

T.C  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNVAZİV A GRUBU STREPTOKOK  
ENFEKSİYONLARINDAN SORUMLU SUŞLARDA EMM  
VE SÜPERANTİJEN GENOTİPLERİNİN DAĞILIMI  
KLİNİK KORELASYONU VE FİLOGENETİK  
İLİŞKİLERİNİN TESPİTİ**

**Suna KIZILYILDIRIM**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

**ADANA-2017**

T.C  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNVAZİV A GRUBU STREPTOKOK  
ENFEKSİYONLARINDAN SORUMLU SUŞLARDA EMM  
VE SÜPERANTİJEN GENOTİPLERİNİN DAĞILIMI  
KLİNİK KORELASYONU VE FİLOGENETİK  
İLİŞKİLERİNİN TESPİTİ**

**Suna KIZILYILDIRIM**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

**Bu çalışma TDK-2014-3348 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma  
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

**ADANA-2017**

## KABUL ONAY

**Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan  
“İnvaziv A Grubu Streptokok Enfeksiyonlarından Sorumlu Suşlarda Emm Ve Süper  
Antijen Genotiplerinin Dağılımı Klinik Korelasyonu Ve Filogenetik İlişkilerinin Tespiti”  
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

**Tarihi: 11 / 10 / 2017**

### TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr. Fatih Köksal  
Çukurova Üniversitesi  
**Başkan**



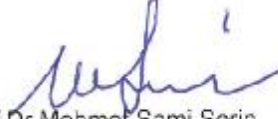
Prof. Dr. Fügen Yarkin  
Çukurova Üniversitesi  
**Üye**



Prof. Dr. Gönül Aslan  
Mersin Üniversitesi  
**Üye**



Prof. Dr. Nizami Duran  
Mustafa Kemal Üniversitesi  
**Üye**



Prof. Dr. Mehmet Sami Serin  
Mersin Üniversitesi  
**Üye**

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve  
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tezimin belirlenmesinde, yürütülmesinde yardımcı olan, yol gösteren, desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatih Köksal’a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Eğitimimde büyük katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Fügen Yarkın, Prof. Dr. Akgün Yaman ve Prof. Dr. Macit İlkit’e teşekkür ederim.

Bilimi ve bilimsel araştırmaları destekleyen, “2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs” katkısından dolayı TÜBİTAK’a teşekkür ederim.

Her anımda yanımda olan, beni yalnız bırakmayan çok kıymetli dostlarıma, birlikte çalıştığım sevgili arkadaşlarıma ve Mikrobiyoloji ailesine teşekkür ederim.

Her zaman yanımda ve destek olan çok değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

|                                                            |      |
|------------------------------------------------------------|------|
| KABUL ONAY .....                                           | ii   |
| TEŞEKKÜR .....                                             | iii  |
| İÇİNDEKİLER .....                                          | iv   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                      | vi   |
| TABLolar DİZİNİ .....                                      | vii  |
| KISALTMALAR DİZİNİ .....                                   | viii |
| ÖZET .....                                                 | x    |
| ABSTRACT .....                                             | xi   |
| 1. GİRİŞ .....                                             | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                    | 3    |
| 2.1. Grup A Streptokoklar (GAS) .....                      | 3    |
| 2.2. Grup A Streptokokların Virulans Faktörleri .....      | 7    |
| 2.2.1. GAS’da Yüzey ile ilişkili Virulans Faktörleri ..... | 7    |
| 2.2.1.1. Kapsül/Hiyalüronik Asid .....                     | 7    |
| 2.2.1.2. Lipoteikoik asit (LTA) .....                      | 8    |
| 2.2.1.3. Fibronektin bağlayıcı proteinler .....            | 8    |
| 2.2.1.4. Kollajen benzeri protein .....                    | 9    |
| 2.2.1.5. T proteini .....                                  | 9    |
| 2.2.1.6. R proteini .....                                  | 9    |
| 2.2.1.7. Serum opasite faktörü (SOF) .....                 | 10   |
| 2.2.1.8. M proteini .....                                  | 10   |
| 2.2.1.9. M benzeri proteinler .....                        | 15   |
| 2.2.1.10. C5a peptidaz .....                               | 17   |
| 2.2.1.11. Streptokokkal kompleman inhibitörü (SIC) .....   | 17   |
| 2.2.2. GAS Salgılanan virülans faktörleri .....            | 17   |
| 2.2.2.1. Sistein Proteaz (SpeB) .....                      | 17   |
| 2.2.2.2. Streptokinaz (Ska) .....                          | 18   |
| 2.2.2.3. Streptolizin S (SLS), Streptolizin O .....        | 18   |
| 2.2.2.4. SpyCEP .....                                      | 19   |
| 2.2.2.5. Streptodornaz/Dnaze .....                         | 19   |
| 2.2.2.6. IdeS/MAC .....                                    | 20   |

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.2.7. Süperantijenler .....                                       | 20        |
| 2.3. Tanı .....                                                      | 24        |
| 2.4. Tedavi.....                                                     | 25        |
| 2.5. Antimikrobiyal direnç .....                                     | 26        |
| 2.6. GAS aşıları .....                                               | 28        |
| <b>3. MATERYAL ve METOD .....</b>                                    | <b>31</b> |
| 3.1. Test suşlarının pasajlanarak üretilmesi ve saklanması.....      | 31        |
| 3.2. Suşların fenotipik özelliklerine göre tanımlanması .....        | 31        |
| 3.3. Dizi analizi yöntemi ile emm tiplendirilmesi.....               | 32        |
| 3.3.1. Genomik DNA' nın ekstraksiyonu: .....                         | 32        |
| 3.3.2. emm-PCR.....                                                  | 32        |
| 3.3.3. Amplifikasyon ürünlerinin saflaştırılması .....               | 33        |
| 3.3.4. Dizi Analizi .....                                            | 33        |
| 3.3.4.1. Sekans reaksiyonu.....                                      | 33        |
| 3.3.4.2. Sekans reaksiyonu ürünlerinin presipitasyonu.....           | 33        |
| 3.3.4.3. Dizi analizi .....                                          | 34        |
| 3.3.4.4. emm tiplerinin analizi .....                                | 34        |
| 3.4. SAg's gen profilinin belirlenmesi: .....                        | 35        |
| 3.5. PFGE yöntemi ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti ..... | 36        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                              | <b>38</b> |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                              | <b>54</b> |
| <b>6. SONUÇ .....</b>                                                | <b>63</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                               | <b>64</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                | <b>77</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <b><u>Şekil No:</u></b>                                                                                      | <b><u>Sayfa No:</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>Şekil 1.</b> GAS virülans faktörleri <sup>19</sup> .....                                                  | 4                       |
| <b>Şekil 2.</b> Bazı M tiplerinin yapısı <sup>62</sup> .....                                                 | 11                      |
| <b>Şekil 3.</b> M proteinleri ve konak canlıda bağlanmama ligandları <sup>62</sup> .....                     | 13                      |
| <b>Şekil 4.</b> Mga bölgesinin varyantları ve kolonizasyon bölgeleri ile olan ilişkileri <sup>85</sup> ..... | 16                      |
| <b>Şekil 5.</b> Antijen sunumu <sup>122</sup> .....                                                          | 22                      |
| <b>Şekil 6.</b> emm- PCR jel görüntüsü .....                                                                 | 38                      |
| <b>Şekil 7.</b> CDC databazı ile tanımlanan bazı emm tipleri .....                                           | 41                      |
| <b>Şekil 8.</b> Multiplex-PCR ile tanımlanan bazı virülans faktörlerinin görüntüsü .....                     | 44                      |
| <b>Şekil 9.</b> PFGE sonucu elde edilen GAS izolatlarının filogenetik ilişkileri ve jel görüntüsü. ....      | 53                      |

## TABLÖLAR DİZİNİ

| <b><u>Tablo No</u></b>                                                                                                                                  | <b><u>Sayfa No:</u></b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>Tablo 1.</b> Grup A Streptokok enfeksiyonlarının klinik semptomları ve epidemiyolojisi <sup>35</sup> . ....                                          | 6                       |
| <b>Tablo 2.</b> emm tipleri ile klinik bulgular ile korelasyonu <sup>80</sup> . ....                                                                    | 15                      |
| <b>Tablo 3.</b> <i>S. pyogenes</i> SAg's' lerin fonksiyonel özellikleri <sup>125</sup> . ....                                                           | 23                      |
| <b>Tablo 4.</b> Sags ve diğer virülans faktörlerinin amplifikasyonda kullanılan primer çiftleri: ....                                                   | 35                      |
| <b>Tablo 5.</b> Multiplex PCR reaksiyonun hazırlanması ....                                                                                             | 36                      |
| <b>Tablo 6.</b> Multiplex PCR amplifikasyon aşaması ....                                                                                                | 36                      |
| <b>Tablo 7.</b> GAS'ların izole edildikleri klinik materyal ve emm tiplerine dağılımı. ....                                                             | 42                      |
| <b>Tablo 8.</b> GAS izolatlarında virülans ile ilişkili aranan genlerin görülme sıklığı. ....                                                           | 43                      |
| <b>Tablo 9.</b> Test suşlarının; izole edildikleri klinik materyal, M genotipi ve virülans faktörleri dağılımı. ....                                    | 45                      |
| <b>Tablo 10.</b> Test suşlarının; izole edildikleri klinik materyal, M genotipi ve virülans faktörleri dağılımı. ....                                   | 46                      |
| <b>Tablo 11.</b> Test suşlarının; izole edildikleri klinik materyal, M genotipi ve virülans faktörleri dağılımı. ....                                   | 47                      |
| <b>Tablo 12.</b> En sık tanımlanan M tiplerinde görülen virülans faktörleri. ....                                                                       | 48                      |
| <b>Tablo 13.</b> Aynı hastadan farklı zamanlar ve/veya lokasyondan izole edilen GAS'ların M tipi ve virülans faktörleri dağılımı. ....                  | 49                      |
| <b>Tablo 14.</b> M tipinden bağımsız olarak Sags'lerin benzerliği dikkate alınarak virülans faktörleri benzerliğine göre izolatların küme analizi. .... | 50                      |
| <b>Tablo 15.</b> M tipinden bağımsız olarak Sags'lerin benzerliği dikkate alınarak virülans faktörleri benzerliğine göre izolatların küme analizi. .... | 51                      |
| <b>Tablo 16.</b> M tipinden bağımsız olarak Sags'lerin benzerliği dikkate alınarak virülans faktörleri benzerliğine göre izolatların küme analizi. .... | 52                      |

## KISALTMALAR DİZİNİ

|                                                           |                 |
|-----------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Akut glomerulonefrit</b>                               | : AG            |
| <b>Akut romatizmal ateş</b>                               | : ARA           |
| <b>Alt solunum yolu enfeksiyonları</b>                    | : ASYE          |
| <b>Amerika Birleşik Devletleri</b>                        | : ABD           |
| <b>Aminoasit</b>                                          | : aa            |
| <b>Another M-like protein</b>                             | : Enn           |
| <b>Antijen sunan hücreler</b>                             | : ASH           |
| <b>Antistreptolizin-O</b>                                 | : ASO           |
| <b>C4-binding protein</b>                                 | : C4BP          |
| <b>Centers for Disease Control and Prevention</b>         | : CDC           |
| <b>Deoksi ribonucleic acid</b>                            | : DNA           |
| <b>Faktör like H -1</b>                                   | : FHL-1         |
| <b>Fc reseptörü</b>                                       | : fcR           |
| <b>Fluorescent amplified fragment length polymorphism</b> | : FAFLP         |
| <b>Fibronektin bağlayıcı proteinler A</b>                 | : FbaA          |
| <b>Fibronektin bağlayıcı proteinler B</b>                 | : FbaB          |
| <b>Grup A streptokoklar</b>                               | : GAS           |
| <b>İmmünoglobülin degradasyon enzimi</b>                  | : İdeS          |
| <b>İndüklenebilir Makrolid-linkozamid-streptogramin B</b> | : iMLSB         |
| <b>İnterferon-<math>\gamma</math></b>                     | : IFN- $\gamma$ |
| <b>Kinolon direncini belirleyen bölgedeki</b>             | : QRDR          |
| <b>Kompleman reseptörleri1</b>                            | : CFHR1         |
| <b>Lipoteikoik asit</b>                                   | : LTA           |
| <b>Majör histokompatibil kompleks</b>                     | : MHC           |
| <b>Makrolid-linkozamid-streptogramin B</b>                | : MLSB          |
| <b>Messenger ribonükleik asid</b>                         | : mRNA          |
| <b>M-related protein</b>                                  | : Mrp           |
| <b>Mobil genetik elementlerde</b>                         | : MGEs          |
| <b>Multilocus enzyme electrophoresis</b>                  | : MLEE          |
| <b>Multilocus sequence typing</b>                         | : MLST          |

|                                                          |                 |
|----------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Nekrotizan fasiit</b>                                 | : NF            |
| <b>Pirolidonil arilamidaz testi</b>                      | : PYR           |
| <b>Polymerase Chain Reaction</b>                         | : PCR           |
| <b>Polimeraz zincir reaksiyonu</b>                       | : PZR           |
| <b>Protein F1</b>                                        | : PrtF1         |
| <b>Protein F2</b>                                        | : PrtF2         |
| <b>Ribozomal ribonükleik asid</b>                        | : rRNA          |
| <b>Romatizmal kalp hastalığının</b>                      | : RKH           |
| <b>Serum opasite faktörü</b>                             | : SOF           |
| <b>Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis</b> | : SDSE          |
| <b>Streptococcus pyogenes hücre zarf proteazı</b>        | : SpyCEP        |
| <b>Streptokinaz</b>                                      | : Ska           |
| <b>Streptokokkal kolajen benzeri protein</b>             | : SclI          |
| <b>Streptokokkal koruyucu antijen</b>                    | : Spa           |
| <b>Streptokokkal pirojenik eritrojenik toksin B</b>      | : SpeB          |
| <b>Streptokokkal sistein proteinaz A</b>                 | : SCPA          |
| <b>Streptokokal toksik şok sendromu</b>                  | : STŞS          |
| <b>Streptolizin S</b>                                    | : SLS           |
| <b>Süperantijen</b>                                      | : SAgS          |
| <b>T hücre reseptörünün</b>                              | : TCR           |
| <b>Todd ünite</b>                                        | : TÜ            |
| <b>Transkripsiyonel düzenleyici olan Rgg</b>             | : RopB          |
| <b>Tümör nekroz faktörü-<math>\alpha</math></b>          | : TNF- $\alpha$ |
| <b>Üst solunum yolu enfeksiyonları</b>                   | : ÜS YE         |
| <b>Yapısal Makrolid-linkozamid-streptogramin B</b>       | : cMLSB         |

## ÖZET

**İnvaziv A grubu streptokok enfeksiyonlarından sorumlu suşlarda emm ve süperantijen genotiplerinin dağılımı, klinik korelasyonu ve filogenetik ilişkilerinin tespiti**

Grup A Streptokoklar (GAS), 5-15 yaş grubunda görülen tonsillofarenjitin major bakteriyel sorumlusudur. GAS'lar solunum yolları dışında deri ve yumuşak dokuda primer süpüratif enfeksiyonlar, romatizmal ateş, glomerülonefrit gibi geç komplikasyonların yanı sıra nadiren de nekrotizan fasiit, bakteriyemi, toksik streptokok şok sendromu (STSS), puerperal sepsis, pnömoni ve menenjit gibi yüksek mortalite ile seyreden hastalıklara yol açarlar.

GAS virulansında çok sayıdaki adeziv ve invaziv proteinin yanı sıra M proteini, adezyon ve invazyonu ile birlikte konak immun cevabından kaçış ve immunopatogenezin oluşumundan sorumludur. Bu güne kadar 250'den fazla M genotipi tespit edilmiştir. M protein genotiplerinin enfeksiyonun prognozu ile ilişkisi gösterilmiş ve M genotipinin prognoz için prediktif öneme sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca M proteinlerinin serotiplendirilmesi veya emm genotip tayini, GAS enfeksiyonlarının sürveyansında altın standart olarak kabul edilmektedir. Diğer taraftan GAS tarafından salgılanan süperantijenler (Sags) malign seyreden streptokok enfeksiyonlarının patogenezinde rolü kesin olarak ispatlanmıştır.

Bu çalışmada, tonsillofarenjit dışı klinik yakınması olan hastalardan tanı amacı ile alınan klinik örneklerden izole edilen GAS suşlarında emm genotipleri ve Sags genlerinin suşlar arasında dağılımı, klinik tablo ile bu genotipler arasındaki ilişki ve bu ilişkinin filogenetik özellikleri sorgulanmıştır. Test suşları Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı ve bölge hastanelerinden temin edilmiştir. Grup A streptokokların M proteinlerinin tiplendirilmesi emm geninin sekans analiz ile yapılmıştır. GAS izolatların Sags ve diğer virülans gen profilleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile belirlenmiştir. Suşlar arasındaki klonal ilişki Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) yöntemi ile tanımlanmıştır.

emm-PCR sonucunda 86 izolatta emm geni pozitif bulunmuştur. CDC databazı kullanılarak yapılan emm tiplendirmesinde 22 (%25.58) ayrı emm tipi tespit edilmiş ve emm tiplerinin prevalansını irdelediğimizde en yaygın görülen tiplerin sırası ile emm28 (%22.09), emm1 (%18.60), emm12 (%13.95), emm3 (%11.62) ve emm89 (%3.48) olduğu görülmüştür. Sags tipleri, Dnaz, proteaz gibi virülans genlerinin tespiti ve prevalansı irdelendiğinde; en prevalan tiplerin SpeG (%58.13), SpeC (%56.97), sdaB (%53.48), mac (%53.48) geninin olduğu tespit edilmiştir. PFGE analiz değerlendirmesinde izolatlar arasında anlamlı bir klonal ilişki bulunmadığı görülmüştür. Sonuç olarak ülkemizde GAS virülans faktörlerinin tespiti ve prevalansı için bölgesel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Sözcükler:** : emm, GAS, klonal ilişki, PFGE, STSS.

## **ABSTRACT**

**Distribution of emm and superantigen genotypes in responsible strains for invasive group A streptococcus infections, clinical correlation and determination of phylogenetic relationships**

Group A Streptococcus (GAS), are the major bacterial agents of tonsillopharyngitis observed between the 5-15 age group. GAS causes late complications such as respiratory system infections, primary suppurative infections of skin and soft tissue, rheumatic fever, glomerulonephritis , and also associated with the diseases in a few cases of necrotizing fasciitis, bacteremia, toxic streptococcus shock syndrome (STSS), puerperal sepsis, pneumonia and meningitis with high mortality.

M protein is responsible for adhesion and invasion to escape from host immune response and the formation of the immunopathogenesis as well as the numerous adhesive and invasive proteins in virulence of GAS. Until today over than 250 M genotypes were determined. The relationship between M protein genotypes and prognosis of infection was shown and the predictive importances of M genotype for prognosis were reported. It is considered that serotyping of M protein or determination of emm genotype is gold standard for surveillance of GAS infections. On the other hand, the role of superantigens (Sags) secreted by GAS in the pathogenesis of malignant characterized streptococcus infections has been proven.

In this study, distribution of emm genotypes, Sags genes, the relation between clinical table and these genotypes and the phylogenetic properties of this relation among the GAS strains isolated from the clinical samples taken from the patients with clinical symptoms excluding tonsillopharyngitis were investigated. Test strains were obtained from Central Laboratory of Çukurova University Balcalı Hospital and regional hospitals. M protein of Group A streptococcus was typed by sequence analysis of emm genes. Sags and other virulence gene profiles of GAS isolates were determined by polymerase chain reaction (PCR) method. Clonal relationships between strains were described by the Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) method.

As a result of emm-PCR was found positive emm genes in 86 isolates. emm typing using the CDC database have been identified 22 (%25.58) different emm types. When examined the prevalence of emm type, it was found that the most common type is emm28 (%22.09), emm1 (%18.60), emm12 (%13.95), emm3 (%11.62) and emm89 (%3.48), respectively. When the detection and prevalence of virulence genes such as SAg types, Dnase, protease were examined, the most prevalent types were SpeG (%58.13), SpeC (%56.97), sdaB (%53.48), mac (%53.48) genes. PFGE analysis showed no significant clonal relationship between isolates. In conclusion, regional studies are needed for the detection and prevalence of GAS virulence factors in our country.

**Keywords:** clonal relationships, emm, GAS, PFGE, STSS.

# 1. GİRİŞ

Lancefield serogruplamasında A grubunda yer alan *Streptococcus pyogenes* veya bir diğer tanımlama ile Grup A streptokoklar (GAS), üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları (ASYE-ÜSYE), kızıl, deri-yumuşak doku enfeksiyonları, nekrotizan fasiit ve streptokokal toksik şok sendromu (STŞS) gibi akut süpüratif enfeksiyonlar ile akut romatizmal ateş (ARA) ve akut glomerulonefrit (AG) gibi non süpüratif komplikasyonlara yol açarlar. GAS'ların lokal doku enfeksiyonlarının yanı sıra invaziv-sistemik enfeksiyonlarda yol açabilmesi, invazyon ve immun cevaptan kaçışta rol oynayan M proteini, pirojenik eksotoksinler, kapsül, streptolizin O ve S, F proteini, streptokinaz, Dnaze gibi çok sayıdaki virülans faktörlerine sahip olmasından kaynaklanmaktadır<sup>1</sup>.

Hücre duvarında yer alan ve **emm**'de kodlanan M proteini, antifagositer ve antikomplementer özelliği olan antijenik yapıda önemli bir virülans faktörüdür<sup>2</sup>. M proteinine immunolojik olarak özgüllük kazandıran **emm**'inin 5' parçası sekanslanarak bütün M serotipleri belirlenmiş ve immunsistemden kaçış yani re-enfeksiyon ve re-aktivasyonlardan sorumlu bu proteinin 250'den fazla sero/genotipe sahip olduğu gösterilmiştir<sup>3</sup>. Sekanslama bazlı epidemiyolojik çalışmalar ile de farklı **emm** tiplerinin, farklı klinik tablolarla ilişkili olabildiği göstermiştir<sup>4,5</sup>. Dünya genelinde **emm** genotiplendirme çalışmalarına ait elde edilen veriler Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ve/veya GeneBank veri tabanlarında toplanmakta, yeni tespit edilen subtiplerin doğrulanması çalışmaları CDC tarafından yürütülmektedir<sup>6</sup>. M serotiplerinin tespitinde, **emm**'indeki M protein serospesifitesini belirleyen yüksek değişken dizinin doğrudan sekanslanması, altın standart olarak kabul edilmektedir<sup>7,8,9</sup>.

GAS enfeksiyonlarında prognozu etkileyen bir diğer putativ virülans faktörü de süperantijenlerdir (SAGs). Pirojenik ve eritromatöz deri enfeksiyonları, STŞS, bakteriyemi, sepsis, peritonit gibi morbidite ve mortalitesi yüksek invazif tutulumların patogeneğinde önemli bir rol oynadıkları bildirilmiştir. Bugüne kadar; speA, speB, speC, speF, speG, speH, speI, speJ, speK, speL, speM, ssa, smeZ ve smeZ2 olarak adlandırılmış süperantijen genotipleri tespit edilmiş, klinik çalışmalarda bazı SAGs gen profilleri ile bazı invaziv enfeksiyonlar arasında epidemiyolojik bir ilişki olduğu tespit edilmiştir<sup>9,4</sup>.

Bütün dünyada **emm**, SAgS, proteaz inhibitörleri ve DNase'lar gibi diğer putativ virölans faktör genlerindeki polimorfizmi hedef alan, çalışmalar giderek artmaktadır. Ancak ülkemizde, sınırlı gen polimorfizminin araştırıldığı, az sayıda çalışma mevcuttur. Yapılacak moleküler bazlı epidemiyolojik çalışmalar ile invaziv enfeksiyonlardan izole edilen GAS'larda **emm** genotipleri, SAgS genotipleri, proteaz inhibitörleri ve DNase gibi virölans genlerinin tespiti; sık karşılaşılan komplike GAS enfeksiyonlarının patofizyolojisinin aydınlatılması ve bu suşların toplumdaki hareketlerinin izlenerek eradikasyonlarına yönelik sağlık politikalarının oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

Bu çalışma ile bölgemizdeki ÜSYE ve solunum yollu dışı enfeksiyonlardan izole edilen GAS suşlarının **emm** genotipleri ile diğer virölans faktörlerindeki gen polimorfizmin irdelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma ile elde edilecek veriler bir taraftan lokal epidemiyolojik bilgi birikimini oluşturacak ve ulusal gen çeşitliliği tespitine katkı sağlayacak diğer taraftanda GAS enfeksiyonlarında bazı tutulumlar ile genotipler arasındaki ilişkinin korelasyonuna ışık tutacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Grup A Streptokoklar (GAS)

GAS'ların tek üyesi olan *S. pyogenes*, insana spesifik en önemli patojenlerden birisidir. *S. pyogenes* diğer mikroorganizmalara kıyasla, lokal veya sistemik, süpüratif veya non-süpüratif karakterli, daha geniş spektrumda görülen klinik yakınmalardan sorumlu bir patojendir.

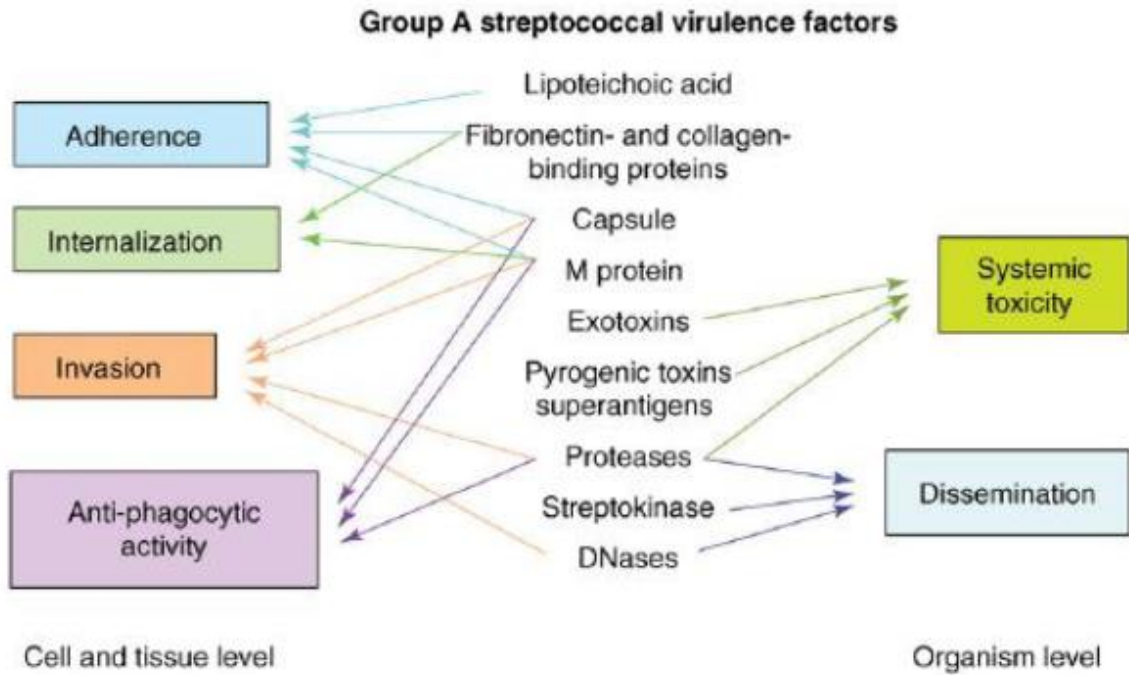
*S. pyogenes*'in önemini ilk kez Rosenbach (1884) ortaya koymuştur. R.Lancefield (1933) farklı bölge ve enfeksiyonlardan izole edilen streptokokları hücre duvarında yer alan karbonhidrat ve protein antijenlerindeki farklılıkları araştıran ve sonuçları günümüzde de önemini yitirmeden kullanılan, serolojik çalışmalar yapmış, bu mikroorganizmaları serotip ve serogruplara ayırmıştır. Hücre duvarında yer alan karbonhidrat yapısındaki antijenin serolojik özelliğine göre Grup A Streptokok olarak tanımlanan ve grupta yer alan *S. pyogenes* önemli bir insan patojenidir. R.Lancefield sınıflandırmasında, bu grubu farklı kılan hücre duvarlarında grup A ramnoz polimer omurgasına bağlı N-asetilglukozaminden oluşan karbonhidratın yapısı farkıdır<sup>10</sup>.

GAS'lar 0.5-1 µm boyutunda küresel şekle sahip olup ve çift veya düz zincirler halinde düzenlenmiştir. Fakültatif anaerob olan bu mikroorganizmaların, katalaz ve oksidazı negatiftir<sup>11</sup>. Optimum üreme ısısı 35-37°C, uygun üreme pH'sı ise 7,4 ile 7,6 arasındır. Adi, nutrisyonel besiyerlerinde üremezler veya geç ürerler. Üreme besiyerine kan veya serum gibi üretme faktörlerinin ilavesi ile sağlanır. Özellikle %5'lik kanlı agar plaklarında oluşturdukları koloniler, eritrositlerin tamamen ayrılmasına aracılık eden streptolizin-S ve O'nun üretilmesinden kaynaklanan geniş beta-hemoliz zonları oluşturmaları ile karakterizedir<sup>13,14</sup>.

GAS'ların hücre duvarı kompleks bir yapıya sahip olup üç bileşenden oluşmaktadır. Hücre duvarının en iç kısımda özellikle duvarın sertliğinden sorumlu peptidoglikan (mukopeptid) tabaka bulunmaktadır. Hücre duvarının polisakkarit veya gruba özgül karbonhidratlarının bulunduğu komponent, insan kalp kapaklarındaki glikoprotein ile benzer bir antijenik yapı gösterir. En dış kısmında ise M, T ve R proteinleri bulunur. Lipoteikoik asit ve M proteini hücre duvarına bağlı bulunmakta ve dışa doğru pili şeklinde uzanmaktadır. Suşların bazılarında hyalüronik asit yapısında kapsül bulunmaktadır<sup>15,16</sup>.

GAS’larda, enfekte dokuda adezyon, kolonizasyon ve invazyona yardımcı olan, konağın doğal bağışıklık cevabı ve fagositozundan da kaçmasına imkan sağlayan güçlü virülans faktörleri bulunur<sup>17,18</sup>.

Genel olarak, *S. pyogenes*’in yüzeyinde bulunan antijenik komponentler, kapsüler polisakkarit, hücre duvarında bulunan peptidoglikan, lipoteikoik asit ve M proteini, fimbria proteinleri, fibronektin bağlayıcı proteinler, streptokokal pirojenik ekzotoksinler ve streptokinaz bu virülans faktörleri arasında yer almaktadır<sup>13</sup>.



Şekil 1. GAS virülans faktörleri<sup>19</sup>

GAS’lar sahip oldukları bu virülans faktörleri ile yüksek morbidite ve mortaliteye sahip, ciddi ekonomik kayıplara yol açan klinik tablolara sebep olurlar<sup>2</sup>. Hijyen prosedürleri ve sağlık koruma yöntemlerinde kaydedilen ilerlemelere rağmen GAS’lar, farenjit, impetigo, kızıl-ateş, selülit, erizipel, nekrotizan fasiit, miyozit ve STŞS gibi invaziv enfeksiyonlarından dolayı dünyada her yıl yarım milyondan fazla kişinin ölümünden sorumlu olan potent bir bakteri olarak kalmaya devam etmektedir<sup>20,212</sup>.

Dünya Sağlık Örgütü tahminlerine göre gelişmekte olan ülkelerde yılda 111 milyon çocukta impetigo, 15.6 milyon kişide romatizmal kalp hastalığı, 470.000 kişide de Akut romatizmal ateş görülmektedir. CDC istatistiklerine göre, ABD’de her yıl

sepsis, pnömoni ve nekrotizan fasiit, selülit gibi yaklaşık 11.000 ila 13.000 sistemik/invaziv GAS enfeksiyonu görüldüğü ve her yıl yaklaşık 1.100 ila 1.600 hastanın bu invaziv GAS enfeksiyonları sebebi ile kaybedildiği bildirilmektedir. Bu raporlarda; yine her yıl birkaç milyon farenjit ve impetigo gibi non-invaziv GAS enfeksiyonu görüldüğü ancak streptokoksik glomerülonefrit ve ARA gibi non-süpürativ komplikasyonların nadir olduğu söylenmektedir<sup>22</sup>.

*S. pyogenes*, bakteriyel farenjitin, % 95-98 gibi yüksek bir oran ile, bilinen en önemli sebebidir. Farenjit sıklıkla kış ve ilkbahar sırasında görülür ve enfekte bir kişiyle respiratuvar damlacıklar yoluyla, kontamine nesneler veya gıda yoluyla doğrudan ya da dolaylı temas yoluyla bulaşabilir. Respiratuvar damlacıklarının temel bulaş yolu olmasının nedeni, bu mikroorganizmanın primer yerleşim yerinin boğaz bölgesi olmasıdır. GAS farenjitinin insidansı 5-15 yaşlarındaki çocuklarda en üst seviyededir. Çocuklarda farenjit olgularının %20 ila 40'i, erişkinlerde ise % 5 ila 15'inde teşhis konur<sup>23,24,25,26,27</sup>.

ARA ve romatizmal kalp hastalığının (RKH) dünya genelinde 20 milyondan fazla kişiyi etkilediği tahmin edilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde hayatın ilk 50 yılında kardiyovasküler ölümlere sebep olurlar ve 5-15 yaş aralığındaki çocuklarda yaygın olarak görülürler. RKH'nin habercisi olan ARA, duyarlı bir konakta GAS enfeksiyonu esnasında kalp kapakları, eklem yüzeyleri, beyin ve derin cilt dokularındaki kros reaktif antijenlere karşı ortaya çıkan otoimmün cevabın sonucudur<sup>22,29</sup>.

İmpetigo, cildin dış tabakalarında kolonize olan GAS'ların epidermise invazyonu sonucu görülen bir yüzeysel enfeksiyondur. Genellikle küçük çocukları etkiler. Her yıl 162 milyondan fazla çocuğun impetigodan etkilenebileceğini tahmin edilmektedir. Enfeksiyon bulaşıcı olup düşük gelirli ve gelişmekte olan ülkelerde insidans daha yüksektir<sup>30,31</sup>.

Nekrotizan fasiit(NF); deri, subkutan doku ve fasyaların, hızla yayılan geniş doku nekrozu ile karakterize, hayatı tehdit eden, ciddi bir enfeksiyondur. Günümüzde, NF vakalarında mortalite oranının yaklaşık olarak % 70-80 olduğu tahmin edilmektedir.

STŞS; şok ve organ yetmezliği ile ani ortaya çıkan, ölümcül, streptokoksik toksin şok sendromu toksininin yol açtığı bir sendromdur<sup>32</sup>. Hastalık bulguları halsizlik, titreme ve enfeksiyon bölgesinde lokalize aşırı ağrı ile kendini gösterir. Sıklıkla nekrotizan fasiit, miyonekroz ile komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından

sonra görülür. Bulantı, kusma, ishal, hipotansiyon, multiple organ yetmezliği tablosu çabuk gelişir. Mortalite oranı yüksek olabilir<sup>33,27,15</sup>. Tüm yaş grubundaki hastalarda gelişebilir. Hastaların çoğunda immün sistem yetmezliği bulunmaz fakat ileri yaş, alkolizm ve diyabet, malign hastalıklar gibi altta yatan predispozan faktörlerle ilişkisi gösterilmiştir. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar ile M1 ve M3 tiplerinin STŞS ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Streptokokal pirojenik ekzotoksinlerin ve proinflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımının, kompleman, koagülasyon ve fibrinolitik aktivasyonun, STŞS patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir<sup>34</sup>.

**Tablo 1.** Grup A Streptokok enfeksiyonlarının klinik semptomları ve epidemiyolojisi<sup>35</sup>.

|                                          |                                                                                |                             |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Farenjit                                 | Boğaz ağrısı, halsizlik, ateş                                                  | 600 milyon                  |
| Scarlet fever                            | Eritem, çilek dili, eksudatif farenjit                                         |                             |
| İmpetigo                                 | Bal rengi deri püstülleri                                                      | 111milyon                   |
| Akut romatizmal ateş                     | Poliartrit, kardit, hızlı ve sarsıntılı hareketler, döküntü, subkütan nodüller | > 471,000                   |
| Romatizmal kalp hastalığı                | Mitral ve / veya aort yetersizliği                                             | 15.6 -19.6 milyon           |
| Akut poststreptokokküler glomerülonefrit | Ödem, hipertansiyon, Anormal idrar sedimenti, kompleman eksikliği              | > 471,000                   |
| Bakteriyemi                              | Yüksek ateş, mide bulantısı, kusma                                             | 660.000 vaka , 160.000 ölüm |
| Selülit                                  | Eritemli ve şişmiş cilt bölgesi                                                |                             |
| Nekrotizan fasiit                        | Ateş, cilt lezyonları, Kusma, diyare, toksemi, doku hasarı                     |                             |
| STŞS                                     | Yüksek ateş, hızlı başlangıçlı hipotansiyon                                    |                             |

Geçmişte *S. pyogenes*'in sebep olduğu salgınların, özellikle az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde sık bildirilmiş olmasına karşılık son yıllarda bu ülkelerde sosyoekonomik şartlarda ve kişisel hijyen alanında sağlanan gelişmeler ile etkili

antibiyotik kullanımının sağlanması sonucu, bu patojenin sebep olduğu enfeksiyon sıklığını azaltmıştır.

Akut streptokok enfeksiyonlarının tedavisi ve komplikasyonlarının önlenmesinde  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler kullanılır<sup>36</sup>. Özellikle penisilin'e karşı direnç bildirilmemiştir. Alternatif antibiyotiklerden makrolidlere karşı direnç oranlarının dünyanın birçok yerinde artışı bildirilmiştir<sup>37,38</sup>. Antibiyotik kullanımının azaltılması, enfeksiyon ve sekellerin önlenmesi için *S. pyogenes*'in virülans faktörlerinin tanımlanması ve aşı gibi yeni terapötik yaklaşımların yaratılması gerekmektedir<sup>20</sup>.

## 2.2. Grup A Streptokokların Virülans Faktörleri

GAS virülans faktörleri, konakta kolonizasyon, çoğalma ve invazyona imkan veren konak immun sisteminden kaçış ve doku patolojisi yaratan bazıları hücre duvarında kolonize iken bir kısmı üretilerek ekstrasellüler ortama sekrete edilen protein, glikoprotein veya glikolipit yapısındaki elemanlardır. *S. pyogenes*'in enfeksiyon esnasında konakta birçok dokuya invaze olabilmesini sağlayan bu faktörler güçlü antijenik özelliğe de sahiptir. Ancak M proteinleri gibi faz varyasyonları da gösterebilen immun dominant antijenler, hem immun sistemi immunopatogenezi sağlayacak şekilde güçlü olarak uyarırlar hem de mikroorganizmanın immun sistemin mediatörlerine karşı korurlar. Bazıları eklem yüzeyleri ve kalp kapağı gibi doku antijenleri ile de kros reaktif olan bu yapılar otoimmun cevap ve cevaba bağlı gelişen patolojinin de sorumlusudur. Virülans faktörlerinin etki biçimi hakkındaki bilgilerimizin derinleştirilmesi, GAS enfeksiyonlarının anlaşılmasına ve önlenmesine yönelik çabalara yardımcı olacaktır. Aşağıdaki bölümlerde, *S. pyogenes*'in virülans faktörlerinin fonksiyonu ve patogenezdaki rolleri ele alınmıştır<sup>13</sup>.

### 2.2.1. GAS'da Yüzey ile ilişkili Virülans Faktörleri

#### 2.2.1.1. Kapsül/Hiyalüronik Asit

N-asetil glukozamin ve D-glukuronik asit moleküllerinin oluşturduğu yüksek molekül ağırlıklı hiyalüronik asit polimerlerinden meydana gelmiştir<sup>12</sup>. Kapsül, **hasA**, **hasB** ve **hasC** tarafından kodlanır. Bu genler sırasıyla, hiyalüronik asit sentaz, UDP-glukoz dehidrogenaz ve glukoz pirofosfataz enzimlerini kodlar. Bu genlerin aşırı

ekspresyonu, mikroorganizmanın koyun kanlı agarda mukoid koloniler oluşturmaya yol açar. **CrsS** ve **CrsR**, **has** ekspresyonunun düzenlenmesi ile kapsül oluşturma derecesini artırma ve azaltma yeteneğine sahip, 2-komponentli regülatör sistem olarak fonksiyon görürler<sup>12,2,15</sup>. Kapsül üretimi, GAS izolatları arasında oldukça değişkendir. Yapılan çok sayıdaki çalışmada kapsülün fagositozu önleyerek koruyucu bir rol üstlendiği gösterilmiştir<sup>39,40</sup>. Kapsül muhtemelen nötrofillerin bakteri yüzeyine bağlı opsonik kompleman bileşenlerine erişimini ve C3b birikimini bloke ederek kompleman aktivitesini inhibe eder ve fagositozu önler<sup>41</sup>.

Ayrıca kapsülün, deri-yumuşak doku enfeksiyonları ile sistemik enfeksiyonlarda virülansı arttırdığı gösterilmiştir<sup>41,42,39</sup>. Bunun sebebinin bağışıklık sistemine müdahale olabileceği, kapsülün faringeal mukoza, cild epiteli ve CD44 insan keratinositlerine, M proteininin ve diğer adhesinlerin etkileşimlerini modüle ederek, doğrudan bağlanabildiği gösterilmiştir<sup>44</sup>.

#### 2.2.1.2. Lipoteikoik asit (LTA)

*S. pyogenes*'in hücre duvarının yüzeyinde yer alan LTA, glikoz ve D-alanin içeren gliserol fosfatın amfifilik bir polimeridir<sup>18,35,46</sup>. Bu polimerler konak hücre yüzeyinde yer alan fibronektin gibi çeşitli reseptörler ile hidrofobik olarak zayıf bağlarla bağlanırlar. Bakteri ve konak hücre arasında gerçekleşen bu zayıf bağlanma yüksek afiniteli bağlanma olaylarına fırsat verir<sup>47</sup>. *S. pyogenes* enfeksiyonlarının başlamasında, bakterinin konak doku epiteline adezyonu ilk adımdır. LTA, epitel hücre yüzeyindeki fibronektine bağlanarak invazyonu başlatır. LTA'nın bazı hücreler için sitotoksik etkisi bulunduğu ileri sürülmüşse de virülansa direkt katkısı farengeal mukozaya adezyon ile sınırlıdır<sup>12</sup>.

#### 2.2.1.3. Fibronektin bağlayıcı proteinler

Fibronektin bağlayıcı proteinler, LTA, gibi *S. pyogenes*'in konak hücrelere adezyonuna aracılık eder. Bu grupta: Protein F1 (PrtF1) / SfbI, Protein F2 (PrtF2) / PFBP, serum opasite faktörü (SOF) / SfbII, fibronektin bağlayıcı proteinler A ve B (FbaA ve FbaB), M1 proteini ve streptokokkal kolajen benzeri protein-1 (SclI) olmak üzere 11 fibronektin bağlayıcı protein yer alır. Fibronektin bağlayıcı proteinlerin GAS izolatları arasında dağılımının M tipi ile ilişkili olduğu ancak klinik bulgularla korelasyonu bulunmadığı düşünülmektedir<sup>48,49</sup>. GAS'ın fibronektin bağlayan

proteinlerinden bazılarının, kompleman aktivitesini inhibe ederek fagositozu önlediği bildirilmiştir<sup>49</sup>. Ayrıca prtF1 ve / veya prtF2 genlerinin makrolide dirençli GAS arasında daha yüksek prevalansı gösterildiği, bu sebeple antibiyotik direnci için prediktiv bir marker olabileceği iddia edilmiştir<sup>50,51</sup>.

#### 2.2.1.4. Kollajen benzeri protein

GAS'lar insan kollajenini taklit ederek konak reseptörlerine bağlanan Scl1 ve Scl2 gibi kollajen benzeri proteinlere sahiptir. Kollajen benzeri proteinler değişen sayıda Gly-X-X motiflerinden oluşur ve insan kollajenine benzer üçlü sarmal bir protein yapısı sergiler. GAS'ın Scl proteinleri, yüksek ve düşük yoğunluklu lipoproteinler, fibronektin, laminin ve kompleman reseptörleri de dahil olmak üzere konağa ait kollajen reseptörlerine, a2b1 ve a11b1 integrinlerine, kompleman reseptörleri CFHR1'e ve faktör H gibi çeşitli konak ligandlarına bağlanabilir. Scl1, tüm GAS suşlarının genomunda kodlanmış ve HEP-2 epitel hücrelerine adheransına aracılık ettiği gösterilmiştir<sup>52</sup>.

#### 2.2.1.5. T proteini

T proteini, M ve R proteinleri ile birlikte hücre yüzeyinde bulunur. Isıya ve asite duyarlı, pepsin ve tripsine dayanıklı, alkolde çözünmeyen proteindir. Streptokok enfeksiyonlarının patogeneğinde önem taşımayan, virülansı artırıcı etkisi olmayan zayıf bir antijen olduğu bildirilmiştir. Ancak T proteinine karşı geliştirilmiş antiserumlarla yapılan aglütinasyon reaksiyonları serotiplendirmeye yardımcı olur. T proteinini kodlayan **tee**'leri arasında homoloji olmasına rağmen, **emm**'lerine göre çok daha fazla çeşitliliğe sahiptirler. M proteinlerinin aksine, **tee**'inin en iyi korunmuş ucu aminoterminal bölgedir. GAS'lar 25 farklı kombinasyonda T proteini türü bulunabilir<sup>2,15</sup>.

#### 2.2.1.6. R proteini

Pepsine duyarlı, tripsine dayanıklı olan R proteini, virulansta rol oynamaz ve serotiplendirmede kullanılmazlar<sup>15</sup>. İlk olarak Rebecca Lancefield tarafından 1950 yılının başlarında tanımlanmıştır<sup>53</sup>. A, B, C, G ve L grubu streptokoklar ile ilişkilidir. Tip spesifite göstermez. R proteinlerinin R28 ve R3 şeklinde iki tipi belirlenmiştir. GBS'larda R28 proteini ile puerperal sepsis arasında olduğu, puerperal sepsis

salgınlardan izole edilen suşların büyük kısmında bu proteinin bulunduğu belirtilmektedir. Ayrıca R28 proteini defektli mutant suşların genital epitele bağlanamadığı gösterilmiştir. Bu bulgular R28 proteininin doku tropizmi ve kadın genital sistemine adezyonu sağladığı düşünülmektedir. R3 proteini hakkında ise fazla bilgi bulunmamakla birlikte virulansta rol oynamadığı düşünülmektedir<sup>15,54</sup>.

#### **2.2.1.7. Serum opasite faktörü (SOF)**

GAS suşlarının hücre duvarında bulunan fibronektin bağlayan proteindir. SOF lipoproteinaz aktiivite gösteren, at serumlu besiyerinde opaklaşmaya sebep olan antijenik proteindir. Sekretuvar protein olan SOF, bakteri hücre yüzeyine bağlanan çift fonksiyonlu bir protein olarak görev yapar. Bu iki aktivite; serumu opaklaştırma ve C-terminal bölgesi ile fibronektin-fibrinojen bağlamadır<sup>2,34</sup>. Opasite reaksiyonu HDL'nin agregasyonu ve HDL'nin çözünmemesine yol açan apoprotein A1'in parçalanmasıyla ortaya çıkar. SOF bulunduran streptokokların impetigo etkeni veya nefritojenik olduğu gösterilmiştir. Bazı SOF tiplerinin belli M serotipleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. SOF streptokokların serogruplandırılmasında kullanılmaktadır<sup>55,56,33</sup>.

#### **2.2.1.8. M proteini**

R. Lancefield, (1927) reenfeksiyona karşı koruyucu cevabı uyaran ancak bakteriye konakda gelişen koruyucu immün cevaba da karşı koyma yeteneği de kazandıran M proteinini "tip spesifik bir madde" olarak tanımlamıştır<sup>57,58</sup>. Bakteri yüzeyinde bulunan bu proteinler, dışa doğru çıkıntı yapan saç benzeri yapılar halinde düzenlenmiştir. M proteini, hücre duvarında sabitlenmiş ve hücreyi çevreleyen alfa-helikal yapıda iki polipeptit zinciri tarafından oluşturulmuştur (Şekil 1.4). Dışa uzanan N- terminal bölgesi, hipervariable bir bölge olup serotip spesifiktir<sup>59</sup>. Proteinin korunan C- terminal bölgesi bağışıklık sistemi ile etkileşime girmektedir ve birçok M proteininin fibrinojen bağlanma alanı hipervariable bölgede yer almaktadır<sup>60,61</sup>.

M proteinin N-terminal bölgesi boyut ve aminoasit diziliminde farklılık gösteren dört bloktan, A-B-C-D, oluşur. A bölgesi, her biri 14 aminoasitten oluşan beş tekrardan, B bölgesi her biri 25 aminoasitten oluşan dört tekrardan, C bölgesi 35 aminoasitten oluşan iki tekrardan, D bölgesi ise yedi aminoasitten oluşan dört tekrardan meydana gelmiştir<sup>62</sup>. C-terminalinin yapısı LPXTG motifi olup, proteinin bakteri hücre duvarına



M proteini, fibronektin, plazminojen, membran kofaktör proteini (CD46) ve glikozaminoglikanlar gibi konak hücrelerdeki reseptörler bağlanabilen önemli bir adezyon faktörüdür<sup>66,2,67,63</sup>. Kompleman sistemi, patojen mikroorganizmalara karşı savunmada önemli bir rol oynamaktadır. Kompleman sisteminin aktivasyonu, C3b ve/veya diğer opsoninlerin birikimi ile işaretlenmiş bakterilerin opsonizasyonu ile sonuçlanır. M proteini, faktör H, faktör H like -1 (FHL-1), C4-binding protein (C4BP) ve CD46 komplement düzenleyici proteininden en az birini bağlayarak komplemanın hücre duvarındaki reseptörüne bağlanmasını engelleyerek fagositozu durdurur. M proteininin faktör-H veya FHL-1 ile etkileşimi, hipervariable bölümünün farklı bölgelerinde gerçekleşir. C3b'nin bakteri yüzeyinde presipitasyonu engellenir. Alternatif kompleman yolağı kesintiye uğratarak polimorf nükleer lökositler tarafından fagositoz engellenir<sup>63,67,2</sup>. C4BP'nin M proteininin hipervariable bölgesine bağlanmasının da, fagositoza karşı direnç kazandırdığı gösterilmiştir.

GAS'lar hücre dışı bir patojen olmakla beraber, insan epitel hücre kültürlerinde hücreye internalizasyonları gösterilmiştir<sup>68,69</sup>. E patterninde yer alan bazı M proteinlerinin IgA'ya bağlandığı ve fagositoz direncine katkıda bulunduğu bildirilmiştir<sup>70</sup>. Yine bazı M proteinlerinin insan IgG1, IgG2 ve IgG4'e, bazılarının ise sadece IgG3'e bağlandığı, E paterninde yer alan M-22 ve 28 proteinlerinin, dört alt sınıfın hepsini bağladığı gösterilmiştir. Ancak M proteinlerinin immünoglobülinlere bağlanarak kolonizasyona veya konak savunmasına karşı nasıl bir rol oynadıkları henüz net değildir. Bununla birlikte M proteininin farklı bölgeleri, farklı konak proteinleri ve bağışıklık sisteminin bileşenleri ile etkileşime girdiğinde, M proteininin boyutunda değişiklikler görülmüştür. Bu varyasyonun GAS'ların immun sistemi yanıltarak hayatta kalmasına imkan sağladığı düşünülmektedir. Ancak M proteininin size varyasyonlarının virülans potansiyeline ve klinik bulgulara etkisi üzerine daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır<sup>65</sup>.

| sof      | emm Pattern | emm Type | M protein region               | Ligand                  |
|----------|-------------|----------|--------------------------------|-------------------------|
| Negative | A-C         | M1       | N-term and sub N-term          | Fibronectin             |
|          |             |          | Sub N-term (AA 66-195)         | Kininogen               |
|          |             |          | Sub N-term                     | Fibrinogen              |
|          |             |          | Sub N-term                     | IgG3                    |
|          |             |          | C-repeat                       | Albumin                 |
|          |             | M3       | N-term and possibly sub N-term | Fibronectin             |
|          |             |          | Sub N-term                     | Fibrinogen              |
|          |             |          | C repeat                       | Albumin                 |
|          |             | M5       | N term (aa 69-111)             | FHL-1                   |
|          |             |          | B repeat                       | Fibrinogen              |
|          |             |          | C repeat                       | Factor H                |
|          |             |          | C repeat                       | Albumin                 |
|          |             |          | C repeat                       | CD46 (on lymphocytes)   |
|          |             | M6       | N-term                         | Kininogen               |
|          |             |          | N term                         | FHL-1                   |
|          |             |          | N-term and possibly sub N-term | Fibronectin             |
|          |             |          | Sub N-term                     | Fibrinogen              |
|          |             |          | C repeat                       | CD46 (on keratinocytes) |
|          |             | M12      | C repeat (aa 256-292)          | Factor H                |
|          |             |          | Sub N-term                     | IgG3                    |
|          |             |          | C repeat                       | Albumin                 |
|          |             | M24      | Sub N-term                     | Fibrinogen              |
|          |             | M46      | N-term and possibly sub N-term | Kininogen               |
|          |             | M55      | Unknown                        | Albumin                 |
|          |             |          | Unknown                        | Fibrinogen              |
|          |             | D        | Unknown                        | IgG1,2,3,4              |
|          |             |          | Sub N-term (aa 77-101)         | Plasminogen             |
|          |             |          | Sub N-term (aa 48-68)          | Plasminogen             |
|          |             |          | Sub N-term (aa 68-96)          | Plasminogen             |
|          |             |          | Sub N-term (aa 62-86)          | Plasminogen             |
|          |             |          | Sub N-term (aa 69-97)          | Plasminogen             |
| Positive | E           | M2       | N-term (first 48 aa)           | C4BP                    |
|          |             |          | Unknown                        | IgG1,2,3,4              |
|          |             | M4       | N-term (aa13-39)               | C4BP                    |
|          |             |          | N-term (aa 46-75)              | IgA                     |
|          |             |          | Unknown                        | IgG3                    |
|          |             | M22      | N-term (first 52 aa)           | C4BP                    |
|          |             |          | Sub N-term (aa 35-83)          | IgA                     |
|          |             |          | Unknown                        | IgG1,2,3,4              |
|          |             |          | Unknown                        | CD46 (on lymphocytes)   |
|          |             | M28      | Probably sub N-term            | IgA                     |
|          |             | M49      | Unknown                        | IgG1,2,3,4              |
|          |             |          | C repeat                       | Albumin                 |
|          |             | M50      | Unknown                        | IgG                     |
|          |             | M60      | Unknown                        | IgG                     |
|          |             |          | N-term (first 66 aa)           | C4BP                    |
|          |             |          | Possibly sub N-term            | IgA                     |
|          |             |          | Unknown                        | IgG3                    |

Şekil 3. M proteinleri ve konak canlıda bağlanmama ligandları<sup>62</sup>

M proteinleri, N-terminal bölgede yer alan ve immunsistemi uyarabilme yeteneğine sahip antijenik bölgenin varlığına göre iki sınıfa ayrılırlar. Sınıf-I M proteinlerde C tekrar bölgesi spesifik antikorları ile reaksiyona girerken, sınıf-II M proteinlerinde bu bölge spesifik antikorlar ile reaksiyona girmez<sup>71</sup>. Bu özellik, her iki sınıfın biyolojik özelliklerinin farklı olduğunu ispatlar. Sınıf-II M proteinlerine sahip GAS suşları, genellikle serum opasite faktörü üretirler<sup>72</sup>. Buna karşılık, sınıf-I M proteinine sahip olan suşlar SOF üretmemektedir<sup>2</sup>. Ayrıca, sınıf-I M protein serotipleri akut romatizmal ateş ile ilişkili iken sınıf-II M proteinine sahip suşların akut glomerülonefrit ile ilişkili olduğu belirtilmiştir<sup>73,71,63</sup>.

M proteinlerinin GAS'ın major dominant antijenleridir. Kardiyak miyozin, tropomyosin, vimentin, laminin, keratin ve çeşitli kapak proteinleri gibi çeşitli insan doku proteinleri ile kros reaktif olan M proteininin otoimmün reaksiyonları

indükleyerek *S. pyogenes* enfeksiyonlarının sebep olduğu özellikle non-süpüratif komplikasyonların patogenezinin sorumludur<sup>63</sup>.

M proteini karmaşık biyolojik özellikleri ve patogeneze olan katkısı sebebi ile üzerinde en fazla çalışılan GAS proteini olmuştur. M protein yapısındaki polimorfizm bu proteini kodlayan **emm**'in yapısının dizi analizi gibi moleküler yöntemler ile detaylı olarak çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar fenotipe yansıyan farklılıkların genotip düzeyinde karşılığının olduğunu göstermiş ve sekans tabanlı **emm** yazılımı elde edilmiştir. **emm**-typing, CDC tarafından kurulan sekans bazlı bir yaklaşımdır. **emm**'lerinin on-line CDC veritabanı tarafından sağlanması farklı laboratuvarlar arasında bilgi alışverişini kolaylaştırmaktadır. **emm**-typing için, M proteininin hipervariable N-terminal ucunu kodlayan **emm**'nin 5'-dizisi analiz edilir. Elde edilen veri **emm** tip ve sub-tiplerini tespiti için kullanılır. **emm**-typing GAS'lar dışında M proteinine sahip *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* (SDSE) için de kullanılmaktadır. **emm**, *S. pyogenes* ve SDSE'nin genotip markerdir ve bu türlerin tiplendirilmesinde serolojik markerlardan daha güvenilirlerdir.

**emm**-typing, *S. pyogenes* izolatlarının çeşitliliğini ortaya çıkarmıştır<sup>60</sup>. Günümüzde bu yöntem ile tanımlanmış 250'den fazla **emm** tipi gösterilmiştir. Yapılacak çalışmalar ile bu sayının artması beklenmektedir. Farklı coğrafik bölgelerden tanımlanan **emm** genotipleri, bilimsel açıdan büyük ilgi gören ve streptokok aşılarının tasarımı büyük önem taşımaktadır<sup>21,6,74,75,76</sup>.

Aşı çalışmaları dışında bazı **emm** tipleri ile klinik tablolar arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmesi, bu tiplendirmenin klinik progresyon için prediktiv bir marker olabileceğini düşündürmüştür. Mesela, M2, M4, M6, M12, M44 ve M61 tipleri yüzeysel enfeksiyonlar ile, M1, M3, M4, M5, M6, M12, M14, M18, M19 ve M24, tipleri faranjit ile, M33, M41, M42, M52, M53 ve M70 tipleri de impetigo ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca M2, M49, M57, M59, M60 ve M61 tiplerinin cilt enfeksiyonlardan. M1, M3, M5, M14, M18, M19 ve M24 tiplerinin nonsüpüratif enfeksiyonlardan sorumlu suşlarda bulunduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan akut poststreptokokkal glomerülonefritin M1, M4, M12, M49, M55, M57, M60 tipleri ile, akut romatizmal ateşin M1, M4, M12, M49, M55, M57, M60 tipleri ile ilişkili olduğu, nekrotizan fasiit gibi invaziv enfeksiyonlardan ise M1, M3 ve M28 tiplerine sahip GAS'ların sorumlu oldukları tespit edilmiştir<sup>77,2,78,79,18</sup>.

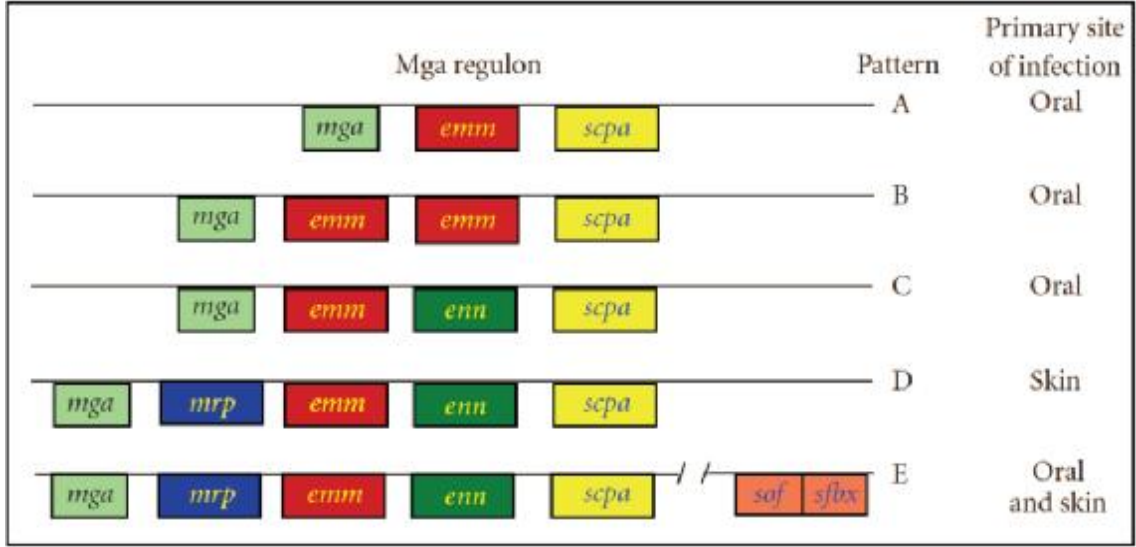
**Tablo 2.** emm tipleri ile klinik bulgular ile korelasyonu<sup>80</sup>.

| Enfeksiyonlar                                      | M tipleri                                                     |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>Süperfisyal enfeksiyonlar</b>                   |                                                               |
| Farenjit, kızıl                                    | 1, 3, 5, 6, 12, 14, 17, 19, 24                                |
| İmpetigo                                           | 33, 41, 42, 52, 53, 70                                        |
| <b>İnvaziv enfeksiyonlar</b>                       |                                                               |
| Nekrotizan fasiit                                  | 1, 3, 28                                                      |
| Streptokoksik toksik şok sendrom                   | 1, 3                                                          |
| Puerperal sepsis                                   | 28                                                            |
| <b>Poststreptokoksik enfeksiyonlar</b>             |                                                               |
| Akut romatizmal ateş,<br>Romatizmal kalp hastalığı | 1, 3, 5, 6, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 24, 27,<br>29, 30, 32, 41 |
| Akut post streptokokkal<br>glomerülonefrit         | 1, 4, 12, 49, 55, 57, 60                                      |

Yapılan çalışmalarda M tipleri prevalansının coğrafik bölgelere göre değişebileceği gösterilmiştir. Global çalışmalarda Afrika’da en sık görülen tiplerin M12, M75, M62, Asya’da M1, M12, M4, Latin Amerika’da M1, M12, M2 ve Orta Asya ülkelerinde ise M12, M1, M3 tiplerinin daha yaygın olduğu görülmüştür<sup>81</sup>.

#### 2.2.1.9. M benzeri proteinler

*S. pyogenes* izolatlarının yaklaşık yarısı M benzeri proteinlere sahiptir. Bu proteinler **emm**, **mrp** ve **enn**’de kodlanır. Bu genler, streptokokkal kromozomun **mga** bölgesinde yer alan **emm**’ine bitişiktir ve gen regülasyonları **mga**’nın kontrolü altındadır. **mga** bölgesinde de bulunan **scpa**, yüzey proteinine bağlı C5a peptidazı kodlar; bu virülans faktörü M proteinleri ile ilgisizdir. **mga** bölgesinin yapısı *S. pyogenes* izolatlarında konakta kolonizasyon bölgelerine göre değişiklik gösterebilir. **mga** A, B ve C paternleri, çoğunlukla oral enfeksiyonlara sebep olurken, D paternine sahip olan suşlar çoğunlukla deriden, E paternine sahip olan *S. pyogenes* izolatları ise hem oral hem de cilt bölgelerinden izole edilmiştir<sup>82,83,84</sup>.



Şekil 4. Mga bölgesinin varyantları ve kolonizasyon bölgeleri ile olan ilişkileri<sup>85</sup>.

M benzeri proteinlere, immünolojik açıdan benzer olmayan M ile ilişkili protein; Mrp (M-related protein) veya M benzeri diğer proteinler; Enn (another M-like protein) denmektedir. M proteinlerinden bazıları gibi, Mrp’de immünoglobülinlerin Fc bölgesine bağlanabilen bir streptokok IgG reseptörüdür. Bu sebeple Fc reseptörü (fcR) olarak da adlandırılır. M proteinleri gibi fibrinojene bağlandığı için, antifagositik faktör olarak düşünülür. M proteinleri ve Mrp’nin birlikte çalışması, streptokokların granüositlere bağlanmasını azaltarak fagositoz direncine katkıda bulunduğu bildirilmiştir<sup>86</sup>.

**enn**’lerinin çoğu IgA’ya bağlanan proteinleri kodlar<sup>87</sup>. In-vitro şartlarda **enn**’in, **emm** ve **mrp**’ye kıyasla çok düşük bir seviyede transkribe edildiği veya hiç bulunmadığı bildirilmiştir<sup>87,88,89</sup>. Bununla birlikte, **emm**, **mrp** ve **enn** ürünlerinin ekspresyonu, enfeksiyon yerlerine bağlı olarak değişebilir. Bu farklılaşmanın bakterinin konak da kolonizasyon ve immunsisteminden kaçış için geliştirdiği stratejinin bir parçası olabileceği düşünülmektedir<sup>87</sup>. **emm**, **enn** ve **mrp** mutant suşlar ile yapılan çalışmada vahşi tipli suş ile karşılaştırıldığında fagositoza duyarlılığın arttığı görülmüştür. Bu veriler, fagositoza karşı direnç sağlayan M ve M benzeri proteinler arasında fonksiyonel bir ilişki olduğunu ima etse de, **mrp** ve **enn**’in patojenezdeki rolü hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır.<sup>90,91</sup>

Streptokok Emm-18 tipi ile yapılan bir çalışmada, bakteri hücre duvarı üzerinde “streptokokkal koruyucu antijen- Spa18” olarak adlandırılan bir yüzey proteini tespit edilmiştir<sup>92</sup>. Bu emm tipi, ARF’ye yol açan *S. pyogenes* enfeksiyonlarının endemik

salgınından sorumlu olduğu düşünülmüştür. Streptokoklar emm36 tipi üzerinde yapılan benzer bir çalışmada da, allelik varyant olan Spa36'yı tanımlanmıştır<sup>93</sup>.

Spa18 ve Spa36, M benzeri proteinlerle karakteristik özellikleri paylaşır. Ancak bu proteinleri kodlayan **spa** mga bölgesinde yer almamaktadır. M proteinleri ve M-benzeri proteinler Mrp ve Enn gibi, Spa'da N-terminal bölgesi diziliminde hipervariable ve C-terminal kısmı korunmuş bölgedir. Spa18, streptokok yüzeyinde bulunur ve M proteini ile birlikte, antifagositik etki ile streptokokların virülansına katkıda bulunur. Sonuç olarak, M-benzeri proteinler olan Mrp, Enn ve Spa, M proteini ile yapısal ve işlevsel benzer homolojileri olan streptokokkal protein sınıfını temsil ederler<sup>91,93,94,95</sup>.

#### 2.2.1.10. C5a peptidaz

C5a peptidaz (scpA), **scpA** ile kodlanan tüm GAS suşlarının yüzeyinde sentezlenen bir serin proteazıdır<sup>96,97</sup>. ScpA, aktif proteazı üretmek için 125 kD proenzim olarak üretilir<sup>35,47,98</sup>. Enzim, nötrofil alımında ve uyarılmasında rol alan kompleman sisteminin kemotaktik bir peptidi olan C5a'yı parçalamaktadır<sup>47,99</sup>. Böylece enfeksiyon yerinde konak fagositozuna müdahale ederler. Yapılan in-vivo çalışmalarda C5a peptidaz mutant suşların fare nazofarinksinin kolonizasyonunda yetersiz olduğunu göstermektedir<sup>18,100</sup>.

#### 2.2.1.11. Streptokokkal kompleman inhibitörü (SIC)

Bilinen en polimorfik proteinlerden biri olan SIC, membran saldırı kompleksinin bakteriyel hücre membranına bağlanmasını inhibe ederek kompleman aracılı lizise müdahale eden 31 kDa bir proteindir<sup>101,102</sup>. *S. pyogenes*'in kalın hücre duvarı nedeniyle kompleman aracılı lizise oldukça dirençli olduğu düşünülse *S. pyogenes* patogeneğine SIC'in katkısı membran saldırı kompleksini engellemektir. SIC, cathelicidin LL-37,  $\alpha$ -defensinler ve lizozim dahil olmak üzere doğuştan gelen bağışıklık sistemini bozabilir<sup>103,104</sup>.

### 2.2.2. GAS Salgılanan virülans faktörleri

#### 2.2.2.1. Sistein Proteaz (SpeB)

Sistein proteaz, streptokokkal pirojenik eritrojenik toksin B (SpeB) veya streptokokkal sistein proteaz olarak da bilinir. SpeB'nin hem pirojenik aktivitesi ve hem

de proteinaz aktivitesi olduğu düşünülmektedir. SpeB, otokatalitik bölünmeye uğrayan ve olgun bir 28 kDa aktif enzime dönüştürülen inaktif bir zimojen (40 kDa) olarak üretilir<sup>105</sup>. Konak proteinlerini bozan proteaz aktivitesine sahip olan SpeB, en çok üretilen virulans faktörlerinden birisidir. Proteaz aktivitesinin hedef proteinleri, IgG, kemokinler, komplement protein C3b ve fibrinojendir<sup>106,107,108,109</sup>.

#### 2.2.2.2. Streptokinaz (Ska)

Ska; plazminojeni plazmine, dönüştüren enzimdir<sup>110,111</sup>. Aktif hale geldiğinde, plasmin geniş spektrumlu bir serin proteaz olarak işlev görür ve kan pıhtılarını, ECM bileşenlerini indirgeyip metaloproteazları harekete geçirir<sup>112</sup>. *S. pyogenes* insan patojeni olduğu için, Ska insan plazminojeni için son derece spesifiktir. Transgenik insan plazminojen ile insanlaştırılmış farelerin kullanarak yapılan in-vivo çalışmalarda, Ska'nın ve aktif plazminin bakterilerin yayılması için gerekli olduğu gösterilmiştir<sup>113</sup>.

#### 2.2.2.3. Streptolizin S (SLS), Streptolizin O

SLS, *S. pyogenes* suşlarının çoğunluğu tarafından üretilen bir  $\beta$ -hemolizindir ve klinik tanımlama için kan agar plakalarında görülen beta-hemolizden sorumludur. Oksijene dayanıklı bir polipeptittir. SLS, **sagA-I**'den oluşan, korunmuş dokuz gen operonunda kodlanmıştır<sup>114,115</sup>. Demir elementi varlığında, üremenin geç logaritmik fazı ile durağan fazında yüksek düzeyde üretilir. Streptolizin-S'in membran fosfolipidleriyle etkileşime girerek toksik etki gösterdiği düşünülmektedir<sup>12,33,15</sup>. SLS, lenfositler ve eritrositler de dahil olmak üzere çok sayıda konak hücreyi lizise uğratarak patogeneze katkıda bulunur<sup>116</sup>. İn-vitro veriler SLS'in patogeneze katkısının sitotoksosite, konak inflamatuvar hücrelerin uyarılması ve fagositoz inhibisyonu yoluyla olduğu gösterilmiştir<sup>117</sup>. SLS mutantlar ile enfeksiyonda, bakteriyel yük, nötrofilik inflamasyon ve doku nekrozunda azalmalara olduğu, in-vivo fare modeli çalışmalarda nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonunun şekillenmesi için vahşi tip SLS'in şart olduğu gösterilmiştir<sup>115</sup>.

Streptolizin-O, kolesterol bağımlı, oksijene duyarlı, ısı ve asitlere dirençli bir hemolizindir. Besiyerindeki güçlü hemolizden sorumludur. Lökosit ve trombositler için toksiktir. Kardiyotoksik özellik göstermesi klinik önem taşımaktadır. Antijenik özelliğe sahiptir ve Streptolizin-O'ya karşı konak tarafından oluşturulan antikorlar serolojik tanı için kullanılmaktadır. Normal şartlarda 200 Todd ünite (TÜ) oranında görülen

Antistreptolizin-O (ASO), üst solunum yolu enfeksiyonlarından sonraki 3-6. haftada en yüksek düzeye ulaşır. *S. pyogenes*' in etken olduğu cilt enfeksiyonlarında ASO yanıtı oluşmamaktadır<sup>13</sup>.

#### 2.2.2.4. SpyCEP

*S. pyogenes*, nötrofil kemokinleri parçalayabilen ve etkisiz hale getirebilen bir serin proteinaz, SpyCEP (*Streptococcus pyogenes* hücre zarf proteazı) salgılar. Özellikle de mikrobiyal bir mücadele ile karşı karşıya kaldıklarında konağın kullandığı kemokin CXCL-8 / IL-8'i etkisiz hale getirir. SpyCEP CXCL8 / IL-8'i C-terminali  $\alpha$  heliksinde parçalamaktadır ve konak tarafından üretilen sinyal proteininin işlevinin azalmasına neden olur. SpyCEP'nin iki polipeptid fragmanından oluşan 170kDa büyük bir olgunlaşmamış form olarak üretilir. Protein, bir otokatalitik bölünme geçirir, ancak iki SpyCEP fragmanı, aktif bir proteaz oluşturmak üzere birlikte hareket eder. SpyCEP transkripsiyonu, CovR / CovS iki komponentli regülatör sistemi tarafından düzenlenir. Çeşitli patojenik streptokoklar, *S. equi*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* ve *S. suis*'de dahil olmak üzere SpyCEP homologları üretir. *S. pyogenes*'in C5a peptidazı, SpyCEP'nin bir homologu olduğu düşünülmüştür. Çalışmalar, SpyCEP'nin hem bakteri klirensini engellediğini hem de bölgesel lenf düğümüne bakteriyel yayılımı ve sistemik dolaşımda yardımcı olduğunu göstermiştir<sup>118</sup>.

#### 2.2.2.5. Streptodornaz/Dnaze

*S. pyogenes*'in ekstraselüler dört farklı Dnaze ürettiği bilinmektedir. Bakteriyofaj tarafından kodlanmış **SdaD2** virülansa büyük katkıda bulunan Dnaze'dir. Bu enzim, *S. pyogenes*'i DNA'ya dayalı ekstraselüler nötrofilleri baskılayarak nötrofil aracılı öldürme olayından korur. **Sda1** Dnaze, *S. pyogenes*'in hiperinvazivitesinde rol oynayabilir ve TLR-9 aracılı cevabı baskılayabilir. **Sda1**'in ekspresyonu, CovRS tarafından negatif olarak düzenlenir. Bununla birlikte, oksidatif stres altında, **sda1** ifadesi PerR'ye bağımlıdır. PerR, peroksit regülatörü, *S. pyogenes*'de metal homeostazı ve oksidatif strese yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. Bir diğer bakteriyofaj kodlu Dnaze, prophage indüksiyonu sırasında eksprese edilen tip 1 ekstraselüler nonspesifik metal bağımlı nükleaz **SpdI1**'dir. Bu Dnaze hem tek hem de çift sarmallı DNA'nın yanı sıra RNA'nın yapısını da bozabilmektedir. Aynı zamanda, fajla kodlanmış streptokokkal pirojenik eksotoksin C (SpeC) ile eksprese edilir. Spd1, Hong Kong'da

skarlet fever salgını sonucu izole edilen emm12 suşlarında bulunmuştur. Diğer nükleazlar, streptodornaz B veya mitojenik faktör 1 (SdaB veya Mf-1), bakteriyofaj kodlanmış Spd-3, M49 suşu NZ131'in kromozomunda bulunmuştur. Transkripsiyonel düzenleyici olan Rgg (RopB olarak da bilinir), bu genlerin ekspresyonunu doğrudan kontrol ederek **SdaB** ve **spd3**'ün transkripsiyonunu bastırır. *S. pyogenes* enfeksiyonlarında bu Dnaze'ların rolü tam olarak araştırılmalıdır<sup>119</sup>.

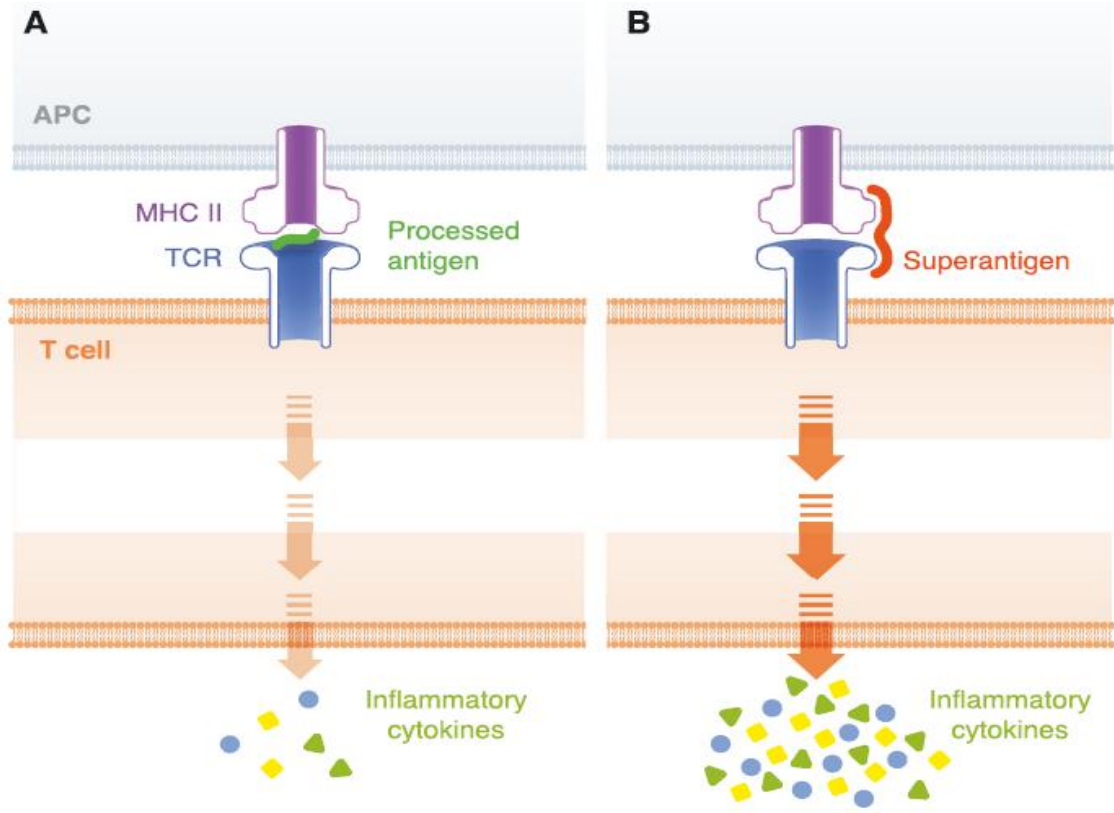
#### 2.2.2.6. IdeS/MAC

İmmünoglobülin degradasyon enzimi, IdeS, IgG'nin menteşe bölgesini spesifik olarak bölen sistein proteazdır. Bu proteaz Mac-1, Sib35 ve MspA olarak da bilinir. Proteaz, IgG'yi parçalayarak streptokoku, konağın antikor aracılı fagositozuna karşı korur ve savunma hücrelerinin sitotoksik cevabını engelleyerek kolonizasyona yardımcı olur. Mac-2, konak hücreler üzerindeki *S. pyogenes*'in IgG'nin Fc reseptörleri tarafından tanınmasını engelleyen IgG endopeptidazıdır. IdeS / MacA CodY tarafından düzenlenir. *S. pyogenes*'in tüm suşlarında bir başka ekstraselüler immünoglobülin proteini olan Sib35'in bulunduğu bildirilmiştir, ancak diğer streptokoklarda görülmediği bildirilmiştir. Sib35 proteini 35 kDa büyüklüğünde olup, hücrenin yüzeyinde olduğu kadar hücre dışında da bulunmuştur. Sib35'in IgG, IgA ve IgM'ye bağlandığı gösterilmiş ve IgG'yi parçalayan enzim olan IdeS'e benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. İmmünoglobülinlerin bağlanmasına ek olarak, bu proteinin B-hücre proliferasyonunu ve aynı zamanda immünoglobülin üreten plazma hücrelerinde farklılaşmayı indüklediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda streptokoksik enfeksiyonlu hastaların sağlıklı gönüllülere kıyasla Sib35'e karşı daha yüksek bir antikor titresi gösterdiği bildirilmiştir<sup>120</sup>.

#### 2.2.2.7. Süperantijenler

Bakteriyel süperantijenler (SAGs), dolaşımdaki insan T hücrelerinin yaklaşık olarak 1/10'unu antijen sunan hücrelerden (ASH) bağımsız olarak aktive edip çok miktarda proinflamatuvar sitokinlerin üretimine sebep olan güçlü toksinlerdir. Konvansiyonel antijenler majör histokompatibil kompleks (MHC) sınıf II molekülünün antijen bağlama bölgesine translokasyon öncesinde antijen ASH'ler tarafından kısa fragmanlara dönüştürülür. Antijen sunan hücreler tarafından T hücrelerine konvansiyonel antijen sunumu, MHC-II moleküllerinin ve T hücre reseptörünün (TCR)

etkileşimi aracılıdır. TCR'ler, çok sayıda yabancı antijene karşı spesifik immun cevap reaksiyonundan sorumlu olan beş değişken element ( $V\beta$ ,  $D\beta$ ,  $J\beta$ ,  $V\alpha$  ve  $J\alpha$ ) tarafından oluşturulur. Bu elementler, MHC reseptörleri ile bu reseptörler tarafından sunulan antijenden oluşan kompleksin tanınarak T-hücre proliferasyonunu uyarması için gereklidir. Antijen bağlama bölgesine giren aminoasitler oldukça fazla polimorfiktir ve sonuç olarak her MHC-II izoformu sadece sınırlı sayıda antijen sunabilir. Bu özgülüğün bir sonucu olarak, ASH aracılı antijenler dolaşımdaki T hücresi repertuarının yaklaşık % 0.01'ini yani çok küçük bir T hücre alt kümesini aktive edebilirler. Bunun aksine SAGs, önceden işleme tabii tutulmadan, MHC sınıf II moleküllerini T hücre reseptörünün (TCR)  $\beta$  zincirinin değişken terminali ( $V\beta$  bölgesi) ile spesifik olmayan şekilde çapraz bağlama yeteneğine sahiptir. SAGs'ler doğrudan ASH yüzeyindeki MHC-II moleküllerine ve TCR popülasyonunun % 25'inde var olan TCR' nin  $V\beta$  değişken bölgesine bağlanır. Bu eş zamanlı bağlanma gerçekleştiğinde uyarılmış T hücreleri ve ASH'ler, IL-2, IL-8, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ve tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi çok miktarda proenflamatuar sitokin salgırlarlar. Bu kontrolsüz sitokin salınımının, sistemik vazodilatasyon, hipotansiyon ve çoklu organ yetmezliği gibi stafilokok veya streptokokların sebep olduğu Toksik Şok Sendromunun karakteristik bulgularından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak, son veriler, bazı SAGs'lerin T hücre yüzeyindeki CD28 reseptörüne bağlanmasının Th1 sitokinlerinin ekspresyonu için gerekli olduğunu göstermiştir. CD28'e bağlanma, STŞS ile ilişkili akut şok ve sistemik vasküler sızıntıyı güçlendiren proinflamatuar sitokinlerin (özellikle IL-2, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ ) çok miktarda salınımıyla sonuçlanır<sup>121,122</sup>.



Şekil 5. Antijen sunumu<sup>122</sup>.

GAS’da süperantijenler 1924’te ilk keşfedildiklerinden sonra, bunların sayı ve önemleri uzun süre fark edilememiştir. Ancak tüm genom dizi analizi teknolojilerinin bakteriyolojide de yaygın kullanımı sonucu Streptokok’lardaki SAg’s’lerin sayısı ve bunların patofizyolojik olaylarla ilişkisinin daha iyi anlaşılmasına yol açmıştır. Günümüzde *S. pyogenes* türü suşlarda 11 süper antijen karakterize edilebilmiştir. Bu süper antijenlerden, SpeG, SpeJ ve SMEZ kromozda kodlanırken, SpeA, SpeC, SpeH, SpeI, SpeK, SpeL, SpeM ve SSA’nın da bakteriyofajlarda kodlandığı tespit edilmiştir. SAg’s’ler, 22 ila 29 kDa arasında non-glikolize küçük proteinlerdir. Düşük DNA dizi homolojisine rağmen, uzun  $\alpha$ -helix ile ayrılmış N-terminal ve C-terminal bölgelerinden oluşur. Streptokoksik SAg’s’lerin çoğunun C-terminal ucunda bir çinko bağlama bölgesi bulunur. Çinko varlığının MHC-II bağlanması için kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir. MHC-H’nin  $\alpha$ -zincirine bağlanan SpeA ve ssa hariç, streptokok SAg’s’lerin çoğunluğu,  $\beta$ -zincirine bağlanır. Ayrıca SAg’s’ler, farklı TCR V $\beta$  zincirlerini tercih eder<sup>122</sup>.

*S. pyogenes* SAg’s genleri iyi korunmuştur ve sıklıkla az sayıdaki nükleik asit farklılığı ile allelik varyasyon gösterirler. İstisna olarak 50’den fazla farklı allelik gene

sahip olan SAg's smez'dir. *S. pyogenes*'de günümüzde bilinen SAg's varyantları: Spe-A; 6, SpeC; 2, SpeG; 6, SpeH; 2, SpeI; 2, SpeJ; 3, SpeK; 1, SpeL;3, SpeM; 4, ssa; 3 ve Smez; 56'dır. Yapılan çalışmalarda *S. pyogenes* suşları arasında ve diğer streptokok türlerinde SAg's genlerinin horizontal transferi ispatlanmıştır.<sup>123</sup>

SAg's'lar, nekrotizan fasiit, STŞS, Kawasaki, sedef hastalığı ve akut romatizmal ateş gibi invaziv enfeksiyonlar ile ilişkilendirilmiştir. Bu enfeksiyonlarla SAg's'lerin ilişkisi, epidemiyolojik çalışmalar, klinik çalışmalar ve hayvan enfeksiyon modelleri ile gösterilmiştir<sup>124</sup>.

Yapılan çok sayıdaki çalışmada, bazı emm geni tipleri ile SAg's'lerin özel enfeksiyonlar ile ilişkili olabildiği göstermiştir. Mesela M1 suşlarının SpeA, SpeG ve Smez gibi toksinleri ve daha az oranda SpeC toksinini, M12 tipi suşların ise özellikle SpeC, SpeG ve Smez toksinlerini eksprese ettiği bildirilmiştir. M4 tipi suşlarda da SpeC, Smez ile daha düşük oranlarda SpeA ve SpeG toksin genlerinin bulunduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda STŞS'li hastalardan izole edilen suşlarda, hem M1 ve M3 tipleri hem de SpeA ve SpeC toksinleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte M1 ve M3 suşlarının sırasıyla speA2 ve speA3 allelleri barındırdığı tespit edilmiş ve bunu daha öldürücü *S. pyogenes* suşları ile invaziv enfeksiyonların yeniden ortaya çıkması ile ilişkilendirilmiştir<sup>124</sup>.

**Tablo 3.** *S. pyogenes* SAg's' lerin fonksiyonel özellikleri<sup>125</sup>.

| SAg   | MW[kDa] | Allel | Çinko bağlanma | MHC II α/β zincirine bağlanma | TcRVβ spesifitesi        |
|-------|---------|-------|----------------|-------------------------------|--------------------------|
| SpeA  | 26.0    | 6     | -              | +/-                           | 2.1, 12.2, 14.1, 15.1    |
| SpeC  | 24.4    | 2     | +              | -/+                           | 2.1, 3.2, 12.5, 15.1     |
| SpeG  | 24.6    | 6     | +              | ?/+                           | 2.1, 4.1, 6.9, 9.1, 12.3 |
| SpeH  | 23.6    | 2     | +              | -/+                           | 2.1, 7.3, 9.1, 23.1      |
| SpeI  | 26.0    | 2     | +              | ?/+                           | 6.9, 9.1, 18.1, 22       |
| SpeJ  | 24.6    | 3     | +              | -/+                           | 2.1                      |
| SpeK  | 27.4    | 1     | +              | ?/+                           | 1.1, 5.1, 23.1           |
| SpeL  | 26.2    | 3     | +              | ?/+                           | 1.1, 5.1, 23.1           |
| SpeM  | 25.3    | 4     | +              | ?                             | 1.1, 5.1, 23.1           |
| ssa   | 26.9    | 3     | -              | ?                             | 1.1, 3, 15               |
| Smez1 | 24.3    | 56    | +              | ?/+                           | 2.1, 4.1, 7.3, 8.1       |
| Smez2 | 24.1    |       |                |                               | 4.1, 8.1                 |

### 2.3. Tanı

GAS enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı klinik örneklerden bakterinin izolasyon ve identifikasyonuna dayanmaktadır. Klinik örnekler tercihen % 5-7'lik koyun kanı ihtiva eden nütrisyonel agar besiyerlerine ekilir. Bir gecelik inkübasyon süresi sonunda besiyerinde küçük  $\beta$ -hemoliz oluşturan kolonilerin görülmesi GAS lehine yorumlanır. Beyaz, grimsi renkte olan GAS kolonilerinin çapları  $> 0.5$  mm'dir. Mikroskopik olarak, Gram yaymada zincir şeklinde Gram pozitif koklar şeklinde görülürler. Fenotipe dayalı tanıda konvensiyonel yöntemler  $> \%90$  başarılıdır. Ancak akut *S. pyogenes* enfeksiyonlarının teşhisinin aksine, akut glomerülonefrit, akut romatizmal ateş, ve serebral bozuklukların tanısında özgül antikorların belirlenmesi tanı koydurur. Ayrıca moleküler tanı yöntemlerindeki hızlı gelişmeler, tanı kadar epidemiyolojik çalışmalar ve salgın araştırmalarında sensitivite ve spesifite bağlamında eksiklikleri kapatmıştır. Günümüzde önceden tanımlanmış suşların veri tabanlarını sağlayan iyi kurulmuş moleküler tiplendirme sistemleri mevcuttur<sup>126</sup>.

GAS'lar 0,04 ünitelik basitrasine duyarlı, 1,25 mg trimetoprim 23,75 mg sulfametaksazol kombinasyonuna dirençli mikroorganizmalardır. Kanlı besiyerinde bu disklerin kullanımı ile elde edilecek inhibisyon zonları tanı koydurur<sup>33,15,13</sup>. Özellikle basitrasin testi *S. pyogenes*'i pirolidonil arilamidaz testi (PYR) pozitif olan *S. iniae* ve *S. porcinius* gibi diğer  $\beta$ -hemolitik streptokoklardan ayırmak için de kullanılmaktadır<sup>127</sup>.

*S. pyogenes*, pirolidonil arilamidaz üretmekte ve bu enzim PYR testi ile tespit edilmektedir. PYR testi basitrasin testinden daha özgüldür ve antijen tespitine yönelik testlerden ise daha ekonomik olduğu bildirilmiştir<sup>33</sup>.

GAS izolatlarının tanısında son adım Latex aglutinasyon yöntemi ile yapılan serotipik doğrulamadır. R. Lancefield Streptokokları hücre duvarı karbonhidrat ve protein antijenlerine göre serogrup ve serotiplere ayırmıştır. Günümüzde de önemini koruyan bu tiplendirme yönteminde kullanılan antikorlar ticari kitler halinde temin edilebilmektedir<sup>12,27</sup>.

Klinik materyallerde GAS antijenlerinin serolojik temelli hızlı testlerle tespitini sağlayan ticari kitler son yıllarda yaygın olarak bu kullanılmaktadır. Ancak bu testler kültürde izolasyon ve identifikasyon bazlı testler ile kıyaslandığında duyarlılıklarının değişken olduğu görülmüştür<sup>128</sup>. Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Birliği (Infectious Diseases Society of America), streptokoksik farenjit klinik bulguları ile başvuran hastalar için eğer yapılabilirse hızlı streptokokal antijen testinin yapılmasını, test

sonucu pozitif olması halinde hastalarda başlanmasını, test sonucu negatif olan hastalardan ise önce boğaz kültürünün alınmasını, kültürde pozitif sonuç elde edilmesi halinde tedaviye başlanmasını önermektedir. Kültür dayalı yöntemler ile kıyaslandığında hızlı antijen testlerinin streptokoksik farenjit tanısındaki duyarlılıklarının % 95 kadar olduğu bildirilmiştir<sup>27</sup>.

Geçirilmiş GAS enfeksiyonları tanısı ile akut romatizmal ateş, post-streptokoksik glomerülonefrit gibi non-süpüratif sekellerin tanısının desteklenmesi için streptokok toksinlerine karşı oluşan antitoksinlerin ölçüldüğü; anti-streptolizin O (ASO) ve anti-deoksiribonükleaz B gibi serolojik testler kullanılmaktadır. ASO titresi akut enfeksiyondan bir hafta sonra yükselmeye başlar ve 3-6. haftalarda 200 TÜ'ın üzerine çıkarak en yüksek seviyeye ulaşır. Anti-DnazeB titresi ise akut enfeksiyondan 1- 2 hafta sonra yükselmeye başlar ve 6-8. haftalarda en yüksek düzeye ulaşır. Deride bulunan kolesterolün, streptolizin-O molekülünün immunojenik ve hemolitik aktivitesini inhibe etmesi sebebi streptokokal cilt enfeksiyonlarının tanısında ASO titresinin tespitinin tanı açısından önemi yoktur<sup>33,27</sup>.

Ancak Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da, 1980'lerin ortalarında ve sonrasında sağlıklı çocuklarda, yetişkinlerde GAS invaziv enfeksiyonlarının yeniden ortaya çıkmasıyla sepsisemi, NF ve STŞS'nin arttığı rapor edilmiş ve bu sebeple moleküler yaklaşımların dikkate alınmasını gerekli olduğu düşünülmüştür. Bu sebeple, PCR, ribotiplendirme, multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) ve multilocus sequence typing (MLST) gibi epidemiyolojik ve popülasyon genetik çalışmalarını üstlenmek için yeni yöntemler geliştirmiştir<sup>129,130</sup>.

## 2.4. Tedavi

Cerrahi debridmanı gerektiren NF gibi derin deri-yumuşak doku enfeksiyonları hariç GAS enfeksiyonlarının temel terapötik tedavi yaklaşımında ilk tercih antibiyotik kullanımıdır.<sup>131</sup> Streptokoksik tonsillo-farenjit vakalarında antibiyotiklerin kullanılması, yalnızca kısa sürede semptomların hafifletilmesi için değil, aynı zamanda özellikle romatizmal ateş gibi non-süpüratif komplikasyonların önlenmesi açısından da önemlidir<sup>132</sup>. Ayrıca, ARA hikayesi olan hastalarda, hastalığın nüksünü önlemek için uzun süreli antibiyotik profilaksisi endikedir<sup>133</sup>. Non-komplike streptokoksik enfeksiyonların tedavisinde ilk tercih antibiyotik penisilin'dir<sup>132,131</sup>. Bununla birlikte,

nekrotizan fasiit ve STŞS gibi şiddetli GAS enfeksiyonlarının tedavisinde, tek başına penisilinin etkinliği sorgulanmış ve penisilinin ile klindamisin kombinasyonu önerilmiştir<sup>131</sup>. Klindamisin kullanıldığında daha yüksek etkinlik, toksin salınımını baskılama ve sitokin üretimini modüle etme kapasitesiyle ilişkili olduğu düşünülmüştür<sup>131</sup>. Penisilin alerjisi olan hastalar alternatif olarak klindamisin ve makrolidler, klaritromisin veya azitromisin kullanılabilir ancak birçok ülkede bu antibiyotiklere karşı direnç görülmüştür<sup>134,135</sup>. Bununla birlikte bu hastalar için alternatif olarak, farenjit vakalarında (anafilaktik duyarlı olmayanlar için) ilk kuşak sefalosporinler, şiddetli yumuşak doku enfeksiyonlarında ise vankomisin, linezolid, daptomisin veya kinopristin / dalfopristin kullanımı önerilmektedir<sup>132,131</sup>.

## 2.5. Antimikrobiyal direnç

*S. pyogenes*'de, penisiline allerjik hastalar ve ağır enfeksiyonların kombine tedavisinde terapötik seçenekler olarak yaygın olarak kullanılan klindamisin ve makrolidlere karşı direnç son derece önemlidir. GAS'da iki ana makrolid direnç mekanizması tanınır, bu da farklı dirençli fenotiplerin ortaya çıkmasına sebep olur. Bu antibiyotiklerin 23S rRNA ribozomal hedefinin transkripsiyon sonrası metilasyonu, tüm makrolidlere, linkozamidlere (Klindamisin, linkomisin gibi) ve streptograminler B'ye (Kinopristin) – MLSB (Makrolid-linkozamid-streptogramin B) fenotipini ortaya çıkaran çapraz dirençle sonuçlanır. Bu fenotip ya yapısal olarak (cMLSB) veya indüklenebilir şekilde (iMLSB) ifade edilebilir. İndüklenebilir dirençte, bakteriler tarafından üretilen doğal mRNA, bir metilaz kodlayamaz, ancak bir makrolid indüsrü varlığında aktive olur. Ribozomal metilazlar, **erm** (eritromisin ribozom metilenaz) tarafından kodlanır. **Erm** 20'den fazla sınıfı tanımlanmıştır, ancak *S. pyogenes*'de MLSB fenotipi tipik olarak **ermA** sınıfının bir alt sınıfı olan **ermB** veya **ermTR** ile ilişkilidir<sup>136,137</sup>. **ErmB** genellikle yüksek seviyeli dirençle ilişkilidir ve yapısal olarak veya indüklenebilir şekilde ifade edilebilirken, **ermTR** genellikle indüklenebilir ve ortaya çıkan direnç seviyesinin eflux pompasının katkısına bağlı olduğu düşünülmektedir<sup>137</sup>.

Eflux pompa sistemi, streptokoklarda yaygın olarak kullanılan 14 ve 15 üyeli lakton halkalı makrolidlere (Eritromisin, Klaritromisin, Azitromisin) düşük ya da orta seviyelerde direnç kazandıran mekanizmadır<sup>136</sup>. *S. pyogenes*'de, Eflux pompa sistemi genellikle **mef (A)** tarafından kodlanır ancak bazı streptokok suşlarında bazı **mef**

varyantları da bulunmuştur<sup>138</sup>. **Erm ve mef** kombinasyonunu barındıran GAS izolatları da tanımlanmış ve bu MLSB fenotipi sunulmuştur<sup>136</sup>.

Streptokokların **erm ve mef** MGEs'lerde kodlanır ve bu da hem türler içi hem de türler arası direncin transferini desteklemektedir. Bununla birlikte tetrasiklin direnç genleri de bulunmaktadır. **tetM ve tetO** her ikisi de transpoze edilebilir makrolid direnç genleri ile birlikte bulunabilir ve protein sentezinde müdahale etmeden, ribozoma tetrasiklin moleküllerin bağlanması önler. Streptokokda tetrasiklin direncinin en yaygın mekanizması budur ancak **tetK ve tetL** tarafından kodlanan eflux pompalar da bulunabilir<sup>139</sup>. GAS izolatları arasındaki makrolid direnç oranları ülkeler arasında önemli farklılık göstermektedir<sup>134</sup>. Portekiz'de, 1998-2003 döneminde tonsillofarenjit ile ilişkili *S. pyogenes* izolatları arasındaki eritromisin direnci % 26.6 iken 2004-2006 yılları arasında bu oran % 13.2'ye düştüğü bildirilmiştir<sup>140,141</sup>. Aynı çalışmada makrolid direncinin emm 4, 22 ve 28 ile anlamlı derecede ilişkili olduğu bulunmuştur. İnvaziv izolatların makrolid direnci Avrupa'da da büyük oranda değiştiği görülmüştür. İskandinav ve Almanya ülkelerinde, İspanya ve İtalya'nın en yüksek direnç seviyelerinin (%17-26.5) aksine en düşük direnç (% 1.5-5.5) oranı görüldüğü bildirilmiştir<sup>142,143,144,129,145,146,147</sup>. Polonya, Yunanistan ve Fransa'da, eritromisin direnç oranlarını % 8-12 arasında değiştiği tespit edilmiştir<sup>148,149</sup>. Yapılan çalışmalarda Norveç'te % 6.1, Polonya'daki % 46.3 olan tetrasiklin direnç oranlarının makrolid direncinden daha yüksek olduğu da bildirilmiştir<sup>129,149</sup>. Portekiz'de sadece invaziv GAS izolatlarının küçük koleksiyonları incelenmiş ve eritromisin direnci % 11 ve % 6, tetrasiklin direnci ise % 40'ın üzerinde olan direnç oranları elde edilmiştir<sup>150,151</sup>. Epidemiyolojik çalışmalarda Florokinolon direncinin çoğunlukla emm 6, 11 ve 75 tipleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur<sup>152,153</sup>. Portekiz'de florokinolon direncinin, orofaringeal, tonsillo farenjit, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ile ilişkili emm 6 izolatlarında bulunmuştur<sup>154</sup>. Aktif eflux sistemi, Streptococcus'taki florokinolon direncinin en yaygın mekanizması hedef enzimlerin değiştirilmesini sağlamaktadır. Intermediate direnç genellikle topoizomera IV'ün alt birimlerinden birini kodlayan **parC**'nin kinolon direncini belirleyen bölgedeki (QRDR) mutasyonları sonucu ortaya çıkar. Yüksek seviyeli direnç ise çoğunlukla QRDR'deki DNA girazı kodlayan *gyrA* geninin mutasyonu ile sağlandığı bildirilmiştir<sup>155</sup>. Bu gibi mutasyonların spontan oluşumu florokinolon direncinin ortaya çıkışının ana mekanizması olarak görülmekle

birlikte *S. pyogenes* ve *S. dysgalactiae* arasında olduğu gibi QRDR'nin streptokoklara horizontal transferi için kanıtlar bulunmuştur<sup>156,157</sup>.

Penisilinin GAS taşıyıcılarında % 100 gibi yüksek bir penisilin direnci bildiren bazı çalışmalarla, GAS taşıyıcılığının ilk tedavisinde penisilinin etkili olmadığı ispatlanmıştır<sup>158</sup>. Araştırmacılar, penisilin epitel hücrelerine internalize olan GAS suşlarına ulaşamadığından, penisilinin GAS taşıyıcılığını ortadan kaldırmada etkili olmadığını düşünmektedirler<sup>159</sup>.

## 2.6. GAS aşıları

GAS enfeksiyonları; global ekonomik yükün yanı sıra, invaziv sekelleri olan hastaları etkileyen mortalite ve morbidite göz önüne alındığında, GAS'a karşı etkili bir aşı geliştirmeye yönelik çabalar uzun zamandan beri devam etmektedir. Son yıllarda, moleküler biyolojideki ilerlemeler, özellikle birkaç *S. pyogenes* genomunun tam genom dizilişi, potansiyel aşı hedeflerinin tanımlanmasına izin vermiştir<sup>160,161,162</sup>. GAS enfeksiyonlarını hedef alan etkili bir aşı oluşturma düşüncesi, araştırmacılar ve halk sağlığı açısından ümit verici olsa da çalışmalarda yüz güldürücü sonuçlara ulaşılamamıştır. GAS'larda deneme aşamasındaki aşılar iki kategoride çalışmalarını sürdürmektedirler. Bunlar; C5a peptidaz, SpeB, SpyCEP, A grubu karbohidrat, fibronektin bağlayıcı proteinler, SLS, SOF ve M proteininin C-terminal bölgesi gibi korunan epitopları hedef alan aşılar ve M proteininin ve pilin N terminal bölgesi gibi değişken yüzey antijenlerine dayalı olan aşılardır.<sup>160,163,164,165</sup>

M proteini, GAS'ın temel virülans belirleyicisidir, çünkü klinik araştırmalara katılan aşılar, 26 ve 30 valanlı aşılar, N-terminal M protein bazlı aşılar; J8 aşısı ve StreptInCor M proteini aşılardır<sup>81</sup>.

Bunlarda 26 valanlı aşı, M1, M1.2, M2, M3, M5, M6, M11, M12, M13, M14, M18, M19, M22, M24, M28, M29, M33, M43, M59, M75, M76, M77, M89, M92, M101 ve M114 proteinlerini kapsamaktadır. Bu yaygın aşı serotipleri ABD, Kanada ve Avrupa gibi yüksek gelirli ülkelerde % 72'sini karşılarken, Afrika, Asya ve Orta Doğu ülkeleri gibi düşük gelirli ülkelerin yalnızca % 24'ünü karşılamaktadır<sup>166,167,81</sup>. Diğer taraftan 30 valanlı aşı, 26 valanlı aşının yeniden formlandırılmış formudur. M4, M29, M73, M58, M44, M78, M118, M82, M83, M81, M87 ve M49 M türleri 26 valanlı aşıda bulunmazken, M1.2, M43, M13, M59, M33, M101 ve M76 proteinleri de 30 valanlı aşı içerisinde bulunmaz. Bu aşı serotipleri, ABD ve Kanada'daki tüm farenjit

vakalarının % 98'ini, Avrupa ve ABD'deki invaziv hastalığın % 90'ını kapsamakta olup, invaziv hastalıkların ise % 78'ini oluşturmaktadır<sup>81,168</sup>.

*S. pyogenes* emm genotiplerinin çeşitliliği, coğrafi bölge ve periyoda bağlı değişimi aşı geliştirilmesinin önündeki engellerden birisidir. Bu problemin üstesinden gelebilmek için farklı yaklaşımlar denenmiştir. Bu yaklaşımlardan birisi spesifik bir coğrafi bölgedeki en sık karşılaşılan streptokok türlerinin aşı preparatlarında kullanılmasıdır. Ancak universal kullanıma açık aşı tasarımı için daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır<sup>169,170</sup>.

M proteininin otoimmün yan etkileri tetiklediği öne sürüldüğünden, araştırmalar M protein bazlı olmayan aşılarda tasarımına doğru ilerlemiştir. Bu çalışmalarının amacı da geniş bir enfeksiyon skalasına karşı etkili olan güvenli bir aşı formülasyonunu bulmaktır. Bu bağlamda GAS'ların farklı antijenlerini hedef alan aşı çalışmaları sürdürülmektedir<sup>171</sup>.

*S. pyogenes* suşlarının hücre duvarında grup spesifik A grubu karbonhidrat (GAC) antijen yer alır. Bu makromolekül streptokok aşısında hedef antijenlerden birisidir. Yapılan çalışmalarda Anti-GAC antikollarının *S. pyogenes* suşlarını opsonize ettiği ve farklı serotipler ile aşılanmış fareleri *S. pyogenes*'e suşlarına karşı koruduğu tespit edilmiştir<sup>172,173</sup>. Bununla birlikte, kalp kapağının aktin, keratin, miyozin ve vimentin gibi ana proteinleri ile anti-GAC antikolları arasındaki immünolojik homoloji sebebi ile, *S. pyogenes* GAC aşı çalışmalarına şüphe ile bakılmaktadır<sup>174,170,175</sup>.

Diğer bir aşı adayı olan M benzeri protein olan streptokok koruyucu antijen (Spa)'dır. Spa'nın N-terminallinin bir parçası, Faz II klinik çalışmalarını tamamlayan StrepAvaxTM (ID Biomedical Corporation, Kanada) adlı 26 valanslı M proteine dayalı aşı ve halen devam etmekte olan 30 valanslı aşının bileşeni olduğu bilinmektedir<sup>91,93</sup>.

*S. pyogenes*'in yüzey proteini olan ve antifagositik özelliğe sahip Streptokokkal sistein proteinaz A (SCPA) kompleman kaskadının anafilatoksin C5a'yı parçaladığı için C5a peptidaz olarak da adlandırılır<sup>176,98</sup>. Homolog C5a peptidazlar aynı zamanda B, C ve G gruplarından streptokoklar tarafından üretilir ve bu da SCPA aşısının diğer β-hemolitik streptokoklarla da enfeksiyonlara karşı da çapraz koruma sağlayabileceğini gösterir<sup>177</sup>. SCPA'nın enjekte edilebilir bir formülasyonu farelerde intranazal olarak inoküle edildiğinde *S. pyogenes*'i eradikasyonunu kolaylaştırdığı tespit edilmiştir<sup>178</sup>. SCPA otoimmüniteyi indüklediğinden umut verici bir aşı adayı olmaya devam etmektedir<sup>179</sup>.

İnaktif streptokokkal süperantijenler SpeA veya SpeC bazlı streptokok aşıları, bu toksinlere karşı antikor yanıtı sağlamıştır. Yapılan çalışmada bu aşıların enfekte tavşanlarda, süperantijenin toksik etkisine karşı koruduğu görülmüştür<sup>180,181</sup>. Ancak süperantijen bazlı aşıların insanlarda akut streptokok enfeksiyonu esnasında, bağışıklık yanıt bakterisidal olmayabilir fakat süperantijenlerin toksik etkilerden koruyabildiği bildirilmiştir<sup>182</sup>.

*S. pyogenes* aşısı geliştirmenin genel amacı, global *S. pyogenes* enfeksiyon yükünün önemli azaltılmasıdır. Hayvan modellerinde etkili olduğu ispatlanmış birtakım aday aşısı antijenleri bulunmaktadır. Etkili ve uygun fiyatlı bir aşısı ürününün piyasaya sürülmesinin önündeki engeller önemli olduğu kanıtlanmıştır. En büyük zorluk, ARA ve tetikleyebilecek enfeksiyonların yanı sıra ciddi invaziv enfeksiyonları önlemede etkili olan aşıları geliştirme konusunda olacaktır. Arzu edilen koruyucu bağışıklık seviyesini elde etmek için çoklu koruyucu antijenler içeren kombinasyon aşılarının geliştirilmesi için sistematik bir deneysel yaklaşım gerektirebilir. Güvenli ve uygun fiyatlı aşıların başarılı bir şekilde yaygınlaştırılması, *S. pyogenes* enfeksiyonlarına atfedilen morbidite ve mortalite üzerinde önemli ve pozitif bir etkiye sahip olabilecektir<sup>183</sup>.

### 3. MATERİYAL ve METOD

Çalışmaya Mayıs 2015 ile Şubat 2017 tarihleri arasından Ç.Ü. Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı ve bölge hastanelerinde klinik örneklerden izole edilen ve VITEK-II cihazı ile tanımlanan toplam 103 *S. pyogenes* izolat dahil edilmiştir. GAS suşlarında emm genotipleri ve SAg's genlerinin suşlar arasında dağılımı, klinik tablo ile bu genotipler arasındaki ilişki sorgulanmıştır. Klinik izolatlar emm-PCR ve Dizi analizi yöntemleri ile genotipik özellikleri yönünden değerlendirilmiştir. SAg's genlerinin suşlar arasında dağılımı multiplex-PCR ile tespit edilmiştir. Ayrıca SmaI-PFGE yöntemiyle test izolatları arasındaki muhtemel klonal ilişki irdelenmiştir.

#### **Çalışma planı şu şekilde oluşturuldu;**

- 1- Test suşlarının laboratuvara getirilip pasajlanarak çoğaltılması ve saklanması
- 2- Çalışma öncesi suşların fenotipik özelliklerine göre tanımlanması
- 3- Dizi analizi yöntemi ile emm tiplendirilmesi
- 4- SAg's ve diğer virülans genlerinin multiplex-PCR ile değerlendirilmesi
- 5- PFGE yöntemi ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti

#### **3.1. Test suşlarının pasajlanarak üretilmesi ve saklanması**

Laboratuvarımıza gönderilen test suşları önce saf koloni elde etme ve çoğaltma amacı ile %5 Koyun Kanlı Colombia Agar besiyerlerine ekilerek 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Saf olarak elde edilen bu kolonilerden ileri testlerde kullanılmak üzere %10 gliserol eklenen stok besiyerine pasaj yapılarak, kullanılabilecek -20°C'de saklandı.

#### **3.2. Suşların fenotipik özelliklerine göre tanımlanması**

Test suşları %5 Koyun Kanlı Colombia Agar besiyerlerine inoküle edilerek 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültürde üreyen koloniler katalaz, gram boyama ve hemoliz oluşturma özelliklerine göre incelenmiştir. Katalaz negatif izolatlar için basitrasin (0,04 U) (Becton Dickinson, ABD) duyarlılık testi yapılmıştır. Gram (+) kok, katalaz negatif, beta hemoliz ve basitrasin duyarlı koloniler çalışmaya dahil edilmiştir.

### 3.3. Dizi analizi yöntemi ile emm tiplendirilmesi

M proteinin tespiti ve emm bölgesinin çoğaltılması için Public Health England, Microbiology Services Colindale, merkezinin uyguladığı protokol dikkate alınmıştır<sup>184</sup>. emm tiplendirme için “Centers for Disease Control” (CDC) databazı kullanılmıştır<sup>6</sup>.

#### 3.3.1. Genomik DNA’ nın ekstraksiyonu:

Kanlı agarda saf olarak elde edilen bakteri kolonilerinden bir öze dolusu alınarak 62µl lizis buffer ( 50 µl TE buffer: (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0), 10 µl mutanolisin (3,000 Units/ml) ve 2 µl hyaluronidaz (30 mg/ml, Sigma H3506; 300-750 Units/mg) epondorf içerisinde karıştırılmıştır ve süspansiyon 37°C’de 30 dakika bekletilip, ardından 100°C’de 10 dakika kaynatılmıştır. Epondorflar 2000 rpm x1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen bakteri lizatları PCR ve Dizi analizi işlemleri için 20°C’de saklanılmıştır.

#### 3.3.2. emm-PCR

Grup A streptokoklarda **emm** varlığını tespit etmek için, emm1: (5’- TAT TCG CTT AGA AAA TTA A-3’) ve emm2: (5’- GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT-3’) primer dizileri kullanılmıştır. PCR reaksiyonu toplam 50 µl olacak şekilde; 34.7 µl dH<sub>2</sub>O, 5µl 10× PCR Buffer, 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.3 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl), 0.5 µl dNTP miks (10 mM), ve her primerden (10 µM) 3 µl alınarak hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR mikisine 2 µl bakteri lizatı eklenerek vortekslenmiştir.

PCR Amplifikasyon aşamaları termal döngü cihazında (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Termal Cyler) aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı:

|                                       |             |
|---------------------------------------|-------------|
| 95°C’de 1 dak. ilk denaturasyon       | } 40 siklus |
| 95°C’de 30 sn. denaturasyon           |             |
| 46.5°C’de 40 sn. bağlanma (annealing) |             |
| 72°C’de 90 sn. uzama (extension)      |             |
| 72°C’de 7 dak. son uzama              |             |
| 12°C’de ∞                             |             |

Sonuçların değerlendirilmesi için, 1X TBE içinde % 1,5 agaroz jel hazırlanmıştır. PCR ürünleri jel yükleme tamponu ile 1/5 oranında (2 µl jel yükleme

tampon çözeltisi + 10 µl PCR ürün ) karıştırılarak her bir kuyuya 12 µl, bir kuyuyada GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus marker olacak şekilde jele aktarılmıştır. Jel 1X TBE içinde 120 V uygulanarak 45-60 dakika yürütülmüştür. Sonuçlar UV ışığa altında görüntülenmiştir. Gel logic 1500 imaging system (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilmiştir.

### **3.4.3. Amplifikasyon ürünlerinin saflaştırılması**

PCR ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin saflaştırılmasında hazır ticari kiti kullanılmıştır. 5 µl PCR ürünü ile 2 µl ExoSap- IT karıştırılmış ve 37°C’de 15 dakika ardından 80°C’de 15 dakika bekletilmiştir.

### **3.3.4. Dizi Analizi**

#### **3.3.4.1. Sekans reaksiyonu**

Sekans reaksiyon karışımı; 4 µl ABI Prism BigDye Terminator v3.1 “cycle sequencing” tamponu, 3.2 pmol emmseq2 primeri (5’TATTCGCTTAGAAAATTAAAAACAGG-3’), 4 µl PCR ürünü, 4 µl 5X buffer ve son hacim 20 µl olacak şekilde su eklenerek hazırlanmıştır. PCR amplifikasyonu, 25 döngü boyunca 96°C de 10 saniye, 50°C’de 5 saniye ve 60°C’ de 4 dakika, 4°C’ de ∞ olarak uygulanmıştır.

#### **3.3.4.2. Sekans reaksiyonu ürünlerinin presipitasyonu**

Sekans ürünlerinin saflaştırılması için ZR DNA Sequencing Cleanup Kit™ ( Zymo Resarch) protokolü kullanılmıştır.

- 1) 20 µl sekans ürününe 240 µl “ Sequencing Binding Buffer” eklendi.
- 2) Karışım Zymo-Spin™ kolonuna aktarıldı.
- 3) 13000 rpm’ de 30 sn santrifüj edildi.
- 4) Spin kolana 300 µl “ Sequencing Wash Buffer” eklendi ve 13000 rpm’ de 30 sn santrifüj edildi.
- 5) Ardından kolona 20 µl % 20’ lik formamid eklendi ve kolon mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek 13000 rpm’ de 15 sn santrifüj edilmiştir.

#### **3.3.4.3. Dizi analizi**

Saflaştırılan sekans ürünleri ABI Prism 310 Genetic Analyser cihazına yüklenmiştir. Dizi analizleri için ABI Prism 310 Data Collection Software yazılımı tarafından oluşturulan kromatogram dosyaları kullanılmıştır.

#### **3.3.4.4. emm tiplerinin analizi**

Dizileme sonuçlarını içeren kromatogram dosyaları FinchTV v1.3.1 yazılımına aktararak, diziler üzerinde gerekli görülen düzeltmeler yapılmıştır. Dizilerin emm tiplendirme işlemi için (<https://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strepblast.asp>) adresinden faydalanılmıştır<sup>6</sup>.



### 3.4. SAgS gen profilinin belirlenmesi:

İzolatların SAgS gen profilleri multiplex-PCR yöntemi ile belirlenmiştir<sup>185</sup>.

**Tablo 4. SAgS ve diğer virülans faktörlerinin amplifikasyonda kullanılan primer çiftleri:**

| SAgS gen profilleri | Primer sekansı (forward)   |             | Primer sekansı (reverse)  | bp  |
|---------------------|----------------------------|-------------|---------------------------|-----|
|                     |                            | <b>Mix1</b> |                           |     |
| SpeL                | CCTGAGCCGTGAAATTCCTCA      |             | ACACCAGAATTGTCGTTTGGT     | 657 |
| SpeK                | CCTTGTGTGTGTATCGCTTGC      |             | TTGCTGTCCCCATCAAACCT      | 568 |
| SpeM                | ATCGCTCATCAAACCTTTTCCT     |             | CCTTGTGTGTGTATCGCTTGC     | 496 |
| SpeC                | GCCAATTCGATTCTGCCGC        |             | TGCAGGGTAAATTTTCAACGACA   | 405 |
| SmeZ                | TTTCTCGTCCTGTGTTTGA        |             | TTCCAATCAAATGGGACGGAGAACA | 246 |
| SpeI                | TTCATAGACGGCGTTCAACAA      |             | TGAAATCTAGAGGAGCGGCCA     | 176 |
|                     |                            | <b>Mix2</b> |                           |     |
| ssa                 | AAGAATACTCGTTGTAGCATGTGT   |             | AATATTGCTCCAGGTGCGGG      | 678 |
| SpeA                | AGGTAGACTTCAATTTGGCTTGTGT  |             | GGGTGACCCTGTTACTCACG      | 576 |
| SpeH                | TGAGATATAATTGTCGCTACTCACAT |             | CCTGAGCGGTTACTTTCCGT      | 480 |
| SpeG                | TGGAAGTCAATTAGCTTATGCAG    |             | GCGAACAACCTCAGAGGGCAAA    | 384 |
| SpeJ                | TCCTTGCTACTAGATGAGGTTGCAT  |             | GGTGGGGTTACACCATCAGT      | 286 |
|                     |                            | <b>Mix3</b> |                           |     |
| spd3                | ATCGTCGTACTTGGAAGGTT       |             | GCCGCTTCTTCAAACCTCTTCG    | 784 |
| sdc                 | AAGCTTAGAACTCTCTCGCCA      |             | AGTTCAGTAATAGCGTTTTTCCGT  | 600 |
| sdaB                | TATAGCGCATGCCGCCTTTT       |             | TGATGGCGCAAGCAAGTACC      | 440 |
| sdaD                | TTTACGCTGAATCGGGCACT       |             | GGCTCTGGTTTGCTTTCCCA      | 295 |
|                     |                            | <b>Mix4</b> |                           |     |
| speB                | AGACGGAAGAAGCCGTCAGA       |             | TCAAAGCAGGTGCACGAAGC      | 952 |
| spyCEP              | GATCCGGCCCATCAAAGCAT       |             | AGCTGCCACTGATGTTGGTG      | 786 |
| scpA                | GCTCGGTTACCTCACTTGTC       |             | CAATAGCAGCAAACAAGTCACC    | 622 |
| Mac                 | TCTTGCCCTGTTGAAAGTGT       |             | CGAGGTGGTATTTTGACGCC      | 389 |
| sic                 | TTACGTTGCTGATGGTGTATATGGT  |             | TTTGATAGAGGGTTTTTCAGCTGGC | 150 |

**Tablo 5.** Multiplex PCR reaksiyonun hazırlanması

|                                                                             | <b>Mix1</b> | <b>Mix2</b> | <b>Mix3</b> | <b>Mix4</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 100µM primer                                                                | 0.6µl       | 0.5 µl      | 0.4 µl      | 0.5 µl      |
| 10X Tag polimeraz buffer<br>(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.5 µl      | 0.5 µl      | 0.1 µl      | 0.5 µl      |
| 25Mm MgCl <sub>2</sub>                                                      | 0.5 µl      | 0.5 µl      | 0.1 µl      | 0.5 µl      |
| 1mM dNTP                                                                    | 0.5 µl      | 0.5 µl      | 0.1 µl      | 0.5 µl      |
| DNA                                                                         | 2.8 µl      | 2.9 µl      | 3.0 µl      | 2.9 µl      |
| 0.5U Tag polimeraz                                                          | 0.1 µl      | 0.1 µl      | 0.1 µl      | 0.1 µl      |

**Tablo 6.** Multiplex PCR amplifikasyon aşaması

|                  | Program1 (Mix1,2,3) |           | Program4 (Mix4) |           |
|------------------|---------------------|-----------|-----------------|-----------|
|                  | Sıcaklık            | Zaman     | Sıcaklık        | Zaman     |
| İlk denatürasyon | 95°C                | 3 dakika  | 95°C            | 3 dakika  |
| Denatürasyon     | 95°C                | 15 saniye | 95°C            | 15 saniye |
| Annealing        | 60°C                | 20 saniye | 52.5°C          | 45 saniye |
| Elongation       | 72°C                | 2dakika   | 72°C            | 3 dakika  |
| Final elongation | 72°C                | 7dakika   | 72°C            | 7dakika   |

Her iki programda amplifikasyon döngüsü 40 siklus olarak ayarlanacaktır.

Sonuçların değerlendirilmesi için, 1X TBE içinde % 1.5 agaroz jel hazırlanarak mikrodalga fırında eritilmiştir. 100 ml eriyik içine 5 mg/ml etidyum bromid çözeltisinden 5µl eklendi ve jel kasetine döküldü, taraklar yerleştirilerek donmaya bırakıldı. PCR ürünleri 10 µl ile 2 µl jel yükleme tampon çözeltisi karıştırılarak her bir kuyunu 12 µl, ardışık iki kuyuyada 5 µl 100 bp DNA Ladder Plus marker olacak şekilde jele aktarıldı. Jel 1X TBE içinde 150 V uygulanarak 40 dakika yürütüldü. Sonuçlar UV ışığı altında görüntülendi. Gel logic 1500 imaging system (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi.

### 3.5. PFGE yöntemi ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti

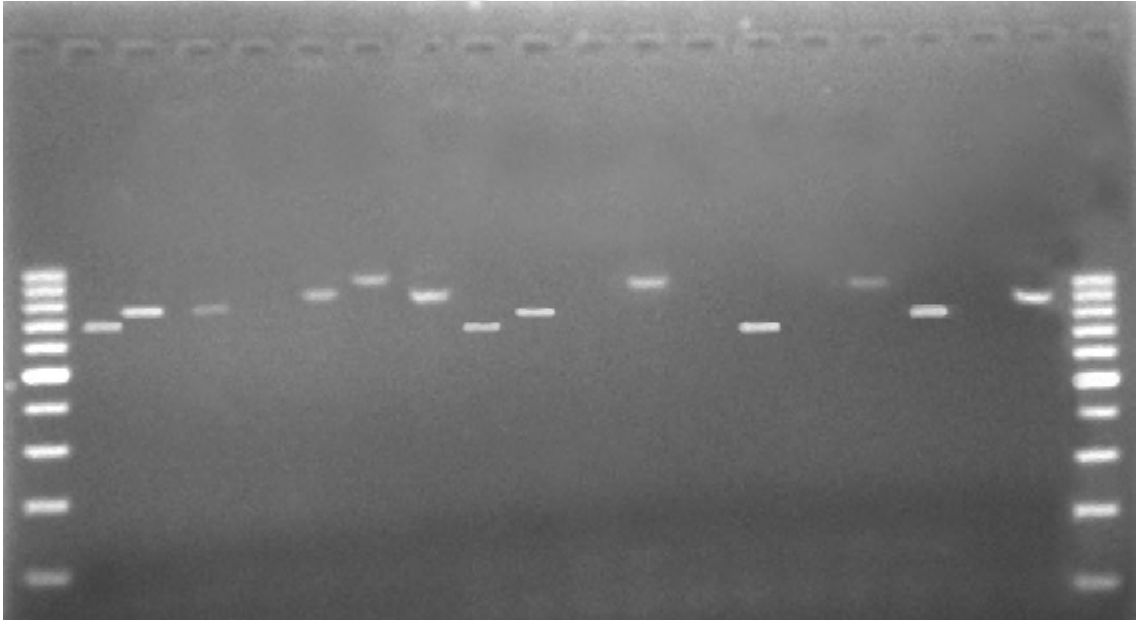
Streptokok izolatları arasındaki filogenetik ilişkileri PFGE yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/listeria-pfge-protocol->

508c.pdf) PulseNet's *Listeria monocytogenes* PFGE protokolü uygulanmıştır. PFGE yöntemi için hazırlanan DNA-agaroz kalıpları *SmaI* ile restriksiyon işlemi uygulandıktan sonra %1'lik PFGE agaroz ile elektroforeze tabii tutuldu. CHEF-DR II sisteminde başlangıç vuruş süresi 4,6 sn, bitiş vuruş süresi 40 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm<sup>2</sup>, sıcaklık 10°C, süre 20 saat olacak şekilde elektroforez işlemi uygulandı. Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 500 ml ultra saf su içine alındı ve 20 dakika boyandı. Boyadan sonra dekolorizasyon için jel, 500 ml saf su içerisinde 10 dakika bekletildi. Ardından jel UV ışığa altında görüntülendi. Gel logic 1500 imaging system (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kaydedildi. GelCompar II yazılım sistemi (version 4.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. "Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)" kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, % 1,5 olarak alındı. Suşlar arasındaki ilişkide %80 benzerlik oranı kriter olarak kullanıldı<sup>186</sup>.

#### 4. BULGULAR

Çalışmada Ç.Ü. Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı ile bölge hastanelerinde klinik örneklerden izole edilmiş 103 GAS izolatında; **emm**, SAg's tipleri, Dnaze, proteaz gibi virölans genlerinin tespiti ve prevalansı irdelenmiş, suşlar arasındaki muhtemel klonal ilişki sorgulanmıştır. Laboratuvarımıza gönderilen ve fenotipik olarak GAS tanısı almış bakteri izolatları, tanının doğrulanması amacıyla laboratuvarımızda yeniden fenotipik testlere tabii tutulmuş, yapılan testler sonucu GAS olduğu doğrulanan 97 izolat çalışmaya dahil edilmiştir.

Suşlarda emm genotiplerinin tespiti amacıyla yapılan emm-PCR sonucunda 97 izolatın sadece 86'sında **emm** pozitif bulunmuştur. emm genotiplendirmede 86 izolat değerlendirmeye alınmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. emm- PCR jel görüntüsü

**emm** pozitif izolatlarının, CDC databazı kullanılarak yapılan emm tiplendirmesinde ise 7'si emm subtip olmak üzere 22 (%25.58) farklı ( 28, 1, 12, 3, 89, 2, 244, 212, 219, 163, 245, 241, 196, 118.5, 11.1, 1.65, 203.1, 89.31, 108.1, 6.19, 28.5, stG 7882.3) emm tipi tespit edildi. emm tiplerinin prevalansı irdelediğimizde en yaygın görülen tiplerin sırası ile emm28 (%22.09), emm1 (%18.60), emm12 (13.95), emm3

(%11.62) ve emm89 (%3.48) olduğu görüldü. emm tiplerinin suşlara göre dağılımı ve tespiti aşağıdaki şekil ve tabloda verilmiştir (Şekil7-Tablo 7).

>|c|EMM28.0 emm28.0 (emm-cluster E4) subtype-determining sequence. Bases  
31-180 encode  
Length=180

Score = 100 bits (110), Expect = 8e-23  
Identities = 143/179 (80%), Gaps = 22/179 (12%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 2  GGCTTTGGACCCCAAACAGATGTTA-GGCTGTC---CCCCTCAAAG-ACAGAGACTTCT 55
      ||||| | ||||| ||| ||| | || ||| |||||
Sbjct 1  GGCTTTGCAAACCAAACAGAAGTTAAGGCTGCGGAGTCTCCAAAAGTACTGAGACTTCT 60

Query 56  G-TAATGG-GCTG-TCCATTAG-TG-TGC-TACA-CA-ATTGCTTACTGA-CATGAGAA- 105
      | |||| ||| | |||| || ||| || ||||| |||||
Sbjct 61  GCTAATGGAGCTGATAAATTAGCTGATGCATACAACACATTGCTTACTGAACATGAGAAA 120

Query 106 CTC-GAGATGAGTAT-ATACCT--ATTGATGCTAA-GATGAAGAACCTAGG-ATAAAGC 158
      || ||||| ||| | ||||| || ||||| |||||
Sbjct 121 CTCAGAGATGAGTATTATACATTAATTGATGCTAAAGAAGAAGAACCTAGGTATAAAGC 179

```

>|cl|EMM1.0 emm1.0. (emm cluster A-C3) usually T1, opacity factor negative.  
Also,  
Length=180

Score = 325 bits (360), Expect = 3e-90  
Identities = 180/180 (100%), Gaps = 0/180 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 39  GGTTTTGCGAATCAAACAGAGGTTAAGGCTAACGGTGATGGTAATCCTAGGGAAGTTATA  98
          |||
Sbjct 1   GGTTTTGCGAATCAAACAGAGGTTAAGGCTAACGGTGATGGTAATCCTAGGGAAGTTATA  60

Query 99  GAAGATCTTGCGAGCAAACAATCCCGCAATACAAAATATACGTTTACGTCACGAAAACAAG  158
          |||
Sbjct 61  GAAGATCTTGCGAGCAAACAATCCCGCAATACAAAATATACGTTTACGTCACGAAAACAAG  120

Query 159 GACTTAAAAGCGAGATTAGAGAATGCAATGGAAGTTGCAGGAAGAGATTTTAAGAGAGCT  218
          |||
Sbjct 121 GACTTAAAAGCGAGATTAGAGAATGCAATGGAAGTTGCAGGAAGAGATTTTAAGAGAGCT  180

```





emm tiplerinin alınan örnek türüne göre dağılımını irdelediğimizde 54 üst solunum yolu (ÜSY) enfeksiyonu ile başvuran hastalardan alınan boğaz sürüntüsü örneklerinde 17 farklı emm tipi, bununla birlikte 14 balgam örneğinde 8, 12 deri yumuşak doku (DYD) örneğinde 7, üriner sistem enfeksiyonu (ÜSE) olan hastalardan alınan idrar örneklerinde de 6 farklı emm tipi dağılımı tespit edildi (Tablo7).

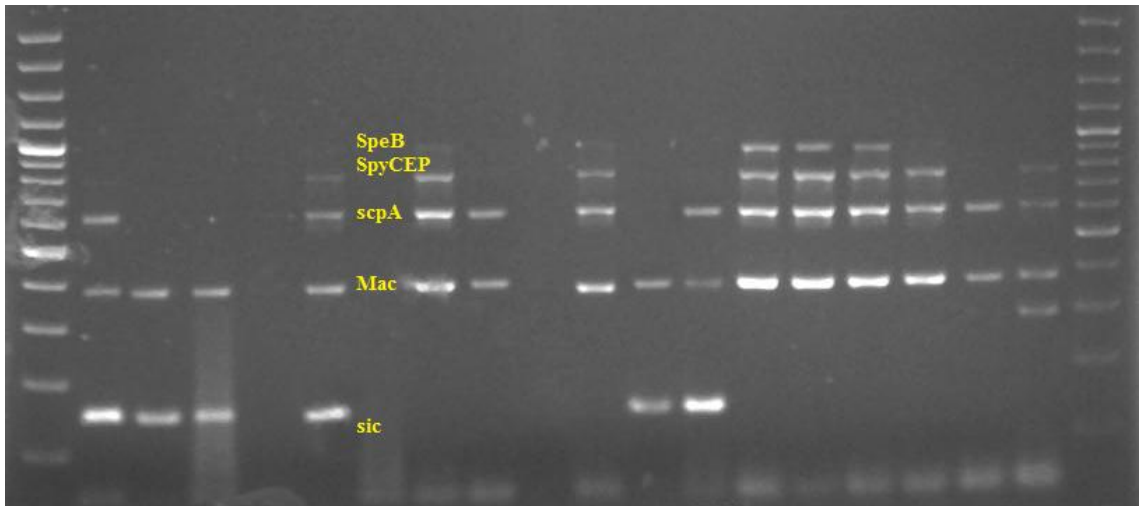
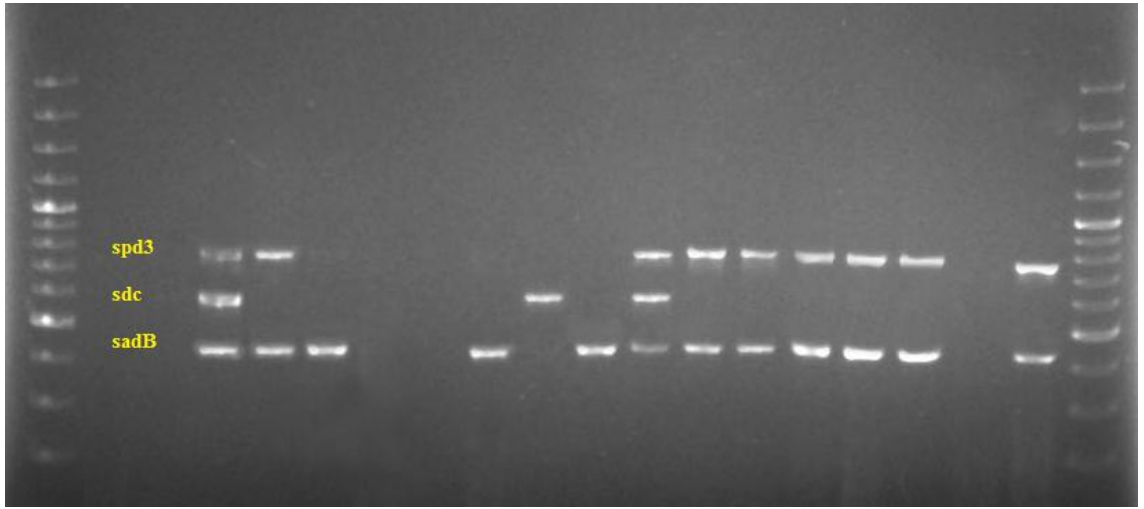
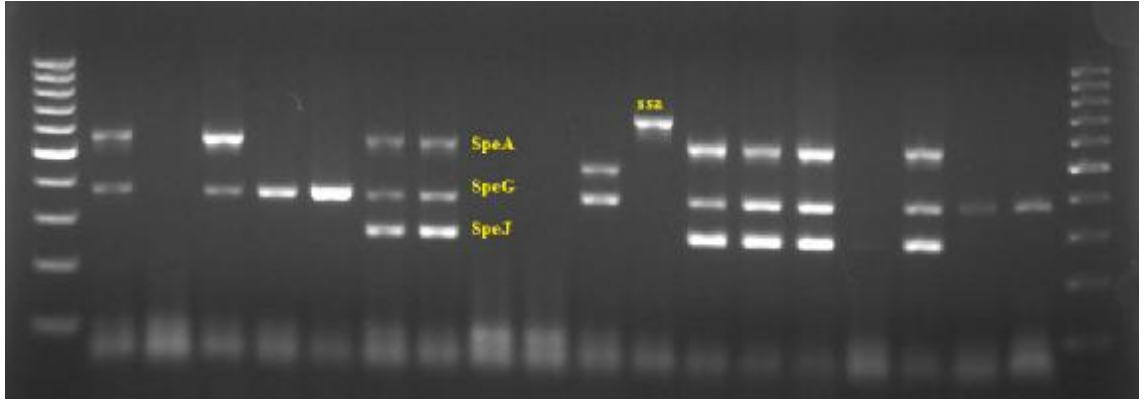
**Tablo 7.** GAS'ların izole edildikleri klinik materyal ve emm tiplerine dağılımı.

| emm<br>tipi   | Örnek türü |        |     |     | Toplam (86) |       |
|---------------|------------|--------|-----|-----|-------------|-------|
|               | ÜSY        | Balgam | DYD | ÜSE | Sayı        | %     |
| 28            | 6          | 7      | 6   | -   | 19          | 22.09 |
| 1             | 14         | 1      | 1   | -   | 16          | 18.60 |
| 12            | 10         | -      | 1   | 1   | 12          | 13.95 |
| 3             | 7          | 1      | 1   | 1   | 10          | 11.62 |
| 89            | 1          | 1      | 1   | -   | 3           | 3.48  |
| 118.5         | 3          | -      | -   | -   | 3           | 3.48  |
| 2             | 2          | 1      | -   | -   | 3           | 3.48  |
| 241           | 2          | -      | --  | -   | 2           | 2.32  |
| 28.5          | 1          | -      | 1   | -   | 2           | 2.32  |
| 163           | 1          | 1      | -   | -   | 2           | 2.32  |
| 212           | 1          |        |     | 1   | 2           | 2.32  |
| 245           | 1          |        | 1   |     | 2           | 2.32  |
| 244           | 1          |        |     |     | 1           | 1.16  |
| 203.1         | 1          |        |     |     | 1           | 1.16  |
| 89.31         | 1          |        |     |     | 1           | 1.16  |
| 6.19          | 1          |        |     |     | 1           | 1.16  |
| stG 7882.3    | 1          |        |     |     | 1           | 1.16  |
| 11.1          |            |        |     | 1   | 1           | 1.16  |
| 1.65          |            |        |     | 1   | 1           | 1.16  |
| 108.1         |            |        |     | 1   | 1           | 1.16  |
| 219           |            | 1      |     |     | 1           | 1.16  |
| 126           |            | 1      |     |     | 1           | 1.16  |
| <b>Toplam</b> | 54         | 14     | 12  | 6   | 86          | 100   |

GAS suşlarında SAgS tipleri, Dnaze, proteaz gibi virülans genlerinin tespiti ve prevalansı irdelendiğinde; en prevalan Sags tipinin SpeG olduğu, bunu ikinci sıklıkta SpeC'nin izlediği, buna karşılık SpeL geninin ise hiçbir izolatta bulunmadığı, Dnaze enzim tiplerinden en sık sdaB bulunduğu, buna karşılık sdaD'nin hiçbir izolatta tanımlanmadığı ve proteaz faktörlerinden mac'ın en prevalan olduğu, sic'in ise en az tespit edilen proteaz olduğu görüldü. Sags genotipleri en az bir, en fazla 4 olmak üzere 86 izolatta tanımlandı. Dnaze genotipleri ise en az bir, en fazla 3 olmak üzere 54 izolatta tespit edildi. Buna karşılık 32 suşta ise bu genotipleri bulunamadı. Proteaz genotipleride 57 izolatta en az bir en fazla dört olmak üzere tanımlandı. Ancak 29 izollatta aranan proteaz genotipleri tespit edilemedi. GAS izolatlarında virülans faktörlerinin bulunma sıklığı ve örnek türü, emm tiplerine göre dağılımı aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Şekil8,Tablo8-9-10-11).

**Tablo 8.** GAS izolatlarında virülans ile ilişkili aranan genlerin görülme sıklığı.

| Virülans Faktörleri | Toplam İzolat | %     | Virülans Faktörleri | İzolat | %     |
|---------------------|---------------|-------|---------------------|--------|-------|
| SpeG                | 50            | 58.13 | SpeL                | 0      | 0     |
| SpeC                | 49            | 56.97 | sdaB                | 46     | 53.48 |
| SpeJ                | 25            | 29.06 | spd3                | 24     | 27.90 |
| SpeA                | 18            | 20.93 | sdc                 | 22     | 25.58 |
| SpeI                | 15            | 17.44 | sdaD                | 0      | 0     |
| SpeM                | 10            | 11.62 | mac                 | 46     | 53.48 |
| SpeH                | 9             | 10.46 | scpA                | 34     | 39.53 |
| SpeK                | 5             | 5.81  | spyCEP              | 26     | 30.23 |
| SmeZ                | 5             | 5.81  | SpeB                | 21     | 24.41 |
| ssa                 | 4             | 4.65  | sic                 | 14     | 16.27 |



**Şekil 8.** Multiplex-PCR ile tanımlanan bazı virülans faktörlerinin görüntüsü

**Tablo 9.** Test suşlarının; izole edildikleri klinik materyal, M genotipi ve virülans faktörleri dağılımı.

| No | Örnek  | M tipi | Sags                   | Dnaze           | Proteaz                 |
|----|--------|--------|------------------------|-----------------|-------------------------|
| 1  | Balgam | 28     | SpeC, SpeJ             | sdaB, sdc       |                         |
| 2  | ÜSE    | 28     | SpeC                   |                 | Sic, Mac                |
| 3  | DYD    | 28     | speM                   | sdc             | Sic, Mac, scpA, spyCEP  |
| 4  | DYD    | 28     | SpeC, SpeG, SpeA       | sdaB            | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 5  | DYD    | 28     | SpeI, SpeG, SpeH       | sdaB, spd3      | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 6  | Balgam | 28     | SpeK, SpeG             | sdaB, spd3      |                         |
| 7  | Balgam | 28     | SpeC, SpeG, SpeJ       |                 | Sic, Mac                |
| 8  | ÜSE    | 28     | SpeC, SpeG, SpeJ, SpeM |                 | Sic, Mac, scpA, speB    |
| 9  | ÜSE    | 28     | SpeG, SpeH, SmeZ, ssa  | sdaB spd3       |                         |
| 10 | ÜSE    | 28     | SpeG, SpeJ, SmeZ       |                 | Mac, scpA, speB         |
| 11 | DYD    | 28     | SpeC                   | sdaB            | Mac, scpA, spyCEP       |
| 12 | Balgam | 28     | SpeI, SpeG             |                 | Sic, Mac                |
| 13 | ÜSE    | 28     | SpeI, SpeC             |                 | Sic, Mac, scpA          |
| 14 | DYD    | 28     | SpeC                   |                 | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 15 | DYD    | 28     | SpeC                   |                 | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 16 | Balgam | 28     | SpeC                   | sdaB            | Mac, scpA, spyCEP       |
| 17 | ÜSE    | 28     | SpeC                   |                 | Mac, scpA, spyCEP       |
| 18 | Balgam | 28     | SpeC, SpeG, SpeA, SpeM | sdaB, spd3, sdc |                         |
| 19 | ÜSE    | 28     | SpeG, SpeK, SpeM       | sdaB, sdc       |                         |
| 20 | ÜSE    | 3      | SpeC, SpeG             |                 | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 21 | Balgam | 3      | SpeC, SpeG, SpeI, SpeH | sdaB            |                         |
| 22 | ÜSE    | 3      | SpeC, SpeI, ssa        | sdaB, spd3, sdc | Sic, Mac, scpA          |
| 23 | ÜSE    | 3      | SpeC, SpeG, SpeJ, SpeA | sdaB, spd3      | Mac, scpA, spyCEP       |
| 24 | DYD    | 3      | SpeC, SpeG             | sdaB, spd3      |                         |
| 25 | ÜSE    | 3      | SpeC, SpeG, SpeK       | sdaB, sdc       |                         |
| 26 | ÜSE    | 3      | SpeG                   | sdaB, spd3, sdc |                         |
| 27 | ÜSY    | 3      | SpeG, SpeJ, SpeA       |                 | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 28 | ÜSY    | 3      | SpeG, SpeJ, SpeA       | sdaB, spd3      | Mac, scpA, spyCEP       |
| 29 | ÜSE    | 3      | SpeJ                   | sdaB, spd3      |                         |

**Tablo 10.** Test suşlarının; izole edildikleri klinik materyal, M genotipi ve virülans faktörleri dağılımı.

| No | Örnek  | M tipi | Sags                   | Dnaze          | Proteaz                 |
|----|--------|--------|------------------------|----------------|-------------------------|
| 30 | ÜSY    | 1      | SpeC, SpeJ, SpeG       | sdaB, sdc      |                         |
| 31 | ÜSY    | 1      | SpeC                   |                | Sic, Mac                |
| 32 | ÜSY    | 1      | speM                   | sdc            | Sic, Mac                |
| 33 | DYD    | 1      | SpeC, SpeG, SpeA       | sdaB, sdc      | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 34 | ÜSY    | 1      | SpeI, SpeG, SpeH       | sdaB, spd3     |                         |
| 35 | ÜSY    | 1      | SpeK, SpeG             |                |                         |
| 36 | ÜSY    | 1      | SpeC, SpeG             |                | Sic, Mac                |
| 37 | ÜSY    | 1      | SpeC, SpeG, SpeJ, SpeM |                | Mac, scpA               |
| 38 | ÜSY    | 1      | SpeG, SpeH, SmeZ, ssa  | sdaB           |                         |
| 39 | Balgam | 1      | SpeG, SpeJ, SpeC       | spd3           | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 40 | ÜSY    | 1      | SpeC                   |                |                         |
| 41 | ÜSY    | 1      | SpeI, SpeG             |                | Sic, Mac                |
| 42 | ÜSY    | 1      | SpeI, SpeC             |                | Mac, scpA               |
| 43 | ÜSY    | 1      | SpeC                   |                | Mac, spyCEP, speB       |
| 44 | ÜSY    | 1      | SpeC                   |                | Mac, speB               |
| 45 | ÜSY    | 1      | SpeC                   | sdaB           |                         |
| 46 | ÜSY    | 12     | SpeC                   | sdaB, sdc      |                         |
| 47 | ÜSE    | 12     | SpeC, SpeG             |                | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 48 | ÜSY    | 12     | SpeA, SpeM             |                |                         |
| 49 | ÜSY    | 12     | SpeK, SpeM             | sdaB, sdc      |                         |
| 50 | DYD    | 12     | SpeC, SpeG, ssa        |                | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 51 | ÜSY    | 12     | SpeI, SpeH             | sdaB           |                         |
| 52 | ÜSY    | 12     | SpeC, SpeI,            | sdaB,spd3, sdc | Mac, scpA               |
| 53 | ÜSY    | 12     | SpeJ, SpeA             | sdaB, spd3     | Mac, scpA, spyCEP       |
| 54 | ÜSY    | 12     | SpeC, SpeG             | sdaB           |                         |
| 55 | ÜSY    | 12     | SpeG                   | sdaB           |                         |
| 56 | ÜSY    | 12     | SpeG, SpeJ, SpeA       |                | Mac, scpA               |
| 57 | ÜSY    | 12     | SpeG, SpeJ, SpeA       | sdaB, spd3     | Mac, scpA, spyCEP       |

**Tablo 11.** Test suşlarının; izole edildikleri klinik materyal, M genotipi ve virülans faktörleri dağılımı.

| No | Örnek  | M tipi    | Sags                   | Dnaze           | Proteaz                 |
|----|--------|-----------|------------------------|-----------------|-------------------------|
| 58 | Balgam | 89        | SpeC, SpeJ             | sdaB            |                         |
| 59 | ÜSY    | 89        | SpeC                   |                 |                         |
| 60 | DYD    | 89        | SpeI, SpeG, SpeJ       | sdc, sdaB, spd3 | Mac, scpA, spyCEP       |
| 61 | ÜSY    | 118.5     | SpeJ                   | sdaB, sdc       | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 62 | ÜSY    | 118.5     | SpeJ, SpeG, SpeA       | sdc             |                         |
| 63 | ÜSY    | 118.5     | SpeJ, SpeH             | sdaB            |                         |
| 64 | ÜSY    | 2         | SpeJ, SpeG             | sdaB, spd3      |                         |
| 65 | ÜSY    | 2         | SpeG, SpeH             | sdaB            | Sic, Mac                |
| 66 | DYD    | 2         | SpeG, SpeJ, SmeZ       | sdaB, spd3      | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 67 | ÜSY    | 241       | SpeC                   |                 | Mac, Sic, scpA          |
| 68 | ÜSY    | 241       | SpeJ, SpeG, SpeA, SpeC | sdaB, spd3      | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 69 | ÜSY    | 28.5      | SpeA, SpeC, SpeI, smeZ |                 |                         |
| 70 | DYD    | 28.5      | SpeC                   |                 | Mac, scpA, spyCEP       |
| 71 | ÜSY    | 163       | SpeG, SpeA,            | sdaB, spd3      |                         |
| 72 | Balgam | 163       | SpeA, SpeC, SpeI       |                 |                         |
| 73 | ÜSE    | 212       | SpeG                   |                 | speB                    |
| 74 | Balgam | 212       | SpeC, SpeG, SpeA, SpeM | sdaB, spd3, sdc |                         |
| 75 | ÜSY    | 245       | SpeC, SpeG, SpeA, SpeJ | sdaB, sdc       | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 76 | DYD    | 245       |                        | sdaB,spd3       | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 77 | ÜSY    | 244       | SpeC, SpeG             | sdaB            |                         |
| 78 | ÜSY    | 203.1     | SpeC, SpeG, SpeJ       |                 | Mac, Sic                |
| 79 | ÜSY    | 89.31     | SpeC                   | Sdc             |                         |
| 80 | ÜSY    | 6.19      | SpeG                   |                 |                         |
| 81 | ÜSY    | stG7882.3 | SpeC, SpeG             |                 |                         |
| 82 | ÜSE    | 11.1      | SpeC, SpeG, SpeA, SpeM | sdc             |                         |
| 83 | ÜSE    | 1.65      | SpeC, SpeG, SpeI       | sdaB, sdc       |                         |
| 84 | ÜSE    | 108.1     | SpeI, SpeH             |                 | speB                    |
| 85 | Balgam | 219       | SpeG                   | sdaB, spd3      |                         |
| 86 | Balgam | 126       | SpeJ                   | sdaB, spd3, sdc | Mac                     |

Test suşları arasında en sık tanımlanan emm genotiplerindeki virülans faktörlerinin dağılımı irdelendiğinde emm 28 tipine sahip 19 izolatın 11’inde en sık tespit ettiğimiz Sags tipinin speC olduğu bunu 9 izolat ile speG’nin izlediği birer izolat da ssa ve speK’nın en az tespit edilen tipler olduğu görüldü. Yine gu grupta 9 izolat ile sdaB Dnaze’nın 14 izolat da Mac’ın en sık karşılaşılan virülans faktörleri olduğu görüldü. M tipi olarak 10 izolat ile 4. sıklıkta tanımlanan emm3’de ise 8 izolatın speG’ye sahip olduğu, Dnaze genlerinden en sık sdaB’nin, Mac ve spyCEP’in en sık görüldüğü tespit edildi(Tablo12)

**Tablo 12.** En sık tanımlanan M tiplerinde görülen virülans faktörleri.

| M tipi | Sayı | Sags                                                                           | Dnaze                | Proteaz                                |
|--------|------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------|
| 28     | 19   | speC;11 speG; 9 speJ; 4 speM; 4 speI; 3, speA; 2 speH; 2 smeZ; 2 ssa;1 speK; 1 | sdaB;9 sdc;4 spd3;4  | Mac;14 scpA; 11 spyCEP; 8 sic;6 speB;6 |
| 1      | 16   | speC;11 speG; 8 speI; 3 speJ; 2 speM; 2 speH; 2 speA; 1 smeZ; 1 ssa;1 speK; 1  | sdaB;5 sdc; 3 spd3;2 | Mac;10 sic;4 scpA;4 speB;4 spyCEP; 3   |
| 12     | 12   | speG; 6 speC;5 speA; 4 speJ; 3 speM; 2 speI; 2 speH; 2 ssa;1 speK; 1           | sdaB;8 sdc; 3 spd3;3 | Mac; 6 scpA; 6 spyCEP; 4 speB;2        |
| 3      | 10   | speG; 8 speC;6 speJ; 4 speA; 3 speI; 2 speH; 1 ssa;1 speK; 1                   | sdaB;8 spd3;6 sdc; 3 | Mac; 5 scpA; 5 spyCEP; 4 speB;2 sic;1  |

Çalışmamızda önemli bulgulardan biri de iki farklı hastadan alınan örneklerden izole edilen GAS izolatlarında emm tipi ve virülans faktörlerin dağılımı idi. Yumuşak doku enfeksiyonu sebebi ile farklı tarihlerde yara sürüntüsü alınan hastanın epizotunda, emm tiplerinin farklı (emm28-28.8), virülans faktörlerinin ise %95 oranında aynı olduğu tespit edildi. Diğer hastaya ait farklı bölgelerden alınan iki örnek türünde ise emm tiplerinin ve tanımlanan virülans faktörlerinin birbirinden farklı, sadece mac geninin ortak olduğu görüldü(Tablo13).

**Tablo 13.** Aynı hastadan farklı zamanlar ve/veya lokasyondan izole edilen GAS'ların M tipi ve virölans faktörleri dağılımı.

| Suşı No | Örnek türü | emm tipi | Sags             | Dnaze     | Proteaz                 |
|---------|------------|----------|------------------|-----------|-------------------------|
| 11      | DYD        | 28       | SpeC             | sdaB      | Mac, scpA, spyCEP       |
| 70      | DYD        | 28.5     | SpeC             |           | Mac, scpA, spyCEP       |
| 76      | DYD        | 245      |                  | sdaB,spd3 | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| 78      | ÜSY        | 203.1    | SpeC, SpeG, SpeJ |           | Mac, Sic                |

GAS izolatlarının M tiplerinden bağımsız olarak virölans faktörlerinin dağılımına göre kümelenme özelliklerini irdelediğimizde, 22 izolatın %100 benzer profile sahip her biri iki üyeli olan 11 kümede yer aldığı görüldü. C kümesinde yer alan iki hastanın hem aynı örnek türünün olması hem de emm ve virölans faktörlerinin benzer olması dikkat çekici bulunmuştur. D kümesinde farklı örneklerden izole edilen izolatların emm ve virölans faktörlerinin birbiri ile aynı olduğu, E-G-H-J-K kümelerinde yer alan izolatların ise sadece emm tiplerinin farklı olduğu görüldü. A-B-F-I kümelerinde yer alan izolatların ise virölans faktörlerinin birbiri ile benzer, emm tipi ve örnek türlerinin farklı olduğu tespit edildi(Tablo14-15-16).

**Tablo 14.** M tipinden bağımsız olarak Sags'lerin benzerliği dikkate alınarak virülans faktörleri benzerliğine göre izolatların küme analizi.

| Küme | Suş No | Örnek türü | emm tipi | Sags | Dnaze           | Proteaz                 |
|------|--------|------------|----------|------|-----------------|-------------------------|
| A    | 31     | ÜSY        | 1        | SpeC |                 | Sic, Mac                |
|      | 2      | ÜSE        | 28       | SpeC |                 | Sic, Mac                |
|      | 44     | ÜSY        | 1        | SpeC |                 | Mac, speB               |
| B    | 17     | ÜSE        | 28       | SpeC |                 | Mac, scpA, spyCEP       |
|      | 70     | ÜSY        | 28.5     | SpeC |                 | Mac, scpA, spyCEP       |
| C    | 14     | DYD        | 28       | SpeC |                 | Mac, scpA, spyCEP, speB |
|      | 15     | DYD        | 28       | SpeC |                 | Mac, scpA, spyCEP, speB |
|      | 43     | ÜSY        | 1        | SpeC |                 | Mac, spyCEP, speB       |
| D    | 16     | Balgam     | 28       | SpeC | sdaB            | Mac, scpA, spyCEP       |
|      | 11     | DYD        | 28       | SpeC | sdaB            | Mac, scpA, spyCEP       |
|      | 45     | ÜSY        | 1        | SpeC | sdaB            |                         |
|      | 46     | ÜSY        | 12       | SpeC | sdaB, sdc       |                         |
|      | 79     | ÜSY        | 89.31    | SpeC | Sdc             |                         |
| E    | 59     | ÜSY        | 89       | SpeC |                 |                         |
|      | 40     | ÜSY        | 1        | SpeC |                 |                         |
|      | 3      | DYD        | 28       | speM | sdc             | Sic, Mac, scpA, spyCEP  |
|      | 32     | ÜSY        | 1        | speM | sdc             | Sic, Mac                |
|      | 26     | ÜSE        | 3        | SpeG | sdaB,spd3, sdc  |                         |
|      | 85     | Balgam     | 219      | SpeG | sdaB, spd3      |                         |
|      | 55     | ÜSY        | 12       | SpeG | sdaB            |                         |
|      | 73     | ÜSE        | 212      | SpeG |                 | speB                    |
|      | 80     | ÜSY        | 6.19     | SpeG |                 |                         |
|      | 62     | ÜSY        | 118.5    | SpeJ | sdaB, sdc       | Mac, scpA, spyCEP, speB |
|      | 86     | Balgam     | 126      | SpeJ | sdaB, spd3, sdc | Mac                     |
|      | 3      | DYD        | 28       | speM | sdc             | Sic, Mac, scpA, spyCEP  |
|      | 32     | ÜSY        | 1        | speM | sdc             | Sic, Mac                |

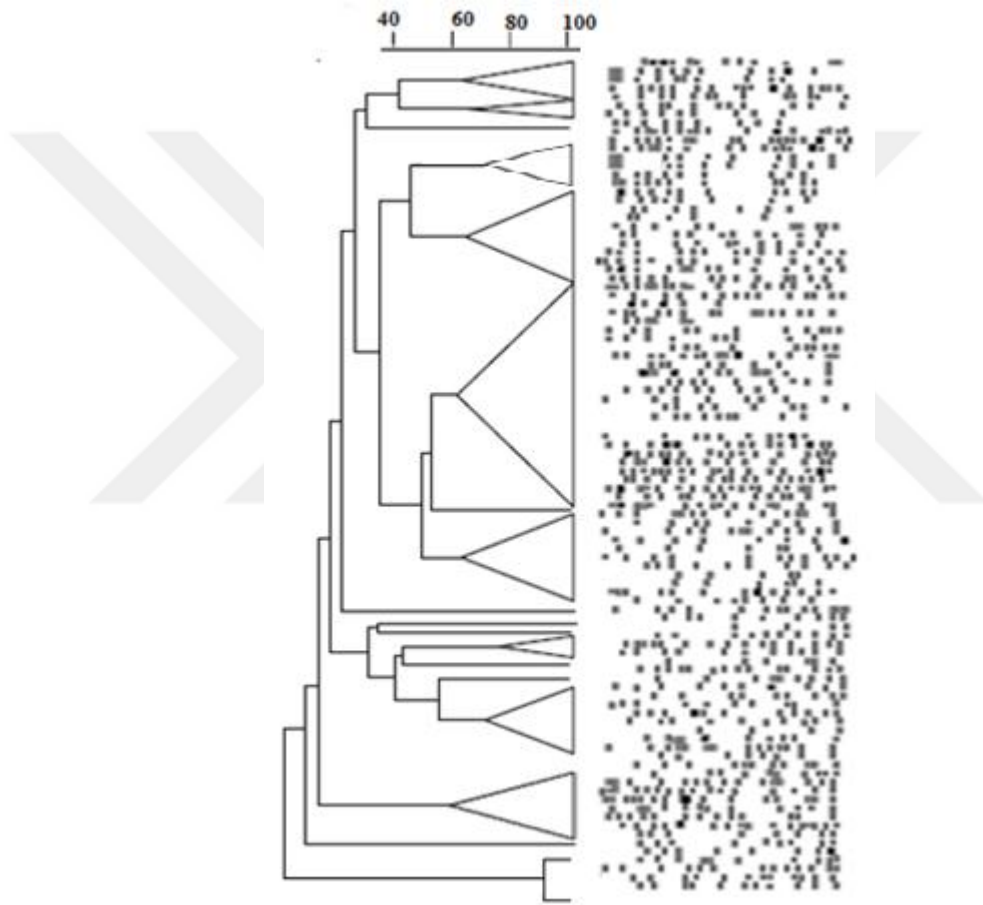
**Tablo 15.** M tipinden bağımsız olarak Sags'lerin benzerliği dikkate alınarak virülans faktörleri benzerliğine göre izolatların küme analizi.

| Küme | Suş No | Örnek türü | emm tipi  | Sags       | Dnaze           | Proteaz                 |
|------|--------|------------|-----------|------------|-----------------|-------------------------|
|      | 1      | Balgam     | 28        | SpeC, SpeJ | sdaB, sdc       |                         |
|      | 58     | Balgam     | 89        | SpeC, SpeJ | sdaB            |                         |
|      | 6      | Balgam     | 28        | SpeK, SpeG | sdaB, spd3      |                         |
|      | 35     | ÜSY        | 1         | SpeK, SpeG |                 |                         |
| F    | 12     | Balgam     | 28        | SpeI, SpeG |                 | Sic, Mac                |
|      | 41     | ÜSY        | 1         | SpeI, SpeG |                 | Sic, Mac                |
|      | 13     | ÜSE        | 28        | SpeI, SpeC |                 | Sic, Mac, scpA          |
|      | 42     | ÜSY        | 1         | SpeI, SpeC |                 | Mac, scpA               |
|      | 52     | ÜSY        | 12        | SpeI, SpeC | sdaB, spd3, sdc | Mac, scpA               |
| G    | 20     | ÜSE        | 3         | SpeC, SpeG |                 | Mac, scpA, spyCEP, speB |
|      | 47     | ÜSE        | 12        | SpeC, SpeG |                 | Mac, scpA, spyCEP, speB |
|      | 24     | DYD        | 3         | SpeC, SpeG | sdaB, spd3      |                         |
|      | 36     | ÜSY        | 1         | SpeC, SpeG |                 | Sic, Mac                |
| H    | 54     | ÜSY        | 12        | SpeC, SpeG | sdaB            |                         |
|      | 77     | ÜSY        | 244       | SpeC, SpeG | sdaB            |                         |
|      | 81     | ÜSY        | stG7882.3 | SpeC, SpeG |                 |                         |

**Tablo 16.** M tipinden bağımsız olarak Sags’lerin benzerliği dikkate alınarak virülans faktörleri benzerliğine göre izolatların küme analizi.

| Küme | Suş No | Örnek türü | emm tipi | Sags                   | Dnaze           | Proteaz                 |
|------|--------|------------|----------|------------------------|-----------------|-------------------------|
|      | 4      | YDY        | 28       | SpeC, SpeG, SpeA       | sdaB            | Mac, scpA, spyCEP, speB |
|      | 33     | DYD        | 1        | SpeC, SpeG, SpeA       | sdaB, sdc       | Mac, scpA, spyCEP, speB |
|      | 5      | YDY        | 28       | SpeI, SpeG, SpeH       | sdaB, spd3      | Mac, scpA, spyCEP, speB |
|      | 34     | ÜSY        | 1        | SpeI, SpeG, SpeH       | sdaB, spd3      |                         |
| I    | 7      | Balgam     | 28       | SpeC, SpeG, SpeJ       |                 | Mac, Sic                |
|      | 78     | ÜSY        | 203.1    | SpeC, SpeG, SpeJ       |                 | Mac, Sic                |
|      | 30     | ÜSY        | 1        | SpeC, SpeG, SpeJ       | sdaB, sdc       |                         |
|      | 39     | Balgam     | 1        | SpeC, SpeG, SpeJ       | spd3            | Mac, scpA, spyCEP, speB |
|      | 10     | YDY        | 28       | SpeG, SpeJ, SmeZ       |                 | Mac, scpA, speB         |
|      | 66     | YDY        | 2        | SpeG, SpeJ, SmeZ       | sdaB, spd3      | Mac, scpA, spyCEP, speB |
|      | 27     | ÜSY        | 3        | SpeG, SpeJ, SpeA       |                 | Mac, scpA, spyCEP, speB |
| J    | 28     | ÜSY        | 3        | SpeG, SpeJ, SpeA       | sdaB, spd3      | Mac, scpA, spyCEP       |
|      | 57     | ÜSY        | 12       | SpeG, SpeJ, SpeA       | sdaB, spd3      | Mac, scpA, spyCEP       |
|      | 56     | ÜSY        | 12       | SpeG, SpeJ, SpeA       |                 | Mac, scpA               |
|      | 63     | ÜSY        | 118.5    | SpeG, SpeJ, SpeA       | sdc             |                         |
|      | 8      | ÜSE        | 28       | SpeC, SpeG, SpeJ, SpeM |                 | Sic, Mac, scpA, speB    |
|      | 37     | ÜSY        | 1        | SpeC, SpeG, SpeJ, SpeM |                 | Mac, scpA               |
|      | 9      | ÜSE        | 28       | SpeG, SpeH, SmeZ, ssa  | sdaB spd3       |                         |
|      | 38     | ÜSY        | 1        | SpeG, SpeH, SmeZ, ssa  | sdaB            |                         |
| K    | 18     | Balgam     | 28       | SpeC, SpeG, SpeA, SpeM | sdaB, spd3, sdc |                         |
|      | 74     | Balgam     | 212      | SpeC, SpeG, SpeA, SpeM | sdaB, spd3, sdc |                         |
|      | 82     | ÜSE        | 11.1     | SpeC, SpeG, SpeA, SpeM | sdc             |                         |
|      | 23     | ÜSE        | 3        | SpeC, SpeG, SpeJ, SpeA | sdaB, spd3      | Mac, scpA, spyCEP       |
|      | 68     | ÜSY        | 241      | SpeC, SpeG, SpeJ, SpeA | sdaB, spd3      | Mac, scpA, spyCEP, speB |
|      | 75     | ÜSY        | 245      | SpeC, SpeG, SpeJ, SpeA | sdaB, sdc       | Mac, scpA, spyCEP, speB |

GAS izolatlarının filogenetik ilişkileri *smaI*-PFGE yöntemi ile değerlendirildi. Suşlar arası ilişki Dice benzerlik katsayısı kullanılarak  $\geq 80\%$  benzerlik oranı baz alındı ve küme analizi yapıldı. Benzerlik oranları dendrogram ile gösterildi. Bu bağlamda PFGE analiz değerlendirmesinde, iki üyeli olan iki izolat aynı hastanın farklı tarihlerde alınan yara kültürü izolatlarına ait olup % 95 benzerlik gösterdiği, 77 izolatın, en küçüğü 3 üyeli olmak üzere 9 küme içerisinde dağıldığı ve 7 örneğin ise tek üyeli olduğu ve izolatlar arasında anlamlı bir klonal ilişki bulunmadığı tespit edildi.



**Şekil 9.** PFGE sonucu elde edilen GAS izolatlarının filogenetik ilişkileri ve jel görüntüsü.

## 5. TARTIŞMA

Tonsillofarenjitin majör bakteriyel patojeni olan GAS'lar akut primer enfeksiyon dışında ARA, endokardid, nekrotizan fasiit ve glomerülofrit gibi ciddi komplikasyonlara da sebep olurlar. GAS'lar tarafından oluşturulan enfeksiyonlar ve enfeksiyon sonrası komplikasyonlar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı problemi olmayı sürdürmektedir. Yüksek morbiditenin yanı sıra mortalitenin de sebebi olan GAS suşlarının enfeksiyonların prognozunu etkileyen virülans faktörleri, toksin yapıları ve emm tipleri gibi genetik özelliklerini hedef alan çalışmaların sayısı gittikçe artmaktadır.

Bizde çalışmamızda farklı klinik örneklerden izole edilmiş GAS suşlarında virülans ile ilişkilendirilen toksin genleri ve emm tiplerinin hastalıklar ile ilişkideki rolü ve toksin eksprese etme özelliklerini araştırmayı amaçladık. Çalışma sonunda bölgesel baskın emm tipleri ve virülans faktör profilleri hakkında bilgi birikimimizi artırmayı ve baskın emm genotiplerinin mevcudiyeti halinde ileride yapılacak bölgesel aşı çalışmalarına ışık tutmayı amaçladık.

Çalışmamızda, toplanan 97 izolatın GAS suşunun sadece 86'sında emm-PCR ile **emm** pozitifliği bulunmuştur. **emm** pozitif izolatlarının genotiplendirmesinde 7'si emm subtip olmak üzere suşların 22 (%25.58) farklı ( 28, 1, 12, 3, 89, 2, 244, 212, 219, 163, 245, 241, 196, 118.5, 11.1, 1.65, 203.1, 89.31, 108.1, 6.19, 28.5, stG 7882.3) emm tipi içerisinde toplandıklarını tespit ettik. emm tiplerinin prevalansını irdelediğimizde en yaygın görülen tiplerin sırası ile emm28 (%22.09), emm1 (%18.60), emm12 (13.95), emm3 (%11.62) ve emm89 (%3.48) olduğu gördük. Karaky N. ve arkadaşlarının yaptığı tez çalışmasında 150 *S. pyogenes* izolatının 5'i tiplendirilmemiş ve 145 izolatın emm tiplendirilmesinde 41 farklı emm türü belirlenmiştir. En yaygın emm türlerinin ise emm89 (% 16), emm12 (% 10), emm2 (% 9) ve emm1 (% 8) olduğunu bildirmişlerdir<sup>187</sup>.

Smit P.W. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2008–2013) 5 yıllık bir periyotta topladıkları 1122 invaziv GAS izolatının 72 farklı emm türü içerisine dağıldığını, en sık rastlanan emm tiplerinin de emm28 (297 izolat,% 26), emm89 (193 izolat,% 12) ve emm1 (132 izolat,% 12) genotipleri olduğunu belirtmişlerdir<sup>188</sup>.

Meisal R. ve arkadaşları da Norveç'te yaptıkları ve 292 GAS izolatını tiplendirdikleri çalışmalarında izolatların 29 emm tipi ve 37 emm subtipi ile ilişkili olduğunu tespit etmişler ve en yaygın görülen emm tiplerinin emm28 (%19.5), emm1 (%14.1), emm82 (%14.1), emm12 (%11.8), emm4 (%8.0), emm3 (%6.1), emm87 (%5.7), emm89 (%4.6), ve emm6 (%4.2) olduğunu bildirmişlerdir<sup>129</sup>.

Brezilya'da Tartof S.Y. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, 238 GAS izolatında 61 farklı emm türü tanımlanmış ve emm12, emm1 en sık görülen tipler olduğu bildirilmiştir<sup>189</sup>. Gowda K.L. ve arkadaşları da Hindistan, Bangalore'de yaptıkları bir çalışmada 60 GAS izolatının emm tiplerini araştırmışlardır. Bu grup test suşlarının 35 emm tipine dağıldığını tespit etmişler ve en yaygın görülen tipin emm12 olduğu belirtmişlerdir<sup>190</sup>. Güney Tayvan'da 1994 ile 2008 yılları arasında National Cheng Kung hastanesinden toplanan 677 *S. pyogenes* izolatının emm tiplerinin çalışan Chiang-Ni C. ve arkadaşları, suşların 44 farklı emm türü içerisine dağıldıklarını ve tüm izolatların % 61.4'ünden sorumlu olan emm12 (161, %23.8), emm4 (107, %15.8), emm1 (82, %12.1), emm11 (43, % 6.4) ve emm81 (23, % 3.4), tiplerinin olduğunu belirtmişlerdir<sup>191</sup>.

Ülkemizde Akça G. ve arkadaşlarının Ankara (2006)'da yaptıkları bir tez çalışmasında boğaz sürüntü örneklerinden izole edilen 114 *S.pyogenes* izolatında 91'inde emm tipi belirleyebilmişlerdir. Bu çalışmada en sık görülen tiplerin 12, 3 ve 1 olduğu ancak daha az olmak üzere 4, 6, 9, 11, 14, 18, 22, 24, 29, 33, 43, 48, 75, 77, 78, 89, 90, 102, 111, 112 ve 118 emm tiplerinin tanımlandığını rapor etmişlerdir<sup>192</sup>. Yine Çakmak A. ve arkadaşları (2009) yaptıkları bir tez çalışmasında; 61 GAS izolatının emm tiplerini araştırmışlar ve suşların 1, 2, 3, 4, 5, 12, 14, 19, 22, 26, 28, 44, 63, 76, 77, 87, 89, 98 ve 188 olmak üzere 19 farklı emm tipine ait olduklarını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu grup sırası ile emm 1, 3, 4 ve 5 tiplerinin baskın olduğunu belirtmişlerdir<sup>5</sup>. Benzer şekilde Mengeloğlu F.Z. ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer tez çalışmasında ise 139 GAS izolatı çalışılmış ve suşların 112'sinde emm tipinin tespit edilebildiği rapor edilmiştir. Bu grup suşların; emm1, emm2, emm3, emm3.1, emm4, emm5, emm5.7, emm11, emm12, emm18, emm24, emm28, emm28.9, emm44, emm71, emm75, emm77, emm78.3, emm85, emm89 ve emm118 olmak üzere 21 emm tipi içerisine dağıldıklarını, dominant emm tiplerinin de sırası ile emm12, emm89, emm1, emm77, emm4 ve emm3 olduğunu belirtmişlerdir<sup>193</sup>.

Bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz emm genotip sayısı çalışmaya dahil edilen suş sayısı ile kıyaslandığında çok dağınık bir emm tipi profiline sahip olduğumuz kanısı uyanmaktadır. Ancak gerek yurt dışı gerekse yurt içinde yapılmış emm tipi profil analizini amaçlayan benzer çalışmalarda test suşları sayısı ile elde edilen emm tipi sayıları bizim bulgularımıza son derece benzerlik göstermektedir. Mesela bizim emm tipine düşen ortalama suş sayımız 3.9 (22/86) olarak gerçekleşti. Yani oldukça heterojen bir emm tipi profili tespit ettik. Ancak literatür değerlendirmesi sonucunda Tartof SY. ve arkadaşlarının 238 izolat ile yaptıkları çalışmada emm tipine düşen ortalama suş sayıları bizimki gibi 3.9 iken, Ankara’da tez çalışması olarak yapılan Akça G. ve arkadaşlarının sonuçlarına göre 3.8 (91/114) Karakay N. ve arkadaşlarının elde ettikleri 3.58 (45/141) ve Çakmak A. ve arkadaşlarının 3.2 (19/61)’lik bulguları ile son derece benzerlik göstermiştir. Yine Meisal R. ve arkadaşlarının 4.42 (66/291) ve Mengeloğlu Z. ve arkadaşlarının 5.3’lük (21/112) bulguları bizim bulgumuzdan yüksek ancak yakındır. Buna karşılık Gowda KL. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada elde edilen emm tipine düşen ortalama suş sayısı 1.71 (35/60)’dır. Bu bizim 3.9’luk suş sayımızdan oldukça düşüktür. Yani bu çalışmada emm tipi dağılımı bize göre daha heterojendir. Farklı bir sonuç olarak Chiang-Ni C. ve arkadaşlarının emm tiplerine dağılan ortalama suş sayıları da 15.38 (677/44)’dür<sup>189,192,5,129,193,190,191</sup>. Bu sonuç bizim sonucumuzda dahil emm tiplendirilmesi yapılan bütün çalışmalara göre bu grubun değerlendirdiği GAS suşlarının çok daha homojen emm kümelenmesi gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Genellikle emm tipi çeşitliliği tip farkı gözetmeksizin tipe düşen suş sayısı bağlamında değerlendirildiğinde elde edilen sayılar benzerlik göstermiştir. Ancak özellikle üst solunum yolları enfeksiyonları ve enfeksiyon etkenlerinin tür ve insidansının belirlendiği çalışmalarda; çalışmanın yapıldığı hasta grubunun yaşı, cinsiyeti, altta yatan hastalık, ailede fert sayısı ve en önemlisi örneklerin toplandığı periyodun mevsim özelliklerindeki değişkenlikler insidans oranlarını etkiler. Genel ortalamanın üstünde heterojenlik tespit eden Gowda K.L. ve arkadaşları ile daha homojen dağılım bildiren Chiang-Ni C. ve arkadaşlarının değerlendirdiği örneklerin yukarıda bahsedilen ve sonuçları etkilemesi beklenen epidemiyolojik özellikleri bilinmemektedir<sup>190,191</sup>.

Bizim çalışmamızda suşların izole edildiği klinik örnekler bakımaksızın genel olarak en sık tespit ettiğimiz emm genotipleri; emm28 (%22.09), emm1 (%18.60), emm12 (%13.95) ve emm3 (%11.62) idi. Karakay N. ve arkadaşları ise sıklık sırasına

göre emm89 (% 16), emm12 (% 10), emm2 (% 9) ve emm1 (% 8)'un baskın tipler olduğunu bildirmişlerdir<sup>187</sup>. Smit P.W. ve arkadaşları en sık rastlanan emm tiplerinin emm28 (% 26), emm89 (% 12) ve emm1 (% 12) genotipleri, Meisal R. ve arkadaşları; emm28 (%19.5), emm1 (%14.1), emm82 (%14.1), emm12 (%11.8), genotipleri, Chiang-Ni C. ve arkadaşları; emm12 (% 23.8), emm4 (%15.8), emm1 (%12.1), emm11 (% 6.4) genotiplerinin baskın genotipler olduğunu bildirmişlerdir<sup>129,191</sup>. Bizim baskın emm genotipimiz emm28 olup Smit P.W. ve Meisal R.'nın sonuçlarında da aynı genotip sırası ile % 26 ve 19.5 olarak tespit edilmiştir<sup>188,129</sup>. Bizim %22.9'luk emm28 oranımız bu iki çalışmada elde edilen oranlar ile benzerdir. Oran belirtilen diğer iki çalışmada emm28 ilk dört baskın genotip arasında yoktur. Bizim ikinci sıklıkta bulduğumuz emm1(%18.60) oranımız Meisal R. ve arkadaşlarının bu genotip için %14.1'lik oranından daha yüksek olmasına karşılık, bu grup tarafından emm1'in bizim bulgularımızda olduğu gibi en sık karşılaşılan ikinci genotip olması dikkat çekicidir<sup>129</sup>. emm1 genotipi Smit P.W. ve Chiang-Ni C.'nin çalışmalarında 3. sıklıkta tespit edilen genotip olmuş ve görülme oranları Meisal R.'nın oranına benzer, sırası ile %12 ve %12.1, olarak rapor edilmiştir<sup>188,129</sup>. Karaky N. ve arkadaşlarının çalışmalarında ise bu genotip %8'lik görülme oranı ile 4. sırada yer almıştır<sup>187</sup>. Bizim 3. sıklıkta tespit ettiğimiz emm12(%13.95) ise Chiang-Ni C.'in bulguları arasında % 23.8 ile ilk sırada, Karaky N.'in bulguları arasında %10'ile 2. ve Meisal R.'nin bulguları arasında da %11.8'lik oran ile 4. sıklıkta bildirilmiştir<sup>191,187,129</sup>. Bizim ilk 4 sıra da yer alan emm tiplerimiz değişen oranlar ve sıralamada olmak üzere bu 4 çalışmada da ilk 4 içerisinde yer almaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da en sık tespit edilen emm tipi içerisinde emm1 ve emm3 bütün çalışmalarda ilk 4 içerisinde yer alırken, emm12'de 1,ve 3 ile birlikte bir çalışmada ilk 4 içerisinde bildirilmiştir. Böylece literatür değerlendirmeleri sonucunda; oran farklılıkları görülmekle birlikte, sırası ile emm1, emm3, emm12 ve emm28 genotiplerinin genel olarak baskın emm genotipler olduğu söylenebilir. Yukarıda bahsedilen epidemiyolojik sebepler ile farklı coğrafi bölgelerde farklı periyotlarda insidans oranlarında farklılıklar bekleneceği gibi, aynı coğrafi bölgede farklı periyotlarda yapılan çalışmalarda bile farklı genotip insidans sonuçlarının alınması doğaldır. Nitekim ABD'de O'Brien K.L. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, 1995-1999 yılları arasındaki 4 yıllık bir periyotta emm tiplendirmesi yapılan 1586 GAS suşunda en sık görülen5 emm tipinin; emm1 (%20.8) , emm28 (%9.2) , emm12 (%7.6), emm3 (%7.1) ve emm11 (%4.5) olduğu, aynı bölgede

O'Loughlin R.E. ve arkadaşlarının 2000-2004 yılları arasındaki yine 4 yıllık bir periyotta topladıkları 4349 GAS izolatu arasında en sık tespit edilen emm genotiplerinin; emm1 (%22), emm3 (%9), emm28 (%9), emm12 (%9) ve emm89 (%6) olarak tespit edildiği bildirilmiştir. Bu iki çalışmada oranlar ve sıralarda değişiklik olduğu ilk çalışmada ilk 5 içerisinde tespit edilmeyen emm89'un ikinci çalışmada insidansının arttığı vurgulanmıştır<sup>194,195</sup>.

Benzer şekilde Atina'da, Koutouzi F. ve arkadaşları tarafından 2003-2006 ve 2007-2013 olmak üzere farklı dönemde yapılan çalışmada emm tiplerinin dağılımının farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Bu grup ilk periyot boyunca emm12, emm4, emm5 ve emm61 tiplerinin prevalan olduğunu, ikinci periyotta ise emm89, emm75 ve emm11 tiplerinin prevalan olduğu bildirilmiştir<sup>196</sup>. Yine Smit P.W. ve arkadaşları 2008-2013 yılları arasında yaptıkları çalışmada emm genotiplerinin yıllara göre dağılımını da rapor etmişlerdir. Bu grup 2008 yılında en sık tespit ettikleri emm84, 1.10, 110.1 tiplerinin 2013 yılında topladıkları GAS suşları arasında bulamadıklarını, 2012 yılının invaziv GAS insidans artışın olduğunu ve bu enfeksiyonlardan izole ettikleri suşlar arasında ilk sıraları emm89 ve emm28 genotiplerinin aldığını emm89 tipinin 2008 ve 2013 yıllarında toplanarak değerlendirilen GAS suşları arasında düşük oranda görüldüğünü bildirmişlerdir<sup>188</sup>.

Bu sonuçlar epidemiyolojik değişkenlere bağlı olarak emm genotiplerindeki sayı, sıra ve genotip insidansındaki değişimlerin beklenmesi gerektiği kanısını doğrulamaktadır. İleride bölgemizde yapılacak uzun soluklu çalışmalar ile bu değişkenliğin sorgulanması emm genotiplerinin epidemiyolojik özelliklerinin tespitinde daha gerçekçi sonuçlar üretilmesini sağlayacaktır. Elde edilecek bilgiler de GAS enfeksiyonlarından korunmak, invaziv sekelleri azaltmak için GAS'a karşı etkili aşı geliştirmesine yönelik yürütülen çalışmalara ışık tutacaktır. Halen GAS'ın majör virülans faktörü olan M proteinini hedef alan 26 ve 30 aş valanlı aşılar üzerinde saha çalışmaları sürdürülmektedir. Yirmialtı valanlı aşının içerisinde emm24, emm5, emm6, emm19, emm29, emm14, emm1, emm12, emm28, emm3, emm1.2, emm18, emm2, emm43, emm13, emm22, emm11, emm59, emm33, emm89, emm101, emm77, emm114, emm75, emm76 ve emm92 tiplerine ait proteinler bulunmaktadır<sup>81</sup>. Çalışmamızda tanımladığımız 22 farklı emm tipi içerisinde bulunan emm 28, 1, 12, 89, 3 ve 2 tipleri 26 valanlı aşı grubunda yer almaktadır. Bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz 86 suşun 73'ü (%84.88) 26 valanlı aşı içerisinde yer almakta, 13

suşumuz ise bu aşı içerisinde yer alan emm genotipleri dışında bulunmaktadır. Kısaca 26 valanlı aşı bizim suşlarımızın % 84.88'ine karşı koruyucu immunité sağlama potansiyelindedir. Akça G. ve arkadaşları 26 valanlı aşının çalışmalarında kullandıkları ve emm genotip tayini yaptıkları izolatların toplamda % 76.9'una, Çakmak A. ve arkadaşları % 77'sine, Mengeloğlu Z.F. ve arkadaşları da Çakmak A. ve arkadaşlarına oldukça benzer şekilde % 77.7'sine karşı koruyucu immün cevap oluşturabilme potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir<sup>192,5,193</sup>. Bu sonuçlara göre ülkemizde yapılan çalışmalarda klinik materyallerden izole edilen GAS emm genotipleri içerisinde bizim bölgemizden izole ettiğimiz suşların 26 valanlı aşı ile immunizasyona diğer iki bölge suşlarına karşı daha yüksek oranda cevap verebileceğini ortaya koymuştur. Arjantin'de yapılan benzer bir çalışmaya ait sonuçlarını rapor eden Lopardo HA. ve arkadaşları çalışmalarında kullanımdaki 26 valanlı aşının, emm genotip tayini yaptıkları 55 izolattın 36'sına karşı, yani % 66.7'sine karşı koruyucu immün cevap oluşturabilme potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir<sup>197</sup>. Shulman S.T. ve arkadaşları ABD'de çalışmalarında aynı aşının tespit ettikleri emm genotipleri dikkate alındığında bölgesel suşların % 86'sına karşı etkili bir cevap oluşturabilme yeteneğinde olduğunu tespit etmişler ve yayınlamışlardır<sup>198</sup>. Yani ABD'den bildirilen 26 valanlı aşının potansiyel immün cevap oluşturma yeteneği bizim sonuçlarımıza veya beklentimize benzerken Arjantin'de bildirilen sonuç, yani koruyucu immün cevap beklenti oranı bizden azda olsa düşük bulunmuştur. Bu veriler, bölgelere göre emm genotipleri dağılımında görülen farklılıkları yansıtmakla beraber aşı geliştirme politikaları belirlenirken bölgesel suşların dikkate alınarak yerel modifikasyonlar yapılmasının önemini de ortaya koymaktadır.

Streptokokal Sags'ler enfeksiyon ve patogeneizindeki rolü hakkındaki bilgiler yıllar içinde genişlemiştir. Bu sebeple, Sags genlerinin dağılımı, genomik heterojenliği ve toksin geni enfeksiyon ilişkisini daha ayrıntılı araştırmak için epidemiyolojik bir araç olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda GAS suşlarında SAgS tipleri, Dnaze, proteaz gibi virülans genlerinin tespiti ve prevalansını incelediğimizde; en prevalan Sags tipinin SpeG olduğu, bunu ikinci sıklıkta SpeC'nin izlediği, SpeL geninin ise hiçbir izolatta bulunmadığı, Dnaze faktörlerinden en sık sdaB genin bulunduğu, buna karşılık sdaD geni hiçbir izolatta tanımlanmadığı ve proteaz faktörlerinden mac geninin en prevalan olduğu, en az ise sic geninin bulunduğu tespit edildi.

Rantala S. ve arkadaşları GAS enfeksiyonlarının invazyon yeteneklerinde Sags rolünün emm tiplerine kıyasla çok daha önemli olduğunu iddia etmişlerdir. Bu grup çalışmalarında yedi önemli Sags gen profili tespit etmişler, bu profillerin; izolatların % 11'inde "SpeB, SpeG" % 7'sinde "SpeB, SpeK" ve % 5'inde de "SpeB, SpeG, ssa" kombinasyonu şeklinde görüldüğünü, baskın profillerin de, puerperal sepsis ve selülit olgularından izole edilen emm12 ve emm89 genotiplerinde prevalan olduğunu bildirmişlerdir<sup>199</sup>.

Strus M. ve arkadaşları da 48'i invaziv, 205'i de non invaziv enfeksiyonlardan izole edilmiş toplam 253 izolatta 23 farklı emm tipi tespit etmişler ve invaziv enfeksiyonlardan en sık emm28, emm1 genotiplerini, üst solunum yolu enfeksiyonları gibi non invaziv enfeksiyonlardan ise emm1, emm12, emm2 ve emm28 tipini genotiplerine ait suşların daha prevalan olduğunu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. İnvaziv enfeksiyonlardan izole edilen suşlarda en prevalan Sags tiplerinin; SpeF, SpeG ve SpeB olduğunu bunları daha az olmakla birlikte SpeL ve SpeM genlerine sahip suşların izlediğini, non invaziv enfeksiyonlardan izole edilen suşlarda ise en prevalan süperantijen genotiplerinin speF, speB ve speG, en az tespit edilen tiplerin ise ssa ve speL genotipler olduğunu rapor etmişlerdir<sup>200</sup>.

Otlu B. ve arkadaşları Malatya'da 134 GAS izolatının 123'ünde emm genotiplendirmesi yaptıkları çalışmalarında 20 farklı emm tipi tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmada en sık tespit ettikleri emm tiplerinin emm1 (%30.9), emm12 (%14.6), emm89 (%8.1), emm118 (%7.3) ve emm4 (%5.7) olduğunu bildirmişlerdir. Toplam 25 (%18.6) izolatta Sags geni bulduklarını, bunların 11(%8.2)'inde speA, 12(%8.9)'sinde speC ve ikisinde (%1.5) ise her iki genin birlikte bulunduğunu rapor etmişlerdir<sup>201</sup>.

Friaes A. ve arkadaşları da GAS suşlarında Sags genotiplerini araştırdıkları bir çalışmada GAS klinik izolatlarında en sık görülen süperantijenlerin smeZ, speG ve speC genlerinin olduğunu bir izolatta da speF geninin bulunduğunu bildirmişlerdir<sup>202</sup>.

Imöhl M. ve arkadaşları 2009-2014 yılları arasında topladıkları 719 invaziv GAS izolatının süperantijen, emm tiplerinin dağılımı ve epidemiyolojik özelliklerini irdeledikleri çalışmalarında en yaygın görülen emm tiplerinin, emm1 (% 31.8), emm28 (% 15.4) ve emm89 (% 14.5) olduğu, en yaygın Sags genlerinin ise speG (% 92.1), speJ (% 50.9) ve speC (% 42.0) olduğunu bildirmişlerdir<sup>203</sup>.

Mengeloğlu Z.F., speA, speB, speC, speG, smeZ olmak üzere sadece 5 virülans faktörünü araştırdıkları çalışmada speB'nin tüm izolatlarda bulunduğunu, bunu sıklık sırasına göre speG, speC, speA ve smeZ genlerinin izlediğini bildirmiştir. Bununla birlikte 139 izolatın altısında PFGE profili belirlenememiş, kalan 133 izolat için 61 ayrı profil tespit etmişlerdir. PFGE ile 133 izolatın, eleman sayısı 2-9 arasında değişen 33 küme oluşturduğu, 28 izolatın da özgül profile sahip olduğunu gözlemlemişlerdir<sup>193</sup>.

Karaky N. ve arkadaşları, 140 GAS izolatında emm genotiplerinin tespitinin yanı sıra Sags gen profillerini de irdelemiş ve izolatların % 87'sinde speB'nin görüldüğünü bunu ssa (% 36) ve speG (% 30) genlerinin izlediği bildirmişlerdir. Bu bulguların farklı coğrafik bölgelerde yapılan benzer çalışmalarda elde edilen bulgular ile büyük oranda homojenlik gösterdiğine dikkat çekmişlerdir. Diğer taraftan çalışmada değerlendirdikleri suşların, %80 benzerlik oranını baz alarak yaptıkları PFGE ile klonal ilişkilerinin analizinde, suşların birden fazla izolat içeren dört üyeli grupların bulunduğu 39 farklı pulsetip sergilediği ve izolatlar arasındaki yüksek genetik heterojenliğini ortaya koymuşlardır<sup>204</sup>.

Çalışmamızda prevalan olarak tanımladığımız Sags'lerin, Imöhl M. ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzer olduğu, diğer çalışmalarda tanımlanan virülans faktörleri ile de uyumlu olduğunu gördük.

Bizim en önemli sonuçlarımızdan birisi de yumuşak doku enfeksiyonu ile tedavide cevap alınamayan bir hastadan iki ay süre ile alınan doku örneklerinden izole edilen GAS suşlarının sergilediği virülans faktörleri profilleri idi. İlk izolat emm28.5 alt genotipine aitti ve SpeC süperantijeni ile Mac, scpA, spyCEP proteaz genlerine sahipti. Aynı hastadan reaktivasyon/reenfeksiyon da 2 ay sonra alınan örekte üretilen ikinci izolat ise emm28 genotipine aitti ve SpeC, sdaB, Mac, scpA, spyCEP genlerine sahipti. Bu iki suşun PFGE analizinde ise suşların %95 benzerlik oranı ile yakın ilişkili oldukları tespit edildi. İki ay gibi kısa sürede ilk izolatın gösterdiği M proteini modifikasyonu ve bakteriyofaj aracılığı ile sdaB genin kazanılması ile aslında immün sistemden kaçmada virülans faktörlerinde görülen modifikasyonların veya kazanımların ne kadar önemli olduğunu gösteren önemli bir bulgu olarak değerlendirildi. Yani bu hastada bir reenfeksiyon değil bir reaktivasyon olduğu düşünüldü. Bir başka dikkat çekici sonucumuzda bir hastanın ÜSY ve DYD bölgesinden izole edilen izolatların farklı emm tipi ve diğer virülans faktörleri profili göstermesi idi. DYD enfeksiyonundan izole edilen suşun profili; emm245, sdaB, spd3, Mac, scpA, spyCEP,

speB şeklinde iken ÜSY enfeksiyonundan izole edilen suşun profili; emm203.1, SpeC, SpeG, SpeJ, Mac, Sic şeklinde idi. Bu bulgu aynı hastada farklı lokalizasyonlarda farklı emm tipi ve virülans faktörleri profiline sahip farklı suşlar görülebileceğinin en önemli delillerinden birisidir.

PFGE analizi ile yaptığımız klonal ilişki değerlendirmesinde, %95 benzerlik oranı ile yakın ilişkili bulunan ve yukarıda anlatılan aynı hastaya ait iki suşun oluşturduğu, küme dışında kalan 77 suşun en küçüğü 3 üyeli olan 9 küme içerisinde toplandıkları, kalan 7 suşunda tek üyeli kümelere dağıldıkları görüldü. PFGE analizi, Karaky N. ve Mengeloğlu Z.F'nin yaptıkları çalışmalarda olduğu gibi, izolatlar arasında anlamlı bir klonal ilişkinin olmadığını gösterdi.



## 6. SONUÇ

Klinik örneklerden izole edilerek laboratuvarımıza gönderilen 103 GAS izolatının emm genotipi, SAgS tipleri, Dnaze, proteaz gibi virölans genlerinin tespiti ve prevalansı ile izolatlar arasındaki filogenetik ilişkinin irdelendiği çalışmamız sonunda;

1. Laboratuvarımızda fenotipik yöntemler ile yapılan doğrulama sonucunda suşlardan 97'sinin GAS olarak tanımlandığı, bu bağlamda laboratuvar yöntemleri arasında standardizasyon problemlerinin olabileceği,
2. emm-PCR sonucunda bu 97 suş içerisinde 86'sında (%88.66) **emm** pozitif bulunduğu, yani bölgemizdeki GAS suşlarında %11.34'ünde **emm** tespit edilemedi. Bu oranın M proteininin hedefleyem aşılardan izolatların %11.34'ünde başarısız olabileceği,
3. CDC databazı kullanılarak yapılan 86 suşun emm tiplendirmesinde 7'si emm subtip olmak üzere 22 (%25.58) farklı ( 28, 1, 12, 89, 3, 2, 244, 212, 219, 163, 245, 241, 196, 118.5, 11.1, 1.65, 203.1, 89.31, 108.1, 6.19, 28.5, stG 7882.3) emm tipinin bulunduğu ve en prevalan tiplerin sırası ile emm28, emm1, emm12, emm3 ve emm89 olduğu, 26 valanlı kullanımdaki aşının emm analizine göre izolatlarımızın sadece %84.88'ünü karşıladığı, yapılacak aşı çalışmalarında dışarıda kalan emm genotiplerinin yer almasının önemli olacağı,
4. Suşlar arasındaki klonal ilişkinin PFGE analiz değerlendirmesinde, kısa ve uzun soluklu salgın analizinin yapılabileceği,
5. SAgS tipleri, Dnaze'lar ve proteaz genlerinin analizinin salgın tespitinin yanı sıra prognostik öneme sahip olduğu ve bu sebeple daha geniş hasta gruplarında benzer virölans gen analizlerini yapımının gerekli olduğu kanısına varılarak,

Ülkemizdeki GAS virölans faktörlerinin profillerinin belirlenmesi, genetik ilişkilerinin belirlenmesi ve hasta klinik öyküsü ile virölans faktörlerinin birlikte değerlendirilmesinin gerek aşı çalışmaları gerek prediktif rehberler oluşturulması gerekse salgın analizi yönünden önemli olduğu, bu ön çalışmanın daha geniş vaka grupları ve hasta sayısı ile devam ettirilmesinin faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. **Paluscio E.**, Adaptive Mechanisms of Niche Remodeling in *Streptococcus pyogenes*. *Washington University in St. Louis*. **2015**; 2-4
2. **Cunningham M.** Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* **2000**; 13:470-511.
3. **Bessen, D.E. et al.** Relationships between emm and multilocus sequence types within a global collection of *Streptococcus pyogenes*. *BMC Microbiol.* **2008**; 8, 59.
4. **Chatellier S, Ihendyane N, Kansal RG, Khambaty F, Basma H, Norrby-Teglund A, Low DE, McGeer A, Kotb M.** Genetic relatedness and superantigen expression in group A streptococcus serotype M1 isolates from patients with severe and nonsevere invasive diseases. *Infection and Immunity.* **2000**; 68(6):3523-3534.
5. **Çakmak A.** İstanbul'da 2007-2009 döneminde çocuk hastaların boğaz kültürlerinden izole edilen A grubu beta hemolitik streptokokların M proteini (emm) geni tiplendirilmesi. *İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanlık Tezi.* **2009**.
6. **CDC** (Centers for Disease and Prevention). <https://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strepblast.asp>
7. **Ana Friaes, Francisco R Pinto, Catarina Silva-Costa, Mario Ramirez, Jose Melo-Cristino and The Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections.** Group A streptococci clones associated with invasive infections and pharyngitis in Portugal present differences in emm types, superantigen gene content and antimicrobial resistance. *BMC Microbiology.* **2012**; 12:280.
8. **Olive C, Schulze K, Sun HK.** Enhanced protection against *Streptococcus pyogenes* infection by intranasal vaccination with a dual antigen component M protein/SfbI lipid core peptide vaccine formulation. *Vaccine.* **2007**; 25:1789-1797.
9. **Johnson DR, Kaplan EL, VanGheem A.** Characterization of group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*): correlation of M-protein and emm-gene type with T-protein agglutination pattern and serum opacity factor. *J Med Microbiol.* **2006**; 55:157-164.
10. **Lancefield, R. C.** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **1933**; 57:571-595.
11. **Murray, P. R., K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller.** *Streptococcus*. In *Medical Microbiology*, 6th ed. Mosby, Inc., Missouri. **2009**; Chapter 22:, p. 225-242.
12. **Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P.** Gram Positive Cocci: Part 2: Streptococci, Enterococci and the "Streptococcus-Like" Bacteria: Ed: Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P. *Koneman's Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Edition. Lippincott Williams and Wilkins Company, USA.* **2006**; pp.305-391.
13. **Spellerberg B, Brandt CEd: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Jorgensen JH.** *Streptococcus. Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC, USA. **2007**; 9th Edition. pp.412-430,
14. **Levinson W, Jawetz E.** *Medical Microbiology and Immunology. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, USA.* **2000**; 6th Edition, pp. 85-95,
15. **Cengiz T. Ed.: Ustaçelebi Ş.** *Streptococcus. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara.* **1999**; s.349-363.

16. **Todar' s Online Textbook of Bacteriology**, <http://www.textbookofbacteriology.net/streptococcus>, (Eriřim tarihi 21.05.2010)
17. **Cole JN, Barnett TC, Nizet V, Walker MJ**. Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. *Nature Reviews Microbiology*. **2011**; 9:724–736.
18. **Olsen RJ, Musser JM**. Molecular pathogenesis of necrotizing fasciitis. *Annual Review of Pathology*. **2010**; 5:1–31
19. **Tart, A. H., M. J. Walker, and J. M. Musser**. New understanding of the group A Streptococcus pathogenesis cycle. *Trends Microbiol*. **2007**; 15:318–325.
20. **Carapetis JR, Steer A. C., Mulholland E. K., Weber M**. The global burden of group A streptococcal diseases. *The Lancet Infectious Diseases*. **2005**;5(11):685– 694.
21. **Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA**. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; [Cited: 2nd September]. P. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333417/>.**2016**; 384
22. **CDC** (Centers for Disease and Prevention). <https://www.cdc.gov/groupastrep/surveillance.html>
23. **Ebell MH, Smith MA, Barry HC, Ives K, Carey M**. The rational clinical examination. Does this patient have strep throat? *JAMA*. **2000**; 284(22):2912–2918
24. **Danchin MH, Rogers S, Kelpie L, Selvaraj G, Curtis N, Carlin JB, et al**. Burden of acute sore throat and group A streptococcal pharyngitis in school-aged children and their families in Australia. *Pediatrics*. **2007**; 120(5):950–957.
25. **Shaikh N, Leonard E, Martin JM**. Prevalence of streptococcal pharyngitis and streptococcal carriage in children: a meta-analysis. *Pediatrics*. **2010**;126(3):e557–e564.
26. **Wessels MR. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors**. Pharyngitis and Scarlet Fever. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center. **2016**; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333418/>.
27. **Bisno AL, Stevens DL**. Streptococcus pyogenes. Ed: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Disease. 6th Edition*. Philadelphia. Churchill Livingstone, USA. **2005**; 2362–2379.
28. **Bisno AL**. Group A streptococcal infections acute rheumatic fever. *New England Journal of Medicine*. **1991**; 325:783-93.
29. **Marijon E, Mirabel M, Celermajer DS, Jouven X**. Rheumatic heart disease. *Lancet*. **2012**;379:953–964.
30. **Mahe A, Hay RJ**. Epidemiology and management of common skin diseases in children in developing countries. *Geneva:World Health Organisation*; **2005**.
31. **Bowen AC, Mahe A, Hay RJ, Andrews RM, Steer AC, Tong SY, et al**. The global epidemiology of impetigo: a systematic review of the population prevalence of impetigo and pyoderma. *PLoS One*. **2015**; 10
32. **Stevens DL, Bryant AE. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors**. Severe Group A Streptococcal Infections. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center. **2016**; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333425/>

33. **Söyletir G, Över U, Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M.** Beta Hemolitik Streptokoklar. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Kitabevi, Ankar.* s. 478-1487, 2002.
34. **Vlaminckx BJ, Mascini EM, Schellekens J, Schouls LM, Paauw A, Fluit AC, Novak R, Verhoef J, Schmitz FJ.** Site-specific manifestations of invasive group A streptococcal disease: Type distribution and corresponding patterns of virulence determinants. *J Clin Microbiol.* **2003**; 41:4941–4949.
35. **Walker M. J., Barnett T. C., M. Jason D., Cole J. N., Gillen C M., Henningham A, Sriprakash K. S., Sanderson-Smith M.L, Nizet V.** Disease Manifestations and Pathogenic Mechanisms of Group A Streptococcus. *Clinical Microbiology Reviews.* **2014**; Volume 27 Number 2. p. 264–301
36. **Falagas M.E., et al.** Effectiveness and safety of short-course vs long-course antibiotic therapy for group a beta hemolytic streptococcal tonsillopharyngitis: a meta-analysis of randomized trials. *Mayo Clin Proc.* **2008**; 83 (8): 880-9.
37. **Bassetti M., et al.** Erythromycin resistance in Streptococcus pyogenes in Italy. *Emerg Infect Dis.* **2000**; 6(2): 180-183.
38. **Cha S., et al.** The emergence of erythromycin-resistant Streptococcus pyogenes in Seoul, Korea. *J Infect Chemother.* **2001**; 7(2):81-6.
39. **Carapetis J.R., et al.** The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis.* **2005**; 5(11):685-94.
40. **Wessels M. R., Moses A. E., J. B. Goldberg, and DiCesare T. J.** Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1991**; 88:8317–8321.
41. **Rothbard, S.** Protective effect of hyaluronidase and type-specific anti-M serum on experimental group A streptococcus infection in mice. *J. Exp. Med.* **1948**; 88:325–342.
42. **Wessels, M. R., In V.A. Fischetti, R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy, and J.I. Rood,** Capsular Polysaccharide of Group A Streptococci, Gram-Positive Pathogens. *2nd ed. ASM Press, Washington, D. C.* **2006**; p. 37–43.
43. **Ashbaugh, C. D., H. B. Warren, V. J. Carey, and M. R. Wessels.** Molecular analysis of the role of the group A streptococcal cysteine protease, hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft-tissue infection. *J. Clin. Invest.* **1998**; 102:550–560.
44. **Schrager, H. M., J. G. Rheinwald, and M. R. Wessels..** Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection. *J. Clin. Invest.* **1996**; 98:1954–1958.
45. **Schrager, H. M., S. Albertí, C. Cywes, G. J. Dougherty, and M. R. Wessels.** Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A Streptococcus to CD44 on human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* **1998**; 101:1708–1716.
46. **Musser JM, Shelburne SA.** A decade of molecular pathogenomic analysis of group A Streptococcus. *The Journal of clinical investigation.* **2009**; 119:2455-2463.
47. **Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF.** Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2009**; 73:407-450.
48. **Olsen, R. J., S. A. Shelburne, and J. M. Musser.** Molecular mechanisms underlying group A streptococcal pathogenesis. *Cell. Microbiol.* **2009**; 11:1–12.
49. **Yamaguchi, M., Y. Terao, and S. Kawabata.** Pleiotropic virulence factor - Streptococcus pyogenes fibronectin-binding proteins. *Cell. Microbiol.* **2012**.

50. **Baldassarri, L., R. Creti, M. Imperi, S. Recchia, M. Pataracchia, and G. Orefici.** Detection of genes encoding internalization-associated proteins in *Streptococcus pyogenes* isolates from patients with invasive diseases and asymptomatic carriers. *J. Clin. Microbiol.* **2007**; 45:1284–1287.
51. **Haller, M., K. Fluegge, S. J. Arri, B. Adams, and R. Berner.** Association between Resistance to Erythromycin and the Presence of the Fibronectin Binding Protein F1 Gene, prtF1, in *Streptococcus pyogenes* Isolates from German Pediatric Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**; 49:2990–2993.
52. **Brouwer S, Barnett T. C., Hernandez T. R., Rohde M and Walker M. J.** *Streptococcus pyogenes* adhesion and colonization. *FEBS Letters, Federation of European Biochemical Societies.* **2016**; 3739–3757 .
53. **Lancefield RC and Perlmann.** Preparation and properties of a protein (R antigen) occurring in streptococci of group A streptococci of group A, type 28, and in certain streptococci of other serological groups. *J Exp Med.* **1952**; 96:83-97.
54. **Areschough T, Carlsson F, Stalhammer-Carlemalm M, Lindahl G.** Host pathogen interactions in *Streptococcus pyogenes* infections with special reference to puerperal fever and A Comment on Vaccine Development. *Vaccine.* **2004**; 22:9-14.
55. **Hynes WL.** Virulence factors of the group A streptococci and genes that regulate their expression. *Front. Biosci.* **2004**; 9:3399-3433.
56. **Johnson D, Kaplan E.** A review of the correlation of T-agglutination patterns and M-protein typing and opacity factor production in the identification of group A streptococci. *J Med Microbiol.* **1993**; 38:311-5.
57. **Lancefield, R. C.** The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*: I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*. *J. Exp. Med.* **1928**; 47:91–103.
58. **Lancefield, R. C.** Persistence of type-specific antibodies in man following infection with group A streptococci. *J. Exp. Med.* **1959**; 110:271–292.
59. **Bisno, A. L., M. O. Brito, and C. M. Collins.** Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect. Dis.* **2003**; 3:191–200.
60. **Hollingshead, S. K., V. A. Fischetti, and J. R. Scott.** A highly conserved region present in transcripts encoding heterologous M proteins of group A streptococci. *Infect. Immun.* **1987**; 55:3237–3239.
61. **Ringdahl, U., H. G. Svensson, H. Kotarsky, M. Gustafsson, M. Weineisen, and U. Sjöbring.** A role for the fibrinogen-binding regions of streptococcal M proteins in phagocytosis resistance. *Mol. Microbiol.* **2000**; 37:1318–1326.
62. **Smeesters P.,R., McMillan D. J., Sriprakash K. S.** The streptococcal M protein: a highly versatile molecule. *Trends in Microbiology.* **2010**; 18, 275–282.
63. **Oehmcke S, Shannon O, Mörgelin M, Herwald H.** Streptococcal M proteins and their role as virulence determinants. *Clinica Chimica Acta.* **2010**; 1172–1180).
64. **Fischetti, V. A., K. F. Jones, and J. R. Scott.** Size variation of the M protein in group A streptococci. *J. Exp. Med.* **1985**; 161:1384–1401.
65. **McMillan, D. J., P.-A. Drèze, T. Vu, D. E. Bessen, J. Guglielmini, A. C. Steer, J. R. Carapetis, L. Van Melder, K. S. Sriprakash, and P. R. Smeesters.** Updated model of group A *Streptococcus* M proteins based on a comprehensive worldwide study. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**; 19:E222–E229.

66. **Ellen, R. P., and R. J. Gibbons.** M Protein-Associated Adherence of *Streptococcus pyogenes* to Epithelial Surfaces: Prerequisite for Virulence. *Infect. Immun.* **1972**; 5:826–830.
67. **Bisno, A. L.** Alternate complement pathway activation by group A streptococci: role of M-protein. *Infect. Immun.* **1979**; 26:1172–1176.
68. **LaPenta, D., C. Rubens, E. Chi, and P. P. Cleary.** Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1994**; 91:12115–12119.
69. **Molinari, G., and G. S. Chhatwal.** Invasion and survival of *Streptococcus pyogenes* in eukaryotic cells correlates with the source of the clinical isolates. *J. Infect. Dis.* **1998**; 177:1600–1607
70. **Blackman Northwood, J., M. Del Grosso, L. R. Cossins, M. D. Coley, R. Creti, A. Pantosti, and D. J. Farrell.** Characterization of Macrolide Efflux Pump *mef* Subclasses Detected in Clinical Isolates of *Streptococcus pyogenes* Isolated between 1999 and 2005. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**; 53:1921–1925.
71. **Bessen, D., K. F. Jones, and V. A. Fischetti.** Evidence for two distinct classes of streptococcal M protein and their relationship to rheumatic fever. *J. Exp. Med.* **1989**; 169:269–283.
72. **Saravani, G. A., and D. R. Martin.** Characterisation of opacity factor from group-A streptococci. *J. Med. Microbiol.* **1990**; 33:55–60.
73. **Bessen, D. E., L. G. Veasy, H. R. Hill, N. H. Augustine, and V. A. Fischetti.** Serologic evidence for a class I group A streptococcal infection among rheumatic fever patients. *J. Infect. Dis.* **1995**; 172:1608–1611.
74. **Blandino G., et al.** *Streptococcus pyogenes* emm-types and subtypes of isolates from paediatric asymptomatic carriers and children with pharyngitis. *New Microbiologica.* **2011**; 34, 101-104.
75. **Reissmann S., et al.** Region specific and worldwide distribution of collagen-binding M proteins with PARF motifs among human pathogenic streptococcal isolates. *PLoS One.* **2012**; 7(1):e30122.
76. **Meisal R., et al.** Sequence type and emm type diversity in *Streptococcus pyogenes* isolates causing invasive disease in Norway between 1988 and 2003. *J Clin Microbiol.* **2008**; 46(6): 2102-2105.
77. **Stollerman GH.** Rheumatic fever in the 21st century. *Clinical Infectious Diseases.* **2001**; 33: 806-814.
78. **Parks T, Smeesters PR, Steer AC.** Streptococcal skin infection and rheumatic heart disease. *Current Opinions in Infectious Diseases.* **2012**; 25:145–153.
79. **Bisno AL.** Nonsuppurative poststreptococcal sequelae: rheumatic fever and glomerulonephritis, In Mandel GL, Bennett JE, Dolan R (ed), Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *Livingstone Elsevier, Philadelphia, PA.* **2010**; 2611–2622..
80. **Ali Al Shamisi F. H.,** "The Prevalence of *Streptococcus Pyogenes* and its emm Gene Types among School Children in AI Ain, UAE". *Theses.* **2016**; 466.
81. **Steer AC, Law I, Matatolu L, Beall BW, Carapetis JR.** Global emm type distribution of group A Streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *Lancet Infect Dis.* **2009**;9(10): 611–616.
82. **McIver K.S., et al.** Regulation of *mga* transcription in the group A streptococcus: specific binding of *mga* within its own promoter and evidence for a negative regulator. *J Bacteriol.* **1999**; 181(17):5373-83.
83. **Bessen D.E., et al.** Genetic correlates of throat and skin isolates of group A streptococci. *J Infect Dis.* **1996**; 173: 896-900.

84. **Bessen D.E., et al.** Two-domain motif for IgG binding activity by group A streptococcal emm gene products. *Gene*. **1997**; 196: 75-82.
85. **Courtney H.S., et al.** Relationship between expression of the family of M proteins and lipoteichoic acid to hydrophobicity and biofilm formation in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One*. **2009**; 9;4(1):e4166.
86. **Podbielski A.** (M-related protein (Mrp) contributes to group A streptococcal resistance to phagocytosis by human granulocytes. *Mol Microbiol*. **1996**; (3):429-41.
87. **Bessen, D.E., et al.** Nucleotide sequences of two adjacent M or M-like protein genes of group A streptococci: different RNA transcript levels and identification of a unique immunoglobulin A-binding protein. *Infect Immun*. **1992**; 60: 124.
88. **Jeppson, H., et al.** Duplication of a DNA sequence homologous to genes for immunoglobulin receptors and M proteins in *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol. Lett*. **1992**; 71: 139.
89. **Podbielski, A., et al.** The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes. *Infect Immun*. **1995**; 63(1):9-20.
90. **Ji Y., et al.** Impact of M49, Mrp, Enn, and C5a peptidase proteins on colonization of the mouse oral mucosa by *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun*. **1998**; 66(11):5399-405.
91. **James B., et al.** New protective antigen of group A streptococci. *J Clin Invest*. **1999**; Volume 103, Issue 9 103(9):1261-1268.
92. **Smoot J.C., et al.** Molecular analysis of group A *Streptococcus* type emm18 isolates temporally associated with acute rheumatic fever outbreaks in Salt Lake City, Utah. *J Clin Microbiol*. **2002**; 40(5):1805-1810.
93. **Ahmed E.A.** Streptococcal protective antigens (Spa): a new family of type-specific proteins of group A streptococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **2010**; 29(1):51-7.
94. **Niedermeyer S.E., et al.** Group a streptococcus expresses a trio of surface proteins containing protective epitopes. *Clin Vaccine Immunol*. **2014**; 10:1421-5.
95. **McLellan D.G.** Spa contributes to the virulence of type 18 group A streptococci. *Infect Immun*. **2001**; 69(5):2943-9.
96. **Chen CC, Cleary PP.** Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*. *The Journal of biological chemistry*. **1990**; 265:3161-3167.
97. **DeMaster E, Schnitzler N, Cheng Q, Cleary P.** M(+) group a streptococci are phagocytized and killed in whole blood by C5a-activated polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*. **2002**; 70:350-359.
98. **Wexler DE, Chenoweth DE, Cleary PP.** Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1985**; 82:8144-8148.
99. **Brown CK, Gu ZY, Matsuka YV, Purushothaman SS, Winter LA, Cleary PP, Olmsted SB, Ohlendorf DH, Earhart CA.** Structure of the streptococcal cell Wall C5a peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2005**; 102:18391-18396.
100. **Park HS, Cleary PP..** Active and passive intranasal immunizations with streptococcal surface protein C5a peptidase prevent infection of murine nasal mucosa-associated lymphoid tissue, a functional homologue of human tonsils. *Infect Immun*. **2005**; 73:7878-7886.
101. **Mitchell TJ.** The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol*. **2003**; 1:219-230.

102. Fernie-King BA, Seilly DJ, Willers C, Wurzner R, Davies A, Lachmann PJ. Streptococcal inhibitor of complement (SIC) inhibits the membrane attack complex by preventing uptake of C567 onto cell membranes. *Immunology*. 2001;103:390-398.
103. Fernie-King BA, Seilly DJ, Davies A, Lachmann PJ. Streptococcal inhibitor of complement inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme. *Infect Immun*. 2002; 70:4908-4916.
104. Frick IM, Akesson P, Rasmussen M, Schmidtchen A, Bjorck L. SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278:16561-16566.
105. Hynes W., Sloan M. Secreted Extracellular Virulence Factors, *Streptococcus pyogenes*. *Basic Biology to Clinical Manifestations Created*. 2016; 411
106. Chaussee MS, Phillips ER, Ferretti JJ. Temporal production of streptococcal erythrogenic toxin B (streptococcal cysteine proteinase) in response to nutrient depletion. *Infect Immun*. 1997; 65:1956-1959
107. Loughman JA, Caparon M. Regulation of SpeB in *Streptococcus pyogenes* by pH and NaCl: a model for in vivo gene expression. *Journal of bacteriology*. 2006. 188:399-408.
108. Kapur V, Topouzis S, Majesky MW, Li LL, Hamrick MR, Hamill RJ, Patti JM, Musser JM. A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microbial pathogenesis*. 1993. 15:327-346.
109. Nyberg P, Rasmussen M, Bjorck L. alpha2-Macroglobulin-proteinase complexes protect *Streptococcus pyogenes* from killing by the antimicrobial peptide LL-37. *The Journal of biological chemistry*. 2004. 279:52820-52823.
110. Boyle MD, Lottenberg R. Plasminogen activation by invasive human pathogens. *Thrombosis and haemostasis*. 1997. 77:1-10.
111. Sanderson-Smith ML, Dowton M, Ranson M, Walker MJ. The plasminogenbinding group A streptococcal M protein-related protein Prp binds plasminogen via arginine and histidine residues. *J Bacteriol*. 2007. 189:1435-1440.
112. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*. 1997; 91:439-442.
113. Sun H, Ringdahl U, Homeister JW, Fay WP, Engleberg NC, Yang AY, Rozek LS, Wang X, Sjobring U, Ginsburg D. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. *Science*. 2004; 305:1283-1286.
114. Nizet V, Beall B, Bast DJ, Datta V, Kilburn L, Low DE, De Azavedo JC. Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus. *Infect Immun*. 2000; 68:4245-4254.
115. Betschel SD, Borgia SM, Barg NL, Low DE, De Azavedo JC. Reduced virulence of group A streptococcal Tn916 mutants that do not produce streptolysin S. *Infect Immun*. 1998. 66:1671-1679.
116. Ofek I, Bergner-Rabinowitz S, Ginsburg I. Oxygen-stable hemolysins of group A streptococci. VII. The relation of the leukotoxic factor to streptolysin S. *The Journal of infectious diseases*. 1970; 122:517-522.
117. Ginsburg I. Is streptolysin S of group A streptococci a virulence factor? *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1999; 107:1051-1059.
118. Hynes W., Sloan M. Secreted Extracellular Virulence Factors. *Streptococcus pyogenes Basic Biology to Clinical Manifestations*. 2016; 413-414.

119. **Hynes W., Sloan M.** Secreted Extracellular Virulence Factors. *Streptococcus pyogenes Basic Biology to Clinical Manifestations* . **2016**; 419-420.
120. **Hynes W., Sloan M.** Secreted Extracellular Virulence Factors. *Streptococcus pyogenes Basic Biology to Clinical Manifestations*. **2016**; 424-425.
121. **Reglinski M., Sriskandan S.** The contribution of group A streptococcal virulence determinants to the pathogenesis of sepsis. *Virulence*. **2014**; 5:1, 127–136.
122. **Barnett T.C., Cole J. N., Hernandez T.R., Henningham A., Paton J. C., Nizet V., Walker M. J.** Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease. *Cellular Microbiology*. **2015**; 17(12), 1721–1741.
123. **Proft T., Fraser J. D.** Streptococcal Superantigens: Biological properties and potential role in disease. *Streptococcus pyogenes Basic Biology to Clinical Manifestations*. **2016**; 453
124. **Proft T., Fraser J. D.** Streptococcal Superantigens: Biological properties and potential role in disease. *Streptococcus pyogenes Basic Biology to Clinical Manifestations*. **2016**; 462-463
125. **Proft T., Fraser J. D.** Streptococcal Superantigens: Biological properties and potential role in disease. *Streptococcus pyogenes Basic Biology to Clinical Manifestations*. **2016**; 449
126. **Spellerberg B., Brandt C.** Laboratory Diagnosis of Streptococcus pyogenes (group A streptococci). *Streptococcus pyogenes Basic Biology to Clinical Manifestations*. **2016**; 875
127. **Spellerberg B., Brandt C.** Laboratory Diagnosis of Streptococcus pyogenes (group A streptococci). *Streptococcus pyogenes Basic Biology to Clinical Manifestations*. **2016**; 879
128. **Peter G. American Academy of Pediatrics.** Group A streptococcal infections. *Red book: report of the Committee on Infectious Diseases. 24th Edition. Ill: American Academy of Pediatrics, Elk Grove Village, USA, 1997*; 486.
129. **Meisal, R., Andreasson, I.K.G., Hooiby, E.A., Aaberge, I.S., Michaelsen, T.E., & Caugant, D.A.** Streptococcus pyogenes Isolates Causing Severe Infections in Norway in 2006 to 2007: emm Types, Multilocus Sequence Types, and Superantigen Profiles. *Journal of Clinical Microbiology*. **2010**; 48, 842-851.
130. **Efstratiou, A.** Group A Streptococci in the 1990s. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2000**; 45, 3-12.
131. **Stevens D. L., Bisno A. L., Chambers H. F., Everett E. D., Dellinger P., Goldstein E. J. C., Gorbach S. L., Hirschmann J. V, Kaplan E. L., Montoya J. G., Wade J. C.** Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *Clin. Infect. Dis.* **2005**. 41:1373–1406.
132. **Shulman, S. T., A. L. Bisno, H. W. Clegg, M. A. Gerber, E. L. Kaplan, G. Lee, J. M. Martin, and C. V. Beneden.** Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. *The Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis.* **2012**; 55:e86–e102.
133. **Chang, C.** Cutting edge issues in rheumatic fever. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2012**. 42:213–237.
134. **Richter, S. S., K. P. Heilmann, C. L. Dohrn, S. E. Beekmann, F. Riahi, J. Garcia-de-Lomas, M. Ferech, H. Goossens, and G. V. Doern.** Increasing telithromycin resistance among Streptococcus pyogenes in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**; 61:603–611
135. **Silva-Costa, C., M. Ramirez, and J. Melo-Cristino.** Identification of macrolide-resistant clones of Streptococcus pyogenes in Portugal. *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**. 12:513–518.

136. **Leclercq, R.** Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* **2002**; 34:482–492.
137. **Varaldo, P. E., M. P. Montanari, and E. Giovanetti.** Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**; 53:343–353.
138. **Del Grosso, M., R. Camilli, G. Barbabella, J. Blackman Northwood, D. J. Farrell, and A. Pantosti.** Genetic resistance elements carrying *mef* subclasses other than *mef(A)* in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**; 55:3226–3230.
139. **Roberts, M. C.** Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**; 245:195–203.
140. **Silva-Costa, C., F. R. Pinto, M. Ramirez, J. Melo-Cristino, and Portuguese Suveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens.** Decrease in macrolide resistance and clonal instability among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**; 14:1152–1159.
141. **Silva-Costa, C., M. Ramirez, J. Melo-Cristino, and the Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens.** Rapid inversion of the prevalences of macrolide resistance phenotypes paralleled by a diversification of T and emm types among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**; 49:2109–2111.
142. **Creti, R., M. Imperi, L. Baldassarri, M. Pataracchia, S. Recchia, G. Alfarone, and G. Orefici.** emm Types, virulence factors, and antibiotic resistance of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Italy: What has changed in 11 years? *J. Clin. Microbiol.* **2007**; 45:2249–2256.
143. **Imöhl, M., R. R. Reinert, C. Ocklenburg, and M. van der Linden.** Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Germany during 2003–2007. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2010**; 58:389–396.
144. **Luca-Harari B., Ekelund K., van der Linden M., Staum-Kaltoft M., Hammerum A. M., and Jasir A.** Clinical and epidemiological aspects of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Denmark during 2003 and 2004. *J. Clin. Microbiol.* **2008**; 46:79–86.
145. **Montes, M., C. Ardanuy, E. Tamayo, A. Domènech, J. Liñares, and E. Pérez-Trallero.** Epidemiological and molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* isolates causing invasive disease in Spain (1998–2009): comparison with non-invasive isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**. 30:1295–1302.
146. **Rivera, A., M. Rebollo, E. Miró, M. Mateo, F. Navarro, M. Gurguí, B. Mirelis, and P. Coll.** Superantigen gene profile, emm type and antibiotic resistance genes among group A streptococcal isolates from Barcelona. *Spain. J. Med. Microbiol.* **2006**. 55:1115–1123.
147. **Lepoutre, A., A. Doloy, P. Bidet, A. Leblond, A. Perrocheau, E. Bingen, P. Trieu-Cuot, A. Bouvet, C. Poyart, and D. Lévy-Bruhl.** Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in France in 2007. *J. Clin. Microbiol.* **2011**; 49:4094–4100.
148. **Stathi, A., J. Papaparaskevas, L. Zachariadou, A. Pangalis, N. J. Legakis, A. Tseleni-Kotsovili, and P. T. Tassios.** Prevalence of emm types 1 and 12 from invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Greece—results of enhanced surveillance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**; 14:808–812.
149. **Szczypa, K., E. Sadowy, R. Izdebski, L. Strakova, and W. Hryniewicz.** Group A streptococci from invasive-disease episodes in Poland are remarkably divergent at the molecular level. *J. Clin. Microbiol.* **2006**. 44:3975–3979.
150. **Melo-Cristino, J., M. L. Fernandes, and Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens.** *Streptococcus pyogenes* isolated in Portugal: macrolide resistance phenotypes and correlation with T types. *Microb. Drug Resist.* **1999**; 5:219–225.

151. **Pires, R., D. Rolo, L. Gama-Norton, A. Morais, L. Lito, M. J. Salgado, C. Johansson, G. Möllerberg, B. Henriques-Normark, J. Gonçalo-Marques, and I. Santos-Sanches.** Group A Streptococci from carriage and disease in Portugal: evolution of antimicrobial resistance and T antigenic types during 2000-2002. *Microb. Drug Resist.* **2005**; 11:360–370.
152. **Malhotra-Kumar, S., C. Lammens, S. Chapelle, C. Mallentjer, J. Weyler, and H. Goossens.** Clonal spread of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**; 55:320–325.
153. **Wajima, T., S. Y. Murayama, K. Sunaoshi, E. Nakayama, K. Sunakawa, and K. Ubukata.** Distribution of emm type and antibiotic susceptibility of group A streptococci causing invasive and noninvasive disease. *J. Med. Microbiol.* **2008**. 57:1383–1388.
154. **Pires, R., C. Ardanuy, D. Rolo, A. Morais, A. Brito-Avô, J. Gonçalo-Marques, J. Liñares, and I. Santos-Sanches.** Emergence of ciprofloxacin-nonsusceptible *Streptococcus pyogenes* isolates from healthy children and pediatric patients in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**. 54:2677–2680.
155. **Hooper, D. C.** Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect. Dis.* **2002**. 2:530–538.
156. **Duesberg, C. B., S. Malhotra-Kumar, H. Goossens, L. McGee, K. P. Klugman, T. Welte, and M. W. R. Pletz.** Interspecies recombination occurs frequently in quinolone resistance-determining regions of clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**. 52:4191–4193.
157. **Pinho, M. D., J. Melo-Cristino, and M. Ramirez.** Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and evidence for a shared global gene pool with *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**; 54:1769–1777.
158. **Prajapati A, Rai S, Mukhiya R, Karki A.** Study on carrier rate of *Streptococcus pyogenes* among the school children and antimicrobial susceptibility pattern of isolates. *Nepal Med Coll J.* **2012**;14: 169–71.
159. **Beres SB, Richter EW, Nagiec MJ, Sumby P, Porcella SF, DeLeo FR, et al.** Molecular genetic anatomy of inter and intraserotype variation in the human bacterial pathogen group A *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2006**;103: 7059–7064.
160. **Bisno, A. L., F. A. Rubin, P. P. Cleary, and J. B. Dale.** Prospects for a group A streptococcal vaccine: rationale, feasibility, and obstacles-report of a National Institute of Allergy and Infectious Diseases workshop. *Clin. Infect. Dis.* **2005**; 41:1150–1156.
161. **Fritzer, A., B. M. Senn, D. B. Minh, M. Hanner, D. Gelbmann, B. Noiges, T. Henics, K. Schulze, C. A. Guzman, J. Goodacre, A. von Gabain, E. Nagy, and A. L. Meinke.** Novel conserved group A streptococcal proteins identified by the antigenome technology as vaccine candidates for a non-M protein-based vaccine. *Infect. Immun.* **2010**; 78:4051–4067.
162. **Sharma, A., D. K. Arya, V. Sagar, R. Bergmann, G. S. Chhatwal, and A. K. Johri.** Identification of potential universal vaccine candidates against group A *Streptococcus* by using high throughput in silico and proteomics approach. *J. Proteome Res.* **2013**; 12:336–346.
163. **Dale, J. B.** Current status of group A streptococcal vaccine development. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**; 609:53–63.
164. **Mora, M., G. Bensi, S. Capo, F. Falugi, C. Zingaretti, A. G. O. Manetti, T. Maggi, A. R. Taddei, G. Grandi, and J. L. Telford.** Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**; 102:15641–15646.

165. **Turner, C. E., P. Kurupati, S. Wiles, R. J. Edwards, and S. Sriskandan.** Impact of immunization against SpyCEP during invasive disease with two streptococcal species: *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equi*. *Vaccine*. **2009**; 27:4923–4929.
166. **McNeil SA, Halperin SA, Langley JM, et al.** Safety and immunogenicity of 26- valent group A streptococcus vaccine in healthy adult volunteers. *Clinical Infectious Diseases*. **2005**;41:1114–1122
167. **Hu MC, Walls MA, Stroop SD, Reddish MA, et al.** Immunogenicity of a 26-valent group a streptococcal vaccine. *Infectious Immunology*. **2002**;70: 2171–2177.
168. **Dale JB, Penfound TA, Chiang EY, Walton WJ.** New 30-Valent M Protein-Based Vaccine Evokes Cross-Opsonic Antibodies Against Non-Vaccine Serotypes of Group A Streptococci. *Vaccine*. **2011**;29(46):8175-8178.
169. **Kaplan E.L, et al.** Dynamic epidemiology of group A streptococcal serotypes associated with pharyngitis. *Lancet*. **2001**; 358(9290):1334-7.
170. **Dale J.B., et al.** Group A streptococcal vaccines: paving a path for accelerated development. *Vaccine*. **2013**; 31(Suppl 2):B216-B222.
171. **Massell B.F., et al.** Rheumatic fever following streptococcal vaccination. Report of three cases. *JAMA*. **1969**; 207(6): 1115-1119.
172. **Widdowson, J.P., et al.** An M-associated protein antigen (MAP) of group A streptococci. *J. Hyg.* **1976**; 69:553-564.
173. **Wilson, M.G., et al.** The familial epidemiology of rheumatic fever. *J. Pediatr.* **1943**; 22:468-492.
174. **Cunningham M.W.** Streptococcus and rheumatic fever. *Curr Opin Rheumatol*. **2012**; 24(4):408-416.
175. **Henningham A., et al.** Group a streptococcal vaccine candidates: potential for the development of a human vaccine. *Curr Top Microbiol Immunol*. **2013**; 368:207-42.
176. **O'Connor S.P., et al.** In vivo *Streptococcus pyogenes* C5a peptidase activity: analysis using transposon- and nitrosoguanidine-induced mutants. *J Infect Dis*. **1987**; 156(3):495-504.
177. **Chmouryguina I., et al.** Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. *Infect Immun*. **1996**; 64(7):2387-2390.
178. **Cleary P.P., et al.** Immunization with C5a peptidase from either group A or B streptococci enhances clearance of group A streptococci from intranasally infected mice. *Vaccine*. **2004**; 22(31-32):4332-4341.
179. **Shet A., et al.** Immune response to group A streptococcal C5a peptidase in children: implications for vaccine development. *J Infect Dis*. **2003**; 188(6):809-817.
180. **Roggiani M., et al.** Toxoids of streptococcal pyrogenic exotoxin A are protective in rabbit models of streptococcal toxic shock syndrome. *Infect Immun*. **2000**; 68(9):5011-5017.
181. **McCormick J.K., et al.** Development of streptococcal pyrogenic exotoxin C vaccine toxoids that are protective in the rabbit model of toxic shock syndrome. *J Immunol*. **2000**; 165(4): 2306-2312.
182. **Bhatnagar A., et al.** Superantigen-induced T cell responses in acute rheumatic fever and chronic rheumatic heart disease patients. *Clin Exp Immunol*. **1999**; 116(1):100-6.

183. **James B. Dale, Michael R. Batzloff, P. Patrick Cleary, Harry S. Courtney, Michael F. Good, Guido Grandi, Scott Halperin, Immaculada Y. Margarit, Shelly McNeil, Manisha Pandey, Pierre R. Smeesters, and Andrew C. Steer.** Current Approaches to Group A Streptococcal Vaccine Development. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; **2016**-. [Cited: 25th September]. 968 P. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343616/>
184. **Coelho J., Chalker V.** Sequencing of streptococcus group A,C and G emm gene. Review Date: 02.06.2019
185. **Borek A. L., Obszańska K., Hryniewicz W. and Sitkiewicz I.** Detection of *Streptococcus pyogenes* virulence factors by multiplex PCR. *Virulence, Landes Bioscience*. **2012**; 3:6, 529–533.
186. **Graves, L. M., and B. Swaminathan.** PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**; 65:55–62
187. **Karaky N. M.** Characterization of *Streptococcus pyogenes* Isolates from Lebanon: Pathogenesis, Epidemiology and Resistance. LEBANESE AMERICAN UNIVERSITY. *A thesis Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Molecular Biology*, June **2011**.
188. **Smit P. W., Lindholm L., Lyytikäinen O., Jalava J, Patari-Sampo A., J. Vuopio.** Epidemiology and emm types of invasive group A streptococcal infections in Finland, 2008–2013. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **2015**; 34:2131–2136.
189. **Tartof SY, Reis JN, Andrade AN, Ramos RT, Reis MG, Riley LW.** Factors associated with Group A *Streptococcus* emm type diversification in a large urban setting in Brazil: a cross sectional study. *BMC Infectious Diseases*. **2010**;10:32.
190. **Gowda KL, Melbin JJ, Patil SA, Bindu SR, Sanjay MK, Shivannavar CT, Brahmadathan KN.** Prevalence of emm types of Group A streptococci recovered from school children and hospital patients in Bangalore City, India. *World J Microbiol Biotechnol*. **2011**; 27:319–323.
191. **Chiang-Ni C., Zheng PX, Wang S.Y., Tsai P.J, Chuang W.J, Lin Y.S, Liu C.C, Wub J.J.** Epidemiology Analysis of *Streptococcus pyogenes* in a Hospital in Southern Taiwan by Use of the Updated emm Cluster Typing System. *J Clin Microbiol*. **2015**; 54:157–162.
192. **Akça G.** Boğaz enfeksiyonu nedeni olan A grubu beta hemolitik streptokokların M protein tiplerinin ‘emm’ gen sekans analizi ile belirlenmesi. *Doktora tezi*. Ankara, **2006**; 61–66.
193. **MENGELOĞLU Z.F.** Hasta ve taşıyıcılardan izole edilen grup a streptokoklarda emm geni tiplerinin, toksin gen profilinin ve klonal ilişkisinin araştırılması. *Doktora tezi*. Zonguldak, **2010**; 64–65.
194. **O'Brien KL, Beall B, Barrett NL, Cieslak PR, et al.** Epidemiology of invasive group A streptococcus disease in the United States, 1995–1999. *Clinical Infectious Diseases*. **2002**; 35:268–276.
195. **O'Loughlin RE, Roberson A, Cieslak PR, Lynfield R, et al.** The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000–2004. *Clinical Infectious Diseases*. **2007**; 45:853–862.
196. **Koutouzi F, Tsakris A, Chatzichristou P, Koutouzis E, et al.** *Streptococcus pyogenes* emm types and clusters during a 7-year period (2007 to 2013) in pharyngeal and nonpharyngeal pediatric isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **2015**; 53:2015–2021.

197. **Lopardo HA, Vidal P, Sparo M, Jeric P, Centron D, Facklam RR, Paganini H, Pagniez NG, Lovgren M, Beall B.** Six-month multicenter study on invasive infections due to *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in Argentina. *J Clin Microbiol.* **2005**; 43(2):802-7.
198. **Shulman ST, Tanz RR, Kabat W, Kabat K, Cederlund E, Patel D, Li Z, Sakota V, Dale JB, Beall B.** US Streptococcal Pharyngitis Surveillance Group. Group A streptococcal pharyngitis serotype surveillance in North America, 2000-2002. *Clin Infect Dis.* **2004**;39:325-332.
199. **Rantala, S., Vahakuopus, S., Siljander, T., Vuopio, J., Huhtala, H., Vuento, R., Syrjanen, J.** *Streptococcus pyogenes* bacteraemia, emm types and superantigen profiles. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* **2012**; 31, 859-865.
200. **Strus M., Heczko1 P. B., Golinska1 E., Tomusiak A., Chmielarczyk A., Dorycka M., Linden M., Samet A., Piorkowska A.** The virulence factors of group A streptococcus strains isolated from invasive and non-invasive infections in Polish and German centres, 2009–2011. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2017**; 36:1643–1649.
201. **Otlı B., Karakurt C., Bayındır Y., Kayabaş Ü., Yakupoğulları Y., Bağ H.G.** İlkokul Çocuklarında *Streptococcus pyogenes* Taşıyıcılığı: M-Protein Tipleri, Pirojenik Toksin Genleri ve İzolatlar Arası Klonal İlişkinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* **2015**; 49(3): 301-313.
202. **Friaes A., Pinto F. R., Silva-Costa C. , Ramirez M., Melo-Cristino J.** Superantigen gene complement of *Streptococcus pyogenes*—relationship with other typing methods and short-term stability. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2013**; 32:115–125.
203. **Imöhl M., Fitzner C., Perniciaro S., Linden M.** Epidemiology and distribution of 10 superantigens among invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Germany from 2009 to 2014. *PLoS ONE.* **2017**; 12(7. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0180757](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180757)).
204. **Karaky N.M, Araj G.F. and Tokajian S.T.** Molecular characterization of *Streptococcus pyogenes* group A isolates from a tertiary hospital in Lebanon. *Journal of Medical Microbiology.* **2014**; 63, 1197–1204.

## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana’da doğdu. İlkokul öğretimini Kanuni, ortaokul öğrenimini Mehmet Akif Ersoy, lise öğrenimini ise yabancı dil ağırlıklı Mehmet Kemal Tuncel’de tamamladı. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü tamamladı. 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. Doktora eğitimine 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında başlamıştır. İyi derecede İngilizce bilmektedir.

