenes*, sahip olduğu çeşitli ve çok sayıda virülans faktörü ile insanlarda geniş bir hastalık yelpazesine yol açan bir patojendir (71). Bizim çalışmamızda da, mikroorganizmanın klinik spektrumunun çeşitliliğine bir örnek sunacak şekilde, *S. pyogenes* izolatlarının elde edildiği 106 hasta farklı klinik tablolarla hastaneye başvurmuştur. Akut farenjit, yüzeysel deri enfeksiyonu, İYE, vulvovajinit ve impetigo gibi hafif seyirli enfeksiyonlarla birlikte; peritonsiller apse, bakteriyemi, septik artrit, ampiyem, pnömoni, selülit, preseptal selülit ve perianal apse gibi daha ciddi kliniklere sahip hasta izolatlarının da dahil edilmesi araştırmamızı zenginleştirmiştir. Ayrıca bir hastada STŞS ve bir hastada kızıl olmak üzere *S. pyogenes* ilişkili spesifik tanılı hasta izolatı da çalışmamızda yer almıştır.

Bugüne kadar *S. pyogenes* suşlarında penisiline karşı gelişen bir direnç bildirilmediğinden, bu enfeksiyonların tedavisinde penisilin ilk seçenek antibiyotik olmaya devam etmektedir (72). Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak 106 *S. pyogenes* izolatının tamamı penisiline duyarlı olarak saptanmıştır ve bulgularımız *S.*

*pyogenes* ilişkili enfeksiyonların tedavisinde ilk seçenek antibiyotik olarak penisilin kullanımını desteklemektedir.

Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda, *S. pyogenes* izolatlarında değişen tetrasiklin direnç oranları tespit edilmiştir. Villalón ve arkadaşları (73) %12, Naseer ve arkadaşları (74) %15, Meletis ve arkadaşları (75) %40,8 oranında tetrasiklin direnci bildirirken; Çin’de yapılan bir çalışmada bu oran %81,5 olarak saptanmıştır (76). Ülkemizde yapılan ve 312 *S. pyogenes* izolatının dahil edildiği bir sürveyans çalışmasında; %10,6 oranında tetrasiklin direnci tespit edilirken, diğer antibiyotiklerin in vitro etkinliği yüksek bulunmuştur (77). Bizim çalışmamızda ise; çalışmaya dahil ettiğimiz izolatlarda %12,3 oranında tetrasiklin direnci saptanmış ve bu oran literatürde bildirilen direnç aralığı ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca Yunanistan (75), İspanya (65) ve Türkiye’de (77) yapılan çalışmalarla benzer şekilde, izolatlarımızdaki baskın direnç türü tetrasiklin direnci olarak tespit edilmiştir.

Sanson ve arkadaşlarının (78) 929 izolattan oluşan bir *S.pyogenes* koleksiyonuyla yaptıkları çalışmada; tüm izolatların %5,6’inde tetrasiklin direnci tespit edilirken, boğaz izolatları ve iGAS izolatlarında bu oran sırasıyla %3,9 ve %5,7 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda; boğaz izolatlarının %7,4’ünde, iGAS izolatlarının ise %11,8’inde tetrasiklin direnci saptanmıştır. İki çalışma arasında tetrasiklin direnç oranlarında farklılık görülse de, boğaz izolatlarına kıyasla iGAS izolatlarında direnç oranının daha fazla olması birbiriyle uyumlu sonuçlardır ve özellikle iGAS izolatlarında antibiyotik direnci takibinin gerekliliğini göstermektedir.

Tetrasiklin direncine neden olan *tet* genleri, yatay gen transferi yoluyla *S. pyogenes*’e alınmakta ve çoğunlukla geniş bir mobil genetik elementte makrolid direnç genleriyle birlikte yer almaktadır. Bu iki antibiyotik grubu arasındaki etkileşim, yapılacak epidemiyolojik çalışmalarla direnç verilerinin takibinin önemini arttırmaktadır (6). Danimarka’da yapılan bir çalışmada; makrolid dirençli *S. pyogenes*’lerde %52 oranında tetrasiklin direnci saptanmıştır. Antibiyotik kullanımıyla direnç gelişimi arasındaki ilişki incelendiğinde ise; makrolid ve tetrasiklinin birlikte kullanımının makrolid direnci gelişimine neden olduğu saptanırken, tek başına makrolid kullanımda böyle bir korelasyon görülmemiştir (79). ABD’de iGAS izolatları üzerinde yapılan bir çalışmada; tüm izolatların %76’sı hem tetrasikline hem de eritromisine dirençli olarak tespit edilmiş, bir izolatta tek başına tetrasiklin direnci

saptanmıştır (80). Ülkemizde yapılan bir çalışmada; eritromisin dirençli *S. pyogenes* izolatlarının %90,9'u tetrasikline de dirençli olarak bulunmuştur (70). Çalışmamızda ise eritromisin dirençli izolatların %33,3'ünde tetrasiklin direnci saptanmıştır. Bu durum çalışmamızın kısa dönemde elde edilmiş izolatlarla yapılması ile açıklanmış olup, *S. pyogenes*'te farklı direnç birlikteliklerinin araştırılması için daha uzun vadeli çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Diğer taraftan, tetrasiklin direncini baskın direnç türü olarak saptayan çalışmaların da mevcut olması verilerimizi desteklemektedir.

Makrolidler ve klindamisin, penisilin alerjisi olan hastalarda ve invaziv enfeksiyonlarda alternatif tedavi seçenekleridir (6). CDC 2019 Antibiyotik Direnci Tehditleri Raporu'nda, her beş iGAS enfeksiyonunun birden fazlasında etkenin eritromisin ve klindamisin dirençli olduğunu bildirmiştir (81). *S. pyogenes*'te makrolid direnci ülkeler ve coğrafi bölgeler arasında büyük farklılık göstermektedir (82). Farklı ülkelerde yapılan çalışmalar incelendiğinde; *S. pyogenes* izolatlarında %3'ten %88,9'a varan geniş bir yelpazede eritromisin direnç oranları raporlandığı görülmüştür (65, 68, 73, 74, 76, 80, 83-86). Bu çalışmalardaki izolatların elde edildiği hastaların klinik durumları değişkenlik göstermekle birlikte, Naseer ve arkadaşlarının (74) tespit ettiği %3 direnç oranı ile Hua ve arkadaşlarının (76) tespit ettiği %88,9 direnç oranı bildiren her iki çalışma da iGAS izolatları üzerinde yapılmıştır. İrlanda'da yapılan invaziv ve non-invaziv izolatların karşılaştırıldığı çalışmada; bu iki gruptaki eritromisin direnç oranları sırasıyla %5 ve %3,9 olarak saptanmıştır (87). Japonya'da ayrı zaman aralıklarında yapılan ve STŞS vakalarından elde edilen *S. pyogenes* izolatlarının incelendiği iki çalışmada; %64,3 (83) ve %39,8 (84) olmak üzere değişen eritromisin direnç oranları tespit edilmiştir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise; %1,3 - %19,1 aralığında eritromisin direnç oranları bildirilmiştir (66, 70, 72, 77, 88-90). Kara ve arkadaşlarının (91) yaptığı çok merkezli çalışmada; farenjit etkeni olan *S. pyogenes* izolatlarında %1,3 eritromisin direnci saptanmış ve bu direncin ülkemiz için henüz ciddi bir sorun oluşturmadığı belirtilmiştir. Ancak daha yakın tarihli iki çalışmada; *S. pyogenes* izolatlarında %4,4 (iGAS izolatlarında) (72) ve %19,1 (non-invaziv izolatlarda) (90) oranlarında eritromisin direnci bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda, toplam 106 *S. pyogenes* izolatının %2,8'inde eritromisin direnci saptanmıştır ve bu oran ülkemiz verileri ve yurtdışı yayınlarla karşılaştırıldığında beklenenden düşüktür.

Bu durum, eritromisin direnç oranlarının coğrafi bölgeler, ülkeler ve hatta aynı merkezlerde bile heterojenlik göstermesi ile açıklanabilir. Çalışmamızdaki eritromisin direnç oranlarının invaziv ve non-invaziv izolatlardaki dağılımına baktığımızda; sırasıyla %11,8 ve %1,1 oranlarını tespit ettik ve özellikle iGAS izolatlarındaki farklılık dikkat çekiciydi. Bu verilerden yola çıkarak, makrolidlerin ADT çalışılmadan *S. pyogenes* enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde kullanılmaması ve direnç dinamiklerinin anlaşılabilmesi için sürveyans çalışmalarının sürekliliğinin sağlanmasının önemli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Klindamisin, bakterinin temel virülans faktörlerinin üretimini ve protein sentezini inhibe eden antitoksik etkisiyle, özellikle iGAS enfeksiyonlarının tedavisinde penisilin ile kombinasyon halinde kullanılan bir antibiyotiktir (72, 73). Lewis ve arkadaşlarının (92) yaptığı çalışmada; tek başına klindamisin ile tedavi edilen ve indüklenebilir klindamisin direnci nedeniyle klinik başarısızlık gelişen sekiz STŞS vakası sunulmuş ve sonuç olarak, beta hemolitik streptokoklarda indüklenebilir klindamisin direncinin rutin olarak taranması önerilmiştir. CDC'nin ABCs ile takip ettiği iGAS verilerinde; 2011 yılı öncesinde sadece yapısal klindamisin direnci raporlanırken, 2011 yılı ve sonrasında hem yapısal hem de indüklenebilir klindamisin direnç oranları bildirilmeye başlanmıştır. Bu verilere göre; 2010 yılında %3,6 olan klindamisin direnç oranı, 2011 yılında %8,9'a çıkmış; sonraki yıllarda da eritromisin direnci ve tetrasiklin direnciyle paralel bir artış sergileyerek 2022 yılında %34,4 olarak saptanmıştır (93). Hua ve arkadaşlarının (76) yaptığı ve hem eritromisin hem de tetrasikline yüksek oranda direnç saptanan çalışmada; klindamisin direnci %81,4 olarak tespit edilmiştir. Bahnan ve arkadaşlarının (68) yaptığı çalışmada ise; *S. pyogenes* izolatlarında klindamisin direnç oranı %3 olarak bulunmuş, klindamisin direnci saptanan üç izolattan ikisinde yapısal, birinde indüklenebilir direnç saptanmıştır. Türkiye'de Şahin ve arkadaşlarının (72) iGAS tanısı alan hastaları inceledikleri çalışmada; 49 iGAS suşunun tamamı klindamisine duyarlı olarak bulunmuştur. Eritromisin direncinin %4,4 olarak tespit edildiği bu çalışmada, indüklenebilir klindamisin direnciyle ilgili bilgi sunulmamıştır. Çalışmamızda *S. pyogenes* izolatlarında %1,9 oranında klindamisin direnci saptanmıştır. Klindamisin dirençli iki izolattan birinde yapısal, diğerinde ise indüklenebilir direnç fenotipi tespit edilmiş ve sonuçta eritromisin dirençli izolatların %66,7'sine klindamisin direnci eşlik

etmiştir. Eritromisin direnciyle paralel olarak klindamisin direnç oranlarımızın literatüre kıyasla düşük bulunması, direnç oranlarının çalışmanın yapıldığı ülke, merkez ve çalışılan zaman dilimine göre değişmesi ile açıklanmıştır. Ayrıca *S. pyogenes* izolatlarının antibiyotik direnç verilerinin düzenli takip edilmesinin, hızlı gelişen değişimlerin saptanması ve uygun kontrol politikalarının zamanında uygulanabilmesi için önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Dünya Sağlık Örgütü, Aralık 2022’de Avrupa ülkelerinde iGAS hastalıkları ve kızıl vakalarında artış görüldüğünü bildirmiştir. Çoğunlukla 10 yaş altındaki çocukları etkileyen bu durum, bazı ülkelerden iGAS ilişkili ölümlerin arttığına dair raporları da içermektedir. DSÖ bu vakaların genel popülasyon için oluşturduğu riski düşük olarak değerlendirse de, o dönemde solunum yolu virüslerinin Avrupa’daki artışını göz önünde bulundurarak, ortaya çıkacak benzer bir duruma karşı tüm ülkeleri uyarılmış; *S. pyogenes* enfeksiyonlarının erken tanınması, bildirilmesi ve hızla tedavinin başlanması için gelişmiş sürveyans programlarını desteklemiştir (3). Ülkemizde de o dönemde hem iGAS enfeksiyonlarının sayısında hem de iGAS hastalarındaki pediatrik yaş grubu oranında artış görülmüştür ve bu artış, pandemiye yönelik önlemlerin kalkması, solunum yolu virüslerinin ve kızıl vakalarının artmasıyla da paralellik göstermiştir (94). Aralık 2023’e gelindiğinde ise, Norveç’te 10 yaşından küçük çocuklarla birlikte 70 yaş ve üzeri yaşlı bireylerin de etkilendiği yeni bir artış dönemi görülmüştür (95). Valcarcel ve arkadaşlarının (95) yaptığı çalışmada; 2022-2024 yılları arasındaki iGAS vakalarının epidemiyolojik özellikleri incelenmiş ve bu veriler COVID-19 pandemisi öncesi dönemle karşılaştırılmıştır. Çalışmada; pandemi öncesi dönem (Mart 2015-Şubat 2020), COVID-19 pandemi dönemi (Mart 2020-Şubat 2022), geç pandemi dönemi (Mart 2022-Şubat 2023) ve pandemi sonrası dönem (Mart 2023-Şubat 2024) olarak dört zaman dilimi tanımlanmıştır. Bu araştırmaya göre; sadece iGAS vakaları değil, GAS farengiti vakalarıyla ilişkili birinci basamak sağlık hizmetlerine başvurular da pandemi sonları ve pandemi sonrası dönemde artmıştır. Pandemi döneminde uygulanan enfeksiyon kontrol önlemlerinin *S. pyogenes* maruziyetini azaltarak, çocuklar ve yaşlılar gibi immünolojik açıdan duyarlı gruplardaki vaka artışlarına yol açtığı ve predispozan viral enfeksiyon patojenlerinden olan İnfluenza, Respiratuar Sinsityal Virus (RSV) gibi etkenlerin yeniden dolaşıma çıkışının *S. pyogenes* duyarlılık artışına katkı sağladığı düşünülmüştür (95). Norveç verilerine paralel olarak,



İngiltere’de de 2023-2024 sezonunda kızıl ve iGAS vakalarının arttığı, ancak 2022-2023 dönemi seviyelerinin çok altında olduğu saptanmıştır. Ayrıca vakaların çoğunluğunu ileri yaş gruplarının oluşturduğu bildirilmiştir (96). Şubat 2024-Mayıs 2024 tarihleri arasında gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, yılın aynı dönemindeki dünya verileriyle uyumlu olarak iGAS hastalarının %64,8’inin erişkin yaş grubunda olduğu saptanmıştır.

Çeşitli klinik tablolara neden olan *S. pyogenes*’in epidemiyolojik sürveyansı, hastalık profilinin bölgesel ve zamansal değişimlerinin saptanabilmesi için oldukça önemlidir (97). *S. pyogenes*’in temel epidemiyolojik belirteci, *emm* geni tarafından kodlanan M proteindir ve yapılan epidemiyolojik çalışmaların neredeyse tamamı *S. pyogenes* izolatlarını *emm* tipi ile tanımlamaktadır. Mikroorganizmanın *emm* tipi; süşun genetik yapısı, biyolojisi ve ilişkili hastalıkların patogenezi hakkında da temel bilgileri sağlamaktadır. Son yıllarda *S. pyogenes* ilişkili ciddi seyirli hastalıkların yeniden ortaya çıkması, bu etkene yönelik farkındalığın artmasına neden olmuştur. Lisanslı bir aşının olmaması ve penisilin direnci gelişimine dair endişelerle birlikte *S. pyogenes*’in yeniden gündeme gelişi, küresel düzeyde yapılacak sürveyans çalışmalarının önemine dikkat çekmektedir (5, 6). Bu çalışmalar ile epidemiyolojik durumun takibi, olası salgınları erken tespit etmek ve *emm* türlerindeki değişiklikler ile birlikte bakteriyel özelliklerin anlaşılması için gereklidir (95).

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi’nin yayınladığı moleküler temelli *emm* tiplendirme protokolü, *emm* geninin serotipe spesifik bölgesinin PCR ile çoğaltılmasının ardından dizileme reaksiyonunun gerçekleştirilmesi esasına dayanmaktadır (7). Bu yöntem epidemiyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmış olsa da maliyetli olması, çoğunlukla birkaç günde sonuçlanması ve çalışma için laboratuvarların tümünde bulunmayan ekipman ve reaktiflere ihtiyaç duyulması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu durumlardan yola çıkarak, özellikle salgın araştırmalarında zaman ve maliyet açısından etkin bir yöntem olan, PCR sonrası doğrulama adımlarını gerektirmeyen, aynı zamanda birçok laboratuvarında mevcut donanımla çalışılabilecek gerçek zamanlı PCR metodu ile *emm* tiplendirme protokolü CDC tarafından belirlenmiştir. Bu yöntemde, ABCs programı kapsamında toplanan iGAS izolatlarının yaklaşık %93’ünü içeren, en sık görülen 20 *emm* tipi tanımlanabilmektedir. ABD’de en yaygın görülen *emm* tiplerini kullanarak geliştirilen

bu metot, ek olarak dünya çapında görülen tiplerin önemli bir kısmını da kapsamaktadır. Her bir tipin bilinen alt tiplerini içeren, 20 *emm* tipi için beş adet dördümlü reaksiyon (quadripleks) gerçekleştirilmektedir. Birçok laboratuvar *S. pyogenes*'i rutinde tanımlayabilirken, *emm* tiplendirme yapamamaktadır. Gerçek zamanlı PCR yönteminin kullanılması ile pek çok laboratuvarın *S. pyogenes*'i tiplendirebilir hale geleceği öngörülmektedir. Yöntemin en önemli sınırlaması tüm *emm* tiplerini hedeflememesi dolayısıyla tüm tipleri belirleyememesidir (8). Bizim çalışmamızda; çeşitli klinik izolardan elde edilen toplam 106 *S. pyogenes* izolatının *emm* tipi analizi bu protokole göre tasarlanmış qPCR panel kiti ile gerçekleştirilmiştir. Yaygın görülen 20 *emm* tipinin (*emm*1, 89, 12, 82, 28, 92, 77, 4, 59, 11, 3, 2, 87, 81, 118, 6, 75, 49/151, 76, 83) varlığı araştırılırken, quadripleks gerçek zamanlı PCR yöntemi ile izolatlarımızın %70,8'i tiplendirilmiştir. Örnek bazında değerlendirildiğinde; boğaz izolatlarında tiplendirme oranı % 83,8 iken, boğaz dışı izolatlarda bu oranın %47,4'e düşmesi dikkat çekici olmuştur. Bu durum; boğaz ve boğaz dışı örneklerdeki *emm* dağılımının ve çeşitliliğin farklı olması, ayrıca *S. pyogenes* ilişkili spesifik klinik tabloların daha az rastlanan tiplerle ilişkili olma ihtimaliyle açıklanmıştır.

Kliniğimizde Haziran-Ağustos 2023 tarihleri arasında yapılan *emm* tiplendirme çalışmasında (98); qPCR yöntemi ile 31 *S. pyogenes* izolatında 20 *emm* tipinin varlığı araştırılmış, izolatların %90,3 'ü bu yöntemle tiplendirilmiştir. Örnek dağılımına bakıldığında; boğaz izolatlarının %95,4'ünün *emm* tipi belirlenebilirken, boğaz dışı izolatlarda bu oran %66,7'ye düşmüştür. Boğaz ve boğaz dışı izolatlar arasındaki farklılık bizim çalışmamızla uyumlu olsa da, bu iki çalışmada tiplendirme oranlarının kısa sürede değişmesi, çalışmaların yapıldığı dönemdeki mevsimsel farklılık ve bununla ilişkili olarak *emm* dağılımlarının değişebileceğini düşündürmüştür.

d'Humières ve arkadaşları (99), invaziv ve non-invaziv *S. pyogenes* izolatlarının *emm* tiplendirmesinde Fransa'daki 13 majör *emm* tipini (*emm* 1, 3, 4, 6, 11, 12, 22, 28, 75, 77, 87, 89 ve 102) saptayabilen üçlü multipleks PCR yöntemi ile 585 boğaz, 125 iGAS ve 32 sağlıklı taşıyıcı izolatını çalışmış ve yöntemin izolatları tiplendirme oranı %92,5 olarak raporlanmıştır. Kısa sürede sonuçlanan bu metot ile çok sayıda *S. pyogenes* suşunun analizi yapılmıştır. Bizim çalışmamız da 45 dakikada sonuçlanan PCR reaksiyonundan oluştuğundan ve PCR sonrası başka aşamalara

ihtiyaç duyulmadığından, çok sayıda izolatin kısa zamanda çalışılmasına imkân vermektedir. Özellikle salgın araştırmalarında kullanılabilecek bir yöntemle tiplendirmenin yapılmış olması nedeniyle çalışmamızın ileride yapılacak araştırmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. İzolatların %70,8'inin qPCR ile tiplendirildiği çalışmamızda, sekans dışı bir yöntem kullanarak %92,5 tiplendirme oranı saptayan diğer çalışmaya göre; kullanılan yöntem, coğrafi özellikler, çalışmanın yapıldığı zaman dilimi gibi çok çeşitli faktörün bu farklı oranlara neden olabileceği düşünülmüştür. d'Humières ve arkadaşlarının bu metodu, Fransa'da yaygın görülen *emm* tiplerini kapsayacak şekilde geliştirmiş olması da yüksek tiplendirme oranlarıyla ilişkili olabilir. Bundan yola çıkarak; daha fazla yerel epidemiyolojik bilgi sağlayacak çalışmanın yapılması, ülkemiz genelindeki *emm* dağılımlarının belirlenmesi ve böylece tiplendirmede kullanılacak yöntemler için referans veri sağlanması açısından önemlidir.

Epidemiyolojik çalışmalarda *S. pyogenes* izolatları arasındaki klonal ilişki esas olarak PCR temelli dizileme yöntemiyle araştırılmış olsa da, darbeli alan jel elektroforezi (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), multilokus dizi tiplendirme (Multilocus sequence typing, MLST) ve özellikle son yıllarda tüm genom dizileme (Whole genome sequencing, WGS) gibi yöntemler de bu amaçla kullanılmıştır. Çalışılan izolat hakkında önemli bilgiler sağlayan bu metotlar yüksek maliyetli olması, sonucun birkaç günde alınması ve rutin laboratuvarlarda bulunmayan ekipmanlara gerek duyulması gibi dezavantajlara sahiptir (8, 100). Bu durum mikrobiyologları *emm* tipi belirlemede alternatif yöntemler aramaya yönlendirmiştir (101). Bu amaçla Tadros ve arkadaşları (101), MALDI-TOF MS kullanmıştır. MALDI-TOF MS yöntemi ile gerçek zamanlı veri elde edilmesi ve maliyetin düşük olmasının, özellikle *S. pyogenes* salgınlarının hızlı tespit edilip yönetilmesinde potansiyel fayda sağlayacağı öngörülmüştür. Velusamy ve arkadaşları (8) ise; tek bir reaksiyonda dört *emm* türünü belirleyebilen, iGAS suşlarında yaygın olarak bulunan 20 *emm* tipini kapsayan, gerçek zamanlı PCR tabanlı tiplendirme yöntemini geliştirmiştir. Bu çalışmada, qPCR yönteminin duyarlılığı *emm tipi* bilinen 21 pozitif kontrol izolatına ait DNA'ların 10 kat seri dilüsyonuyla belirlenmiştir. Hem monopleks hem de multipleks reaksiyonlarda tespit duyarlılığı yüksek (<10 genom kopyası/analiz) bulunmuştur. Multipleks PCR reaksiyonlarında yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuç saptanmamakla birlikte, qPCR

ile tiplendirme yapılan izolatların tamamında *emm* tipinin doğru bir şekilde tanımlandığı bildirilmiştir. CDC tarafından yayınlanan bu protokole göre tasarlanan kit ile yaptığımız çalışmamızda; qPCR yöntemi ile tiplendirilemeyen 14 izolatta dizi analizi ile *emm* tipi belirlenmiş ve bu tiplerin tamamının qPCR panel kitinde mevcut olan *emm* tiplerinden olduğu tespit edilmiştir. Bu 14 izolatın altısında *emm4* saptanırken; *emm6*, *emm12* ve *emm118* ikişer izolatta; *emm2* ve *emm82* ise birer izolatta tespit edilmiştir. Bizim referans aldığımız çalışmada (8) qPCR yöntem sonuçlarının PCR temelli dizileme ve/veya WGS ile %100 uyumlu olduğu belirtilmiş olsa da, protokolde tanımlanan primer tasarımları CDC'nin ABCs yoluyla elde ettiği izolatlara ait *emm* tipleri ve bunların alt tipleri ile belirlenmiş olup, doğrulamada da bilinen izolatlar kullanılmıştır. Rutin laboratuvarımıza gelen örneklerden elde edilen *S. pyogenes* izolatlarıyla yaptığımız çalışmamızda, özellikle *emm4* tipinde qPCR ile tiplendirme oranımızın düşük olması, izolatlarımızda ABCs içinde yer almayan farklı *emm4* alt tiplerinin mevcut olabileceğini düşündürmüştür. Araştırılan 20 *emm* tipine ait tüm alt tiplerin hedeflenmemesi yöntemin kısıtlılıklarından olsa da, primer ve problemlerin ülkemizdeki *S. pyogenes* izolatlarına yönelik tasarlanmasıyla qPCR kitinin tiplendirme duyarlılığının artabileceği öngörülmektedir. Bunu sağlamak için laboratuvar temelli aktif bir sürveyans ağının kurulması gerekmektedir.

Smeesters ve arkadaşları (102), 1 Ocak 1992-23 Şubat 2023 tarihleri arasındaki *emm* türlerinin dağılımını bildiren çalışmaların sistematik bir incelemesini yaparak, *emm* tipleri hakkında küresel düzeyde geniş kapsamlı veri sağlamışlardır. Buna göre; en düşük *emm* çeşitliliği Avrupa'da ve ardından Kuzey Amerika'da gözlemlenmişken, en yüksek *emm* çeşitliliği Afrika ve ardından Okyanusya'da tespit edilmiştir. *emm* tipi çeşitliliği ile ülkelerin gelişmişlik düzeyi arasında ters bir korelasyon saptanmıştır. Ülkemizde Topkaya ve arkadaşlarının (103) yaptığı çalışmada; 12 farklı bölgeden elde edilen iGAS izolatlarında 17 farklı *emm* tipi tespit edilmiştir. Otlu ve arkadaşları (104) ise; aynı bölgede bulunan iki ilköğretim okulundaki çocukların boğaz kültürlerinden elde edilen *S. pyogenes* izolatlarında 20 farklı *emm* tipi saptamıştır. qPCR ile 20 *emm* tipi varlığını araştırdığımız çalışmamızda; 11 farklı *emm* tipi saptanmış olup, her tipten bir izolat qPCR ile moleküler tiplendirmeyi temsilen Nanopore sekans yöntemiyle dizilenmiş ve qPCR yönteminin *emm* tiplerini doğru belirlediği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, sekans yöntemi ile *emm* tipi belirlenen 14 izolatın sonuçları da dahil

edildiğinde saptanan *emm* tür çeşidi sayımız 12 olmuştur. Türkiye’de yapılan diğer *emm* tiplendirme çalışmalarına bakıldığında, çok merkezli ve uzun süreli çalışmaların mevcut olmaması, ülkemizdeki *emm* tür çeşitliliğiyle ilgili verilerimizi kısıtlamaktadır. *S. pyogenes* enfeksiyonlarından korunmada en etkili araç olarak kabul edilen *S. pyogenes* aşılarının içeriğine yön vermesi açısından yerel *emm* dağılımlarını belirleyecek, çok merkezli epidemiyolojik çalışmaların yapılmasının önemli olduğunu düşünmekteyiz. Araştırmaya dahil ettiğimiz izolatların bölgesel olması *emm* çeşitliliğini potansiyel olarak etkilemiş olabileceğinden, tek merkezde ve kısa sürede elde edilen izolatların değerlendirilmesi çalışmamızın kısıtlılıklarındandır. Diğer taraftan, qPCR yöntemi ile sekans sonuçlarının %100 uyumlu olması, *emm* tiplendirmesinde kullandığımız yöntemle güvenilir sonuçlar elde ettiğimizi göstermiştir.

*Streptococcus pyogenes* izolatlarında saptanan baskın *emm* tipleri dünya genelinde heterojen bir dağılım göstermektedir. Rusya’da (105) *emm89* ve *emm75*; Güney Afrika’da (97) *emm76* ve *emm81*; Yunanistan’da (106) *emm1*, *emm12*, *emm77*, *emm4*; Pakistan’da (107) *emm68* ve *emm104*, Hindistan’da (108) *emm11*; Avusturya’da (109) *emm1*, *emm4*, *emm12*, *emm28*; Tayland’da (110) *emm44*; Kore’de (111) *emm1*, *emm12*, *emm4* yapılan çeşitli çalışmalarda saptanan baskın tipler olarak raporlanmıştır. Ülkemiz geneline bakıldığında, farklı şehirlerde yapılan *emm* tiplendirme çalışmalarında baskın *emm* tiplerinin farklılık gösterdiği görülmüştür. Ankara’da (112) *emm12*, *emm3* ve *emm1*; İstanbul’da (113) *emm1*, *emm3* ve *emm4*; Kocaeli’de (70) *emm4*, *emm1*, *emm2* ve *emm114*; Zonguldak’ta (114) *emm12*, *emm89* ve *emm1*; Konya’da (115) *emm1*, *emm89*, *emm18* ve *emm19*; Malatya’da (104) *emm1*, *emm12* ve *emm89*; Adana’da (116) *emm28*, *emm1* ve *emm12*; Çanakkale’de (117) *emm89*, *emm44* ve *emm6* tipleri Türkiye’de yapılan farklı çalışmalardaki baskın *emm* tipleri olarak bildirilmiştir. Kliniğimizde yapılan Erten ve arkadaşlarının çalışmasında (98); *S. pyogenes* izolatlarının %25’inde tespit edilen *emm1* baskın tip olurken; *emm89*, *emm3* ve *emm2* de aynı oranlarda sıklıkla tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise en sık saptanan *emm* tipi *emm3* iken; sırasıyla *emm2*, *emm6* ve *emm89* diğer baskın tipleri oluşturmuştur. *emm* tipi dağılımlarındaki bu değişkenlik; coğrafi özellikler, mevsimler faktörler, çalışmanın yapıldığı zaman ve seçilen hasta grubu gibi çok farklı parametrelerden etkilenmiş olabilir. Ayrıca Erten ve

arkadaşlarının çalışma yaptığı dönem iGAS salgın vakalarını kapsarken, bizim çalışmamızın sporadik hasta izolatlarını içermesi baskın *emm* tipi farklılığının temel nedeni olabilir. Özellikle farklı zaman dilimlerinde aynı merkezdeki *emm* dağılımının farklılaşması dikkat çekici bir sonuçtur ve bundan yola çıkarak; *S. pyogenes* ile ilgili epidemiyolojik çalışmaların sürekliliğinin, kısa dönemde ortaya çıkabilecek değişikliklerin saptanması açısından kıymetli olacağı kanaatine varılmıştır.

Fay ve arkadaşları (118), ABD'deki iGAS süveyans verilerini inceledikleri çalışmalarında; eritromisine duyarlılık göstermeyen izolat oranı en yüksek *emm* tiplerinin *emm77*, *emm58*, *emm11*, *emm83* ve *emm92* olduğunu tespit etmiştir. ABD'de yapılan başka bir çalışmada; *emm92* ve *emm11*, eritromisin dirençli izolatların %86'sını oluşturmuş ve bu iki tipteki izolatların hepsi hem eritromisine hem de klindamisine direnç göstermiştir (80). Villalón ve arkadaşları (73) ise eritromisin direncinin *emm 4*, *emm 11*, *emm 12* ve *emm 77* tiplerinde yoğunlaştığını saptamıştır. Yirmi yıllık süreçte makrolid dirençli *S. pyogenes* izolatlarının fenotip ve genotiplerinin incelendiği geniş kapsamlı bir çalışmada; 13 *emm* tipi (*emm12*, 4, 28, 77, 75, 11, 22, 92, 58, 60, 94, 63, 114) makrolid direnci ile ilişkili bulunurken, 14 *emm* tipi (*emm89*, 3, 6, 2, 44, 82, 87, 118, 5, 49, 81, 59, 227, 78) makrolid duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir (119). Ülkemizde Dündar ve arkadaşlarının (70) yaptığı çalışmada ise; eritromisin dirençli izolatlarda baskın bir *emm* tipi saptanamamıştır. Eritromisin dirençli üç izolat tespit ettiğimiz çalışmamızda; izolatların birinde *emm2* tipi saptanırken, diğer iki izolat qPCR yöntemi ile tiplendirilememiştir. Dizi analizi yöntemi ile bu iki izolattan birinde *emm118* tipi tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda *emm2* ve *emm118* tiplerinin makrolid duyarlılığıyla ilişkilendirilmiş olması, çalışmamızın bulgularıyla çelişmektedir. Çalışmaya dahil ettiğimiz eritromisin dirençli izolat sayısının az olması bu uyumsuzluğun nedeni olabilir. *emm* tipi ile makrolid direnci ilişkisinin araştırılması için daha fazla sayıda eritromisin dirençli *S. pyogenes* izolatının dahil edildiği çalışmaya ihtiyaç vardır.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, *S. pyogenes*'in *emm* tipleri ile yol açtığı hastalık türleri arasındaki ilişki çok kez gösterilmiştir (5). Virülans faktörleri, coğrafi özellikler ve antibiyotik direnç modifikasyonları gibi zamanla oluşan değişiklikler *emm* tiplerini etkilese de, bazı tipler ile spesifik *S. pyogenes* hastalıkları arasındaki ilişki değerini korumaktadır. Literatüre bakıldığında; *emm1*, 3, 5, 6, 12, 14, 17, 19, 24

tipleri farenjit; *emm33*, 41, 42, 52, 53, 70 impetigo; *emm1*, 3, 6, 12, 28, 53, 68, 81, 89 bakteriyemi ; *emm1*, 3, 4, 28 kızıl; *emm1* ve *emm3* ise STŞS ile ilişkilendirilen *emm* tiplerini oluşturmaktadır (6, 60). Bizim çalışmamızda farenjit tanılı hastalardan elde edilen izolatlarda en sık tespit edilen tipler *emm3*, 6, 2 ve 89 iken; impetigo tanılı iki hastada *emm4* ve *emm82*; bakteriyemi tanılı iki hastada *emm1* ve *emm2* tipleri saptanmıştır. STŞS tanılı hasta başta olmak üzere toplam 17 hasta izolatında *emm* tip tayini yapılamamıştır. Tiplendiremediğimiz örneklerde klinik uyum konusunda yorum yapamamamız, çalışmamızın kısıtlılıklarındandır. Ayrıca farklı hastalıklarda *S. pyogenes*'in moleküler karakterizasyonunu yapabilmek için daha fazla sayıda izolatin dahil edildiği, çok merkezli çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

*Streptococcus pyogenes*'in neden olduğu klasik bir döküntülü hastalık olan kızıl, 20. yüzyıl başlarına kadar yüksek mortalite oranları ile seyretmiştir (120). Hastalığın görülme sıklığı son yüzyılda önemli oranda azalmış olsa da, özellikle son yıllarda kızıl görülme sıklığının arttığına dair yayınlanan raporlar önemli bir endişe kaynağı olmuştur (5). İngiltere'de yapılan bir moleküler epidemiyoloji çalışmasında; 2016 yılındaki hem kızıl hem de iGAS vakalarındaki artış, *emm1* tipinin yayılmasıyla ilişkilendirilmiştir (121). Ayrıca yapılan filogenetik analiz ile suşlarda, daha önce ABD'de (122) tespit edilen pandemi M1T1 klonunun bir alt soyu olarak M1<sub>UK</sub> tanımlanmış ve bu soyun diğer *emm1* suşlarından daha fazla SPE A ürettiği tespit edilmiştir (121). Almanya'da yapılan bir çalışmada; Ekim 2022 ile Nisan 2023 tarihleri arasında kan ve doku örneklerinden elde edilen *S. pyogenes* izolatlarının 17'sinde saptanan *emm1* baskın *emm* tipi olarak bildirilmiştir. Tek nükleotid polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism, SNP) analizi ile bu 17 izolatın 14'ünde M1<sub>UK</sub> soyu tespit edilmiştir (123). Çalışmamızda; kızıl tablosu gelişen hastanın boğaz izolatında ve bakteriyemi tanılı hastalardan birinin kan izolatında qPCR yöntemi ile *emm1* tipi saptanmıştır. Bu izolatların birçok ülkede invaziv enfeksiyonlar ve kızıl hastalığı ile ilişkilendirilen M1<sub>UK</sub> klonu olup olmadığının belirlenmesi için ileri incelemelerin yapılması gerekmektedir.

Akça ve arkadaşlarının (112) 114 *S. pyogenes* izolatıyla yaptığı çalışmada; 23 (%20,2) izolatın *emm* tipi, dizi analizi yöntemi ile belirlenememiştir. Bunlardan 16'sında yeterli DNA ürünü elde edilememiş, dördü veri tabanındaki tiplerden herhangi biri ile uyumlu bulunmamış ve üçü dizilemede karışık popülasyon

sergilemiştir. Çakmak ve arkadaşlarının (113) 112 izolat ile yaptığı *emm* sekans çalışmasında ise; 37 izolatta elde edilen DNA miktarı dizi analizi için yetersiz saptanırken, 14 izolatta dizileme sonucu elde edilen DNA yeterli saflıkta bulunmamış, toplamda 51 (%45,5) izolatta sonuç alınamamıştır.

Nanopore sekans çalışmaları için başlangıç DNA miktarının 20 ng/μl'den fazla olması gerekmektedir (124). Çalışmamızda qPCR yöntemi ile *emm* tipi tespit edilemediği için Nanopore sekans yapılan 31 izolattan 17'sinde, elde edilen DNA miktarı yetersiz olduğundan yeterli sekans okuma verisi alınamamış ve *emm* tipi belirlenememiştir. İzolatlarımızın %16'sında *emm* tipinin belirlenememiş olması çalışmamızın kısıtlılıklarındandır. Bu durum spesifik klinik tablolarla ilişkili *emm* tiplerinin sorgulanması, *emm* tür çeşitliliğinin saptanması ve aşı kapsayıcılığının araştırılması alanlarındaki verilerimizi kısıtlamaktadır. Ancak literatürdeki diğer çalışmalarda da *emm* tipi belirlenemeyen *S. pyogenes* izolatlarının mevcut olduğu ve çalışma sonuçlarının tiplendirilebilen izolatlar üzerinden paylaşıldığı saptanmıştır.

Dizi analizi verileri dahil edilerek izolat tipine göre *emm* tiplendirme oranları değerlendirildiğinde; çalışmamızdaki boğaz izolatlarının %7,4'ünde yeterli DNA elde edilemediğinden *emm* tipi saptanamamışken, boğaz dışı izolatlarda bu oranın %31,6'ya yükseldiği tespit edilmiştir. Bu farklılık, boğaz ve boğaz dışı klinik örneklerin inkübasyon ortamı gibi kültür şartlarının değişmesi ve dolayısıyla elde edilen DNA miktarının bu durumdan etkilenmesi sorusunu akla getirmektedir. Bu konu tartışmalı olmakla birlikte bundan yola çıkarak, özellikle boğaz dışı izolatlar için DNA ekstraksiyon basamağının gözden geçirilip yeniden düzenlenmesi ya da alternatif bir DNA ekstraksiyon prosedürünün kullanılması ile bu izolat tiplerinde *emm* tiplendirme yöntemlerinin başarısının artırılabilceği düşünülmüştür.

*Streptococcus pyogenes* ilişkili enfeksiyonların ve komplikasyonların önlenmesi için güvenli ve etkili, aynı zamanda da düşük maliyetli aşılar küresel düzeyde ihtiyaç vardır. Uzun yıllardır devam eden aşı çalışmalarında temel yaklaşımlardan birisi, bakterinin majör virülans faktörü olan M proteininin kullanılmasıdır. İçerdiği opsonik epitoplara ile fagositozu tetikleyen ancak insan dokusu ile çapraz reaksiyon göstermeyen N-terminal M protein peptitleri ile rekombinant çok değerlikli M protein aşıları oluşturulmuştur (125, 126). Suşların M proteinini kodlayan gen olan *emm* tiplerinin belirlenmesi, aşı çalışmaları için temel bilgiler sağlamaktadır



(127). *S. pyogenes*'in 26 farklı serotipinin dahil edildiği 26 valanlı aşı; emm 1, 1.2, 2, 3, 5, 6, 11, 12, 14, 18, 19, 22, 24, 28, 29, 33, 43, 59, 75, 76, 77, 89, 92, 94, 101, 114 tiplerini içermektedir (128). Ülkemizde yapılan çeşitli *emm* tiplendirme çalışmasında 26 valanlı aşının kapsayıcılığı araştırılmış; Mengeloğlu ve arkadaşları (114) %77,7, Arslan ve arkadaşları (88) %74, Topkaya ve arkadaşları (103) %70,5, Kızılyıldırım ve arkadaşları (116) %84,8 oranında *emm* tipi belirledikleri izolatlarda aşı kapsayıcılığı bildirmişlerdir. Çalışmamızda saptadığımız 12 farklı *emm* tipinin 8'i (%66,7), 26 valanlı içeriğinde mevcut olup, dizi analizi verilerini de dahil ederek tiplendirme yaptığımız 89 izolatta aşı kapsayıcılığı %83,1 olarak hesaplanmıştır. Bu oran Türkiye verileriyle uyumludur. En son geliştirilen çok değerlikli N-terminal peptit bazlı M protein aşısı 30 değerlikli olan StreptAnova'dır ve *emm* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 14, 18, 19, 22, 24, 28, 29, 44, 49, 58, 73, 75, 77, 78, 81, 82, 83, 87, 89, 92, 114 ve 118 tiplerini içermektedir (129). Yunanistan'da yapılan ve 7 yıllık dönemde 1349 *S. pyogenes* izolatının dahil edildiği çalışmada; 35 farklı *emm* türü saptanan izolatların 30 valanlı aşıda bulunan *emm* tiplerini kapsama oranı %97,2 olarak bildirilmiştir (106). Türkiye'de Altun ve arkadaşlarının (117) çalışmasında; tonsillofarenjit hastalarından elde edilen *S. pyogenes* izolatlarının 30 valanlı aşı için kapsama oranı %84,6 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda tespit ettiğimiz 12 farklı *emm* tipinin tamamı 30 valanlı aşıda mevcut olup *emm* tipini belirleyebildiğimiz 89 *S. pyogenes* izolatı için bu aşının kapsayıcılığı %100'dür. Ancak *emm* tipi saptanamayan 17 izolatın mevcut olması, çalışmamızın aşı kapsayıcılığını belirlemedeki kısıtlılıklarındandır. Ayrıca tek merkezli ve kısa sürede topladığımız sporadik izolatların çalışmaya dahil edilmiş olması da *emm* tür çeşitliliğini etkilemiş olabilir. Çeşitli merkezlerin dahil edildiği uzun süreli çalışmaların yapılması, *S. pyogenes* aşı içeriğine yön vermesi ve yerel ihtiyaçların belirlenmesi açısından önemlidir.

## 6. SONUÇLAR

Çalışmamızda, 106 *S. pyogenes* izolatında quadripleks gerçek zamanlı PCR yöntemi ile *emm* tiplendirme yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların %81,1'i pediatrik yaş grubundayken, iGAS enfeksiyonlarının %64,8'i erişkin hastalarda saptanmıştır. Tüm izolatlar penisiline duyarlı iken tetrasikline %12,3, eritromisine %2,8 ve klindamisine %1,9 oranında direnç tespit edilmiştir. CDC protokolüne göre tasarlanan qPCR kiti ile yaygın görülen 20 *emm* tipinin varlığı araştırılmış ve *S. pyogenes* izolatlarının %70,8'inde bu yöntemle 11 farklı *emm* tipi belirlenmiştir. Tiplendirmeyi temsilen her *emm* tipinden birer izolatta Nanopore sekans yöntemi ile dizi analizi yapılmış ve sonuçlar birbiriyle uyumlu bulunmuştur.

Quadripleks gerçek zamanlı PCR yöntemi ile *emm* tipi belirlenemeyen 31 izolatta gerçekleştirilen dizi analizinde; altı izolatta *emm4* tipi saptanırken, qPCR panel kitinde mevcut olan *emm* tipleri dışında farklı bir *emm* tipi tespit edilmemiş ve izolatlarımızdaki *emm* tür çeşidi sayısı toplamda 12 olmuştur. Çalışmaya dahil edilen izolatların %16'sında yeterli miktarda DNA elde edilemediği için *emm* tipi belirlenememiştir. *S. pyogenes* izolatlarında saptanan baskın *emm* tipi *emm3* iken; *emm2*, *emm6* ve *emm89* da diğer sık tespit edilen *emm* türlerini oluşturmuştur.

*Streptococcus pyogenes* enfeksiyonlarından korunmada en etkili araç olarak kabul edilen *S. pyogenes* aşılarının içeriğine yön vermesi açısından mevsimsel aşı kapsayıcılığının bilinmesi önemlidir. Çalışmamızda tespit ettiğimiz 12 farklı *emm* tipinin tamamı 30 valanlı aşıda mevcut olup *emm* tipini belirlediğimiz 89 *S. pyogenes* izolatı için bu aşının kapsayıcılığı %100 olarak saptanmıştır.

Bölgesel ve tek bir dönemdeki sporadik vakalardan elde *S. pyogenes* izolatlarını içeren bir çalışma olması ve izolatlarımızın %16'sında *emm* tipinin belirlenememiş olması çalışmamızın kısıtlılıklarındandır. Bu durum; spesifik klinik tablolarla ilişkili *emm* tiplerinin sorgulanması, *emm* tür çeşitliliğinin saptanması ve aşı kapsayıcılığının araştırılması alanlarındaki verilerimizi sınırlamaktadır. Ülkemizdeki *emm* çeşitliliğinin belirlenebilmesi için farklı merkezlerden ve farklı dönemlerde elde edilen *S. pyogenes* izolatlarıyla yapılacak daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu araştırmaların *emm* tiplendirmesinde kullanılacak yöntemler için referans veri sağlayacağı öngörülmüştür.

Çalışmamızın verilerine dayanarak; hızlı, maliyet etkin ve pek çok laboratuvar alt yapısına uygun bir yöntem olan qPCR ile *emm* tiplendirmesinin güvenilir bir şekilde gerçekleştirileceği ve bu yöntemin olası *S. pyogenes* salgınlarının yönetimine katkı sağlayacağı belirlenmiştir. Primer ve prob tasarımlarının ülkemizde dolaşımda olan *S. pyogenes* izolatlarına yönelik yapılmasıyla qPCR kitinin tiplendirme duyarlılığının artacağı öngörülmüştür. Yerel epidemiyolojik verilerimizin sürekliliğinin sağlanması için laboratuvar temelli aktif bir sürveyans sisteminin geliştirilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.



## 7. KAYNAKLAR

1. Walker MJ, Barnett TC, McArthur JD, Cole JN, Gillen CM, Henningham A, et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A Streptococcus. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(2):264-301.
2. Siemens N, Lütticken R. Streptococcus pyogenes ("Group A Streptococcus"), a Highly Adapted Human Pathogen-Potential Implications of Its Virulence Regulation for Epidemiology and Disease Management. *Pathogens*. 2021;10(6).
3. WHO. Increased incidence of scarlet fever and invasive Group A Streptococcus infection - multi-country [cited 2024 1 Sep]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON429>.
4. CDC. Group A Strep Disease Surveillance and Trends [cited 2024 Sep 1]. Available from: <https://www.cdc.gov/group-a-strep/php/surveillance/index.html>.
5. Efstratiou A, Lamagni T. Epidemiology of Streptococcus pyogenes. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet] 2nd edition. 2022.
6. Brouwer S, Rivera-Hernandez T, Curren BF, Harbison-Price N, De Oliveira DM, Jespersen MG, et al. Pathogenesis, epidemiology and control of Group A Streptococcus infection. *Nature Reviews Microbiology*. 2023;21(7):431-47.
7. CDC. M Protein Gene (emm) Typing [cited 2024 May 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/emm-background.html>.
8. Velusamy S, Jordak K, Kupor M, Chochua S, McGee L, Beall B. Sequential quadriplex real-time PCR for identifying 20 common emm types of group A Streptococcus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020;59(1):10.1128/jcm.01764-20.
9. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019: US Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
10. Organization WH. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: Report by the Director-General. *World Heal Organ*. 2018:A71.
11. Avire NJ, Whiley H, Ross K. A Review of Streptococcus pyogenes: Public Health Risk Factors, Prevention and Control. *Pathogens*. 2021;10(2).
12. Billroth T. Untersuchungen über die Vegetation formen von Coccobacteria septica 1874. *Georges Reimer, Berlin*.
13. Billroth T. Lectures on surgical pathology and therapeutics: a handbook for students and practitioners: *New Sydenham Society*; 1878.
14. Evans AC. Studies on hemolytic streptococci: II. Streptococcus pyogenes. *Journal of bacteriology*. 1936;31(6):611-24.
15. Becker WC. The necessity of a standard blood-agar plate for the determination of hemolysis by streptococci. *The Journal of Infectious Diseases*. 1916:754-9.
16. Brown JH. The use of blood agar for the study of streptococci: *Rockefeller Institute for medical research*; 1919.
17. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *The Journal of experimental medicine*. 1933;57(4):571-95.
18. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC. *Manual of Clinical Microbiology*: ASM Press; 2015.
19. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases E-Book: 2-Volume Set*: Elsevier health sciences; 2019.
20. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*: Jones & Bartlett Learning; 2020.
21. Pontigo F, Moraga Vergara M, Flores Carrasco S. Molecular phylogeny and a taxonomic proposal for the genus Streptococcus. 2015.

22. Sherman JM. The streptococci. *Bacteriological reviews*. 1937;1(1):3-97.
23. Fischetti VA. M Protein and Other Surface Proteins on *Streptococcus pyogenes*. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet] 2nd edition. 2022.
24. Wilde S, Johnson AF, LaRock CN. Playing with fire: proinflammatory virulence mechanisms of group A streptococcus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11:704099.
25. Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nature Reviews Microbiology*. 2003;1(3):219-30.
26. Tart AH, Walker MJ, Musser JM. New understanding of the group A *Streptococcus* pathogenesis cycle. *Trends in microbiology*. 2007;15(7):318-25.
27. Hamada S, Kawabata S, Nakagawa I. Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group A *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2015;91(10):539-59.
28. Yüksekaya Ş, Seyhan T, Findik D, Tuncer İ, Arslan U. Investigation of *Streptococcus pyogenes* virulence factors and typing by multiple locus variable number tandem repeat fingerprinting (MLVF) method. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2018;52(3):233-46.
29. Parks T, Smeesters PR, Curtis N, Steer AC. ASO titer or not? When to use streptococcal serology: a guide for clinicians. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015;34(5):845-9.
30. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(3):470-511.
31. Cunningham MW. Molecular Mimicry, Autoimmunity, and Infection: The Cross-Reactive Antigens of Group A Streptococci and their Sequelae. *Microbiol Spectr*. 2019;7(4).
32. Oehmcke S, Shannon O, Mörgelin M, Herwald H. Streptococcal M proteins and their role as virulence determinants. *Clinica chimica acta*. 2010;411(17-18):1172-80.
33. Dale JB, Beachey EH. Protective antigenic determinant of streptococcal M protein shared with sarcolemmal membrane protein of human heart. *The Journal of experimental medicine*. 1982;156(4):1165-76.
34. Rodriguez-Iturbe B, Haas M. Post-*Streptococcus pyogenes* Glomerulonephritis. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center.; 2022.
35. Wessels MR. *Streptococcus pyogenes* Pharyngitis and Scarlet Fever. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet] 2nd edition. 2022.
36. Shulman ST, Bisno AL, Clegg HW, Gerber MA, Kaplan EL, Lee G, et al. Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Group A Streptococcal Pharyngitis: 2012 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;55(10):e86-e102.
37. Dietrich ML, Steele RW. Group A streptococcus. *Pediatrics in review*. 2018;39(8):379-91.
38. Stevens DL, Bryant AE. *Streptococcus pyogenes* Impetigo, Erysipelas, and Cellulitis. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center  
© The University of Oklahoma Health Sciences Center.; 2022.
39. Pereira LB. Impetigo-review. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2014;89:293-9.
40. Orioux A, Prevel R, Dumery M, Lascarrou J-B, Zucman N, Reizine F, et al. Invasive group A streptococcal infections requiring admission to ICU: a nationwide, multicenter, retrospective study (ISTRE study). *Critical Care*. 2024;28(1):4.
41. Stevens DL, Bryant AE. Severe *Streptococcus pyogenes* infections. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet] 2nd edition. 2022.

42. Hakkarainen TW, Kopari NM, Pham TN, Evans HL. Necrotizing soft tissue infections: review and current concepts in treatment, systems of care, and outcomes. Current problems in surgery. 2014;51(8):344-62.
43. Carapetis JR, Beaton A, Cunningham MW, Guilherme L, Karthikeyan G, Mayosi BM, et al. Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:15084.
44. CDC. Clinical Guidance for Acute Rheumatic Fever [cited 2024 Aug 20]. Available from: <https://www.cdc.gov/group-a-strep/hcp/clinical-guidance/acute-rheumatic-fever.html>.
45. Gewitz MH, Baltimore RS, Tani LY, Sable CA, Shulman ST, Carapetis J, et al. Revision of the Jones Criteria for the diagnosis of acute rheumatic fever in the era of Doppler echocardiography: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 2015;131(20):1806-18.
46. Satoskar AA, Parikh SV, Nadasdy T. Epidemiology, pathogenesis, treatment and outcomes of infection-associated glomerulonephritis. Nat Rev Nephrol. 2020;16(1):32-50.
47. Spellerberg B, Brandt C. Laboratory diagnosis of Streptococcus pyogenes (group A streptococci). 2022.
48. Leber AL. Clinical microbiology procedures handbook: John Wiley & Sons; 2020.
49. Thompson TZ, McMullen AR. Group A streptococcus testing in pediatrics: the move to point-of-care molecular testing. Journal of clinical microbiology. 2020;58(6):10.1128/jcm.01494-19.
50. Abraham T, Sistla S. Identification of Streptococcus pyogenes—Phenotypic Tests vs Molecular Assay (spy1258PCR): A Comparative Study. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR. 2016;10(7):DC01.
51. Fan WT, Qin TT, Bi RR, Kang HQ, Ma P, Gu B. Performance of the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for rapid identification of streptococci: a review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36(6):1005-12.
52. Coutinho G, Duerden M, Sessa A, Caretta-Barradas S, Altiner A. Worldwide comparison of treatment guidelines for sore throat. International Journal of Clinical Practice. 2021;75(5):e13879.
53. Ramazan G, İzlem G, Yunus N, Fazlı Y, Emin Ü. The effectiveness of rapid Strep A Test in the diagnosis of Streptococcal tonsillopharyngitis. Journal of Child. 2011;11(4):157-9.
54. Cohen JF, Pauchard J-Y, Hjelm N, Cohen R, Chalumeau M. Efficacy and safety of rapid tests to guide antibiotic prescriptions for sore throat. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2020(6).
55. Wilde S, Johnson A, LaRock C. Playing with fire: proinflammatory virulence mechanisms of group A Streptococcus. Front Cell Infect Microbiol 11: 704099. 2021.
56. Vannice KS, Ricaldi J, Nanduri S, Fang FC, Lynch JB, Bryson-Cahn C, et al. Streptococcus pyogenes pbp2x Mutation Confers Reduced Susceptibility to  $\beta$ -Lactam Antibiotics. Clinical Infectious Diseases. 2019;71(1):201-4.
57. Pellegrino R, Timitilli E, Verga MC, Guarino A, Iacono ID, Scotese I, et al. Acute pharyngitis in children and adults: descriptive comparison of current recommendations from national and international guidelines and future perspectives. Eur J Pediatr. 2023;182(12):5259-73.
58. Harbison-Price N, Rivera-Hernandez T, Osowicki J, Davies MR, Steer AC, Walker MJ, et al. Current Approaches to Vaccine Development of Streptococcus pyogenes. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center

© The University of Oklahoma Health Sciences Center.; 2022.

59. Meakins J. Phagocytic immunity in Streptococcus infections. *The Journal of Experimental Medicine*. 1909;11(6):815.
60. Fan J, Toth I, Stephenson RJ. Recent Scientific Advancements towards a Vaccine against Group A Streptococcus. *Vaccines*. 2024;12(3):272.
61. EUCAST. Clinical breakpoints - breakpoints and guidance [cited 2024 Apr 10]. Available from: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_14.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_14.0_Breakpoint_Tables.pdf).
62. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(11):685-94.
63. Craik N, Hla T, Cannon J, Moore H, Carapetis JR, Sanyahumbi A. Global disease burden of Streptococcus pyogenes. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations [Internet]* 2nd edition. 2022.
64. Alcolea-Medina A, Snell LB, Alder C, Charalampous T, Williams TGS, Tan MKI, et al. The ongoing Streptococcus pyogenes (Group A Streptococcus) outbreak in London, United Kingdom, in December 2022: a molecular epidemiology study. *Clin Microbiol Infect*. 2023;29(7):887-90.
65. Villalón P, Sáez-Nieto JA, Rubio-López V, Medina-Pascual MJ, Garrido N, Carrasco G, et al. Invasive Streptococcus pyogenes disease in Spain: a microbiological and epidemiological study covering the period 2007-2019. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40(11):2295-303.
66. Arabacı Ç, Ak K. Beta hemolytic Streptococci strains isolated from clinical specimens, their characteristics and antibiotic susceptibility. *Journal of Surgery and Medicine*. 2020;4(1):38-42.
67. Cannon JW, Zhung J, Bennett J, Moreland NJ, Baker MG, Geelhoed E, et al. The economic and health burdens of diseases caused by group A Streptococcus in New Zealand. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021;103:176-81.
68. Bahnan W, Hashwa F, Araj G, Tokajian S. emm typing, antibiotic resistance and PFGE analysis of Streptococcus pyogenes in Lebanon. *J Med Microbiol*. 2011;60(Pt 1):98-101.
69. Konrad P, Hufnagel M, Berner R, Toepfner N. Long-term, single-center surveillance of non-invasive group A streptococcal (GAS) infections, emm types and emm clusters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(2):273-80.
70. Dundar D, Sayan M, Tamer GS. Macrolide and tetracycline resistance and emm type distribution of Streptococcus pyogenes isolates recovered from Turkish patients. *Microbial Drug Resistance*. 2010;16(4):279-84.
71. Su M-W, Cheng YL, Lin YS, Wu JJ. Interplay between group A Streptococcus and host innate immune responses. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2024;88(1):e0005222.
72. Şahin A, Yüksel NC, Karadağ Öncel E, Kara Aksay A, Yılmaz N, Yılmaz Çiftdoğan D. Clinical and Laboratory Features of Invasive Group A Streptococcal Infections: 8 Years Experience. *Turk Arch Pediatr*. 2022;57(1):75-80.
73. Villalón P, Bárcena M, Medina-Pascual MJ, Garrido N, Pino-Rosa S, Carrasco G, et al. National Surveillance of Tetracycline, Erythromycin, and Clindamycin Resistance in Invasive Streptococcus pyogenes: A Retrospective Study of the Situation in Spain, 2007–2020. *Antibiotics*. 2023;12(1):99.
74. Naseer U, Steinbakk M, Blystad H, Caugant DA. Epidemiology of invasive group A streptococcal infections in Norway 2010-2014: A retrospective cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(10):1639-48.
75. Meletis G, Soulopoulos Ketikidis AL, Floropoulou N, Tychala A, Kagkalou G, Vasilaki O, et al. Antimicrobial resistance rates of Streptococcus pyogenes in a Greek tertiary care hospital: 6-year data and literature review. *New Microbiol*. 2023;46(1):37-42.

76. Hua CZ, Yu H, Xu HM, Yang LH, Lin AW, Lyu Q, et al. A multi-center clinical investigation on invasive *Streptococcus pyogenes* infection in China, 2010-2017. *BMC Pediatr.* 2019;19(1):181.
77. Gür D, Mülazimoğlu L, Unal S. In vitro susceptibility of respiratory isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* to telithromycin and 11 other antimicrobial agents: Turkish results of e-BASKETT-II surveillance study. *Mikrobiyoloji Bulteni.* 2007;41(1):1-9.
78. Sanson MA, Macias OR, Shah BJ, Hanson B, Vega LA, Alamarat Z, et al. Unexpected relationships between frequency of antimicrobial resistance, disease phenotype and emm type in group A *Streptococcus*. *Microbial genomics.* 2019;5(11):e000316.
79. Nielsen HUK, Hammerum AM, Ekelund K, Bang D, Pallesen LV, Frimodt-Møller N. Tetracycline and macrolide co-resistance in *Streptococcus pyogenes*: co-selection as a reason for increase in macrolide-resistant *S. pyogenes*? *Microbial Drug Resistance.* 2004;10(3):231-8.
80. Powell LM, Choi SJ, Chipman CE, Grund ME, LaSala PR, Lukomski S. Emergence of Erythromycin-Resistant Invasive Group A *Streptococcus*, West Virginia, USA, 2020-2021. *Emerg Infect Dis.* 2023;29(5):898-908.
81. Prevention CfDca. Antibiotic resistance threats in the United States. 2019.
82. Berbel D, González-Díaz A, López de Egea G, Càmara J, Ardanuy C. An Overview of Macrolide Resistance in *Streptococci*: Prevalence, Mobile Elements and Dynamics. *Microorganisms.* 2022;10(12).
83. Ikebe T, Tominaga K, Shima T, Okuno R, Kubota H, Ogata K, et al. Increased prevalence of group A streptococcus isolates in streptococcal toxic shock syndrome cases in Japan from 2010 to 2012. *Epidemiol Infect.* 2015;143(4):864-72.
84. Ikebe T, Okuno R, Kanda Y, Sasaki M, Yamaguchi T, Otsuka H, et al. Molecular characterization and antimicrobial resistance of group A streptococcus isolates in streptococcal toxic shock syndrome cases in Japan from 2013 to 2018. *Int J Med Microbiol.* 2021;311(3):151496.
85. Espadas Maciá D, Flor Macián EM, Borrás R, Poujois Gisbert S, Muñoz Bonet JI. [*Streptococcus pyogenes* infection in paediatrics: from pharyngotonsillitis to invasive infections]. *An Pediatr (Engl Ed).* 2018;88(2):75-81.
86. Silva-Costa C, Friães A, Ramirez M, Melo-Cristino J. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*: prevalence and treatment strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(5):615-28.
87. Meehan M, Murchan S, Gavin PJ, Drew RJ, Cunney R. Epidemiology of an upsurge of invasive group A streptococcal infections in Ireland, 2012-2015. *J Infect.* 2018;77(3):183-90.
88. Arslan U, Oryaşın E, Eskin Z, Türk Dağı H, Fındık D, Tuncer I, et al. [Distribution of emm genotypes and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pyogenes* strains: analogy with the vaccine in development]. *Mikrobiyoloji bulteni.* 2013;47(2):318-23.
89. Eryılmaz M, Akın A. RESISTANCE TO ERYTHROMYCIN IN GROUP A BETA HEMOLYTIC STREPTOCOCCI ISOLATED FROM THROAT CULTURES. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University.* 2006;35(1):13-8.
90. Balcı P. Erythromycin resistance in Group A Beta-hemolytic streptococci. *Anatolian Current Medical Journal.* 2022;4(4):421-5.
91. Kara A, Parlakay AO, Gur D, Cengiz AB, Tezer H, Ciftci E, et al. Evaluation of group a beta hemolytic streptococci macrolide resistance in Turkey: pilot study results/Grup a beta hemolitik streptokok Türkiye makrolid direnc degerlendirmesi pilot calisma sonuclari. *Journal of Pediatric Infection.* 2011;5(3):96-100.
92. Lewis JS, 2nd, Lepak AJ, Thompson GR, 3rd, Craig WA, Andes DR, Sabol-Dzintars KE, et al. Failure of clindamycin to eradicate infection with beta-hemolytic streptococci inducibly



resistant to clindamycin in an animal model and in human infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1327-31.

93. CDC. ABCs Bact Facts Interactive Data Dashboard [Available from: <https://www.cdc.gov/abcs/bact-facts/data-dashboard.html>].

94. Klimik. A Grubu Beta Hemolitik Streptokok İnfeksiyonları Hakkında Kısa Bilgi Notu [cited 2024 Aug 27]. Available from: <https://www.klimik.org.tr/2023/01/30/a-grubu-beta-hemolitik-streptokok-infeksiyonlari-hakkinda-kisa-bilgi-notu/>.

95. Valcarcel Salamanca B, Cyr PR, Bentdal YE, Watle SV, Wester AL, Strand Å MW, et al. Increase in invasive group A streptococcal infections (iGAS) in children and older adults, Norway, 2022 to 2024. *Euro Surveill.* 2024;29(20).

96. Group A streptococcal infections: first update on seasonal activity in England, 2023 to 2024 [cited 2024 Aug 27]. Available from: <https://www.gov.uk/government/publications/group-a-streptococcal-infections-report-on-seasonal-activity-in-england-2023-to-2024>.

97. Li H, Zhou L, Zhao Y, Ma L, Liu X, Hu J. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of group A streptococcus recovered from patients in Beijing, China. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):507.

98. Erten AZU, Saygın B, Korukluoğlu G, Çöplü N, Dinç B. Grup A Streptokok İzolatlarında Emm Serotipinin Klinik Sunuma Etkisi: qPCR ile Yapılan Bir Serotiplendirme Çalışması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi.* 2024:190.

99. d'Humières C, Bidet P, Levy C, Béchet S, Bonacorsi S, Bingen E, et al. Comparative epidemiology of *Streptococcus pyogenes* emm-types causing invasive and noninvasive infections in French children by use of high-resolution melting-polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(6):557-61.

100. You Y, Wang H, Bi Z, Walker M, Peng X, Hu B, et al. Molecular typing of Chinese *Streptococcus pyogenes* isolates. *Mol Cell Probes.* 2015;29(3):172-6.

101. Tadros M, Cabrera A, Matukas LM, Muller M. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and ClinPro Tools as a Rapid Tool for Typing *Streptococcus pyogenes*. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(11):ofz441.

102. Smeesters PR, de Crombrugghe G, Tsoi SK, Leclercq C, Baker C, Osowicki J, et al. Global *Streptococcus pyogenes* strain diversity, disease associations, and implications for vaccine development: a systematic review. *Lancet Microbe.* 2024;5(2):e181-e93.

103. Topkaya AE, Balıkçı A, Aydın F, Haşçelik G, Kayman T, Kesli R, et al. Türkiye’de invazif streptokok enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, klinik ve mikrobiyolojik özellikleri, 2010-2011. 2014.

104. Otlu B, Karakurt C, Bayındır Y, Kayabaş Ü, Yakupoğulları Y, Gözükara Bağ H. İlkokul çocuklarında *Streptococcus pyogenes* taşıyıcılığı: M-protein tipleri, pirojenik toksin genleri ve izolatlar arası klonal ilişkinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(3):301-13.

105. Minko AG, Danilova TA, Danilina GA, Adzhieva AA, Tikhomirov EE, Zhukhovitsky VG. Molecular Genetic Characterization of *Streptococcus pyogenes* Strains Isolated from Patients with Various Manifestations of Streptococcal Infection. *Bull Exp Biol Med.* 2023;175(5):662-6.

106. Koutouzi F, Tsakris A, Chatzichristou P, Koutouzis E, Daikos GL, Kirikou E, et al. *Streptococcus pyogenes* emm Types and Clusters during a 7-Year Period (2007 to 2013) in Pharyngeal and Nonpharyngeal Pediatric Isolates. *J Clin Microbiol.* 2015;53(7):2015-21.

107. Khan RMA, Anwar S, Pirzada ZA. *Streptococcus pyogenes* strains associated with invasive and non-invasive infections present possible links with emm types and superantigens. *Iran J Basic Med Sci.* 2020;23(1):133-9.

108. Mathur P, Bhardwaj N, Mathur K, Behera B, Gupta G, Kapil A, et al. Clinical and molecular epidemiology of beta-hemolytic streptococcal infections in India. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(3):297-303.
109. Eisner A, Leitner E, Feierl G, Kessler HH, Marth E. Prevalence of emm types and antibiotic resistance of group A streptococci in Austria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;55(4):347-50.
110. Paveenkittiporn W, Nozawa T, Dejsirilert S, Nakagawa I, Hamada S. Prevalent emm types and superantigen gene patterns of group A Streptococcus in Thailand. *Epidemiol Infect.* 2016;144(4):864-9.
111. Choi JH, Yang NR, Lee WJ, Lee H, Choi EH, Lee HJ. Distribution of emm types among group A Streptococcus isolates from children in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;82(1):26-31.
112. Akça G. Boğaz enfeksiyonu nedeni olan A grubu beta hemolitik streptokokların M protein tiplerinin 'emm' gen sekans analizi ile belirlenmesi. *Tıpta Uzmanlık Tezi.* 2006.
113. Çakmak A. İstanbul'da 2007-2009 döneminde çocuk hastaların boğaz kültürlerinden izole edilen A grubu beta hemolitik streptokokların M proteini (emm) geni tiplendirilmesi. *Uzmanlık Tezi.* 2009.
114. Mengeloğlu F. Hasta ve taşıyıcılardan izole edilen grup A streptokoklarda emm geni tiplerinin, toksin gen profilinin ve klonal ilişkinin araştırılması. *Tıpta Uzmanlık Tezi.* 2010(259):34.
115. Arslan U, ORYAŞIN E, Eskin Z, DAĞI HT, FINDIK D, Tuncer İ, et al. Streptococcus pyogenes suşlarının emm genotiplerinin dağılımı ve antibiyotik duyarlılığı: Geliştirilmekte olan aşı ile karşılaştırma. *Mikrobiyol Bul.* 2013;47(2):318-23.
116. Kızılyıldırım S. İnvaziv A grubu streptokok enfeksiyonlarından sorumlu suşlarda emm ve süperantijen genotiplerinin dağılımı klinik korelasyonu ve filogenetik ilişkilerinin tespiti. *Doktora Tezi.* 2017.
117. Altun M, Mericli Yapıcı B. Detection of Group A Beta Hemolytic Streptococci Species, emm, and Exotoxin Genes Isolated from Patients with Tonsillopharyngitis. *Curr Microbiol.* 2020;77(9):2064-70.
118. Fay K, Onukwube J, Chochua S, Schaffner W, Cieslak P, Lynfield R, et al. Patterns of Antibiotic Nonsusceptibility Among Invasive Group A Streptococcus Infections—United States, 2006–2017. *Clinical Infectious Diseases.* 2021;73(11):1957-64.
119. Rafei R, Al Iaali R, Osman M, Dabboussi F, Hamze M. A global snapshot on the prevalent macrolide-resistant emm types of Group A Streptococcus worldwide, their phenotypes and their resistance marker genotypes during the last two decades: A systematic review. *Infect Genet Evol.* 2022;99:105258.
120. Ferretti JJ. History of Streptococcus pyogenes research. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations [Internet]* 2nd edition. 2022.
121. Lynskey NN, Jauneikaite E, Li HK, Zhi X, Turner CE, Mosavie M, et al. Emergence of dominant toxigenic M1T1 Streptococcus pyogenes clone during increased scarlet fever activity in England: a population-based molecular epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases.* 2019;19(11):1209-18.
122. Maamary PG, Ben Zakour NL, Cole JN, Hollands A, Aziz RK, Barnett TC, et al. Tracing the evolutionary history of the pandemic group A streptococcal M1T1 clone. *Faseb j.* 2012;26(11):4675-84.
123. Wolters M, Berinson B, Degel-Brossmann N, Hoffmann A, Bluszis R, Aepfelbacher M, et al. Population of invasive group A streptococci isolates from a German tertiary care center is dominated by the hypertoxigenic virulent M1(UK) genotype. *Infection.* 2024;52(2):667-71.

124. Oxford Nanopore Technologies [cited 2024 22 Augustos]. Available from: [community.nanoporetech.com/docs/prepare/library\\_prep\\_protocols/input-dna-rna-qc/v/idi\\_s1006\\_v1\\_revb\\_18apr2016/assessing-input-dna](https://community.nanoporetech.com/docs/prepare/library_prep_protocols/input-dna-rna-qc/v/idi_s1006_v1_revb_18apr2016/assessing-input-dna).
125. Dale JB, Walker MJ. Update on group A streptococcal vaccine development. *Curr Opin Infect Dis.* 2020;33(3):244-50.
126. Pastural É, McNeil SA, MacKinnon-Cameron D, Ye L, Langley JM, Stewart R, et al. Safety and immunogenicity of a 30-valent M protein-based group a streptococcal vaccine in healthy adult volunteers: A randomized, controlled phase I study. *Vaccine.* 2020;38(6):1384-92.
127. Xiang C, Zhang J, Zhao F, You Y. Emm type distribution of group A Streptococcus in China during 1990 and 2020: a systematic review and implications for vaccine coverage. *Front Public Health.* 2023;11:1157289.
128. Hu Mary C, Walls Michael A, Stroop Steven D, Reddish Mark A, Beall B, Dale James B. Immunogenicity of a 26-Valent Group A Streptococcal Vaccine. *Infection and Immunity.* 2002;70(4):2171-7.
129. Harbison-Price N, Rivera-Hernandez T, Osowicki J, Davies MR, Steer AC, Walker MJ, et al. Current approaches to vaccine development of Streptococcus Pyogenes. 2022.

# EKLER

## EK-1



T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ  
Ankara Bilkent Şehir Hastanesi  
2 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : E.Kurul –E2-24-6459 No'lu çalışma

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği'nde yapılması planlanan; Prof. Dr. Bedia DİNÇ'in sorumlu araştırmacısı olduğu "Çeşitli Klinik Örneklerden Elde Edilen Streptococcus Pyogenes İzolatlarında Quadripleks Gerçek Zamanlı PCR Yöntemi İle Belirlenen Emm Serotip Dağılımının Hastaların Klinik Durumu İle İlişkilendirilmesi" konulu çalışma incelenmiş olup, Etik açıdan oy birliği ile uygun görülmüştür.

07/02/2024

Prof. Dr. Fuat Emre CANPOLAT  
2 Nolu Etik Kurul Başkanı

Etik Kurul Sekreterliği Üniversiteler Mah. Bilkent Cad. No:1 Çankaya/Ankara İrtibat; 2nolu Etik Kurul: B.Özkan  
K.Çetindağ  
G.Uzun

Tel: 0 (312) 552 66 00 Dahili:721197–721198

Evrak Tarih ve Sayısı: 28.03.2024-346865



T.C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
Gülhane Tıp Fakültesi Dekanlığı



Sayı : E-86241737-100--346865  
Konu : GTF Tez İnceleme ve Değerlendirme  
Akademik Kurulu Kararları

28.03.2024

## DAĞITIM YERLERİNE

Gülhane Tıp Fakültesi Tez İnceleme ve Değerlendirme Akademik Kurulu, 22.03.2024 tarihinde saat 14:00'da Gülhane Tıp Fakültesi Dekan Yardımcısı Prof.Dr.zhan ÖZDEMİR başkanlığında üyelerin uzaktan dijital ortamda online katılımı ile toplanmıştır.

Toplantıda, Dekanlığımızla afiliye olan SUAM'larda görevli 90 (doksan) uzmanlık öğrencisine ait tez incelenerek değerlendirilmiş olup; tezlerle ilgili olarak oybirliği ile alınan kararlar Ek'tedir. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Mehmet Ali GÜLÇELİK  
Dekan

Ek:Kurul Kararı

Dağıtım:

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığına  
Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanlığına  
Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahisi  
Anabilim Dalı Başkanlığına  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı  
Başkanlığına  
Üroloji Anabilim Dalı Başkanlığına  
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı  
Başkanlığına  
Hava ve Uzay Hekimliği Anabilim Dalı  
Başkanlığına  
Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı  
Başkanlığına  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı  
Başkanlığına  
Kardiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığına  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığına  
Deri ve Zührevi Hastalıkları Anabilim Dalı

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ DEĞERLENDİRME VE TEZ İNCELEME VE DEĞERLENDİRME KURULU  
28/03/2024, 09:04:30 - E-72320890-000-240497209



240497209  
ANKARA BİLİMLERİ DEĞERLENDİRME VE TEZ İNCELEME VE DEĞERLENDİRME KURULU

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Değerleme Kodu \*BSLL63KZMK\* Pin Kodu :82192

Belge Takip Adresi : <https://www.surkiye.gov.tr/sbu-cbys>

Adres:Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Yerleşkesi Emrah Mah. 0618

Bilgi için: Levent YILDIRIM

Etiler/Keçiören/ANKARA

nvanı: Uzman

Telefon:0 312 304 61 73 Faks:0 312 304 61 90

Web: <http://sbu.edu.tr>Kep Adresi: [sbu@sa01.kep.tr](mailto:sbu@sa01.kep.tr)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

1/2