

T.C.
ZONGULDAK KARAELMAS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HASTA VE TAŞIYICILARDAN İZOLE EDİLEN GRUP A
STREPTOKOKLARDA *emm* GENİ TİPLERİNİN, TOKSİN GEN
PROFİLİNİN VE KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Fırat Zafer MENGELOĞLU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Elif AKTAŞ

ZONGULDAK
2010

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bana verdikleri emekleri ve tezimin hazırlanmasındaki özverili katkılarından dolayı tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Elif AKTAŞ'a, değerli hocalarım Doç. Dr. Füsün CÖMERT ile Doç. Dr. Canan KÜLAH'a teşekkürü borç bilirim.

Tezimin tamamlanmasında büyük emek ve yardımlarından dolayı Doç. Dr. Barış OTLU'ya teşekkür ederim.

Sayın Prof. Dr. Vildan SÜMBÜLOĞLU ve Öğr. Gör. Füzûzan KÖKTÜRK'e tezimin istatistiksel analizi için katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim ve tezimi hazırlama sürecinde yardımlarını esirgemeyen araştırma görevlisi arkadaşlarım ve laboratuvar çalışanlarımıza teşekkür ederim.

Desteğini her zaman hissettiğim ve uzmanlık eğitimim boyunca hep yanımda olan sevgili eşime ve aileme, ayrıca kendisine zaman zaman kısıtlı vakit ayırmak zorunda kaldığım biricik oğlum Emre'ye “sabrından” dolayı çok teşekkür ederim.

Dr. Fırat Zafer MENGELOĞLU
ZONGULDAK, 2010

TEZ ONAY TUTANAĞI

Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı : Hasta ve Taşıyıcılardan İzole Edilen Grup A Streptokoklarda emm Geni Tiplerinin, Toksin Gen Profilinin ve Klonal İlişkisinin Araştırılması

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Fırat Zafer MENGELOĞLU

Tez Savunma Tarihi: 13/07/2010

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Elif AKTAŞ

Prof. Dr. Nedim SULTAN
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Fusun CÖMERT
Üye

Doç. Dr. Canan KÜLAH
Üye

Doç. Dr. İshak Özel TEKİN
Üye

Yrd. Doç. Dr. Elif AKTAŞ
Üye

UYGUNDUR
13/07/2010

Prof. Dr. N. Aydın MÜNGAN
Dekan

ÖZET

Mengeloğlu F.Z., Hasta Ve Taşıyıcılardan İzole Edilen Grup A Streptokoklarda *emm* Geni Tiplerinin, Toksin Gen Profilinin Ve Klonal İlişkinin Araştırılması, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Zonguldak, 2010.

Bu çalışmada, hasta ve taşıyıcılardan elde edilen grup A streptokok izolatlarının antibiyotik duyarlılığı, *emm* geni tipleri, toksin gen profillerinin belirlenmesi ve izolatlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Hastanemize başvuran hastalardan endikasyon gereği alınan klinik örneklerden etken olarak izole edilen 79 klinik izolat ile üç ilköğretim okulunda öğrencilerden izole edilen 60 taşıyıcılık izolatı değerlendirilmiştir. *emm* geni tiplendirilmesi DNA dizi analizi, *speA*, *speB*, *speC*, *speG* ve *smeZ* genlerinin tespiti polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle yapılmıştır. İzolatlar arası klonal ilişki “pulsed-field” jel elektroforez yöntemiyle araştırılmıştır. GAS taşıyıcılık oranı % 11,2 olarak bulunmuştur.

Tüm izolatlar penisiline duyarlı iken eritromisin, klindamisin ve tetrasikline karşı değişen oranlarda direnç görülmüştür. Direnç oranlarında gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Dizi analizi ile 139 izolatın 112’sinin *emm* geni tiplendirilebilmiştir. Toplam 21 farklı *emm* tipi bulunmuş, en sık saptanan *emm* tipleri; *emm12*, *emm89*, *emm1*, *emm77*, *emm4* ve *emm3* olarak belirlenmiştir. *emm3* hasta izolatlarında daha yüksek oranda bulunmuştur. Hasta ve taşıyıcı grupları arasında diğer *emm* tiplerinin saptanma oranları bakımından anlamlı fark bulunamamıştır. Klinik ve taşıyıcı izolat gruplarında toksin genlerinin saptanma oranları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. İnvazif izolatlarda *speA* saptanma oranı non-invazif izolatlardan anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. PFGE ile tiplendirilebilen 133 izolat için 61 ayrı profil tespit edilmiştir; 105 izolat, eleman sayısı iki ile dokuz arasında değişen 33 küme oluşturmuş, 28 izolat özgün profil göstermiştir. Hasta ve taşıyıcı gruplarında kümelenme bakımından anlamlı fark bulunamamıştır. Taşıyıcılık oranının yüksek bulunduğu ilköğretim okulunda kümelenme oranı da yüksek bulunmuştur. *emm1* tipi izolatlarda *speA* ve *smeZ* pozitiflik oranları anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. *smeZ* pozitif *emm1* tipi izolatların tümünün hasta grubunda olduğu gözlenmiştir. *emm4* tipi izolatlardaki *speG* geninin pozitiflik oranı anlamlı olarak düşük bulunmuştur. *emm1* tipi hasta izolatlarında saptanan ortalama gen sayısı taşıyıcı izolatlarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda saptanan 21 *emm* tipinden 12’si, 26 değerlikli aşı kapsamında yer almaktadır, bunlar tiplendirilebilen izolatların % 77,7’sini oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bu çalışmada en sık saptanan *emm* tiplerinden olan *emm4* bu aşı kapsamında değildir.

Anahtar Kelimeler: Grup A streptokok, *S. pyogenes*, *emm* tiplendirme, eritrojenik toksin, *speA*, *speB*, *speC*, klonal ilişki, PFGE

ABSTRACT

Mengeloğlu F.Z., Evaluation of *emm* gene types, toxin gene profiles and clonal relatedness of group A streptococci obtained from patients and carriers. Zonguldak Karaelmas University, Faculty of Medicine, Department of Clinical Microbiology, Thesis. Zonguldak, 2010.

The aim of this study is to evaluate antibiotic susceptibilities, *emm* gene types, toxin gene profiles and clonal relatedness of group A streptococci (GAS) obtained from patients and carriers. Seventy-nine clinical isolates obtained from clinically indicated samples from patients admitted to our hospital and 60 isolates from carriers in three primary schools were included in the study. DNA sequencing was used for *emm* typing while polymerase chain reaction was used to detect *speA*, *speB*, *speC*, *speG* and *smeZ* toxin genes. The clonal relatedness of the isolates were assessed by pulsed-field gel electrophoresis. The rate of GAS carriage was 11,2 %. All of the isolates were susceptible to penicillin while resistance to erythromycin, clindamycin and tetracycline was found in varying rates. No significant difference was found between the groups with respect to resistance rates. Of the 139 isolates, 112 were typeable by DNA sequencing for *emm* types. A total of 21 distinct *emm* types were detected; the most common types being *emm12*, *emm89*, *emm1*, *emm77*, *emm4* and *emm3*. The rate of *emm3* type was significantly higher in patients than carriers while no significant difference was present for the other *emm* types. The detection rates of the toxin genes did not differ significantly between patients and carriers. The rate of *speA* detection was significantly higher in invasive isolates when compared to non-invasive ones. PFGE analysis yielded 61 profiles for the 133 typeable isolates; 105 isolates formed 33 clusters with 2-9 members while 28 of the isolates had unique profiles. The rate of clustering was not significantly different in patients and carriers. The clustering rate was higher in the school where the rate of carriers was higher when compared to the other schools screened. The presence of *speA* and *smeZ* was significantly higher in *emm1* and the presence of *speG* was significantly lower in *emm4* when compared to the other *emm* types. All of the *smeZ* positive, *emm1* type isolates belonged to patient group. The mean number of genes detected was significantly high in *emm1* type patient isolates compared to carriage isolates. Twelve of the 21 *emm* types detected in this study were covered by the 26-valent vaccine, constituting 77,7 % of the *emm* typeable isolates however the *emm4* type, which is one of the most common types in the present study, is not among this coverage.

Keywords: Group A streptococci, *S. pyogenes*, *emm* typing, eritrogenic toxin, toxin gene profile, *speA*, *speB*, *speC*, clonal relation, PFGE

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
TABLO DİZİNİ	xi
ŞEKİL DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Grup A Beta Hemolitik Streptokoklar (GAS).....	3
2.2. Tanım	3
2.4.2. Yapısı	4
2.4.3. Virulans Faktörleri	5
2.4.4. Klinik ve Epidemiyoloji.....	16
2.4.5. Patogenez	22
2.4.6. Tanı	24
2.4.7. Duyarlılık	26
2.4.7. Tedavi.....	27
2.4.8. Taşıyıcılık.....	28
2.4.9. Korunma ve bağışıklık	28
2.4.10. <i>emm</i> tipi, toksin profili ve klonotiplerin klinik önemi	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Örneklerin Toplanması.....	33
3.1.1. Hasta izolatlarının elde edilmesi	33
3.1.2. Taşıyıcı izolatlarının elde edilmesi	33
3.2. Kültür ve İdentifikasyon	35
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	36
3.4. DNA Ekstraksiyonu	36
3.5. <i>emm</i> Geni Tiplerinin Belirlenmesi	37

3.5.1. <i>emm</i> geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ve PZR ürünlerinin dizileme için saflaştırılması.....	37
3.5.2. DNA dizi analizi için sekans reaksiyonu	38
3.5.3. Sekans reaksiyonu ürünlerinin presipitasyonu.....	38
3.5.4. Dizileme	39
3.5.5. Sonuçların analizi.....	39
3.6. Toksin Gen Profilinin Belirlenmesi	39
3.6.1. Amplifikasyon için kullanılan primerler	40
3.6.2. Amplifikasyon.....	40
3.6.3. Amplifikasyon ürünlerinin tespit edilmesi.....	41
3.7. İzolatlar Arası Klonal İlişkinin Belirlenmesi	41
3.7.1. İzolatların hazırlanması	41
3.7.2. Agaroz kalıbın hazırlanması	42
3.7.3. Agaroz içinde hücre lizisi.....	42
3.7.4. Yıkama aşaması	42
3.7.5. DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesilmesi.....	42
3.7.6. Elektroforez için jelin hazırlanması	43
3.7.7. Elektroforez.....	43
3.7.8. Görüntüleme.....	43
3.7.9. Analiz	43
3.8. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	44
3.9. İstatistiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Hasta İzolatları	46
4.2. Taşıyıcı İzolatları	47
4.3. Duyarlılık	51
4.4. <i>emm</i> Geni Tiplerinin Belirlenmesi	51
4.4. Toksin Genlerinin Araştırılması.....	54
4.5. Klonal İlişkinin Araştırılması.....	57
4.6. <i>emm</i> Tipleri, PFGE Profilleri ve Toksin Genleri İlişkisi.....	60
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇLAR	87

7. KAYNAKLAR	89
7. EKLER.....	108
Ek 1: Etik Kurul Onayı	108

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AGN	: Akut glomerulonefrit
ARA	: Akut romatizmal ateş
ark.	: Arkadaşları
ASO	: Antistreptolizin O
bç	: Baz çifti
C	: Santigrad
Cm	: Santimetre
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Dnaz	: Deoksiribonükleaz
DPNaz	: Difosfopiridin nükleotidaz
EDTA	: Etilendiamintetraasetat
EMB	: Eozin metilen mavisi
GAS	: Grup A streptokok
gr	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
IL	: İnterlökin
kDa	: Kilodalton
M	: Molar
mg	: Miligram
MHC	: Majör histokompatibilite kompleksi
ml	: Mililitre
MLS	: Makrolid linkozamid streptogramin direnci
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
PFGE	: Pulsed-field jel elektroforezi
PSRA	: Post streptokoksik reaktif artrit
PYR	: Pirolidonil arilamidaz

PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	: Picomolar
SMEZ	: Streptokokal mitojenik ekzotoksin Z
SOF	: Serum opasite faktörü
SPE	: Streptokokal Pirojenik Ekzotoksin
ssa	: Streptokokal Süperantijen
STŞS	: Streptokokal Toksik Şok Sendromu
TBE	: Tris- Borik asit –EDTA
TE	: Tris –EDTA
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TRIS	: Tris(hidroksimetil) aminometan
U	: Unite
UPGMA	: Unweighted pair group method with mathematical averaging
UV	: Ultraviyole
ÜSYE	: Üst solunum yolları infeksiyonu
V	: Volt
μ A	: Mikroamper
μ g	: Mikrogram
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar

TABLO DİZİNİ

Tablo

Sayfa

Tablo 1: <i>emm</i> gen paternlerinin ilişkili olduğu süperaileler ve enfeksiyon bölgeleri.	9
Tablo 2: GAS adezinleri ve konak hücre reseptörleri	23
Tablo 3: Öğrenciler için doldurulan anket formu örneği.	34
Tablo 4: Amplifikasyonda kullanılan primer çiftleri	40
Tablo 5: Hasta örneklerinin dağılımı	46
Tablo 6: İzolatların elde edildiği hastaların yaş gruplarına göre dağılımı	47
Tablo 7: Hasta örneklerinin cinsiyete göre dağılımı	47
Tablo 8: İzolatların yaş gruplarına göre dağılımı.....	47
Tablo 9: Okullara göre üst solunum yolu muayene bulgularının dağılımı	48
Tablo 10: Okullara göre taşıyıcılık oranları	48
Tablo 11: Öğrencilerin cinsiyetlerine göre taşıyıcılık oranları	49
Tablo 12: Öğrencilerin kardeş sayılarına göre taşıyıcılık oranları.....	49
Tablo 13: Öğrencilerin evlerinin ısınma yöntemlerine göre taşıyıcılık oranları.....	49
Tablo 14: Öğrencilerin evlerinin ısınma yöntemlerine göre taşıyıcılık oranlarının okullara göre dağılımı	49
Tablo 15: Taşıyıcılık oranlarının farklı değişkenlere göre dağılımları.	50
Tablo 16: İzolatların direnç durumlarının gruplara göre dağılımı (n).....	51
Tablo 17: <i>emm</i> tiplerinin izolat gruplarına göre dağılımı (n).....	52
Tablo 18: Okullara göre saptanan <i>emm</i> tip dağılımı	53
Tablo 19: İzolat gruplarına göre toksin genlerinin dağılımı	54
Tablo 20: Toksin gen profillerinin gruplara göre dağılımı	55
Tablo 21: Toksin gen profillerinin cinsiyete göre dağılımı.	56
Tablo 22: Toksin genlerinin birlikte saptanma oranları.....	56
Tablo 23: PFGE kümelenme oranları	59
Tablo 24: En sık görülen PFGE profillerine göre saptanan toksin genlerinin dağılımı	59
Tablo 25: En sık görülen PFGE profillerinde saptanan toksin gen profilleri	60
Tablo 26: En sık saptanan <i>emm</i> tiplerine göre toksin genlerinin dağılımı.....	61
Tablo 27: En sık saptanan <i>emm</i> tiplerine göre <i>speA-speC</i> birlikteliği	61

Tablo 28: En sık görülen <i>emm</i> tiplerine ve izolat gruplarına göre toksin gen profillerinin dağılımı	62
Tablo 29: Bazı çalışmalara ait saptanan GAS taşıyıcılık oranları.....	64
Tablo 30: Bazı çalışmalara ait saptanan direnç oranları	69
Tablo 31: Toksin genleri ile ilgili yapılmış bazı çalışmalara ait veriler.	78
Tablo 32: Ülkemizde <i>emm</i> tipleri ile ilgili çalışmalarda bulunan <i>emm</i> tipleri dağılımı	85

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: <i>Streptococcus pyogenes</i> ' in hücre yüzeyi yapısı ve virulansta rol oynayan ürünleri.....	5
Şekil 2: M proteininin yapısındaki A, B, C ve D tekrarları ile protein bağlantı..	7
Şekil 3: <i>emm</i> genlerine ait amplifikasyon ürünleri.	51
Şekil 4: En sık saptanan 6 <i>emm</i> tipinin klinik ve taşıyıcı izolatlarına göre dağılımı .	52
Şekil 5: Toksin gen bölgelerinin amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonrası jel görüntüleri.....	54
Şekil 6: PFGE jel görüntüsü.....	57
Şekil 7: İzolatlar arasındaki klonal ilişkiyi gösteren dendrogram.....	58
Şekil 8: <i>emm</i> tiplerine göre izolat sayıları.....	62

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Grup A streptokoklar (GAS, *Streptococcus pyogenes*), üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları, kızıl, deri enfeksiyonları, nekrotizan fasit, streptokokal toksik şok sendromu, akut romatizmal ateş ve akut glomerulonefrit gibi enfeksiyöz hastalıkların etkeni olan önemli patojenlerdir (1).

Çocukluk çağında üst solunum yolu enfeksiyonlarında en sık görülen bakteriyel etkenin GAS olduğu bildirilmiştir (2-3). Toplumda nazofarenkste GAS taşıyıcılığı oranının bölgeye ve yaşa göre değiştiği, özellikle çocukluk çağında yüzde 15-20 oranlarında görülebildiği belirtilmektedir. Taşıyıcılık ve enfeksiyon geçirme açısından okul, kreş gibi kalabalık ortamlar risk faktörüdür (3-5).

Grup A streptokokların neden olduğu, sepsis, septik şok ve nekrotizan fasit gibi hastalıkların içinde yer aldığı invazif enfeksiyonların sıklığında, özellikle 1980'li yılların ortalarından itibaren artış görülmüştür. Morbidite ve mortalitesi yüksek olan bu tür enfeksiyonlara yol açan GAS suşlarının toksin yapıları ve *emm* tipleri gibi genetik özellikleri ile ilgili çalışmaların sayısı gittikçe artmaktadır (6).

GAS'ın virulans faktörleri arasında M proteini, pirojenik eksotoksinler, kapsül, streptolizin O ve S, F proteini, streptokinaz ve DNaz bulunmaktadır (2). Virulans faktörlerinden M proteini ayrı bir öneme sahiptir. M proteini hücre yüzeyinde bulunan antijenik yapıda bir proteindir. Antifagositer ve antikomplementer özelliği bulunmaktadır. GAS, M proteinine göre 100'den fazla serotipe ayrılmıştır. M proteini, GAS'a karşı aşı geliştirme çalışmaları için iyi bir adaydır (5). Ancak kişi aşı kapsamı dışında kalan M tipleriyle streptokoksik enfeksiyon geçirebildiğinden, aşı geliştirme konusunda bölgedeki yaygın serotiplerin bilinmesi önemlidir.

M proteini *emm* geni tarafından kodlanmakta olup, moleküler yöntemlerle 120'den fazla *emm* tipi gösterilmiştir. Çalışmalarda belli *emm* geni tiplerinin, farklı klinik tablolarla ilişkili olabildiği bildirilmiştir. *emm* geninin tiplendirilmesi için DNA dizi analizi yöntemi kullanılmaktadır (7-8).

GAS'ın önemli virulans faktörlerinden streptokokal pirojenik (eritrojenik) toksinler, pirojenik ve eritromatöz deri enfeksiyonları, toksik şok sendromu, bakteriyemi, sepsis ve peritonit gibi morbidite ve mortalitesi yüksek invazif enfeksiyöz hastalıklar ile ilişkilidir. Bugüne kadar tanımlanmış olan toksin genleri

speA, *speB*, *speC*, *speF*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *ssa*, *smeZ* ve *smeZ2*'dir. Özellikle *speA* geninin daha ağır seyreden streptokokal enfeksiyonlarla ilişkisini araştıran çalışmalar mevcuttur (9-10).

GAS virölans faktörlerini moleküler yöntemlerle araştıran çalışmalar irdelendiğinde, boğaz enfeksiyonu etkeni GAS izolatlarının dizi analizi ile *emm* tiplerinin belirlendiği iki tez çalışması dışında ülkemizden herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır (11-12).

Moleküler epidemiyolojik çalışmalar, hastanelerde ve toplum içinde enfeksiyon etkenlerinin yayılma dinamiğini anlama ve kontrol etmede yararlıdır (13-14). "Pulsed-field" jel elektroforezi (PFGE), moleküler epidemiyolojik yöntemler arasında tiplendirebilirliği, tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü ile öne çıkan, GAS izolatları arasındaki klonal ilişkinin değerlendirilmesinde kullanılabilen uygun bir yöntemdir (13-16).

Hastanemize başvuran hastalardan endikasyon gereği alınan örneklerden etken olarak izole edilen GAS izolatları ile ilköğretim okullarında yapılan tarama ile 1-8. sınıflar arasındaki çocukların boğaz kültürlerinden izole edilen GAS izolatlarının değerlendirildiği bu çalışmada,

1- Bölgemize ait GAS taşıyıcılık prevalansı ile ilgili ilk bilgilerin elde edilmesi,

2- Hasta ve taşıyıcılardan izole edilecek olan GAS izolatlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılık durumlarının belirlenmesi,

3- İzolatlar arası klonal ilişkinin belirlenmesi, bu ilişkiyi etkileyebilecek faktörlerin ve bu mikroorganizmanın bölgemizde yayılma dinamiğinin değerlendirilmesi

4- GAS izolatlarının *emm* geni tipleri ile ilgili bölgemizden ilk verilerin elde edilmesi ve Türkiye'de yapılan/yapılacak benzer çalışmalarla bu verilerin birleştirilerek aşı geliştirme çalışmalarına katkı sağlanması,

5- Eritrojenik toksin gen profilinin (*speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *smeZ*) klinik izolatlar ve asemptomatik taşıyıcı populasyon izolatları arasındaki dağılımının karşılaştırılması, amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Grup A Beta Hemolitik Streptokoklar (GAS)

Fehleisen 1883 yılında erizipel lezyonlarından ilk kez Grup A streptokokun saf kültürünü elde etmiş, Rosenbach ise 1884'te bu mikroorganizmayı "*Streptococcus pyogenes*" olarak isimlendirmiştir. Streptokokların serogruplara ayıran Lancefield, bu türün virulansı ve GAS'lara karşı gelişen doğal ve kazanılmış immünitede M proteininin etkisini saptamıştır (17). Yirminci yüzyılın ikinci yarısında GAS suşları ile akut romatizmal ateş ve akut glomerulonefrit ilişkisi bulunmuştur (18). Aynı dönemde "et yiyen hastalık" olarak bilinen nekrotizan fasitli, yanıklı hastalarda ve 2. Dünya Savaşı'nda yaralanan askerlerde görülen mortalitenin önemli bir sebebi olarak bildirilmiştir. Kanada'da 1980'li yıllar sonlarında *S. pyogenes*'in etken olduğu nekrotizan fasit salgınları görülmüştür (19).

2.2. Tanım

Grup A streptokoklar, gram pozitif boyanma özelliği gösteren, spor oluşturmeyen koklardır. Pürülan lezyonlarda ve özellikle sıvı besiyerlerinde kısa-orta uzunlukta zincir oluşturan küre veya ovoid şekilli bakterilerdir. Üreme esnasında tek bir düzlemde bölünmelerinden dolayı zincir oluşturmaktadırlar. Patojen streptokokların oluşturdıkları zincirler, normal floradaki streptokokların oluşturdıklarına göre daha uzun olmaktadır. Zincir oluşturma özellikleri; besiyeri içeriği, ortam ısısı ve besiyerine eklenen antibiyotikler gibi çeşitli etkenlerden etkilenmektedir (1, 20-21).

S. pyogenes, bu grubun temsilcisi olan türdür. Bu mikroorganizma fakültatif aeroptur, optimum üreme ısısı 35-37°C, uygun üreme pH'sı ise 7,4 ile 7,6 arasındır. Serum, kan ve beyin gibi zenginleştirici maddeler eklenmiş besiyerlerinde daha iyi üreme gösterirler. Yüzde 5-7 koyun kanlı agarda beta hemoliz oluşturur, bu hemoliz zonu 2-3 mm çapında görülür ve koloninin 2-3 katından daha geniş olabilir. Beta hemolitik özelliği anerobik ortamdaki inkübasyonda daha belirgin olarak ortaya çıkar. *S. pyogenes*'in beta hemolitik aktivitesi bakteride bulunan Streptolizin S ve O nedeniyle oluşur (1, 21-22).

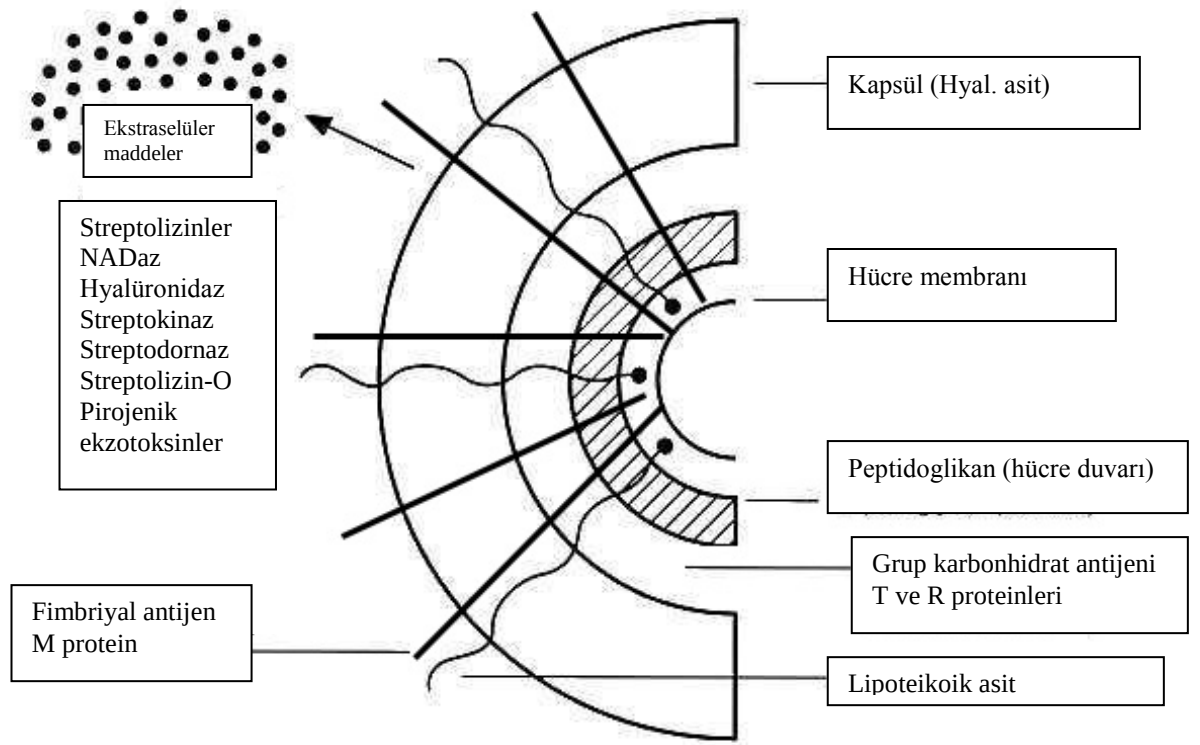
S. pyogenes, kanlı agarda küçük, gri görünümde koloniler oluşturur. Besiyerinde oluşan hiyalüronik asit yapısındaki kapsül, koloni büyüklüğünü ve yüzey yapısını etkiler, hiyalüronik asit fazla ise koloni daha parlak görülmektedir (20-23).

2.4.2. Yapısı

Kompleks bir yapıya sahip olan hücre duvarı üç kısıma ayrılır:

1. En iç kısımdaki peptidoglikan (mukopeptid) tabaka bulunmaktadır, özellikle duvarın sertliğinden sorumludur.
2. Polisakkarit veya gruba özgül karbonhidratların olduğu kısım. Hücre duvarının bu komponenti insan kalp kapaklarındaki glikoprotein ile benzer bir antijenik yapı gösterir.
3. Hücre duvarının en dış kısmında M, T ve R proteinleri bulunur.

Hücre duvarı peptidoglikan matriks üzerinde yer almakta olduğundan sağlam bir yapıya sahiptir. Peptidoglikan matrikste GAS gruplandırılmasında kullanılan karbonhidrat antijeni bulunmaktadır. Lipoteikoik asit ve M proteini hücre duvarına bağlı bulunmakta ve dışa doğru pili şeklinde uzanmaktadır. Hücre duvarında T ve R proteinleri de yer almaktadır. Suşların bazılarında hiyalüronik asit yapısında kapsül bulunmaktadır (20-23) (Şekil 1).



(<http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/strep.fig2.jpg> internet adresindeki şekilden değiştirilerek uyarlanmıştır.)

Şekil 1: *Streptococcus pyogenes*' in hücre yüzeyi yapısı ve virulansta rol oynayan ürünleri.

2.4.3. Virulans Faktörleri

GAS'lar immün sistemden kaçmaya veya immün sistemi ortadan kaldırmaya yarayan bir takım virulans faktörlerine sahiptir. Bu virulans faktörleri kolonizasyonda, fagositozun oluşmasında ve konağın immün yanıtının meydana gelmesinde rol oynar. 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 faktörler arasındadır (21).

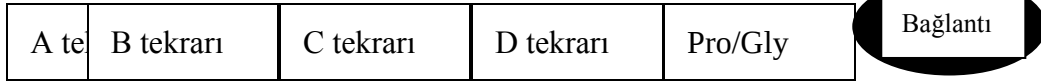
2.4.3.1 Yüzey antijenleri

S. pyogenes'in hücre yüzeyinde bulunan bazı antijenler, insan kalp, düz kas dokusu, iskelet, kalp kapak fibroblastları ve nöronal dokuları ile benzerlik gösterirler. Bu durum konakta immün toleransa veya baskılanmış immün yanıtın oluşmasına yol açar. Duyarlı bazı kişilerde mikroorganizmaya karşı oluşturulan antikorların otoimmün mekanizmalarla akut romatizmal ateş ve akut glomerulonefrit gibi klinik tablolar görülebilmektedir (2-3).

a) M proteini: Grup A streptokokların en önemli yüzey antijeni olan M proteini, mikroorganizmanın bağışıklık sisteminden kaçmasını sağlamaktadır. M protein antijeni, tripsine duyarlı, asit ve ısıya dirençlidir. Alkolde çözünür. M proteini, tekrarlayan yedili hidrofobik parçaları ve sekonder alfa helikal yapısı nedeniyle yay şeklindedir. M proteininin yüksek değişkenlik gösteren N-terminali, grup A beta hemolitik streptokokların serolojik tiplendirmesini ve tipe özgül antikor oluşumunu sağlamaktadır. Başlıca mat ya da mukoid koloni yapan A grubu streptokoklarda bulunan M proteini, fimbria ile ilgili olup epitel hücrelerine tutunmayı sağlamaktadır. M proteini olmayan streptokokların fimbriaları bulunmaz. M proteini C-terminali ile konak proteinlerine bağlanarak ya da konak proteinlerinin mikroorganizmaya bağlanmasını engelleyerek kompleman C3b ile işaretlenmesini önlemekte, böylece mikroorganizmanın fagositer hücreler tarafından tanınmasını ve fagosit edilmesini sağlayan kompleman sistemini durdurmaktadır (1-2, 21, 24-26).

M proteini hücre zarına tutunan filamentöz bir makromoleküldür ve hücre duvarını geçerek dışarıya doğru uzanmaktadır. M proteininin N-terminalinde serotipler arasında çeşitliliğe neden olan yüksek değişken ve tipe özgül epitoplar, karboksi terminalinde ise pek çok M serotipinde ortak olarak bulunan epitoplar bulunmaktadır. Hastalıkları Önleme Merkezi (Center for Disease Control: CDC) verilerine göre M proteini yüksek değişkenlik gösteren N-terminaline göre en az 100 farklı serotipe ayrılmıştır. N-terminali negatif elektrik yüklüdür ve helikal yapıda değildir (8, 24-25, 27-29).

Şekil 2’de M proteininin yapısındaki A, B, C ve D tekrarları görülmektedir.



Şekil 2: M proteininin yapısındaki A, B, C ve D tekrarları ile protein bağlantı. A tekrar bölgesi serotipler arasında değişkenlik gösterir ve N terminalinde yüksek derecede değişken, serotipe özgül M proteini amino asit dizisi içerir. B tekrar bölgesi serotipten serotipe değişkenlik gösterir. C tekrar bölgesi tüm serotiplerde ortak olarak bulunan korunmuş dizi içerir. Bağlantı bölgesi ise gram pozitif hücre zarına tutunmayı sağlar (2 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

M proteini karboksi ucundaki farklılıklar nedeniyle iki sınıfa ayrılmıştır:

M proteini sınıf I: Molekül ağırlığı yüksek olan bu grup proteinler, GAS suşlarının hepsinin yüzeyinde sunulur ve C tekrar ünitesine karşı gelişen antikorlara bağlanma özelliği gösteren epitopu bulundurlar. Bu grup proteinlerin serum opasite faktörleri negatiftir. ARA’ya neden olan serotiplerle M protein sınıf I epitopu arasında güçlü ilişki bulunduğu bildirilmiştir (2). M proteini sınıf I epitopu, yapısal ve immunolojik açıdan insan kasında bulunan miyozin, sarkolemma, α -tropomiyozin, laminin ve vimentin gibi proteinlere benzerlik göstermektedir. Bu yüzden konak ile mikroorganizma arasında çapraz reaksiyonlara yol açabilmektedirler (24-25, 28-31).

M proteini sınıf II: M proteini sınıf I epitopuna sahip olmayıp, serum opasite faktörleri pozitiftir. Cilt enfeksiyonlarından sorumludur. Daha düşük molekül ağırlıklı tiptir (25, 30-31).

GAS suşlarının bir bölümü serotiplendirilememektedir. M proteinleri *emm* gen bölgesi tarafından kodlanmaktadır. M proteinine immunolojik olarak özgüllük kazandıran *emm* geninin 5’ parçası, bilinen bütün M serotipleri için sekanslanarak *emm* tipleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler CDC ve/veya GeneBank genetik veritabanlarında bulunmaktadır (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/emmtypes.html>). CDC verilerine göre şu ana kadar 124 *emm* tipi tanımlanmıştır, dünyanın çeşitli merkezlerinde saptanan birçok alttip dizisinin farklı bir *emm* tipi olup olmadığına dair analizler CDC tarafından yürütülmektedir. En sık görülen *emm* tipleri *emm1*, *emm6*, *emm18*, *emm48*, *emm49*, *emm75*, *emm95* ve *emm103*’tür (8, 32). *emm* dizi analizi iki adet yüksek korumalı

primer aracılığı ile *emm* geninin büyük bir parçasını çoğaltmak prensibi ile uygulanmaktadır. M protein serospesifitesini belirleyen yüksek değişken dizinin, gen çoğaltma işlemi sırasında kullanılan primer dizinin komşuluğunda yer alması, bu bölgenin doğrudan sekanslanmasını sağlamaktadır. Bu yöntemle M protein gen dizileri (*emm1-emm124*) belirlenmekte, yeni *emm* dizi tip ve alttiplerinin tanımlanması sağlanmaktadır. Bu metot *S. pyogenes* tiplendirme yöntemleri içinde altın standart olarak kabul edilmektedir (8, 21).

S. pyogenes, M proteininin N-terminaline karşı oluşan IgG karakterindeki antikorları hidrolize edecek bir proteaz da salgılamaktadır. Grup A streptokokların bazıları *emm* gen komşuluğundaki *emm* benzeri gen lokuslarından M protein benzeri proteinler kodlamaktadır. Bu proteinler de antifagositer özellik göstermekle birlikte esas görevleri mikroorganizmanın konak bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılmasını sağlayan proteinlerin etkisiz hale getirilmesidir (2-3, 20, 29).

A grubu beta hemolitik streptokoklara ait *emm*-benzeri genler toplu olarak genetik materyalin *vir* lokusunda yer almakta olup, 5' ve 3' bölgelerindeki farklılıklara ve lokus içerisindeki yerleşimlerine göre *emm*, *enn* ve *mrp* olmak üzere üç farklı gen grubuna ayrılmaktadırlar ve M proteinindeki antijenik değişikliklere, M proteinini kodlayan *emm* gen bölgesinde, genler arası ve gen içi rekombinasyonlar, nokta mutasyonlar ve kısa nükleotid girişleri yol açmaktadır (2, 25).

M protein geni (*emm*) ile ilişkili genler M geni süperailesi olarak adlandırılmaktadır ve immünglobulin bağlayan proteinleri, M ilişkili proteinleri ve M proteinlerini içermektedir. Bu proteinler immünglobulin bağlayan özellikte veya antifagositer davranışta bulunabilirler. 5' uçlarında % 70'den büyük DNA sekans benzerliği gösteren *emm* geni süperailesi içinde 20'den fazla gen tanımlandığı bildirilmiştir. M proteini molekülünün hücre ilişkili bölgesindeki 3 ayrı alanda yüksek oranda korunmuş benzerlik bulunmaktadır (2).

emm süperailesi genlerinin sayıları ve düzenine göre beş majör *emm* kromozomal alt-aile gen paterni tanımlanmıştır. Bu alt-aile gen paternleri A'dan E'ye kadar isimlendirilmiştir. *emm* gen paternleri birçok farklı fenotip gösterebilir (Tablo 1) (2).

Tablo 1: *emm* gen paternlerinin ilişkili olduğu süperaileler ve enfeksiyon bölgeleri.

Kromozomal patern	Enfeksiyon	<i>emm</i> geni süperailesi	M sınıfı	Opasite faktör reaksiyonu	İzolatu genellikle elde edildiği örnek	Tipik M serotipleri
A	Farenjit	SF1*	I	Negatif	Boğaz	1, 3, 6, 12, 17, 19, 24
B	Farenjit	SF1-SF1	I	Negatif	Boğaz	1, 5, 14
C	Farenjit	SF1-SF3	I	Negatif	Boğaz	18
D	İmpetigo	SF4-SF1-SF3	I	Negatif	Deri	33, 41, 42, 52, 53, 70
E	Farenit veya impetigo	SF4-SF2-SF3	II	Pozitif	Boğaz veya deri	2, 4, 11, 22, 28, 49, 75

*SF: Süperaile (2 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır.)

Her *emm* dizisinde yaklaşık 15-23 membran eksport sinyal dizi_kalıntısı ve 60-250 aminoasitten oluşan, olgun M proteininin N terminalini kodlayan 5' parçası bulunmaktadır (8).

M proteinlerinin serotipleri ve *emm* gen tipleri ile klinik arasındaki ilişkilere ilgili bölümde ayrıca değinilmiştir.

b) T proteini : T proteini ısıya ve asite duyarlı, pepsin ve tripsine dayanıklı, alkolde çözünmeyen, virulans arttırıcı etkisi olmayan antijenik bir proteindir. Vücutta kendilerine karşı antikor üretmezler. T protein antijeni M ve R proteinleri ile birlikte hücre yüzeyinde bulunur. T proteinini kodlayan *tee* genleri arasında homoloji olmasına rağmen, *emm* genlerine göre daha çok çeşitliliğe sahiptirler. M proteinlerinin tersine, *tee* geninin en iyi korunmuş ucu amino terminalidir. Bu gözlemlere göre GAS'lar 25 farklı kombinasyonda T proteini türü içerebilmektedir ve T proteinine karşı geliştirilmiş antiserumlarla yapılan aglütinasyon yöntemi ile streptokoklar serotiplendirilebilmektedir (2, 20).

c) R proteini: R proteini pepsine duyarlı, tripsine dayanıklı, virulansta rol oynadığı düşünülmeyen ve tiplendirmede henüz kullanılmayan bir antijendir (20). Tipe özgül değildir, R28 ve R3 şeklinde iki tipi belirlenmiştir. i) R28: Bu protein ile puerperal sepsis arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Genellikle bu hastalık nedeniyle oluşan

salgınlardan izole edilen suşların büyük kısmında bulunduğu belirtilmektedir. Bu tip proteinden yoksun mutant bir bakterinin genital epitel hücrelerine bağlanamadığı gözlenmiştir, bu yüzden R28 proteininin doku tropizmi ve kadın genital sistemine adezyonu sağladığı düşünülmektedir. ii) R3: Bu protein hakkında fazla bilgi bulunmamakla beraber virulansta rol oynamadığı düşünülmektedir (20, 33).

d) Serum opasite faktörü (SOF): GAS suşlarının hücre duvarında bulunan, bu türün en önemli fibronektin bağlayıcı proteinidir. SOF lipoproteinaz yapıda, at serumu içeren besiyerinde opaklaşmaya neden olan bir antijendir. Bu protein mikroorganizma tarafından salınır ve hücre yüzeyine tutunur. Opasite reaksiyonu HDL'nin agregasyonu ve HDL'nin çözünmemesine yol açan apoprotein A1'in parçalanmasıyla ortaya çıkar. SOF, hücre yüzeyine bağlanan çift fonksiyonlu bir protein olarak görev yapar. Bu iki aktivite; serumu opaklaştırma ve C-terminal bölgesi ile fibronektin-fibrinojen bağlamadır (2, 6).

SOF bulunduran streptokokların impetigo etkeni veya nefritojenik olduğu gösterilmiştir. Bazı SOF tiplerinin belli M serotipleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir, SOF streptokokların serogruplandırılmasında kullanılmaktadır.(3, 26, 34).

e) Kapsül antijeni: GAS kapsülü, N-asetil glukozamin ve D-glukuronik asit moleküllerinin oluşturduğu yüksek molekül ağırlıklı hyalüronik asit polimerlerinden meydana gelmektedir (1). Kapsül, *hasA*, *hasB* ve *hasC* denilen üç adet genden oluşan küme tarafından kodlanan enzimlerin bir ürünüdür. Bu 3 gen, sırasıyla, hyalüronik asit sentaz, UDP-glukoz dehidrogenaz ve glukoz pirofosfataz enzimlerini kodlar. Bu genler, GAS suşları arasında yüksek derecede korunmuştur ve kapsüller gen ekspresyonu derecesindeki varyasyonlar gen transkripsiyonunun düzenlenmesindeki farklılıkları yansıtmaktadır. Sözü geçen genlerin çokça eksprese olması, mikroorganizmanın koyun kanlı agarda mukoid koloniler halinde üremesine yol açar. *CrsS* ve *CrsR* adındaki iki gen ürünü, *has* geni ekspresyonunun düzenlenmesi ile kapsül oluşturma derecesini artırma ve azaltma yeteneğine sahip 2-komponentli regülatör sistem olarak fonksiyon görmektedir. Kimyasal olarak, bu kapsüller materyal, bağ dokusunun zemin maddesinden ayırt edilememektedir ve bu durumun enfekte konakta bu maddenin yetersiz immün yanıt oluşturmamasını

açıklayabileceği düşünülmektedir. Kapsülün antijenik özelliği fazla olmamakla birlikte virulans artırıcı özelliği bulunmaktadır (1-2, 20).

g) Lipoteikoik asit (LTA): Fibronektine bağlanma özelliğinde olan virulans faktörüdür. Birçok hücre için sitotoksik etkisi bulunmaktadır. Mikroorganizmanın faregeal mukozaya yapışmasının başlamasında merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (1).

h) Fibronektin bağlayıcı proteinler: LTA'ya ek olarak streptokokal adezinler arasında sayılan, fibronektin bağlayıcı proteinler; protein F1 (sfbI-streptokokal fibronektin bağlayan protein I), protein F2 (sfbII), FPB54 ve PFBP'den oluşmakta ve mikroorganizmanın mukozal ve kutanöz hücre tiplerinin yüzeylerde bulunan fibronektin molekülünün amino terminaline yapışmasında rol oynamaktadır (1).

2.4.3.2. Toksin ve enzimler:

GAS suşları hastalık yapıcı özellikleri arasında salgıladıkları bazı toksin ve enzimler de önemlidir.

a) Streptolizin-S ve Streptolizin-O : Grup A beta hemolitik streptokoklar, oksijene dayanıklı lökosidin olan streptolizin-S ve oksijene duyarlı lökosidin olan streptolizin-O olmak üzere hücre dışı ortama iki çeşit hemolizin salgılar. Bakteri, bu sitotoksinler ile lökosit, trombosit ve doku hücrelerinde lizis oluşturur. Lökosidinler, konak organizmanın hücre zarına doğrudan bağlanarak hücre erimesine neden olan transmembran kanallar oluşturmaktadır (3, 20-21).

Streptolizin-O, oksijene duyarlı, ısı ve asitlere dirençlidir ve besiyerindeki derin hemolizden sorumludur. Bu hemolitik etki, ortamda oksijen varlığında geri dönüşümlü, kolesterol varlığında ise geri dönüşümsüz olarak ortadan kalkar. Etkinliği, ultrasantrifügasyon, dondurma-çözme ve liyofilizasyon ile azalmaktadır. Lökosit ve trombositler için toksiktir. Bu proteinin kardiyotoksik özellik göstermesi klinik önem taşımaktadır. Antijenik özelliğe sahiptir. Streptolizin-O'ya karşı konak tarafından oluşturulan antikorlar serolojik tanı için kullanılmaktadır (Antistreptolizin-

O antikor – ASO) (20). ASO, enfeksiyondan 3-6 hafta sonra en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Bu yükselme üst solunum yolu enfeksiyonlarından sonra gözlenirken *S. pyogenes*'in etken olduğu cilt enfeksiyonlarında ASO yanıtı oluşmamaktadır (21).

Streptolizin-S, kanlı agardaki yüzeyel hemolizden sorumlu olan, oksijene dayanıklı bir polipeptittir. Eritrosit, lökosit ve protoplastları eriten bu peptit fagositozu engellemektedir. Hemolitik aktivitesi, lesitin ve beta lipoproteinaz tarafından engellenen bu protein antijenik değildir. Üremenin geç logaritmik fazında ve durağan fazında demir elementi varlığında en yüksek düzeyde üretilmektedir. Streptolizin S'nin membran fosfolipidleriyle etkileşerek toksik etkilerini gösterdiği düşünülmektedir. (1, 3, 20).

b) Streptokinaz: Streptokinazlar (fibrinolizin), konak organizmanın plazmasında aktif olmayan plazminojen molekülünü aktif form olan plazmine dönüştürerek fibrinin eritilmesini sağlar. Plazminin fibrinolitik etkisi mikroorganizmanın çevresinde oluşan fibrin bariyerini aşarak çevre dokulara yayılmasına yardım etmektedir. Plazminojen ve streptokinaz kompleksi ayrıca kompleman proteinlerini alternatif yoldan aktive etmektedir. (3).

c) Streptodornaz : Streptodornazlar (DNaz), tüm grup A streptokoklarda bulunan ve deoksiribonükleik asidi depolimeraz ederek enfeksiyon ortamının akıcılığını sağlayan enzimdir. İmmunolojik ve elektroforetik olarak dört tipe ayrılırlar. Streptodornaz B ve D ek olarak ribonüleaz aktivitesine sahipken Streptodornaz A ve C ise sadece deoksiribonükleaz aktivitesi göstermektedir. Deri ve boğaz enfeksiyonlarında streptodornaza karşı gelişen antikorlar serolojik tanıda kullanılır. Üretilen dört DNaz arasında DNaz B'ye karşı oluşan konak yanıtı daha tutarlıdır. Anti-DNaz B titresi 6-8 haftaya en üst düzeye ulaşmaz, ancak ASO titresinden daha uzun süre yüksek olarak kalır ve geçirilmiş streptokoksik deri enfeksiyonunu saptamada ASO'dan daha güvenilirdir. Romatizmal ateşli vakaların % 80-85'inde ASO titresi yükseldiğinden dolayı tanıda DNaz B titresinin de ek olarak kullanılması güvenilirliği arttırabilir (3, 17, 20).

2-12 yaş arası çocuklarda *S. pyogenes* ile sık karşılaşılmasından dolayı yüksek ASO ve DNaz B titreleri bulunabilir. Enfeksiyonun tam olarak tedavi edilmesi titreyi düşürür, ancak antikor üretimini bitirmez.

Streptodornaz ve streptokinaz birlikte seröz boşluklarda gelişen inflamasyonlar sonucu oluşan yapışıklıkların ayrılması ve koyu irinin akışkan hale getirilerek boşaltılmasının sağlanmasında kullanılmaktadır (20-23).

d) Hyalüronidaz: Streptokokların doku içinde yayılmasını sağlar ve hyalüronik asiti depolimeraz ederek yayılma faktörü olarak görev yapar. Antijenik özelliktedir. (20).

e) Difosfopiridin nükleotidaz (DPNaz): DNP'den nikotinamidi açığa çıkaran ve özellikle nefritojenik streptokoklar tarafından üretilen bir enzimdir.

f) Streptokokal pirojenik (eritrojenik) ekzotoksinler (SPE): Grup A streptokoklar'ın kızıl gibi toksinlerle oluşturdukları klinik tablolardan sorumlu eritrojenik toksin olarak da bilinen protein yapısında toksinlerdir. Şu ana kadar tanımlanmış SPEA, SPEB, SPEC, SPED, SPEF, SPEG, SPEH, SPEJ, SPEK, SPEL, SPEM, SSA (Streptokokal süperantijen), SMEZ (Streptokokal mitojenik ekzotoksin Z) ve SMEZ-2 olmak üzere 14 tipi bulunan streptokokal pirojenik ekzotoksinler süperantijen olarak davranmakta ve antijen sunucu hücreler tarafından işlenmesine gerek olmadan doğrudan ve spesifik olmayan yollarla MHC sınıf II moleküllerine bağlanarak T hücrelerini uyarmaktadırlar (1-2).

Lizojenik fajlar tarafından kodlanan, SPEA kızıl hastalığında görülen döküntü bulgusundan sorumludur, ayrıca bu toksin Streptokokal Toksik Şok Sendromu (STŞS) patogenezindeki başlıca virulans faktörüdür. Pirojenik ekzotoksinlerden A ve kodlayan geni iyi tanımlanmıştır, bu toksinlerle ilgili yapılmış olan çok sayıda çalışma mevcuttur. SPEA'nın çok miktarda gama interferon ve TNF-beta salınmasını indüklediği gösterilmiştir. *speA*'nın nükleotid dizisi Weeks ve Ferretti tarafından belirlenmiştir. *speA*'nın 37°C'de 26°C'dekinden 4 kat fazla eksprese olduğu gösterilmiştir. *speA*'nın birer amino asitin farklı olmasına yol açan *speA1*, *speA2*, *speA3* ve *speA4* olmak üzere 4 aleli vardır (1-2, 26, 35-36).

SPEB, bakteri kromozomu üzerinden kodlanan, genelde tüm GAS suşlarında bulunduğu bildirilen, hücre dışı sistein proteaz aktivitesine sahip olup, fibronektin ve vitronektin de dahil olmak üzere ekstraselüler matriksi oluşturan proteinlerin enzimatik olarak parçalanmasını ve interlökin-1, histamin ve kinin gibi biyolojik olarak aktif peptitlerin oluşumunu sağlamaktadır. SPEB, aslında C5a peptidaz olup hücre yüzeyine bağlanmada rol oynamaktadır. Mevcut düşünce, SPEB'nin peptidaz aktivitesinin süperantijen rolünden daha ön planda olduğudur. C5a peptidaz, bir kemotaktik kompleman komponenti olan C5a'yı inaktive ederek polimorf nüveli lökositlerin kemotaksisini sınırlamaktadır (23, 35-36).

Sistein proteaz 40 kDa'lık zimojen olarak salınmakta ve bu molekül indirgeyici koşullarda proteolitik olarak aktif olan 28 kDa'lık olgun enzime dönüşmektedir. Farenjit, romatizmal ateş ve invazif hastalıklar gibi streptokok enfeksiyonlarında konak organizmada proteaza karşı antikorlar üretilmektedir. Fatal invazif hastalıklarda SPEB ekzotoksine karşı oluşan antikorlar daha hafif olgulardakinden daha düşük düzeydedir (2).

Sistein proteazın, IL-1-beta prekürsörünün aktif IL-1-beta'ya dönüştürülmesi, vitronektin ve fibronektinin degradasyonu, 66 kDa'lık insan endotelial hücre matriks metalloproteazının aktivasyonu, mononükleer lökositlerin yüzeyinden ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü salınımı gibi birçok görevi bulunmaktadır (2).

SPEC lizojenik fajlar tarafından kodlanır. *speC* kızıla neden olabilmekte, aynı zamanda süperantijen olarak görev yapmaktadır. *speC* geni iyi tanımlanmıştır, bu toksinle ilgili yapılmış olan çok sayıda çalışma mevcuttur. SPEC ile majör histokompatibilite kompleksi (MHC) ve T-hücre reseptörü arasındaki etkileşim konusu araştırılmaktadır, bazı yayınlar çinko bağımlı majör histokompatibilite kompleksi bağlayan bölgenin SPEC'nin fonksiyonu için kritik olduğunu bildirirken bazı çalışmalarda ise tersine bunun, aktivite için gerekli olmadığını belirtilmiştir (1-2, 26).

SPEF'nin ise SPEA ve SPEB gibi sitokin indüksiyon paternine sahip olduğu bildirilmiştir, bu toksinlerin büyük miktarlarda gama interferon ve TNF-beta salınmasını indüklediği gösterilmiştir. Streptokokal toksik şok sendromu kısmen süperantijen tarafından indüklenmiş çok miktarda sitokin üretimi sonucu ortaya

çıkabilir. Nükleaz aktivitesi bulunan SPEF ile birlikte SPEJ, SPEL, SPEM ve SMEZ mitojenik aktiviteye sahiptir. SMEZ 2 ise SME Z ile aynı homolojidedir (1-2, 26).

SPEG, SPEH, SMEZ ve SMEZ-2'nin rekombinan molekülleri insan periferik kan lenfositleri için mitojeniktir; SMEZ-2 mitojenik yönünden en potent olanıdır. SMEZ-2'nin ayrıca tavşan T hücreleri için de mitojenik olduğu gösterilmiştir (1-2, 26).

SMEZ bilinen diğer mitojenik ekzotoksinlerden farklıdır, anti-SMEZ antiserumları mitojenik aktivite nötralizasyon deneylerinde SPEA, SPEB ve SPEC ile çapraz reaksiyon vermemiştir. Bununla birlikte SMEZ-2, SPEG ve SPEJ'nin en yakın olarak SMEZ ve SPEC ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. SPEA, SPEC, SPEH ve SSA stafilokokal enterotoksinlerle % 20-90 sekans benzerliği bulunmaktadır (2, 26).

Filogenetik analizler, toksin genlerinin horizontal transfer ile yayıldığını düşündürmektedir. Ayrıca toksik enzimlerin üretimi *emm* tiplerine göre farklılık gösterir (2). Özellikle bakteriyofajla kodlanan süperantijenlerin varlığı veya yokluğu gibi, farklı *emm* tipleri için korunmuş süperantijen profilleri, yüzey M proteinlerinin süperantijenleri kodlayanlar da dahil olmak üzere bakteriofajların girişini selektif olarak etkilemekte olduğu düşüncesini desteklemektedir (37).

Örneğin *speA* ve *speJ* gibi bazı süperantijen genlerinin *speH* ve *speI* genleri ile beklenenden daha az bir arada bulunması, bu genleri bulunduran izolatlardaki M proteininin niteliklerinin *speA* ve *speJ* içeren mobil elemanların geçişine izin verdiği ve *speH* ve *speI* içeren bakteriyofajların girişine engel olduğunu düşündürmektedir (37, 38). Önceki bazı yayınlar süperantijen genleri ve *emm* tipi ilişkisinin bölgesel olarak değişebileceğini belirtmektedir, ayrıca zamana bağlı ortaya çıkabilecek değişimler de söz konusu olabilir (39). Örneğin, *emm1* tipi izolatlarda *speA*, *speG* ve *smeZ* genlerinin yüksek oranlarda, *speC*'nin ise az sıklıkta bulunduğu, *emm3* tipi ile *speA*'nın ilişkili olduğu, *emm12* tipi izolatlarda *speC* geninin sık saptandığı, *emm4* ve *emm77* tipi izolatlarda ise *speG*'nin düşük oranlarda bulunduğu yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (6, 38, 40-42).

2.4.3.3. *S. pyogenes* virulans faktörleri özet

Virulans faktörleri şu şekilde gruplandırılarak özetlenebilir (23):

Kolonizasyon (Aderans) Yüzey Makromolekülleri

- M-protein
- Lipoteikoik asit
- Protein F ve fibronektin bağlayıcı proteinler

Dokuya Yayılımı Kolaylaştırıcı Faktörler

- Hiyalüronidaz
- Proteazlar
- Streptokinaz : Fibrini eritir
- Streptodornazlar

Fagositozdan Koruyucu Faktörler

- Kapsül : Hiyalüronik asit yapısında
- C5a peptidaz: Serin proteza, kemotaksisi önler
- M proteini
- Lökosidinler: Streptolizin S, Streptolizin O

Konak İmmün yanıtına karşı savunma faktörleri

- Antijenik gizlenme ve hyalüronik asit tarafından sağlanan tolerans
- Antijenik varyasyon

Toksinler

- Streptokoksik pirojenik ekzotoksinler

Kan Dolaşımındaki Antikorlar

- Konağın bazı dokuları ile çapraz reaksiyon gösteren mikroorganizma antijenlerine karşı konağın oluşturduğu antikorlar, bu benzerlik nedeniyle konak dokularında hasar oluşturmaktadır.

2.4.4. Klinik ve Epidemiyoloji

S. pyogenes esas olarak solunum yollarında, sistemik dolaşımda ve ciltte akut enfeksiyonlara neden olmaktadır. Kızıl ve streptokoksik toksik şok sendromu, kan dolaşımındaki streptokokal toksinlerin neden olduğu tablolardır (3).

1980'li yılların sonlarında grup A streptokokların neden olduğu ağır, invazif yumuşak doku enfeksiyonlarının sıklığı artmıştır. Mortalitesi yüksek olan bu enfeksiyonlar sırasında gelişen çoklu organ yetmezliği tablosu, patogeneizde toksinlerin ve mikroorganizmanın kan dolaşımı aracılığı ile uzak organlara direkt

inokülasyonun rol oynadığı düşüncesini desteklemektedir (3, 20). Bakterinin neden olduğu invazif enfeksiyonlar arasında; septik şok, bakteriyemi, puerperal sepsis, nekrotizan fasit, selülit, artrit, pnömoni, ile peritonit ve menenjit gibi klinik tablolar yer almaktadır. (6, 41).

Günümüzde *S. pyogenes*, klinikte neden olduğu enfeksiyonların yanı sıra % 1-3 oranında tedavi edilmeyen ya da yetersiz tedavi edilmiş enfeksiyonlardan sonra immünojenik mekanizmalar ile gelişen akut romatizmal ateş ve akut glomerulonefrit gibi süpüratif olmayan komplikasyonlardan da sorumludur (3, 17, 20).

2.4.4.1. İnvazif olmayan enfeksiyonlar

a) Farenjit: Grup A beta hemolitik streptokoklar 5-15 yaş grubu okul çağı çocuklarında bakteriyel farenjit tablosunun en sık nedenidir. Çocukluk çağında her yaş grubunda görülmekle birlikte, en sık 5-15 yaş grubunda saptanmaktadır. Enfeksiyon, akut başlayan boğaz ağrısı, halsizlik, ateş ve baş ağrısı ile karakterizedir. Tonsiller çevresindeki pililler, uvula ve yumuşak damak kızarıklık, ödemli ve sarı-beyaz renkli eksüda ile kaplanmıştır. Servikal lenf bezlerinde şişlik ve hassasiyet görülebilir. Ateş 3-5. günlerde, diğer klinik bulgular ise bir hafta içerisinde kendiliğinden gerileyerek kaybolur. Bazen, enfeksiyon yayılarak peritonsiller ya da retrofarengeal apse, otitis media, akut sinüzit veya süpüratif servikal lenfadenit tablolarının gelişmesine neden olmaktadır. Nadiren kan dolaşımı aracılığıyla, uzak dokularda da menenjit, pnömoni ya da bakteriyemi gibi enfeksiyonların gelişmesine yol açabilmektedir (3, 17, 20).

GAS'lar kişiden kişiye temas yolu ile, çoğunlukla da tükürük veya nasal sekresyon damlacıkları yolu ile bulaşmaktadır. Solunum damlacıklarının temel bulaş yolu olmasının nedeni bu mikroorganizmanın primer yerleşim yerinin boğaz bölgesi olmasıdır (17). Kalabalık kapalı ortamlarda kolaylıkla sağlıklı bireylere bulaş olabilmektedir. Streptokoksik farenjit en sık sonbahar ve kış aylarından saptanmaktadır. Asemptomatik olguların da burun ve farenks mukozasında kolonize olan mikroorganizmaların duyarlı bireylere bulaşmasında rol oynadıkları düşünülmektedir (3, 17).

b) İmpetigo: Cilt dokusunun geçici olarak Grup A beta hemolitik streptokoklar ile kolonize olduğu dönemlerde oluşan küçük püstüler lezyonlar, kaşıntı ile sağlıklı çevre dokulara da yayılmaktadır. Yaz aylarında daha sık görülmektedir (3). İlk oluşan lezyon eritem ile çevrili, bir santimetreden küçük çapta, yuvarlak bir veziküldür. Enfeksiyonun devamında vezikül büyür, püstül oluşur ve lezyon kabuklanır. Lezyonlar en sık 2-5 yaş grubu çocuklarda, yüz ve alt ekstremitelerde görülür. Lezyonlar birleşerek derin ülserlerin oluşumuna yol açabilir (3, 17, 20).

c) Erizipel: Streptokoklar tarafından oluşturulan cilt ve cilt altı dokuları etkileyen, özellikle dermis tabakasında gelişen bir enfeksiyon olan erizipel, dokuda yaygın eritem ve ödem tablosu ile başlar ve kısa sürede iyi sınırlandırılmış, ağrılı, ateş ve lenfadenopati gibi sistemik bulguların da eşlik ettiği lokal enfeksiyon tablosu ile seyreder. Lezyon sıklıkla yüz bölgesinde görülür ve öncesinde streptokoksik boğaz enfeksiyonu hikayesi bulunur (3, 17, 20).

d) Kızıl: Streptokoksik pirojenik ekzotoksin salgılayan bir suş ile gelişen streptokoksik farenjit olgularında görülen kızıl enfeksiyonunda yanak mukozası, şakaklar ve yanaklar eritemli, ağız çevresi ve burun soluk görünümündedir. Sert ve yumuşak damakta noktasal tarzda kanama odakları görülür. Dil önce sarı-beyaz renkli eksüda ile kaplanarak beyaz, daha sonra papillardaki mukozal hiperemi nedeniyle çilek dili olarak bilinen kırmızı renk görünümünü alır. İkinci gün vücutta yaygın olarak zımpara kağıdı görünümünde bir döküntü gelişir. Antikorların kan dolaşımındaki toksinleri nötralize etmesi ile birlikte klinik tablo gerilemeye başlar (3, 17, 20).

e) Yara enfeksiyonları ve puerperal enfeksiyonlar: Grup A streptokoklar seyrek olarak ameliyat sonrası yara enfeksiyonlarına ve puerperal enfeksiyonlara da neden olmaktadır. Doğum sırasında ya da doğumdan kısa süre önce endometriumun GAS'lar ile enfekte olması yaşamı tehdit eden, ciddi bir tablodur. Bu tablo, günümüzde hijyen koşullarının iyileşmesi ile birlikte daha nadir olarak görülmektedir (3, 17, 20).

f) Nöropsikiyatrik hastalıklar: İlk defa 1998'de çocukluk çağı obsesif-kompulsif hastalık ve tik bozukluklarının, streptokoksik enfeksiyonlardan sonra otoimmün mekanizmalar ile gelişebileceği hipotezi öne sürülmüş ve bu grup

hastalıklar ‘Streptokoksik Enfeksiyonlarla İlişkili Otoimmün Nöropsikiyatrik Hastalık’ olarak adlandırılmıştır. GAS enfeksiyonu sonrasında, Sydenham koresi gelişmesine yol açan otoimmün yanıtı benzer mekanizmalarla beyin dokusunda gelişen değişiklikler sonucu obsesif-kompulsif bozukluk ya da tik bozukluklarının geliştiği bildirilmektedir (43).

2.4.4.2. İnvazif ve toksijenik enfeksiyonlar

a) Streptokokal Toksik Şok Sendromu (STŞS) : STŞS, streptokokların neden olduğu herhangi bir enfeksiyondan sonra, hipotansiyon ve çoğul organ yetmezliği şeklinde görülmektedir. Hastalık bulguları halsizlik, titreme ve lokal enfeksiyon bölgesinde aşırı ağrı ile kendini gösterir. Sıklıkla nekrotizan fasit ve miyonekroz ile komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından sonra görülür. Bulantı, kusma, ishal, hipotansiyon, şok ve çoğul organ yetmezliği tablosu çabuk gelişir. Mortalite ve morbidite oranı yüksek olabilir (3, 17, 20). Tüm yaş grubundaki hastalarda gelişebilir, hastaların çoğunda immün sistem yetmezliği bulunmaz, fakat ileri yaş, alkolizm ve diyabet, malign hastalıklar gibi altta yatan hastalıklarla ilişkisi gösterilmiştir. M1 ve M3 tiplerinin STŞS ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Streptokokal pirojenik ekzotoksinlerin ve proinflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımı ve kompleman, koagülasyon ve fibrinolitik aktivasyonun STŞS patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (6).

b) Nekrotizan fasit: Nekrotizan fasit; deri, subkutan dokular ve fasyaların ilerleyici nekrozu ile seyreden yaşamı tehdit edici bir enfeksiyondur. Bu enfeksiyonda cilt nekrozu her zaman bulunmayabilir, fakat fasya nekrozu sabit bir bulgudur. Çocuklarda nadir görülen nekrotizan fasit, tamamen sağlıklı bireylerde ortaya çıkabildiği gibi, predispozan risk faktörlerinin varlığında sıklığı artmaktadır. Ölüm oranının % 6-76 arasında bildirildiği bu hastalığa yakalananların öyküsünde çoğunlukla travma bulunmaktadır. Uzun süreli non steroid anti inflamatuvar ilaç kullanımı da bir risk faktörüdür (3, 17, 20).

Hastalığın başlangıç bulguları, tutulan bölgede ödem, kızarıklık, ısı artışı ve ödemdir. Bu erken bulgular sıklıkla selülit taklit eder ve tanı gecikebilir. Tedavi edilmeyen olgularda lezyon bölgesinde kırmızı-mor renkten gri-maviye dönüşen

görünüm değişikliği gözlenir ve 3-5 gün içinde bu bölgede ince duvarlı hemorajik büller oluşmaktadır. Damarlarda oluşan trombüse sekonder deri nekrozu da gelişebilir. Hastalıkta sistemik toksisite bulguları ve yüksek ateş görülmektedir (3, 17, 20). Hastalığın hızlı seyirli olması, ciltte gangren oluşması ve şok tablosu ile birlikte bilinç değişikliği ve belirgin ödem olması ayırıcı tanıda nekrotizan fasit lehinedir. Deri altında çocuklarda nadir olmakla birlikte gaz saptanabilir. Nekrozun yaygın olduğu olgularda hipokalsemi ve kreatin fosfokinazda artış görülebilmektedir (3, 17, 20).

c) Puerperal sepsis: Puerperal sepsis, hastada kolonize olan veya sağlık personelinin hastaya bulaşan GAS'lar endometriuma invaze olduğunda doğum veya düşük sonrasında oluşmakta, hastada sepsis tablosu görülmektedir (6).

d) GAS pnömonisi: GAS pnömonisi genellikle viral bir üst solunum yolu enfeksiyonu veya kronik pulmoner hastalıkla birlikte görülmektedir (6).

2.4.4.3. Post-streptokoksik süpüratif olmayan komplikasyonlar

GAS enfeksiyonlarından sonra bazı bireylerde immunojenik mekanizmlarla geliştiği bilinen iki tablo tanımlanmıştır: Akut romatizmal ateş, 'romatojenik' GAS suşları ile gelişen enfeksiyonlardan sonra görülmektedir. Deri ve solunum yolu enfeksiyonları dışındaki enfeksiyonlardan sonra görülmez. Son yıllarda yapılan çalışmalarla akut romatizmal ateşe neden olan serotipler M1, M3, M5, M6, M14, M18, M19 ve M24 olarak belirlenmiştir. İkinci dünya savaşı yıllarında ve sonrasında yaygın olarak görülen akut romatizmal ateş insidansı, 1960-1980 yılları arasında, streptokoksik farenjit ve tonsillit olgularının tanınması ve penisilin ile uygun tedavisinin verilmesi yanında yaşam şartlarının iyileşmesi ile birlikte azalmıştır (3, 17, 20).

a) Akut romatizmal ateş (ARA): ARA, Ateş, kardit, cilt altı nodüller, kore ve gezici poliartrit ile karakterize süpüratif olmayan bir klinik tablodur. Bulgular GAS farenjitinden ortalama üç hafta sonra ortaya çıkmaktadır. Anti-inflamatuvar tedavi uygulanmadığında atak 2-3 ay sürmektedir. İlk atak sıklıkla 5-15 yaş arasında görülmektedir. Grup A streptokokları eradike etmek için konak tarafından salgılanan antikolar, kalp dokusu ile çapraz reaksiyona girerek kalp dokusunda immunolojik mekanizma ile miyokardit gelişmesine yol açarlar. Hastalarda göğüs ağrısı, aritmi,

kalp yetersizliği gelişebilir. Tekrarlayan ataklar endokard ve kalp kapaklarında ilerleyici hasara ve fibröz doku gelişimi sonucu kapak yetersizlikleri veya kapak darlıklarına neden olmaktadır (3, 17, 20).

b) Akut glomerulonefrit (AGN): Akut glomerulonefrit (AGN), GAS'ın yol açtığı farenjitten 1-4 hafta sonra, cilt enfeksiyonlarından ise 3-6 hafta sonra otoimmün mekanizmalarla gelişen çocukluk çağı hastalığıdır. AGN; ödem, hipertansiyon, hematüri, proteinüri ve serum kompleman proteinlerinde azalma ile karakterizedir. Nefritojenik özellik gösteren GAS'ların bazı antijenleri ve bu antijenlere karşı konak organizma tarafından oluşturulan antikorlar, kan dolaşımında antijen-antikor kompleksi oluşturarak glomerül bazal membranında birikir ve kompleman protein sistemini aktif hale getirirler. Etkilen bireylerin glomerüllerinde patolojik olarak yaygın proliferatif lezyonlar görülür. Tablo, destek tedavileri ile kendiğinden gerilemektedir. Daha az oranda (% 5) ise akut böbrek yetersizliğine ilerlemekte ve ölüme neden olmaktadır (3, 17, 20).

Streptokoksik enfeksiyon sonrasında gelişen akut glomerulonefrit (AGN), 'nefritojenik' grup A streptokok suşları ile gelişen yüzeysel cilt enfeksiyonları ve solunum solunum yolu enfeksiyonlarından sonra görülür.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda M2, M4, M12, M49, M55, M57, M59, M60 ve M61 serotipleri nefritojenik suşlar olarak saptanmıştır (2-3, 17, 20).

c) Post streptokoksik reaktif artrit (PSRA): Post-streptokoksik reaktif artrit tanımlaması, GAS farenjitini sonrasında artrit gelişen ancak akut romatizmal ateş tanı kriterlerini tamamlamayan olgular için kullanılmıştır PSRA ve ARA olgularında GAS farenjitini sonrasında semptomsuz bir dönemin ardından artrit ortaya çıkmaktadır. ARA komponenti olarak gelişen artrit, GAS farenjitinden 2-3 hafta sonra gelişmekte ve asetil salisilik asit tedavisine yanıt vermekte iken PSRA, GAS farenjitinden yaklaşık 10 gün sonra görülmekte ve asetilsalisilik asit tedavisine yanıt vermemektedir. ARA olgularında artrit gezici tarzda olup, büyük eklemleri etkilemekte iken PSRA büyük veya küçük eklemleri ya da aksiyal iskeleti oluşturan eklemleri kalıcı olarak etkilemektedir. PRSA olgularının tamamında geçirilmiş GAS enfeksiyonunu serolojik olarak göstermek mümkün olmaktadır (3, 20).

2.4.5. Patogenez

Mikroorganizmanın mukozal yüzeylere tutunması akut streptokoksik enfeksiyonlarının gelişmesindeki kritik basamaktır. Grup A streptokokların nazofarenks mukozal hücrelerine ya da cilt epitel hücrelerine tutunmasını sağlayan adezin molekülleri bulunmaktadır. Bu moleküllerin en önemlileri M protein, lipoteikoik asit ve protein F olarak sayılabilir. Bunlar, epitel hücrelerinin üzerini kaplayan glikoprotein yapısındaki fibronektinin yağ asidi bağlanma bölgesine tutunarak, nazofarenks mukozasına adezyonda rol oynamaktadır. M proteini bu bağlanmada lipoteikoik asitin bağlantı bölgesine ulaşması için iskelet oluşturmaktadır (1-2, 21, 26).

SPE'lerin süperantijen gibi davranarak konak organizmada çok miktarda sitokin salınımına neden olmaları sonucunda streptokoksik toksik şok sendromunun (STŞS) klinik bulguları arasında yer alan şok ve çoğul organ yetmezliği ortaya çıkmaktadır. T hücrelerinin uyarılması ile birlikte dolaşıma çok miktarda sitokin (TNF- α , interlökin 1 β ve interlökin 2) ve interferon γ gibi T hücre medyatörleri salınmaktadır. Sitokin salınımının kompleman sistemini aktive etmesi, koagülasyon yollarını ve fibrinolitik yolları harekete geçirerek hipotansiyon ve çoğul organ yetersizliği ile karakterize STŞS tablosunun gelişmesine yol açar. SPE B mikroorganizmanın invazif enfeksiyona neden olması ile ilişkilendirilmektedir. SPE A ve C şok tablosundan sorumlu tutulan toksinlerdir (1-2, 21, 26).

Streptokoksik farenjit enfeksiyonu sonrasında otoimmün mekanizmalarla ARA gelişen olgularda yüksek düzeylerde antistreptokokal antikor, otoreaktif antikor ve T hücreleri bulunur. Yüksek düzeylerdeki bu antikorlar, antikor oluşumunu stimüle eden M proteini ile kalp kasının yapısında yer alan miyozin proteini gibi, mikroorganizma ve konak organizma arasındaki benzerlikler nedeniyle bağ dokusu ve kalp kası ile de reaksiyona girerler. İmmunolojik incelenmeler M proteinin kalp kası ile benzerlik gösteren kısımları tanımlanmış ve bu bölgelerin faktör H ve fibrinojen bağlayan bölgelerden farklı olduğu gösterilmiştir. Grup A karbonhidrat (N-asetil glukozamin) molekülünün dominant epitopuna karşı oluşan antikorlar kalp kapakçığı endotelinde; M proteini tarafından uyarılan T hücreleri ise fibröz yapıdaki

kapak dokusunda hasar oluşturmaktadır. ARA gelişen olgularda streptokoksik antijenlere karşı artmış hücresel bağışıklık yanıtı görülür. Romatizmal karditte görülen Aschoff cisimcikleri, kalp kapağı üzerindeki fibrin birikimlerinin kan dolaşımındaki sitotoksik T hücreleri ve makrofajlar tarafından sınırlandırılması ile oluşmaktadır (1-2, 21, 26).

Akut post-streptokoksik glomerülonefrit, antikor-antijen kompleksinin glomerüllerde birikmesi ve kompleman proteinlerinin aktivasyonu ile gelişen inflamasyonun sonucunda ortaya çıkmaktadır. Nefritojenik streptokok suşlarının M proteinleri ile glomerül arasında da antijenik benzerlik vardır. Bu nedenle AGN patogenezi de ARA'da görülene benzer şekilde otoimmün mekanizmalar rol oynamaktadır. Hastalığın patogenezi de moleküler benzerlik ve plazminojen aktivasyon kapasitesi nedeniyle streptokinazların da ayrıca etkisi bulunmaktadır (1-2, 21, 26).

Tablo 2’de özetle GAS adezinleri ve konak hücre reseptörleri gösterilmiştir (2).

Tablo 2: GAS adezinleri ve konak hücre reseptörleri

Adezin	Konak hücre reseptörü
LTA	Epitel hücresi / fibronektin resptörü
M proteini	Hep-2 hücreleri (IL-6 üretimi) / Keratinositler /CD46 reseptörü / faktör H
Protein F /Sfbl	Epitel hücresi / fibronektin / keratinositlerdeki CD46 reseptörü
Fibronektin bağlayan protein	Fibronektin / fibrinojen
SOF	Keratinosit / CD44 (Hyalüronat reseptörü)
Hyalüronik asit kapsül	Farengeal epitel / fibronektin / hücre iskelet proteinleri / plazminojen / plazmin
Vitronektin bağlayan protein	Vitronektin
Galaktoz bağlayan protein	Galaktoz
Kollajen bağlayan protein	Kollajen

(2 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır.)

2.4.6. Tanı

2.4.6.1. Kültür ve bakteri tanımlanması

Alınan örneklerin kanlı agara ekilerek inkübe edilmesi beta hemolizin görülmesini ve mikroorganizmanın kolay tanınmasını sağlamaktadır (3, 20-21). GAS'lar asitrasine duyarlı, trimetoprim sulfametaksazole ise dirençlidir. Bu amaçla 0,04 ünitelik basitrasin diski ve 1,25 mg trimetoprim 23,75 mg sulfametaksazol kombine diski kullanarak besiyerinde üreyen kolonilerin basitrasin ve trimetoprim sulfametaksazol duyarlılıkları değerlendirilebilir (3, 20-21).

Beta hemolitik streptokoklar arasında sadece *S. pyogenes*, pirolidonil arilamidaz üretmekte olup, bu enzimin varlığı pirolidonil arilamidaz testi (PYR) ile saptanmaktadır. PYR testi basitrasin testinden daha özgündür ve antijen saptamaya yönelik testlerden ise daha ekonomiktir (3).

GAS tanısını doğrulamak için yapılan testlerden biri Lancefield lateks gruplandırma testidir. Bu test ile streptokokların hücre duvarı karbonhidratlarındaki (C maddesi) farka göre serolojik gruplandırma yapılır. Gruba özgül karbonhidratın gösterilmesi için hazır ticari kitler kullanılmaktadır. Bu şekilde streptokok hücre duvarından ekstrakte edilen antijenler özgül antiserumlarla presipitin reaksiyonu, koagülasyon veya lateks aglütinasyonu yöntemleri ile belirlenmektedir (1, 17). API (Biomerieux, Fransa) ile BBL (Becton-Dickinson, İngiltere) gibi yarı otomatize, VITEK, VITEK 2 (Biomerieux, Fransa), Microscan Walkaway (Dade Behring, Almanya) gibi tam otomatize sistemlerle de bakteri tanımlaması yapılabilmektedir.

2.4.6.2. Hızlı antijenik tanımlama

Hasta başında grup A antijeninin hızlı testlerle saptanmasını sağlayan ticari kitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testlerin hızlı sonuç verdiği, antijene özgül olduğu ve kültür temel alındığında duyarlılığının değişken olduğu bildirilmektedir (44). Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Birliği (Infectious Diseases Society of America), streptokokal farenjit klinik bulguları ile başvuran tüm çocuklar için - eğer

yapılabilirse - hızlı streptokokal antijen testi yapılması; test sonucu pozitif olan çocukların antibiyotik kullanılarak tedavi edilmelerini, test negatif olanlardan ise önce boğaz kültürünün alınması ve eğer kültürde pozitif sonuç elde edilirse o zaman antibiyotik tedavisine başlanmasını önermektedir (17). Kaynakların kısıtlı olduğu ortamlarda, hızlı antijen testi yapılması veya kültür alınmasının çeşitli nedenlerden dolayı mümkün olmadığı durumlarda uygulanan laboratuvar test sayısını azaltmak ve uygun olmayan tedavi verilmesini önlemek için bazı kriterler ve skorlamalar belirlenmeye çalışılmıştır. 38°C üzeri ateş, öksürük yokluğu, hassas ön servikal lenfadenopati ve tonsillalar üzerinde eksudasyon gibi bulguların streptokok farenjitini desteklediği düşünülmektedir (45). Kültür ve hızlı antijen testlerinin duyarlılıkları karşılaştırıldığında, hızlı antijen testlerinin streptokoksik farenjit olgularının % 5'ine tanı koymakta yetersiz kalabildiği bildirilmiştir (17).

2.4.6.3. Serolojik tanı

Serolojik yöntemler ile streptokoklara karşı oluşan anti-streptolizin-O, Anti-deoksiribonükleaz-B gibi antikorlar da araştırılmaktadır. Bu antikorların gösterilmesinde asıl amaç akut enfeksiyonun saptanması değil, geçirilmiş enfeksiyonların tanınması ya da akut romatizmal ateş ya da post-streptokoksik glomerulonefrit gibi süpüratif olmayan post-infeksiyöz sekellerin tanısının desteklenmesidir. Antistreptolizin-O titresi akut enfeksiyondan bir hafta sonra yükselmeye başlar ve 3-6. haftalarda en yüksek seviyeye ulaşır. Anti-DnaseB titresi ise akut enfeksiyondan 1- 2 hafta sonra yükselmeye başlar ve 6-8. haftalarda en yüksek düzeye ulaşır. Antistreptolizin- O titresinin test edilmesinin streptokokal cilt enfeksiyonlarının tanısında yeri yoktur, bu yöntem sadece farenjit, tonsillit gibi GAS enfeksiyonlarının tanısında önemlidir. Çünkü deride bulunan kolesterol, streptolizin-O molekülünün immunojenik ve hemolitik aktivitesini inhibe eder (3, 17).

2.4.6.4. Deri testi ile tanı

Ciltte döküntü ile seyreden tablolarda döküntünün kızıl ile ilgili olup olmadığının ayırt edebilmesi için Schultz-Charlton sönme reaksiyonundan yararlanılabilmektedir. Kızıl

hastalarında intradermal olarak homolog anti-toksin enjekte edildiği zaman, enjeksiyonun yapıldığı bölgedeki eritemin solduğu ve cilt renginin açıldığı gözlenir. Bu durum Schultz-Charlton sönme reaksiyonu olarak tanımlanır ve toksinin deride nötralizasyonu ile açıklanır. Hastaların kızıla neden olan eritrojenik toksine karşı duyarlılıkları ise Dick testi ile araştırılabilir. Bu test için kan dolaşımında antikor bulunmayan kişiye intradermal olarak toksin enjekte edilerek, 24 saat içerisinde enjeksiyon bölgesinde lokal eritem gelişmesi beklenir. Pozitif sonuç, kişinin kan dolaşımında antikor bulunmadığını ve eritrojenik toksine duyarlı olduğunu göstermektedir. ARA tanısında Jones kriterleri kullanılmaktadır. Tanı için en az iki majör veya bir majör, iki minör bulgu ile bunların yanında streptokok infeksiyonunun varlığını gösteren destekleyici bulgular gerekmektedir. Majör bulgular; kardit, poliartrit, kore, eritema marjinalum ve subkutan nodüller; minör bulgular ise ateş, artralji vb. semptomlardır (3, 17, 20-21).

2.4.7. Duyarlılık

GAS enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenek olan penisiline karşı henüz direnç saptanmamıştır. Penisiline dirençli olduğu bildirilen suşlar ise referans laboratuvarlarda onaylanmamıştır (21). Ancak GAS'ın etken olduğu bir enfeksiyöz hastalık geçiren kişilerde görülebilen tedavi başarısızlığının nedenlerinden birinin penisilin toleransı olabileceği belirtilmektedir (46).

Özellikle penisilin allerjisi olan % 10 civarındaki hastada tedavi seçeneği olan makrolidlere karşı değişen oranlarda direnç bildirilmiştir. Makrolidlere karşı direnç oranı tüm dünyada giderek artmaktadır. Dünyanın değişik yerlerinde yapılan çok sayıda çalışmada makrolidlere karşı direnç oranları % 0 ile % 10 arasında çıkmasına rağmen, özellikle Japonya ve ABD merkezli çalışmalarda % 60'lara varan oranlar bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da % 0 ile % 30 arasında değişik oranlarda yüksek direnç oranları bildirilmiştir (47-60). Söz konusu direnç klinikte makrolidlerin sık kullanımına bağlıdır.

Makrolid direncinde başlıca iki mekanizma söz konusudur. Düşük düzeyde eritromisin direncini *mefA* geni kodlar, klindamisin direncine yol açmaz. Klindamisin direncinde bakterinin hücre duvarından artmış ilaç dışarı atılımı görülmektedir

(Efluks). 23rRNA'da makrolid bağlayan bölgenin *erm* geninin kodladığı metilazlar tarafından metillenmesi makrolidlere, linkozamidlere ve streptogramin B'ye karşı direnç meydana gelmesine neden olur.. İndüklenebilir veya yapısal olarak meydana gelen metilasyon yüksek düzeyde makrolid direncine yol açar. İndüklenebilir MLS_B direnci bulunan suşlar in vitro olarak eritromisine dirençli, klindamisine duyarlıdır. bunun aksine, yapısal MLS_B direnci olanlar ise eritromisin ve klindamisin her ikisine de dirençlidir. Makrolid direnci olan izolatların çoğunda *mefA* geni bulunduğu ve *erm* genlerinin varlığına bağlı makrolid direncinin *S. pyogenes* 'te daha az olduğu bildirilmektedir (21).

2.4.7. Tedavi

Streptokoksik tonsillofarenjit olgularında antimikrobiyal tedavi ile bakteriyel eradikasyon, klinik iyileşmenin sağlanması, akut romatizmal ateş ve süpüratif komplikasyonların gelişiminin ve rekürrenslerin önlenmesi amaçlanmaktadır. GAS suşlarının tümü penisilin G'ye duyarlıdır. Penisilin G'nin bakterisidal etki gösterebilmesi için gereken minimal inhibitör konsantrasyon 0.01 µg/ml'dir. Tedavide penisilin G dışında sefalosporin, tetrasiklin ve makrolid grubu antibiyotikler de etkilidir. Ancak bu grup antibiyotiklerin etki spektrumu ve maliyeti nedeniyle tedavide ilk seçenek olarak yer almamaktadır (3, 17).

Streptokok farenjitinin 10 gün içerisinde tedavi edilmesi, antijenik uyarıyı ortadan kaldırdığı için ARA gelişimini önlemektedir. Uygulanan tedavinin esas hastalığın seyri ve süresi üzerindeki etkileri, hastalığın kendi kendini sınırlayan ve kısa doğal seyri nedeniyle net olarak bilinmemektedir. Bu antibiyoterapi AGN gelişimini önlememektedir. GAS tonsillofarenjitlerinde penisilin tedavisinin başarısızlığı veya nükslerin nedenleri; beta laktamaz oluşturan oral flora, yakın temasla bakterinin yeniden bulaşması, taşıyıcılık, uygun olmayan doz veya yetersiz tedavi süresi olarak bilinmektedir (3, 17).

2.4.8. Taşıyıcılık

GAS'lar sağlıklı bireylerin nazofarenkslerinde bulunarak taşıyıcılığa neden olurlar. Özellikle kış ve erken sonbahar döneminde okul çocuklarının % 5-15'inin asemptomatik GAS taşıyıcısı olabileceği belirtilmektedir (17, 61-67). Fakat bu oranların üstünde taşıyıcılık durumları olduğunu bildiren yayınlar da mevcuttur (68-72) Streptokok taşıyıcılığının tanımlanması hakkında bazı karışıklıklar mevcuttur. Genellikle streptokok enfeksiyonları, mikroorganizmanın boğaz kültüründe üretilmesi ve serolojik yanıtın pozitif olması şeklinde tanımlanırken, taşıyıcılık ise boğaz kültüründe üreme olmasına rağmen serolojik yanıtın bulunmaması olarak değerlendirilebilmektedir. Taşıyıcılık durumunun netleşmesinde klinik bulgularla birlikte 3-4 hafta aradan sonra kültür pozitifliğinin tekrarı da önemlidir. Taşıyıcılık durumunda streptokoka bağlı aktif enfeksiyon bulguları mevcut olmamakla birlikte anti-streptolizin O yüksekliği, süpüratif ya da non-süpüratif komplikasyonlar beklenmez. Taşıyıcılık oranları erişkinlerde daha düşük beklenmektedir (17).

Taşıyıcılar üst solunum yolu enfeksiyonları için bir kaynak oluşturabilirler, damlacık yolu veya kontamine eller aracılığı ile mikroorganizmanın bulaşı söz konusu olabilmektedir. Kalabalık ortamlar bulaşmayı kolaylaştırmaktadır. Taşıyıcılarda ARA gelişme riski çok düşüktür (3, 17).

Taşıyıcıların tedavi endikasyonu sadece, toplumda romatizmal ateş veya post-streptokoksik glomerulonefrit salgını, kapalı bir çevrede GAS salgını, aile içerisinde belli bir sürede ardışık veya tekrarlayan semptomatik akut GAS tonsillofarenjit vakaları ve ailede akut romatizmal ateş profilaksisi alan bir başka olgunun bulunması gibi özel durumlar için söz konusudur. Tedavi ile eradike edilen olgularda daha sonra uzun süreli izlemde tekrar GAS kolonizasyonunun gelişebildiği bildirilmiştir (3, 17).

2.4.9. Korunma ve bağışıklık

GAS tonsillofarenjiti geçirenlerin toplumdan izolasyonu gerekmemektedir. Ancak kalabalık alanlarda damlacık yolu ile bulaşın azaltılması için iyi havalandırma sağlanmalıdır. Tek doz uygun antibiyotik kullanımından yirmidört saat sonra enfekte kişinin bulaştırıcılığının olmadığı bildirilmiştir (3). Streptokoksik cilt

enfeksiyonlarında ise özellikle impetigodan korunmak için kişisel hijyene dikkat etmek gerekmektedir. Kardit bulunan ARA olgularında tekrarlayan ARA ataklarını önlemek için 21 yaşına kadar depo penisilinle profilaksi yapılması önerilmektedir. Romatizmal ateş ya da romatizmal kalp hastalığı hikayesi bulunan olgular, cerrahi girişimler ya da diş çekimi öncesinde, gelişebilecek geçici bakteriyemi riski nedeniyle profilaktik antimikrobiyal tedavi almalıdırlar (61).

ARA'nın tüm dünyada, özellikle de gelişmekte olan ülkelerde halen ciddi bir sağlık problemi olması ve gelişmiş ülkelerde invazif streptokok enfeksiyon görülme sıklığının artması aşı çalışmalarına yönlendirmesini sağlamıştır. Tüm GAS suşları tarafından üretildiği ve konak organizmada koruyucu bağışıklık oluşturabildiği için M proteini, antijenik çeşitlilikten dolayı aksini düşünen araştırmacılar olmasına rağmen, aşı çalışmalarında kullanılacak uygun bir molekül olarak değerlendirilmektedir. M proteinin, konak organizma ile benzer antijenik özellikler taşıması nedeniyle, aşı ile elde edilen ve konağı enfeksiyonlardan koruması hedeflenen antikorların çapraz reaksiyona yol açarak zarar verme olasılığı araştırmacıları kaygılandırmaktadır. Günümüzde M protein epitoplarına yönelik olarak da aşı geliştirme çalışmaları sürdürülmektedir (5, 73-74).

M proteinine karşı oluşan antikorlar tekrarlayan streptokok enfeksiyonlarına karşı koruyucu rol oynarlar. Koruyuculuk ancak aynı tip M proteinine sahip suşlar için sağlanabildiğinden dolayı 'tipe özgül bağışıklık' olarak da tanımlanmaktadır. IgG karakterindeki koruyucu antikorlar, M proteinin yüksek değişkenlik gösteren amino terminali ile etkileşime girerek M proteininin fagositoz engelleyici özelliğini ortadan kaldırırlar. Tipe özgül antikor tarafından işaretlenen streptokoklar, klasik yol aktivasyonu ile kompleman proteinlerine C3b ile bağlanarak fagositer hücreler tarafından tanınırlar. Humoral bağışıklık sisteminin öğelerinden olan IgG mikroorganizmanın invazyonunu önlerken, mukozal yüzeylerde salgılanan salgısal IgA da mikroorganizmanın mukozal yüzeylere tutunmasına engel olur. Enfeksiyonun geçirilmesi ile kazanılan bağışıklık tipe özgül olduğundan dolayı sadece aynı M protein tipine sahip suşların enfeksiyonuna karşı bir bağışıklık söz konusu olmaktadır. Farklı tip M proteinlerine sahip suşlar ise organizmayı enfekte edebilmektedir (1, 2).

Ayrıca rekombinan teknoloji kullanılarak, patojen mikroorganizma ve konak organizma arasında çapraz reaksiyonlara yol açmayacak çok değerlikli bir aşı geliştirme çalışmaları yürütülmektedir (74-75). Söz konusu aşı, 26 değerlikli olup sıklıkla streptokoksik farenjit ve invazif enfeksiyonlara neden olan M1, M2, M3, M5, M6, M11, M12, M13, M14, M18, M19, M22, M24, M28, M29, M33, M43, M59, M75, M76, M77, M89, M92, M101, M114 serotiplerini kapsamaktadır. Çok değerlikli bu aşının tavşanlar üzerinde güçlü bağışık yanıt oluşturduğu bildirilmiştir (74-75).

Diğer bir aşı adayı ise ScpA'dır. Ancak bu aşının insanlarda koruyucu immüniteyi nasıl sağladığı hakkında geniş bilgi mevcut değildir. Aşı adayı olarak üzerinde çalışılan birçok yüzeyel yapılar bulunmakla birlikte bu yapılar tüm GAS suşları tarafından eksprese edilmediklerinden dolayı aşı adaylığından vazgeçilmiştir (75).

2.4.10. emm tipi, toksin profili ve klonotiplerin klinik önemi

1980'lerin sonlarında A.B.D. ve Avrupa'da streptokokal toksik şok sendromu, bakteriyemi ve ciddi invazif grup A streptokokal deri ve yumuşak doku enfeksiyonları bildirilmiştir (2-3). Bu ciddi ve invazif hastalıkların yüksek mortalite ve morbidite oranlarına sahip olduğu ve mikroorganizmanın belli serotip ve klonotipleri ile ilişkili olduğu görülmüştür. Ağır invazif streptokokal enfeksiyonlardan birçok farklı M protein serotipleri izole edilmesine rağmen, M serotip 1 baskın olarak bulunan tip olmuştur. Konak duyarlılığının toksik streptokokal sendromun meydana gelmesinde önemli bir faktör olduğu düşünülmüştür (2).

GAS'ların M serotipleri ile ilgili yapılan çalışmalarda bazı serotipler ile bazı hastalıklar arasında yakın ilişki olduğu gösterilmiştir. Romatojenik suşlar olarak bilinen, streptokoksik farenjit ve ARA ile ilişkilendirilen M serotipleri, M1, M3, M5, M6, M14, M18, M19, M24, M27 ve M29; cilt enfeksiyonlarından piyoderma ve AGN ile ilişkilendirilen M serotipleri ise M2, M49, M52, M57, M59, M60 ve M61 olarak bildirilmiştir. M2, M49, M55, M57, M59, M60 ve M61 serotiplerinin cilt enfeksiyonlarından sonra, M1, M4, M12 ve M25 serotiplerinin ise streptokoksik farenjit enfeksiyonlarının ardından AGN'ye neden olduğu bildirilmiştir. İnvazif ve

toksik streptokokal enfeksiyonlardan sorumlu suşların en sık M1 ve M3 serotipleri olmak üzere, M11, M12 ve M28 serotipleri olduğu bildirilmiştir (76).

Deri ve boğaz serotipleri epidemiyolojik olarak i) opasite faktörü üretimi, ii) anti-M protein monoklonal antikoru 10B6 tarafından M proteinleri üzerinde tanımlanan sınıf I C tekrar bölgesi epitopunun varlığı ve iii) *emm* geni paternlerine göre gruplandırılmıştır (1-2).

Belli M ve *emm* tipleri belli T tipleri ile ilişkili olduğundan dolayı M veya *emm* tiplendirme süreci, T tipinin bilinmesi ile kısaltılabilir. T tiplendirmesinin *emm* tiplendirmesine ek olarak yapılması suşlar arasındaki ilişkinin daha net olarak tanımlanmasını sağlar (1-2).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarla GAS'ların sadece epitel hücrelerine yapışmadığı, bu hücreleri invaze ettiği anlaşılmıştır. İnvazyonun sıklığı M proteininin ve/veya SfbI gibi fibronektin bağlayan proteinlerin eksprese olması ile ilişkilidir. M1 proteinleri ve SfbI invazinlerdir (2).

Şu ana kadar tanımlanmış olan streptokokal pirojenik ekzotoksinler SPEA, SPEB, SPEC, SPEF, SPEG, SPEH, SPEJ, SPEK, SMEZ, SMEZ-2 ve streptokokal süperantijen (SSA)'nın toksik şok, deri ve yumuşak dokulara invazyon ve nekrotizan fasitin patogeneziindeki rolleri araştırma konusudur. Güncel veriler STŞS'nin patogeneziinde rol oynayan birçok süperantijenin olduğunu işaret etmektedir (2, 40). Bu toksinler çok miktarda T hücreleri nonspesifik olarak aktive etmek için majör histokompatibilite kompleksi sınıf II molekülleri ve sınırlı sayıda T lenfosit resptörünün V-beta bölgeleri ile etkileşime giren süperantijenler olarak görev yaparlar. Bu aktivasyon büyük miktarda interlökinlerin ve tümör nekroz faktörü ve gama interferon gibi sitokinlerin salınımına yol açar. Pirojenik ekzotoksinler STŞS'nin bazı tablolarından sorumludur. STŞS hastalarında V-beta1, V-beta5.1 ve V-beta 12'yi eksprese eden T hücrelerinin selektif deplesyonunun kanıtı gösterilmiş ve söz konusu hastalığın patogeneziinde streptokokal süperantijenlerin önemli bir rol oynadığı hipotezi desteklenmiştir (2, 25).

Yapılan birçok çalışma, belli *emm* geni tipleri ile bazı toksin genlerinin ve belli hastalıkların ilişkili olabildiğini göstermiştir. Örneğin *emm1* tipindeki suşların SPEA, SPEG ve SMEZ gibi toksinleri ürettiği, SPEC toksinini daha az oranda bulundurduğu, *emm12* tipi suşların özellikle SPEC toksinini eksprese ettiği bildirilmiştir. *emm12* tipi

suşlarda SPEC dışında SPEG ve SMEZ de beklenen toksinlerdendir. *emm4* tipi suşlarda da SPEC ve SMEZ toksinlerinin üretimi beklenirken SPEA ve SPEG genelde daha düşük oranlarda bulunur (6, 35-36, 38, 40-42).

Her bölge için *emm* geni tiplerinin, eritrojenik toksin gen profilinin, izolatlar arası klonal ilişkinin, bölgedeki klonotipler, *emm* geni tipleri ve toksin gen profili arasındaki ilişkinin, bu parametrelerin non-invazif ve invazif klinik izolatlar ile asemptomatik taşıyıcı populasyon izolatları arasındaki dağılımının belirlenmesi hem bu mikroorganizmanın neden olduğu enfeksiyonların daha iyi anlaşılması hem de aşı geliştirme çalışmalarına katkı sağlanması açısından önemlidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada; hastalardan ve taşıyıcılardan izole edilen iki grup GAS izolatu değerlendirilmiştir:

1. Hasta grubu izolatları; ZKÜ Tıp Fakültesi'ne başvuran hastalardan endikasyon gereği alınan klinik örneklerden etken izole edilen 79 klinik izolat

2. Taşıyıcı grubu izolatları; 3 ayrı ilköğretim okulunda 1-8 arası sınıflarda üst solunum muayenesi ile enfeksiyon bulguları saptanmayan 538 öğrenciden izole edilen 60 GAS izolatu

Çalışma dahilindeki toplam 139 GAS izolatu için şu testler uygulanmıştır:

1. Antibiyotik duyarlılık testleri
2. DNA dizi analizi yöntemi ile *emm* geni tiplendirilmesi
3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile *speA*, *speB*, *speC*, *speG* ve *smeZ* genleri araştırılarak toksin gen profilinin belirlenmesi
4. PFGE ile izolatlar arası klonal ilişkinin araştırılması

3.1. Örneklerin Toplanması

3.1.1. Hasta izolatlarının elde edilmesi

Hasta grubu; Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne başvuran hastalardan endikasyon gereği alınan klinik örneklerden etken olarak izole edilen 79 klinik izolat çalışmaya dahil edilmiştir Üst sonunum yolu enfeksiyonu bulguları olan hastaların nazofarenks ve tonsillerinden alınan sürüntü örnekleri, başka enfeksiyon hastalıkları ile ilgili bulguları olan hastalardan ise diğer örnekler (kan, doku, yara yeri sürüntü örneği, periton sıvısı, balgam vb.) gönderildi.

3.1.2. Taşıyıcı izolatlarının elde edilmesi

Taşıyıcı izolatları için Zonguldak İl Milli Eğitim Müdürlüğünden yazılı onay alındıktan sonra devam eden öğrencilerin ortalama sosyoekonomik düzeylerine (iyi, orta ve ortanın altı) göre önceden belirlenmiş 3 ayrı ilköğretim okuluna 2009 yılı

Mayıs ayında gidildi. Örnek alınacak her bir öğrencinin velisinden yazılı ve imzalı izin alındı ve her öğrenci için anket formu dolduruldu (Tablo-3). Öğrencilerin bir Kulak-Burun-Boğaz (KBB) uzmanı tarafından muayeneleri yapıldı ve nazofarenks ve tonsillerinden sürüntü örnekleri alındı. Üst solunum yolu enfeksiyonu bulguları olmayan öğrencilerden alınan örnekler taşıyıcılık taraması için değerlendirilmeye alındı.

Tablo 3:Öğrenciler için doldurulan anket formu örneği.

Adı soyadı:	
Yaşı:	
Okulu / Sınıfı	
Sınıf mevcudu:	
Kardeş sayısı:	
Evde yaşayan kişi sayısı:	
Odasında kalan kişi sayısı:	
Evin ısıtma yöntemi (Kalorifer / Soba)	
Okula ulaşım yöntemi (Otobüs / Servis / Yaya)	
Son 15 gün içinde üst solunum yolu enfeksiyonu geçirmiş mi?	
Son 15 gün içinde bir antibiyotik kullanmış mı?	
Son 3 ay içinde hastanede yatmış mı?	
Tonsillektomi (bademcik alınması) operasyonu geçirmiş mi?	
Adenoidektomi (geniz eti alınması) operasyonu geçirmiş mi?	
Reflü şikayeti var mı?	
Muayene sonrasında ÜSYE bulgusu var mı?	

Aynı okullara 2009 yılının Ekim ayında bir kez daha gidilerek aynı yöntemle boğaz kültürü örnekleri tekrar alındı. Her iki tarama sonrasında taramalardan en az birinde alınan örneklerinden Grup A streptokok izole edilen ve üst solunum yolu enfeksiyon bulguları olmayan öğrencilerden Kasım ayında 3. kez örnekler alındı.

Çalışmaya alınma kriterleri:Taşıyıcı grubu: Üst solunum yolu enfeksiyon bulgusu olmayan, son 15 gün içinde bilinen enfeksiyon geçirmeyen, 3 taramanın en az ikisinde boğaz kültüründe GAS izole edilen öğrenciler.

Hasta grubu: Hastanemiz kliniklerinden enfeksiyon tanısıyla klinik örneği alınıp laboratuvarımıza gönderilen ve ilgili materyalin kültüründe klinik bulgularla uyumlu şekilde GAS izole edilen hastalar.

Tanımlamalar:

İnvazif izolat: Hasta grubunda, septik şok, sepsis veya bakteriyemi olgularında kan kültüründen; nekrotizan fasiit ve selülit olgularında doku veya yara kültürlerinden; peritonit ve menenjit gibi normalde steril bölgelerin enfeksiyonları bulunan olgularda ilgili steril vücut sıvısı kültüründen elde edilen GAS izolatları. .

İnvazif olmayan (non-invazif) izolat: Hasta grubunda, invazif enfeksiyonlar dışında, tonsillofarenjit, kızıl, yara yeri enfeksiyonu gibi hastalık olgularında ilgili örneklerin kültüründen elde edilen GAS izolatları.

3.2. Kültür ve İdentifikasyon

Hasta veya taşıyıcı grup için alınan tüm boğaz kültürü örnekleri % 5 kanlı agar besiyerlerine, diğer tüm örnekler ise kanlı agar (Oxoid, İngiltere), eozin metilen mavisi (EMB) (Oxoid, İngiltere) ve çukulata agar (Oxoid, İngiltere) besiyerlerine ekildi. Boğaz kültürleri dışındaki örnekler % 5 karbondioksitli etüvde olmak üzere tüm kültürler 35⁰ C’de 48 saat inkübe edildi. Besiyerleri 24. ve 48. saatler sonunda üreme açısından değerlendirildi.

Kanlı agar besiyerindeki geniş beta hemolitik, krem rengi küçük kolonilerden Gram boyama yapıldı. Gram boyamada Grampozitif kok morfolojisinde olan koloniler için katalaz testi yapıldı. Katalaz negatif izolatlar için basitrasin (0,04 U) (Becton Dickinson, ABD) ve trimetoprim sulfametoksazol disklerine (1,25/23,75 µg) (Becton Dickinson, ABD) duyarlılık araştırıldı ve L-pirolidonil arilamidaz (PYR)

(Becton Dickinson, ABD) testleri yapıldı (21). Lateks aglütinasyon (Plasmatec Lab. Products Ltd., İngiltere) ile serolojik gruplandırma yapıldı. Basitrasine duyarlı, trimetoprim sulfametoksazole dirençli olan, PYR testi ile pirolidonil peptidaz enzimi pozitif olan bakteriler ayrıldı ve Lancefield serolojik gruplandırma testi ile A grubu antijeni gösterilen bakteriler, Grup A Streptokok olarak tanımlandı (1, 21). Gerekli durumlarda yarı otomatize ticari sistemlerden BBL (Becton Dickinson, ABD) kiti ile tam identifikasyon yapıldı.

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Elde edilen tüm izolatların antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile CLSI kriterleri doğrultusunda yapıldı. Vankomisin (30 µg) (Becton Dickinson, ABD), penisilin (10µg) (Becton Dickinson, ABD), eritromisin (15 µg) (Becton Dickinson, ABD), levofloksasin (5 µg) (Becton Dickinson, ABD), klindamisin (2 µg) (Becton Dickinson, ABD), tetrasiklin (30 µg) (Becton Dickinson, ABD), linezolid (30 µg) (Becton Dickinson, ABD), kloramfenikol (30 µg) (Becton Dickinson, ABD) ve sefepim (30 µg) (Becton Dickinson, ABD) diskleri yerleştirilerek 24 saat 35⁰ C’de inkübe edildi (77).

İndüklenebilir klindamisin direnci, D test yöntemi ile araştırıldı Eritromisin ile klindamisin diskleri aralarında 15 mm’lik bir uzaklık olacak şekilde yerleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda yapılan değerlendirmede klindamisin diski etrafındaki inhibisyon zonunun eritromisin yönündeki kısmında düzleşme görülmesi durumunda indüklenebilir klindamisin direnci pozitif olarak değerlendirildi (77).

3.4. DNA Ekstraksiyonu

Ticari DNA ekstraksiyon kiti (EZ-10 Spin Column Genomic DNA MiniPreps Kit, Bio Basic, Kanada) ile DNA’lar izole edildi. Ekstraksiyon firmanın önerileri doğrultusunda şu şekilde yapıldı:

- 1) Hazırlanan 1,5 ml’lik bakteri süspansiyonu 12.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.

- 2) Önce Solüsyon I'den 100 mikrolitre pelletin üzerine eklendi, 1 dk. bekletildi, sonrasında Solüsyon II'den 200 mikrolitre eklendi ve yine 1 dk. bekletildi.
- 3) Solüsyon III'den 350 mikrolitre eklenerek 1 dk. Oda ısısında bekletildi ve 12.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
- 4) Süpernatant kısım EZ-10 tüpüne aktarıldı ve 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi.
- 5) Alt kısım atıldı ve EZ-10 tüpüne 750 mikrolitre yıkama solüsyonu eklenerek 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapıldı.
- 6) Yıkama kısmı bir kez daha tekrar edildi ve alt kısım atıldı, tekrar 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapıldı.
- 7) EZ-10 tüpü 1,5 ml'lik temiz bir santrifüj tüpüne alınarak üzerine 50 mikrolitre Elüsyon Tamponu (Elution Buffer) eklendi ve oda ısısında 2 dk. inkübe edildi, sonrasında 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapıldı.

Elde edilen DNA çözeltisi -20°C 'de saklandı.

3.5. *emm* Geni Tiplerinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmı İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki donanımdan faydalanılarak yapılmıştır.

3.5.1. *emm* geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ve PZR ürünlerinin dizileme için saflaştırılması

S. pyogenes "*emm*" geninin çoğaltılması için "Centers for Disease Control" (CDC) tarafından önerilen protokol (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/doc.html>) kullanılmıştır. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jelde, TAE tampon kullanılarak elektroforezi yapılmıştır. Elektroforez işlemi sonrası DNA bantlarının görüntülenmesi amacı ile jel, 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren 1x TAE buffer içinde 15 dakika boyanmış ve bantlar UV transilluminator ile görüntülenmiştir. DNA moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırıldığında, 600-1500 bp ağırlığındaki bantlar dizileme işlemi için kullanılmıştır. Bu büyüklükte yer alan

bantlar, jel üzerinden QIAquick Gel Extraction Kiti (Hilden, Germany) kullanılarak saflaştırılmıştır. Jelden saflaştırılmış PZR ürünleri sekans reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılmak üzere çalışılncaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.5.2. DNA dizi analizi için sekans reaksiyonu

Sekans reaksiyon karışımı; 4 µl ABI Prism BigDye Terminator v3.1 “cycle sequencing” tamponu (Applied Biosystems, ABD), 3.2 pmol emmseq2 primeri (5’-tattcgcttagaaaattaaaaacagg-3’), hedef DNA olarak jelden saflaştırılmış 2-5 µl PZR ürünü ve son hacim 15 µl olacak şekilde su içerecek şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon koşulları 35 döngü boyunca 96°C’de 10 saniye, 50°C’de 5 saniye ve 60°C’de 4 dakika olarak uygulanmıştır (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD).

3.5.3. Sekans reaksiyonu ürünlerinin presipitasyonu

Floresan boyalı di-deoksi terminatör nükleotidler ile işaretlenmiş ampikonlar, dizileme işleminden önce 5M NaAc ve etanol kullanılarak presipite edilmiştir. Bu amaçla 15 µl’lik sekans reaksiyonu ürünlerinin üzerine 2µl NaAc ve 50 µl %100 etanol eklenmiş ve sonar tüp içeriğinin tamamı 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır, -20°C’de 15 dakika bekletilen ependorf tüpler, 13.000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilerek üstte kalan sıvı pipet ile çekilmiştir. Tüm sıvı dışarı atıldıktan sonra, 250µl %70’lik taze etanol ile tekrar 13.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüm alkol dökülerek tüpler kurumaya bırakılmıştır. Tüpler tamamen kuruduktan sonra, DNA pelletleri üzerine 25 µl formamid (Applied Biosystems, ABD) eklenmiş ve tüpler iyice vortekslenerek elektroforez aşamasına kadar -20°C’de bekletilmiştir. Formamid içinde bu şekilde çözülmüş durumdaki DNA’nın dizileme öncesi sekonder yapılarının açılması ve denatüre olmalarının sağlanması için tüpler 94°C’de 2 dakika kuru ısı bloğunda tutulmuş ve daha sonra buz üstüne alınan tüpler -20°C’de 1-2 dakika bekletilmiştir.

3.5.4. Dizileme

Denatürasyon işleminin ardından örnekler ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, ABD) cihazına yüklenmiştir. Elektroforez için 47 cm'lik kapiller ve her örnek için 1–2 µl POP-6 (Performance Optimized Polymer–6, Applied Biosystems, ABD) kullanılmıştır. Denatüre edilen örnekler 30 saniye boyunca, 1,5 kV potansiyel farkı altında 1µA akım ile kapillere yüklenmiştir. Elektroforez koşulları 35 dakika boyunca 15 kV potansiyel farkı ve 7 µA akım olacak şekilde uygulanmıştır. Dizi analizleri için ABI Prism 310 Data Collection Software yazılımı tarafından oluşturulan kromatogram dosyaları kullanılmıştır.

3.5.5. Sonuçların analizi

Dizileme sonuçlarını içeren kromatogram dosyaları FinchTV v1.3.1 yazılımına (GeoSpiza Inc., ABD) aktararak, diziler üzerinde gerekli görülen düzeltmeler yapılmıştır. Tiplendirme işleminde kullanılacak referans DNA dizileri CDC'nin ftp://ftp.cdc.gov/pub/infectious_diseases/biotech/tsemm adresinden sağlanmıştır. Suşların *emm* genotiplerini belirlemek için CLC Bioinformatics Software (Aarhus, Danimarka) yazılımı kullanılarak tüm dizileri içeren global hizalama yapılmıştır. Lokal hizalama için NCBI'da (National Centre for Biotechnology Information) yer alan Gen Bankası ve BLAST (Basic Local Alignment Tool) sunucusu kullanılmıştır.

3.6. Toksin Gen Profilinin Belirlenmesi

İzolatların toksin gen profilleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile belirlendi. Süperantijen genlerinden *speA*, *speB*, *speC*, *speG* ve *smeZ* genlerinin varlığı araştırıldı. Profiller beş gen bölgesi için aynı sıraya göre pozitif ve negatif işaretleri kullanılarak tanımlandı. Örneğin *speA* pozitif, *speB* negatif, *speC* pozitif, *speG* negatif, *smeZ* pozitif olan izolatın profili “+--+-” olarak belirlendi.

PZR yöntemi şu şekilde uygulandı:

3.6.1. Amplifikasyon için kullanılan primerler

Kullanılan primer çiftleri tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 4: Amplifikasyonda kullanılan primer çiftleri

Süperantijen geni	Primer F (5'→3')	Primer R (5'→3')	Bant büyüklüğü (bp)	Referans
<i>speA</i>	ACT TAA GAA CCA AGA GAT GG	CCT TAT TCT TAG GTA TGA AC	309	Weeks ve ark. (1986) (78)
<i>speB</i>	GGATCCCAACCA GTTGTTAAATCTCT	AAC GTT CTA AGG TTT GAT GCC TAC AA	764	Mollick ve ark. (1993) (79)
<i>speC</i>	AAG TGA CTC TAA GAA AGA CA	TTG AGT ATC AAT GTT TAA TG	130	Goshorn ve ark. (1988) (80)
<i>speG</i>	AGA AAC TTA TTT GCC C	TAG TAG CAA GGA AAA GG	155	Schmitz ve ark. (2003) (36)
<i>smeZ</i>	TAA CTC CTG AAA AGA GGC	CAT TGG TTC TTC TTG ATA AG	391	Schmitz ve ark. (2003) (36)

3.6.2. Amplifikasyon

50 mikrolitrelik amplifikasyon karışımı :

10x PZR tamponu (10 mM Tris/HCl, pH:8,3; 50 mM KCl) : 5 mikrolitre
MgCl₂ (20mM) (Bio Basic, Kanada) : 5 mikrolitre
dNTP (2mM) (Bio Basic, Kanada) : 5 mikrolitre
Primer çifti (100 mikromolar) (Alpha DNA, Kanada) : Her biri 0,2 mikrolitre
Taq polimeraz (5U /mikrolitre) (Bioron, İngiltere) : 0,2 mikrolitre
Kalıp DNA : 3 mikrolitre
dH₂O : 31,4 mikrolitre

Hazırlanan karışımlar termal döngü cihazında (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD) şu koşullarda amplifiye edildi (38):

95⁰ C 10 dakika

35 sikl s:

94⁰ C 30 saniye

50⁰ C 30 saniye

72⁰ C 1 dakika

Son olarak 72⁰ C 2 dakika

PZR  r nleri kısa süreli olarak +4⁰ C’de, uzun süreli olarak ise -20⁰ C’de saklandı.

3.6.3. Amplifikasyon  r nlerinin tespit edilmesi

Amplifikasyon  r nleri, 1X TBE tamponu içindeki % 2’ lik agaroz jelde (Sigma, Almanya) 120 V akımla 60 dakika elektroforez sonrası Gel Doc UV görüntüleme sistemi (Bio Rad, Belçika) ile görüntüleme yapıldı. Belirleyici (marker) olarak 50-b ’lik DNA ladder (Sigma, Almanya) kullanıldı.

3.7.  zolatlar Arası Klonal  li kinin Belirlenmesi

Elde edilen klonal ilişkileri Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE) yöntemi ile araştırıldı (81).

3.7.1.  zolatların hazırlanması

1. Saf kültür halinde kanlı agarda üreyen koloniler toplanarak hücre süspansiyon tamponu (HST) (10 mM Tris-HCl [Sigma, Amanya], 50 mM EDTA (Amresco, A.B.D), 20 mM NaCl (Amresco, A.B.D), pH 7.2) içinde süspanse edildi.
2. Hücre süspansiyonu, 2500 x g’de, 4 C’de, 15 dakika santrifüj edildi.
3. Pelletin  zerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı

3.7.2. Agaroz kalıbın hazırlanması

1. HST içerisinde % 2'lik düşük erime ısıları agaroz (Amresco, A.B.D) hazırlandı.
2. HST içinde hazırlanmış bakteri suspansiyonundan 150 mikrolitre, düşük erime ısıları agaroz çözeltisinden 150 mikrolitre ve lizostafinden (1mg/ml) (Amresco, A.B.D) 2 mikrolitre alınarak agaroz kalıbına (10 mm x 5 mm x 1.5 mm, Bio Rad, Belçika) döküldü ve donması beklenerek kalıplar hazırlandı..

3.7.3. Agaroz içinde hücre lizisi

1. Hücre parçalama tamponu-1 (HPT-1) hazırlandı [10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM NaCl (Amresco, A.B.D), 50 mM EDTA (Amresco, A.B.D), % 0,2 sodyum deoksikolat (Amresco, A.B.D), % 0,5 sarkozil (Amresco, A.B.D)].
2. Hazırlanmış olan kalıplar HPT-1 içinde 37⁰ C'de 1 saat inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda kalıp hücre parçalama tamponu-2'nin [250 mM EDTA (pH 9.0) (Amresco, A.B.D), 1% sarkozil (Amresco, A.B.D) - 50 µg/ml proteinaz K (Amresco, A.B.D)] içine alınarak 50⁰ C'de 30 dakika tekrar inkübasyona alındı.

3.7.4. Yıkama aşaması

Lizis aşamasından sonra kalıplar her biri 50⁰ C'de 30 dakika olmak üzere TE tamponu [10 mM Tris-HCl (pH 7.6)-0.1 mM EDTA] içinde bekletilerek, 3 kez, yıkandı. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz restriksiyon enzimi ile kesime hazır hale geldi.

3.7.5. DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesilmesi

DNA içeren agaroz kalıbının 1/4'ü alınarak *SmaI* (Takara, Japonya) enzim çözeltisi içinde 30⁰ C'de 2 saat inkübe edildi. Hemen restriksiyona alınmayacak olan kalıplar +4⁰ C'de TE [10 mM Tris-HCl (pH 7.6) (Sigma, Almanya), 0.1 mM EDTA

(Amresco, A.B.D)] çözeltisi içinde bekletildi. Enzim ile restriksiyon işleminden sonra kalıplar 15 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'de tutularak kalıpların katılaşması sağlandı.

3.7.6. Elektroforez için jelin hazırlanması

1. 0,5x TBE (44.5 mM Trisma base (Sigma, Almanya), 44.5 mM Borik asit (Riedel de Haen, Almanya), 1 mM EDTA (Amresco, A.B.D), pH 8.4) içinde % 1'lik agaroz (Pulsed-field certified agarose, Bio-Rad, Belçika) hazırlandı.
2. Kalıplar dişli tarağın ucuna yerleştirilerek üzerine agaroz döküldü ve jelin katılaşması beklendi.

3.7.7. Elektroforez

1. Hazırlanan jel PFGE tankına (Bio-Rad, Belçika) yerleştirildi. Tank 1900–2000 mililitre 0.5x TBE tamponu ile dolduruldu.
2. CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad, Belçika) başlangıç vuruş süresi 4,6 sn, bitiş vuruş süresi 40 sn, vuruş açısı 120° , akım 6 V/cm^2 , sıcaklık 10°C , süre 20 saat olacak şekilde elektroforez koşulları uygulandı.

3.7.8. Görüntüleme

1. Elektroforezden sonra jel, $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ etidyum bromid içeren ultra saf su içine alınarak boyandı.
2. Ultraviyole ışık altında görüntülendi.
3. Gel Doc UV görüntüleme sistemi (Bio Rad, Belçika) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi.

3.7.9. Analiz

GelCompar II yazılım sistemi (versiyon 3.0; Applied Maths, Belçika) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan standartlar (marker) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. “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. Değerlendirme, tolerans değeri 1, optimizasyon değeri 0,5 alınarak yapıldı. % 80’in üzerindeki benzerlik derecesi bulunan izolatlar “yakın ilişkili” olarak değerlendirildi (40-41) ve bu değere göre PFGE profilleri numaralandırılarak belirlendi, yakın ilişkili bulunan izolatlarda profil numarasının yanına harfler eklenerek alt tip isimlendirmesi yapıldı.

3.8. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

TBE (Tris-borik asit-EDTA) tamponu hazırlanması

Stok solüsyon (10 X, p H 8.0)
44.5 mM Trisma base (Sigma, Almanya),
44.5 mM Borik asit (Riedel de Haen, Almanya),
1 mM EDTA (Amresco, A.B.D), pH 8.4
Distile suda çözülerek +4°C’de saklandı.

Proteinaz K stok solüsyonun (100 mg/ml) hazırlanması

Proteinaz K(Amresco, A.B.D) 100 mg
Distile su 1 ml
Proteinaz K distile suda çözülerek -20°C’de saklandı.

Etidyum Bromid (5 mg/ml stok)

10 mg etidyum bromid 2 ml distile suda, çözülerek renkli şişeye kondu ve şişenin etrafı alüminyum kağıt ile kapatılarak oda sıcaklığında saklandı. Hazırlanan bu çözeltiden her 100 ml agaroz içine 10 µl eklendi (82).

Hücre Süspansiyon Tamponu

10 mM Tris-HCl [Sigma, Amanya],
50 mM EDTA (Amresco, A.B.D),
20 mM NaCl (Amresco, A.B.D), pH 7.2
Distile suda çözülerek +4°C’de saklandı.

Hücre Parçalama Tamponu 1

10 mM Tris-HCl (pH 7.2),
50 mM NaCl (Amresco, A.B.D),
50 mM EDTA (Amresco, A.B.D),

% 0,2 sodyum deoksikolat (Amresco, A.B.D),
% 0,5 sarkozil (Amresco, A.B.D)
Distile suda çözülerek +4°C’de saklandı.

Hücre Parçalama Tamponu 2

250 mM EDTA (pH 9.0) (Amresco, A.B.D),
1% sarkozil (Amresco, A.B.D)
50 µg/ml proteinaz K (Amresco, A.B.D)
Distile suda çözülerek +4°C’de saklandı.

TE Tamponu

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)
0.1 mM EDTA
Distile suda çözülerek +4°C’de saklandı.

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS (Versiyon 13.0) programı kullanılarak yapıldı. Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Kategorik yapıdaki değişkenler bakımından gruplar arası farklılıklar ve değişkenler arası ilişkiler Ki-kare ve Fisher Kesin Ki-kare testi ile incelendi. Grupların yaş değişkeni bakımından karşılaştırılmasında iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi kullanıldı. Sonuçlar % 95 güven aralığında değerlendirildi ve $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hasta İzolatları

Ocak 2009 ile Nisan 2010 ayları arasında, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi poliklinik ve servislerine başvuran enfeksiyon bulguları olan hastalardan endikasyon gereği alınan klinik örneklerden toplam 79 izolat etken olarak izole edildi. Belirtilen süre içerisinde değerlendirmeye alınan yaklaşık 450 boğaz kültürü örneğinin 66'sında GAS etken olarak izole edildi. Örneklerin dağılımı Tablo 5'te gösterildi.

Tablo 5: Hasta örneklerinin dağılımı

Örnek	İzolat sayısı
Boğaz	66
Yara	4
Balgam	3
Doku	3
Kan	2
Periton	1
Toplam	79

İnvazif izolatların ikisi sepsis ön tanılı hastaların kan kültürlerinden, üçü selülit ön tanılı hastaların doku örneklerinden ve biri peritonit ön tanılı bir hastanın periton sıvısı kültüründen izole edildi.

İzolatların elde edildiği hastalar yaş gruplarına ayrılarak gruplandırıldı. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı ve izolatların elde edildiği enfeksiyon bölgeleri Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6: İzolatların elde edildiği hastaların yaş gruplarına göre dağılımı

Örnek	Yaş grubu					Toplam
	0-5 yaş	6-15 yaş	16-29 yaş	30-59 yaş	60 yaş üzeri	
Bogaz	10	49	4	1	2	66
Yara	3	0	1	0	0	4
Balgam	0	0	0	2	1	3
Doku	0	1	1	0	0	3
Kan	0	0	1	0	1	2
Periton	0	0	0	0	1	1
Toplam	13	51	7	3	5	79

İzolatların elde edildikleri klinik örneklerin cinsiyete göre dağılımı Tablo-7’de ve elde edilen invazif ve non-invazif izolatların hastaların yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 8’de gösterildi.

Tablo 7: Hasta örneklerinin cinsiyete göre dağılımı

Örnek	Erkek	Kadın	Toplam
Boğaz	35	31	66
Yara	2	2	4
Balgam	3	0	3
Doku	0	3	3
Kan	0	2	2
Periton	0	1	1
Toplam	40	39	79

Tablo 8: İzolatların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş grubu	İnvazif	Non-invazif	Toplam
0-5 yaş	0	13	13
6-15 yaş	1	50	51
16-29 yaş	3	4	7
30-59 yaş	0	3	3
60 yaş üzeri	2	3	5
Toplam	6	73	79

4.2. Taşıyıcı İzolatları

Zonguldak İl Milli Eğitim Müdürlüğüne bağlı ilköğretim okullarında tarama çalışmaları sonucu toplam 60 GAS izolatı elde edildi.

Her bir okul için üst solunum yolları muayene sonuçları Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9: Okullara göre üst solunum yolu muayene bulgularının dağılımı

Muayene sonucu	İlköğretim okulu K	İlköğretim okulu A	İlköğretim okulu F	Toplam
Sağlıklı	183	209	146	538
Tonsillofarenjit	2	8	3	13
Kulak zarında retraksiyon	0	0	1	1
Kulak zarında çökme	0	1	0	1
Postnazal akıntı	25	19	2	46
Perfore kulak zarı	1	0	0	1
Buşon	41	19	1	61
Otitis media	2	5	2	9
Mat kulak zarı	4	1	4	9
Diğer	1	0	0	1
Toplam	259	262	159	680

Çalışmamızda GAS genel taşıyıcılık oranı % 11,2 olarak bulundu. Herbir okul için tarama ve elde edilen GAS izolat sayıları tablo’da gösterilmiştir. Sosyoekonomik durumu “ortanın altı” olarak kabul edilen ilköğretim okulu K’da saptanan taşıyıcılık oranı diğer okullardakinden anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,001$) (Tablo 10).

Tablo 10: Okullara göre taşıyıcılık oranları

Okul	Tarama yapılan toplam öğrenci sayısı	Herhangi bir ÜS YE bulgusu saptanmayan öğrenci sayısı	Herhangi bir ÜS YE bulgusu saptanan öğrenci sayısı	Taşıyıcı kabul edilen toplam öğrenci sayısı	Taşıyıcılık yüzdesi (ÜS YE bulgusu saptanmayanlar içinde) (%)
İlköğretim okulu K	259	183	76	35	% 19,1
İlköğretim okulu A	262	209	53	18	% 8,6
İlköğretim okulu F	159	146	13	7	% 4,8
Toplam	680	538	142	60	% 11,2

Okul taramalarında taşıyıcı bulunanlar ile taşıyıcı olmayanların ortalama yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,869$).

Tarama sonucunda taşıyıcı kabul edilenlerin cinsiyete göre dağılımı tabloda gösterilmiştir. Erkek öğrenciler kız öğrenciler arasında taşıyıcılık oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,136$) (Tablo 11).

Tablo 11: Öğrencilerin cinsiyetlerine göre taşıyıcılık oranları

Cinsiyet	n	Taşıyıcı	%	p
Erkek	248	25	9,2	0,136
Kız	265	35	13,2	

Kardeş sayısı ile taşıyıcılık arasındaki ilişki tabloda gösterilmiştir. Ailenin tek çocuğu olanlardaki taşıyıcılık oranı farklı sayıda kardeşleri olanlardakinden anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0,027$) (Tablo 12).

Tablo 12: Öğrencilerin kardeş sayılarına göre taşıyıcılık oranları

Kardeş sayısı	Taşıyıcı	(%)	Toplam (n)
0	5	(3,9)	129
1	32	(13,3)	241
2	17	(14,2)	120
>2	6	(12,5)	48
Toplam	60	(11,2)	538

Öğrencilerin evlerinde kullanılan ısınma yöntemleri ile taşıyıcılık oranları arasında anlamlı ilişki bulundu. Buna göre evleri soba ile ısınanlarda taşıyıcılık anlamlı oranda yüksek bulundu ($p=0,002$) (Tablo 13).

Tablo 13: Öğrencilerin evlerinin ısınma yöntemlerine göre taşıyıcılık oranları

Evin ısınma yöntemi	Taşıyıcılık (n/toplam)	%
Soba	57/424	13,4
Kalorifer	3/114	2,6

Öğrencinin devam ettiği okul ve evindeki ısınma yöntemine göre taşıyıcılık oranları Tablo 14'te gösterildi. Buna göre soba ile ısınanlar arasında, ilköğretim okulu K öğrencilerindeki taşıyıcılık oranı, diğer okullardaki öğrencilerin taşıyıcılık oranından anlamlı olarak yüksek bulundu. ($p=0,004$).

Tablo 14: Öğrencilerin evlerinin ısınma yöntemlerine göre taşıyıcılık oranlarının okullara göre dağılımı

Okul	Soba	Kalorifer
İlköğretim okulu K	% 20 (35/175)	% 0 (0/8)
İlköğretim okulu A	% 8,4 (17/202)	% 14,3 (1/6)
İlköğretim okulu F	% 10,6 (5/47)	% 2 (2/97)

Tarama sonucunda taşıyıcılık ile diğer anket bilgileri arasındaki ilişkiler tabloda gösterilmiştir. Öğrencilerin okula ulaşım yöntemleri arasında anlamlı fark saptanmıştır, buna göre okula yaya olarak veya araba ile ulaşanlardaki taşıyıcılık oranı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,026$).

Yapılan analizlere göre öğrencilerin odalarında yatan kişi sayısına, son 15 gün içinde geçirilmiş üst solunum yolu enfeksiyonu öyküsüne, son 15 gün içinde antibiyotik kullanılmış olma durumuna, son 3 ay içinde hastaneye yatış öyküsüne, geçirilmiş tonsillektomi ve adenoidektomi operasyonlarına ve sınıf mevcuduna göre saptanan taşıyıcılık oranları arasında anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo 15). Ankette var olan “reflü” ile ilgili bölümde yeterli veri bulunmadığı için analiz yapılamamıştır.

Tablo 15: Taşıyıcılık oranlarının farklı değişkenlere göre dağılımları.

Değişken	Değerler	Taşıyıcılık	p
Odasında yatan kişi sayısına göre	1	% 9,4 (16/171)	0,662
	2	% 11,4 (30/264)	
	3	% 14,6 (12/82)	
	>4	% 10 (2/20)	
Okula ulaşım yöntemine göre	Yaya-Araba	% 13,4 (48/357)	0,026
	Servis-Otobüs	% 6,6 (12/181)	
Son 15 gün içinde geçirilmiş ÜSYE öyküsüne göre	Geçirmiş	% 10,1 (10/99)	0,848
	Geçirmemiş	% 11,4 (50/439)	
Son 15 gün içinde antibiyotik kullanım öyküsüne göre	Kullanmış	% 13,1 (11/84)	0,669
	Kullanmamış	% 10,8 (49/454)	
Son 3 ay içindeki hastaneye yatış öyküsüne göre	Yatmış	% 28,6 (2/7)	0,178
	Yatmamış	% 10,9 (58/531)	
Geçirilmiş tonsillektomi öyküsüne göre	Geçirmiş	% 9,1 (4/44)	0,806
	Geçirmemiş	% 11,3 (56/494)	
Geçirilmiş adenoidektomi öyküsüne göre	Geçirmiş	% 7,7 (3/39)	0,605
	Geçirmemiş	% 11,4 (57/499)	

4.3. Duyarlılık

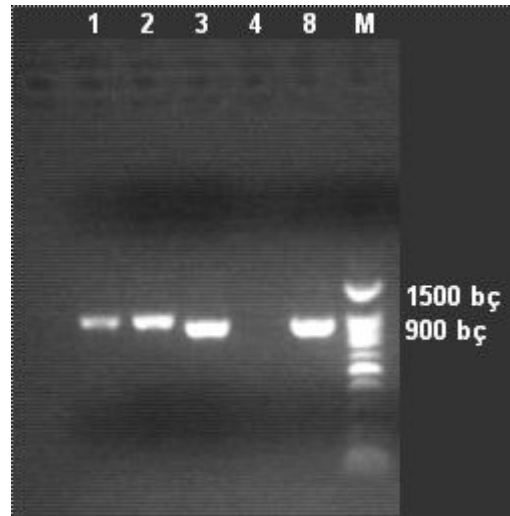
Elde edilen tüm izolatlar penisilin, vankomisin, linezolid, kloramfenikol, levofloksasin ve sefepime duyarlı bulundu. Eritromisin, klindamisin ve tetrasikline karşı değişen oranlarda. direnç görüldü. Direnç durumlarına göre gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). İzolatların direnç durumlarının gruplara göre dağılımı Tablo 16’da gösterilmiştir.

Tablo 16: İzolatların direnç durumlarının gruplara göre dağılımı (n)

	Taşıyıcı izolatları (n=60)	Hasta izolatları		
		İnvazif izolatlar (n=6)	Non-invazif izolatlar (n=73)	Genel hasta izolatları (n=79)
İndüklenebilir klindamisin direnci	3	0	1	1
Eritromisine direnç	5	0	3	3
Klindamisine direnç	1	0	0	0
Tetrasikline direnç	2	0	10	10

4.4. *emm* Geni Tiplerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda 139 izolatın 112 tiplendirilebildi (% 80,6). Araştırılan *emm* geninin temsili amplifikasyon ürünleri Şekil 3’te görülmektedir.



Şekil 3: *emm* genlerine ait amplifikasyon ürünleri.

Çalışmamızda; *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 toplam 21 ayrı *emm* tipi saptandı. En sık saptanan *emm* tipleri sıklık sırasına göre *emm12*, *emm89*, *emm1*, *emm77*, *emm4* ve *emm3* idi. Bunlar tiplendirilebilen tüm izolatların yaklaşık % 73,2'sini oluşturmaktaydı.

Çalışmamızda cinsiyetlere göre *emm* tipleri dağılımında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$).

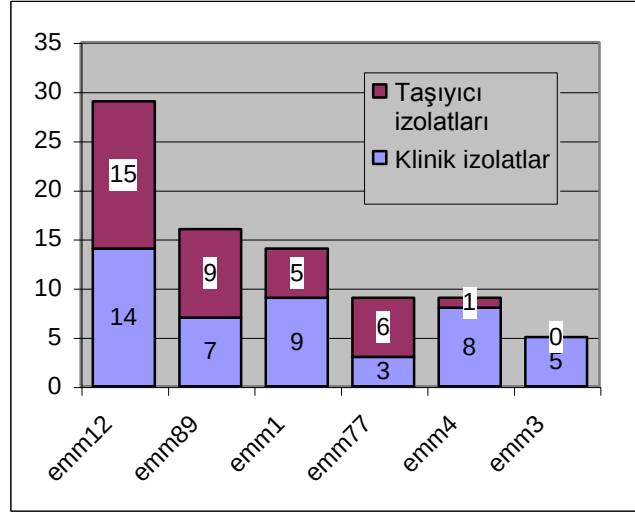
Hasta ve klinik izolat gruplarında saptanan *emm* tiplerinin dağılımı Tablo17'de gösterilmiştir. Buna göre *emm3* tipi taşıyıcı izolatlarında bulunmazken klinik gruptaki beş izolatta saptanmıştır ($p<0,05$). Hasta ve taşıyıcı izolat grupları arasında diğer *emm* tiplerinin saptanma oranları bakımından anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 17: *emm* tiplerinin izolat gruplarına göre dağılımı (n)

<i>emm</i> tipi	Tasiyıcı	Klinik	Toplam
<i>emm12</i>	15	14	29
<i>emm89</i>	9	7	16
<i>emm1</i>	5	9	14
<i>emm77</i>	6	3	9
<i>emm4</i>	1	8	9
<i>emm3</i>	0	5	5
<i>emm5.7</i>	3	1	4
<i>emm118</i>	1	3	4
<i>emm11</i>	2	1	3
<i>emm75</i>	1	2	3
<i>emm44</i>	2	0	2
<i>emm3.1</i>	1	1	2
<i>emm2</i>	0	2	2
<i>emm28</i>	0	2	2
<i>emm5</i>	0	2	2
<i>emm28.9</i>	1	0	1
<i>emm18</i>	0	1	1
<i>emm24</i>	0	1	1
<i>emm71</i>	0	1	1
<i>emm78.3</i>	0	1	1
<i>emm85</i>	0	1	1
Tiplendirilemeyen	13	14	27
Toplam	60	79	139

Çalışmamızda altı invazif izolatın ikisi *emm* 3, biri *emm* 89 iken diğer üç tanesi tiplendirilemedi.

En sık saptanan altı *emm* tipinin dağılımı Şekil 4’te gösterilmiştir.



Şekil 4: En sık saptanan altı *emm* tipinin klinik ve taşıyıcı izolatlarına göre dağılımı

Okullara göre *emm* tipleri dağılımı Tablo-18’de gösterilmiştir.

Tablo 18: Okullara göre en sık oranlarda saptanan *emm* tiplerinin dağılımı

<i>emm</i> tipi	Toplam izolat sayısı	Taşıyıcı toplam	İlköğretim okulu K	İlköğretim okulu A	İlköğretim okulu F
<i>emm12</i>	29	15	13	1	1
<i>emm89</i>	16	9	3	4	2
<i>emm1</i>	14	5	3	2	0
<i>emm77</i>	9	6	3	3	0
<i>Toplam</i>	77	36	22	10	4

Direnç durumunun düşük oranlarda görülmesinden dolayı, indüklenebilir klindamisin direnci ve antibiyotiklere duyarlılık oranları bakımından *emm* tipleri arasında istatistiksel analiz yapılamamıştır.

4.4. Toksin Genlerinin Araştırılması

Araştırılan toksin genlerinin temsili amplifikasyon ürünleri Şekil 5'te görülmektedir.



(M: Marker, bp: Bazçifti) Belirleyici(marker) olarak 50-bp'lik DNA ladder (Sigma, Almanya) kullanıldı.

Şekil 5: Toksin gen bölgelerinin amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonrası jel görüntüleri.

Polimeraz zincir reaksiyonları sonucunda *speB* geni tüm izolatlar için pozitif bulundu. *speA*, *speC*, *speG* ve *smeZ* genleri için izolat grubuna göre pozitiflik oranları Tablo 19'da gösterilmiştir. Klinik ve taşıyıcı izolat gruplarında toksin genlerinin saptanma oranları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). İnvazif izolatlarda *speA* saptanma oranı non-invazif izolatlardan anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p=0,04$).

Tablo 19: İzolat gruplarına göre toksin genlerinin dağılımı

İzolat	<i>speA</i>			<i>speC</i>			<i>speG</i>			<i>smeZ</i>		
	n	%	p	n	%	p	n	%	p	n	%	p
Taşıyıcı (n=60)	21	35,0	0,377	29	48,3	0,788	46	76,7	0,424	8	13,3	0,172
Klinik etken (n=79)	21	26,6		40	50,6		66	83,5		19	24,1	
*İnvazif (n=6)	4	66,7	0,04	2	33,3	0,432	6	100	0,582	2	33,3	0,627
*Non-invazif (n=73)	17	23,3		38	52,1		60	82,2		17	23,3	
Toplam	42	30,2		69	49,6		112	80,6		27	19,4	

İzolatlar, streptokokal pirojenik ekzotoksin genleri bulundurma bakımından olası 16 profil içinde 14 farklı profil gösterdiler. Tablo-20’de bu profiller sırasıyla *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *smeZ* bulunma durumuna göre “+” ve “-” işaretlerle belirtilmiştir. Yapılan analizde, “++-++” profili klinik izolatların yedisinde bulunurken, taşıyıcı izolatlarında saptanmamıştır. “++-” profili de sadece beş taşıyıcı izolatında görülmüştür.

Tablo 20: Toksin gen profillerinin gruplara göre dağılımı

Toksin gen profili					Taşıyıcı (n=60)	Hasta (n=79)			Toplam (n=139)
<i>speA</i>	<i>speB</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>smeZ</i>		Genel (n=79)	*İnvazif (n=6)	*Non- invazif (n=73)	
-	+	-	-	-	2	3	0	3	5
+	+	-	-	-	5	0	0	0	5
-	+	+	-	-	5	6	0	6	11
-	+	-	+	-	15	19	1	18	34
-	+	-	-	+	0	1	0	1	1
+	+	+	-	-	1	0	0	0	1
+	+	-	+	-	7	8	2	6	15
+	+	-	-	+	0	0	0	0	0
-	+	+	+	-	13	22	1	21	35
-	+	+	-	+	0	3	0	3	3
-	+	-	+	+	3	1	0	1	4
+	+	+	+	-	6	2	0	2	8
+	+	+	-	+	0	0	0	0	0
+	+	-	+	+	0	7	1	6	7
-	+	+	+	+	1	3	0	3	4
+	+	+	+	+	2	4	1	3	6

Tüm izolatların araştırılan beş toksin geninden ortalama 2,78 ($\pm 0,88$) geni bulundurduğu saptandı. Taşıyıcı izolatlarında ortalama 2,70 ($\pm 0,85$) gen bulunurken, klinik izolatlarında ortalama 2,85 ($\pm 0,907$) gen vardı, fark anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

Gen profillerinin cinsiyete göre dağılımı Tablo 21’de gösterildi.

Tablo 21: Toksin gen profillerinin cinsiyete göre dağılımı.

Toksin gen profili					Erkek	Kadın	Toplam
<i>speA</i>	<i>speB</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>smeZ</i>			
-	+	-	-	-	0	5	5
+	+	-	-	-	2	3	5
-	+	+	-	-	6	5	11
-	+	-	+	-	19	15	34
-	+	-	-	+	0	1	1
+	+	+	-	-	0	1	1
+	+	-	+	-	9	6	15
+	+	-	-	+	0	0	0
-	+	+	+	-	15	20	35
-	+	+	-	+	1	2	3
-	+	-	+	+	1	3	4
+	+	+	+	-	2	6	8
+	+	+	-	+	0	0	0
+	+	-	+	+	4	3	7
-	+	+	+	+	3	1	4
+	+	+	+	+	3	3	6
Toplam (n)					65	74	139

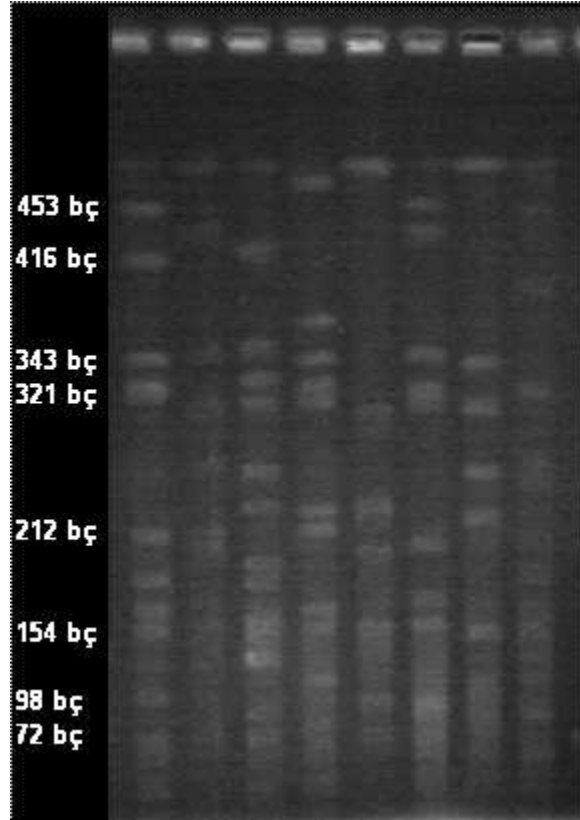
Genlerin birliktelik oranları Tablo 22’de gösterilmiştir. Buna göre *speG* en çok saptanan gen olduğundan dolayı, *speA*, *speC* ve *smeZ* genlerinin en sık birlikte bulunduğu gen olarak görülmektedir. *speG*’nin özellikle “seçtiği” bir gen gözlenmemektedir. *SmeZ* ise sadece bir izolatta “tek başına” saptanmıştır, genel olarak diğer genlerle birlikte bulunma eğilimindedir.

Tablo 22: Toksin genlerinin birlikte saptanma oranları

	Tek olarak bulunma		<i>speA</i> ile birlikte		<i>speC</i> ile birlikte		<i>speG</i> ile birlikte		<i>smeZ</i> ile birlikte		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>speA</i>	6	15,8	-	-	15	35,7	36	85,7	14	33,3	42	30,2
<i>speC</i>	11	15,9	15	21,7	-	-	53	76,8	15	21,7	69	49,6
<i>speG</i>	34	30,4	36	32,1	53	47,3	-	-	22	19,6	112	80,6
<i>smeZ</i>	1	4	14	51,9	15	55,6	22	81,5	-	-	27	19,4

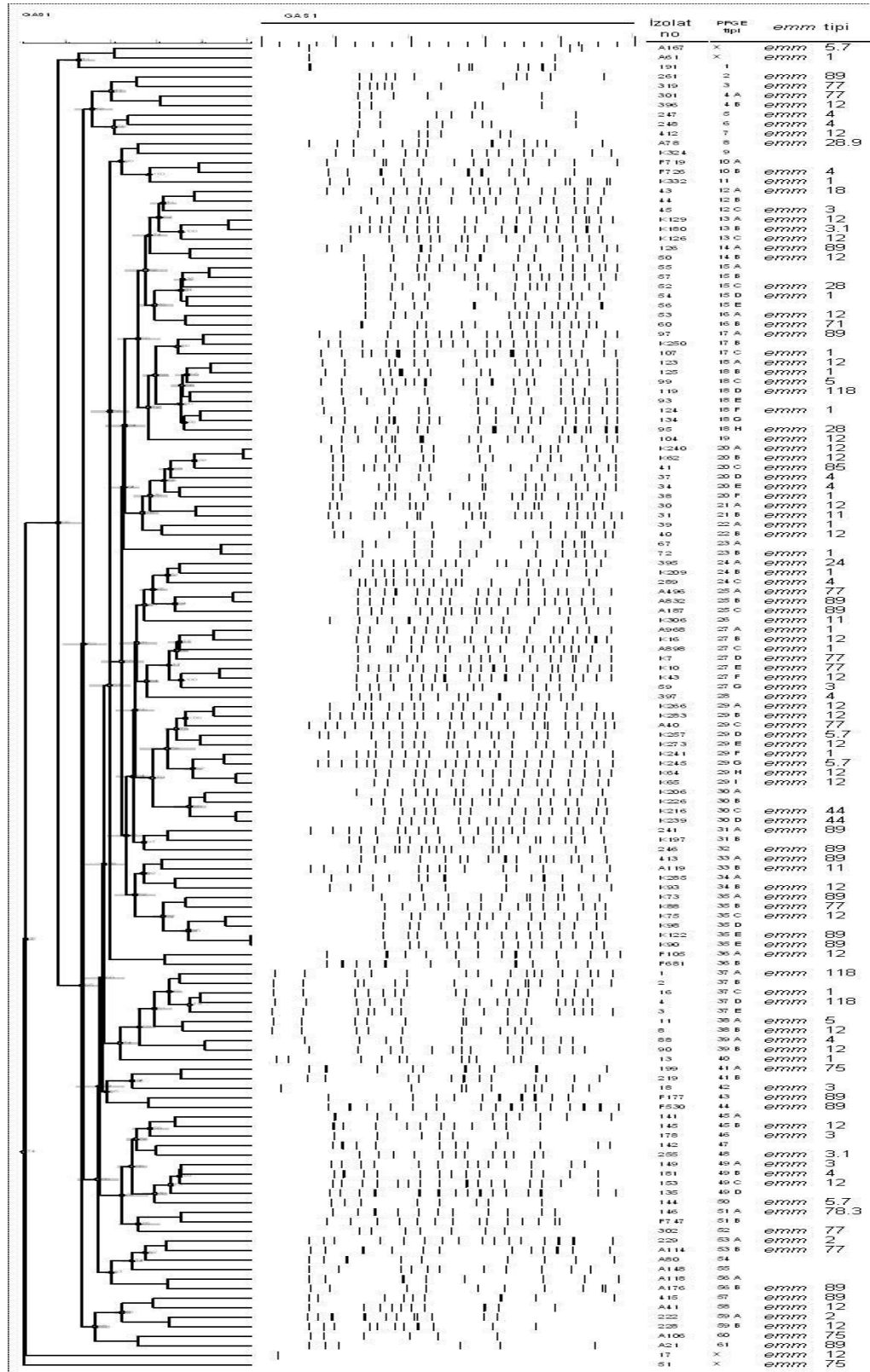
4.5. Klonal İlişkinin Araştırılması

Tüm izolatlar arasındaki klonal ilişki PFGE ile araştırıldı. Öğrencilerin kültürlerinden elde edilen her bir izolatın birbirleri ile ilişkisi değerlendirildi. Buna göre her bir öğrenciden elde edilen birden fazla izolatın klonal olarak ayırt edilemez olduğu gösterildi ve izolatlardan biri çalışmaya dahil edildi. Uygulanan PFGE yöntemine ait temsili görüntü Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6: PFGE jel görüntüsü.

139 izolatın altısında PFGE profili belirlenemedi, kalan 133 izolat için 61 ayrı profil tespit edildi (Şekil 7). 133 izolat, eleman sayısı 2-9 arasında değişen 33 küme oluşturdu; 28 izolatın özgül profile sahip olduğu gözlemlendi.



Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Değerlendirme, tolerans değeri 1, optimizasyon değeri 0,5 alınarak yapıldı.

Şekil 7: İzolatlar arasındaki klonal ilişkiyi gösteren dendrogram.

PFGE analizine göre izolat gruplarının kümelenme oranları Tablo 23'te gösterilmiştir. Genel kümelenme oranı % 78,9 olarak bulunmuştur. Buna göre klinik ve taşıyıcı izolat grupları arasında kümelenme oranları bakımından anlamlı fark bulunmazken ($p>0,05$), ilköğretim okulu K'dan elde edilen izolatların kümelenme oranı diğer okullarinkinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,036$).

Tablo 23: PFGE kümelenme oranları

İzolat grubu	Tiplendirilebilen izolat sayısı (n)	Kümelenme oranı (%)	p
Klinik	77	77,9	0,901
Taşıyıcı	56	80,4	
Okul K	34	91,2	0,036
Okul A	15	60,0	
Okul F	7	71,4	

Taşıyıcı izolatlarında K90 ve K122'nin ayırt edilemez PFGE profili oluşturduğu belirlenirken; K62 ile K240, A496 ile A832, K64 ile K65, K216 ile K239, K75 ile K98, K129 ile K180 izolatları % 95'in üzerinde yakınlık gösterdi.

En sık saptanan 7 PFGE profiline göre süperantijen genlerinin dağılımı Tablo 24'te gösterildi. Tüm izolatların % 31,7'si (44/139) bu yedi profilde toplandı.

Tablo 24: En sık görülen PFGE profillerine göre saptanan toksin genlerinin dağılımı

PFGE	n	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>smeZ</i>	Ortalama gen sayısı
29	9	3	6	8	3	3,22
18	8	1	1	7	2	2,38
20	6	2	5	3	2	3
35	6	2	1	5	6	2,33
15	5	1	2	5	1	2,8
27	5	3	1	4	2	2,8
37	5	2	5	5	4	4,2
Toplam	44	14	21	37	14	2,93

En sık saptanan yedi PFGE profilindeki izolatlarda gözlenen toksin gen profilleri Tablo 25'te gösterildi. Bunlar içinde en sık görülen profiller genel dağılımda da en sık gözlenmiş olan profillerdi; 12 izolatta -+--+ profili, yedi izolatta ise -++++- profili saptandı.

Tablo 25: En sık görülen PFGE profillerinde saptanan toksin gen profilleri

Toksın gen profili					n
<i>speA</i>	<i>speB</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>smeZ</i>	
-	+	-	-	-	1
+	+	-	-	-	2
-	+	+	-	-	3
-	+	-	+	-	12
-	+	-	-	+	0
+	+	+	-	-	0
+	+	-	+	-	3
+	+	-	-	+	0
-	+	+	+	-	7
-	+	+	-	+	1
-	+	-	+	+	3
+	+	+	+	-	3
+	+	+	-	+	0
+	+	-	+	+	2
-	+	+	+	+	3
+	+	+	+	+	4
Toplam (n)					44

4.6. *emm* Tipleri, PFGE Profilleri ve Toksin Genleri İlişkisi

En sık saptanan altı *emm* tipi izolatlarından, *emm1* tipi araştırılan beş gen içinde saptanan ortalama gen sayılarında en yüksek ortalamaya sahipti, *emm1* tipi hasta izolatlarında saptanan ortalama gen sayısı 4,1 ile anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$) (Tablo 26).

emm1 tipi izolatlarda *speA* geninin pozitiflik oranı (11/14) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,005$) (Tablo-26).

emm1 tipi izolatlarda *smeZ* geninin pozitiflik oranı (8/14) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,004$) (Tablo 26).

speC bulunma oranları bakımından *emm* tipleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,243$) (Tablo 26).

emm4 tipi izolatlarda *speG*'nin negatiflik oranı (9 izolatın 2'sinde pozitif) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,005) (Tablo 26).

Tablo 26: En sık saptanan *emm* tiplerine göre toksin genlerinin dağılımı

<i>emm</i> tipi	Toplam (n)	n		Ortalama gen sayısı		<i>speA</i>		<i>speC</i>		<i>speG</i>		<i>smeZ</i>	
		Hasta	Taşıyıcı	Hasta	Taşıyıcı	Hasta	Taşıyıcı	Hasta	Taşıyıcı	Hasta	Taşıyıcı	Hasta	Taşıyıcı
<i>emm12</i>	29	14	15	2,7	3,1	1	6	9	9	13	11	1	2
<i>emm89</i>	16	7	9	2,6	2,7	0	5	5	2	6	7	0	2
<i>emm1</i>	14	9	5	4,1	2,2	8	3	3	1	9	2	8	0
<i>emm77</i>	9	3	6	1,3	2,8	0	3	2	3	0	5	0	1
<i>emm4</i>	9	8	1	2,5	1,0	1	0	5	0	2	0	4	0
<i>emm3</i>	5	5	0	2,8	-	3	0	1	0	5	0	0	0
Toplam	77	41	36	3,4	2,7	10	17	24	15	30	25	13	5

En sık saptanan *emm* tiplerine göre *speA-speC* genlerinin bulunma kombinasyonları Tablo 27'de gösterilmiştir.

Tablo 27: En sık saptanan *emm* tiplerine göre *speA-speC* birlikteliği

<i>emm</i> tipi	n	<i>speA</i> (+) <i>speC</i> (-)	<i>speA</i> (-) <i>speC</i> (+)
<i>emm12</i>	29	2	13
<i>emm89</i>	16	4	6
<i>emm1</i>	14	8	1
<i>emm77</i>	9	2	4
<i>emm4</i>	9	1	5
<i>emm3</i>	5	3	1

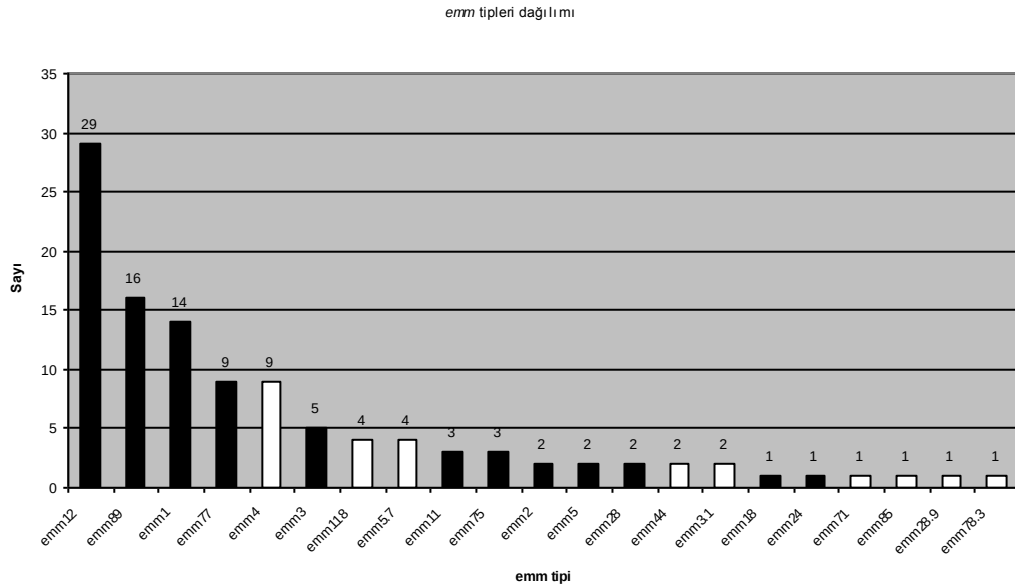
Tablo 28'de en sık görülen *emm* tiplerindeki izolatlarda en sık oranlarda saptanan toksin gen profillerinin taşıyıcı ve hasta izolat gruplarına göre dağılımı görülmektedir. Buna göre *emm1*'in taşıyıcı izolatlarında ++---, hasta izolatlarında ise +-++ toksin gen profilleri; *emm12*'nin taşıyıcılardaki ++++-, hastalardaki -+++ profilleri, *emm89*'un ise hastalardaki -+++ profili ön plana çıkarken -++-+ profili saptanan 3 izolatın tümü *emm4* tipindedir.

Tablo 28: En sık görülen *emm* tiplerine ve izolat gruplarına göre toksin gen profillerinin dağılımı

Toksın gen profili*				<i>emm1</i>		<i>emm12</i>		<i>emm77</i>		<i>emm89</i>		<i>emm4</i>	
	Taşıyıcı	Hasta	Toplam	Taşıyıcı	Hasta	Taşıyıcı	Hasta	Taşıyıcı	Hasta	Taşıyıcı	Hasta	Hasta	
++++-	13	22	35			2/15	7/14			0	4/7		
-+--	15	19	34			4/15	4/14			3/9	2/7		
++--	7	8	15					2/6	0				
----	5	6	11					1/6	2/3				
++++-	6	2	8			3/15	0						
++-++	0	7	7	0	5/9								
+++++	2	4	6	0	3/9								
++---	5	0	5	3/5	0								
---++	0	3	3									3/9	

*Profiller sırasıyla *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *smeZ* bulunma durumuna göre “+” ve “-” işaretlerle belirtilmiştir.

Çalışmamızda saptanan 21 farklı *emm* tipinden *emm1*, *emm2*, *emm3*, *emm5*, *emm11*, *emm12*, *emm18*, *emm24*, *emm28*, *emm75*, *emm77* ve *emm89* tipleri 26 valanlı aşı kapsamında yer almaktadır. Bunlar tiplendirilebilen 112 izolatın 87’sini (% 77,7) oluşturmaktadır (Şekil 8).



26 değerlikli aşı kapsamına giren tipler siyah, bu aşı kapsamında olmayanlar beyaz dolgu ile gösterilmiştir.

Şekil 8: *emm* tiplerine göre izolat sayıları.

5. TARTIŞMA

Grup A streptokoklar üst solunum yolu enfeksiyonlarına sıklıkla neden olduğu gibi ağır seyreden, mortalite ve morbiditesi yüksek bazı invazif enfeksiyonlara da yol açabilen önemli patojenlerdir. Farenjitten toksik şok sendromuna kadar değişen geniş bir enfeksiyon spektrumunun yanında asemptomatik taşıyıcıların bulunması; günümüzde araştırmaları taşıyıcılık izolatları ile non-invazif ve invazif klinik izolatların genetik karakterinin belirlenmesine yönlendirmiştir.

Çalışmamız dahilindeki klinik izolatların büyük kısmını (66/79) boğaz kültürleri oluştururken, bunların da çoğu (49/66) 6-15 yaş grubu hastalardan elde edilen izolatlardır. 79 klinik izolatın 40'ı erkek hastalardan, 39'u ise kadın hastalardan elde edilmiştir. Klinik izolat grubunda toplam altı izolat, invazif izolat olarak değerlendirilmiştir.

Bireyin grup A streptokok taşıyıcısı olduğunun belirlenmesi herhangi bir üst solunum yolu enfeksiyon bulgusu olmaksızın alınan boğaz kültürü örneğinde mikroorganizmanın üretilmesi, aynı zamanda serolojik yanıtın da negatif olarak saptanması gereklidir. Taşıyıcılık boğazda olabileceği gibi, burun, cilt, anüs ve vajende de söz konusu olabilmektedir (83-85). Bu çalışmada taşıyıcılık tespiti için okullarda yapılan boğaz kültürü taraması sırasında herhangi bir serolojik test yapılmamıştır. Gerekli resmi onay sonrası, velilerinden yazılı, kendilerinden ise sözlü olarak onay alınan tüm öğrencilere, ilki Mayıs, ikincisi de Ekim ayında olmak üzere boğaz kültürü taraması uygulanmıştır. Bu iki kültür taramasının en az birinde grup A streptokok üremesi saptanan öğrencilerden ikinci taramadan en az bir ay sonra 3. kez boğaz kültürü örnekleri alınmıştır. Sonuç olarak, söz konusu üç taramanın en az ikisinde kültüründe grup A streptokok üreyen öğrenciler "taşıyıcı" olarak kabul edilmiştir. Her üç örnek alımı sırasında, hastanemiz Kulak-Burun-Boğaz hekimlerinden biri tarafından, öğrencilerin üst solunum yolu muayenesi yapılmıştır ve enfeksiyon bulgusu olan çocuklar "taşıyıcı" adayı olmaktan çıkarılmıştır.

Çalışmamızda genel taşıyıcılık oranı % 11,2 olarak saptanmıştır. İlk ve ikinci . taramada GAS izole edilen öğrencilerin sekizinden üçüncü taramada örnek alınamamıştır, bunlardan yedisine ulaşılamamış, biri ise tekrar örnek vermeyi reddetmiştir. Sözü edilen bu sekiz kişiye ulaşılabilsen ve tümünden GAS izole edilmiş olsaydı taşıyıcılık oranı 12,6'ya ulaşacaktı. Bu sonuç doğrultusunda taşıyıcı

oranımızın 11,2 ile 12,6 arasında olduğunu söylemek daha uygun olabilir, ancak moleküler testlerde hasta-taşıyıcı izolatlarının karşılaştırılmasında şüpheli sonuçlarla analizde bulunulmaması için kesin olarak taşıyıcı olarak kabul edilebilecek 60 kişiden elde edilen izolatlar taşıyıcı grubuna dahil edilip, ulaşılamayan öğrencilerden önceki taramalarda elde edilen izolatlar çalışma dışı tutulmuştur.

Ülkemizden taşıyıcılıkla ilgili yapılan diğer çalışmalarda; Cengiz ve ark.'ları (69) 1989 yılında Ankara'daki bir yatılı ilköğretim okulunda 7-16 yaş grubu çocuklarda yaptıkları çalışmada GAS oranını % 19,26 ; Şahin ve ark.'ları (62) çocuk yuvası öğrencilerinde % 7,9; Topal ve ark. (86) % 7,1 ve Durmaz ve ark. (15) % 14,3 olarak bildirmişlerdir. Taşıyıcılık taraması sonrasında GAS oranı; Jasir ve ark.'ın (68) 1995 – 1997 yıllarında İran'da yaptıkları çalışmada % 21; Nussinovitch ve ark. (87) İsrail'de okul öncesi çocuklarda yaptıkları çalışmada % 6,7; Dawson ve ark. (88) Birleşik Arap Emirlikleri'nde 6-7 yaş arası çocuklarda yaptıkları çalışmada % 21,3; Gonzalez ve ark (89) Las Palmas'ta 4-15 yaş çocuklarda yaptıkları çalışmada % 6 olarak bildirmişlerdir. Yurtiçi ve yurtdışında yapılan bazı çalışmalara ait taşıyıcılık oranları ile ilgili veriler Tablo-29'da gösterilmiştir. Bu verilerle karşılaştırıldığında çalışmamızda saptanan % 11,2'lik taşıyıcılık oranı literatürle uyumlu görünmektedir.

Tablo 29: Bazı çalışmalara ait saptanan GAS taşıyıcılık oranları

Araştırmacı	Yıl	Bölge	GAS oranı
Çalışmamızda	2009	Zonguldak	% 11,2
Toprak ve ark. (90)	2008	Afyon	% 6,5
Topal ve ark. (86)	2006	Afyon	% 7,1
Topkaya ve ark. (91)	2005	İstanbul	% 13
Şahin ve ark. (62)	2005	Sivas	% 7,9
Öztürk ve ark. (70)	2004	Düzce	% 25,9
Altındış ve ark. (56)	2003	Afyon	% 18
Durmaz ve ark. (15)	2003	Malatya	% 14,3
Gür ve ark. (92)	2002	İstanbul	% 13,9
Kurtoğlu ve ark. (93)	2001	Van	% 16
Değerli ve ark. (94)	1999	Manisa	% 2,8
Hızel ve ark. (4)	1997	Ankara	% 3,2
Özcan ve ark. (64)	1997	Manisa	% 14,2
Metintaş ve ark. (63)	1991	Eskişehir	% 13,6
Gökfidan ve ark. (71)	1989	Adana	% 19,6
Durupınar ve ark. (72)	1988	Samsun	% 20,4

Tablo 29: Bazı çalışmalara ait saptanan GAS taşıyıcılık oranları (devamı)

Yurtdışında yapılan bazı çalışmalar			
Steer ve ark. (95)	2009	Fiji	% 6
Lloyd ve ark. (67)	2005	Hindistan	% 8,4
Navaneeth ve ark. (96)	2001	Salem	% 6,2
Gonzalez ve ark. (89)	2000	Las Palmas	% 6
Pichichero ve ark. (97)	1999	ABD	% 2,5
Nussinovitç ve ark. (87)	1999	İsrail	% 6,7
Jasir ve ark. (68)	1997	İran	% 21
Dirchburn ve ark. (98)	1995	İngiltere	% 0,6
Begovac ve ark. (66)	1993	Zagreb	% 8,3
Dawson ve ark. (88)	1989	B. Arap Em.	% 21,3
Strömberg ve ark. (99)	1988	İsveç	% 5
Takeuchi ve ark. (65)	1985	Japonya	% 12,2

Boğaz kültürü örnekleri alınacak öğrencilerin ortalama sosyo-ekonomik durumlarına göre "iyi", "orta" ve "ortanın altı" olarak 3 ayrı ilköğretim okulu belirlenmiştir. "ortanın altı", "orta" ve "iyi" olarak bildirilen okullardaki taşıyıcılık oranları sırasıyla % 19,1, % 8,6 ve % 4,8 olarak saptandı. yapılan istatistiksel analiz sonucu okullar arasındaki taşıyıcılık farkı anlamlı bulundu ($p<0,001$). Sosyo-ekonomik durumu "ortanın altı" olarak tanımlanan okuldaki taşıyıcılık en yüksek, "iyi" olarak tanımlanan okuldaki taşıyıcılık ise en düşük olarak saptanmış oldu. İstatistiksel analize göre İlköğretim Okulu K'nın oranı anlamlı derecede yüksek bulundu.

Orak ve ark. (100) 1989'da Elazığ'da anaokulu çocuklarında yaptıkları çalışmada GAS izole edilme oranını orta-yüksek sosyoekonomik çevredeki çocuklar ile düşük sosyoekonomik çevredeki çocuklarda arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Değerli ve ark. da (94) Manisa'da okul çocuklarında yaptıkları çalışmada GAS oranını sosyoekonomik düzeyi düşük çocuklarda % 4,1; sosyoekonomik düzeyi iyi çocuklarda % 1,3 olarak saptamışlar ve GAS taşıyıcılığı ile sosyoekonomik çevre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Durmaz ve ark. (15) Malatya'da yaptıkları çalışmada sosyo ekonomik düzeyin GAS taşıyıcılığı üzerine etkisini araştırmışlar ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamamışlardır. Yazov ve ark. (101) Etiyopya'da okul çocuklarında yaptıkları çalışmada sosyoekonomik düzeyi iyi ve düşük çocuklarda GAS taşıyıcılık oranını karşılaştırdıklarında istatistiksel anlamda bir farklılık bulamamışlardır. Şahin ve ark.'nın (62) yaptığı çalışmada sosyoekonomik düzeyi

düşük çocuklarda GAS oranı % 10,2, orta olan çocuklarda % 5,2, iyi olan çocuklarda % 5,6 olarak bulunurken sosyoekonomik düzeyin GAS bulunma oranına etki etmediği saptanmış ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Toprak ve ark. (90) 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada, devlet okullarına devam eden öğrencilerdeki taşıyıcılık oranını özel okul öğrencilerinkinden istatistiksel olarak daha yüksek olarak bulmuştur.

Genel sosyo-ekonomik durumu daha iyi olan öğrencilerin, muhtemelen daha iyi hijyen koşullarında yaşıyor olması taşıyıcılığın bu grupta daha az olmasını sağladığı düşünülebilir. Ancak bu ayırım, her bir okula sosyo-ekonomik durumu farklı öğrencilerin devamı söz konusu olduğundan net bir tanımlayıcı olarak değerlendirilmemiştir. Öğrencilerin aile eğitim ve kültür düzeyleri ve maddi durumları gibi bilgiler net olarak sorgulanmadığından, ayrıca bu unsurların da hijyen koşullarını tam olarak gösteremeyeceği düşünüldüğünden, sözü edilen bu ilişkinin yalnızca burada ortaya çıkan istatistiksel anlam ile kararlaştırılması doğru olmayabilir. Bu nedenle çalışmamızda, bunun yanında, örnek alınan her bir öğrenci için kardeş sayısı, evde yaşayan kişi sayısı, öğrencinin yattığı odada kalan kişi sayısı ve evin ısıtma yöntemlerinin de dahil olduğu soruların bulunduğu anket formları doldurulmuş ve çeşitli değişkenlerin taşıyıcılık üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

Çalışmada kardeşi olmayan öğrencilerdeki taşıyıcılık oranı bir veya daha fazla kardeşi olanlardan anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,027$). Sınıf mevcudu ile taşıyıcılık arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p>0,05$).

Literatürde genellikle taşıyıcılığın 5 veya 6 ile 15 yaş arasında yüksek olduğu bildirilmiştir (3, 17). Bunun nedeni erken çocukluk dönemi sonrası anneden geçen antikorların zamanla azalmasıyla GAS'ların değişik serotipiyle karşılaşma olasılığının artmasıdır (3, 17). Ancak yaş ilerledikçe farklı serotiplerle karşılaşma olduğundan dolayı bağışıklık daha geniş dağılımlı olur ve yetişkinlerde taşıyıcılık oranı azalır. Çalışmamızda taşıyıcılık ile çocukların yaşları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).

Maekawa ve ark. (102) 1977-1979 yıllarında Japonya'da, Hoffmann (103) 1983-1984 yıllarında Danimarka'da ve Elçi ve ark. (104) Diyarbakır'da yaptıkları çalışmalarda erkek ve kız çocukları arasında GAS taşıyıcılık oranı bakımından bir

fark olmadığını saptamışlardır. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak taşıyıcılık ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Öğrencinin odasında kalan kişi sayısı, öğrencinin okula ulaşım yöntemi, son 15 gün içinde geçirilmiş üst solunum yolu enfeksiyonu öyküsü, son 15 gün içindeki antibiyotik kullanımı, son 3 ay içerisinde hastaneye yatış ve geçirilmiş tonsillektomi veya adenoidektomi operasyonu öyküsü ile taşıyıcılık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. Öğrencinin evinin ısıtma yöntemi ile taşıyıcılık arasında anlamlı ilişki saptandı. Isınmak için kalorifer kullananlarda % 2,6 (3/114) olan taşıyıcılık oranı soba ile ısınanlarda % 13,4 (57/424) olarak ortaya çıktı.

Çalışmada ilkokullar ile öğrencinin evinin ısıtma yöntemi arasında bir ilişki varlığının araştırılması için yapılan analiz sonucunda, sadece genel sosyo-ekonomik düzey olarak “ortanın altı” kategoride incelenen ilköğretim okulu K’daki taşıyıcılık ilişkisi anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu okulda evi soba ile ısıtılan öğrencilerdeki taşıyıcılık yüzdesi anlamlı olarak yüksekti. Bu bulgu ile okullar arasındaki taşıyıcılık oranı birlikte irdelendiğinde; İlköğretim okulu K’daki anlamlı olarak yüksek bulunan taşıyıcılık oranı ile bu okuldaki soba ile ısınanlarda bulunan anlamlı yüksek olan taşıyıcılık oranının ilişkili olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızda okula yaya olarak veya özel araç ile ulaşanlardaki taşıyıcılık oranı otobüs veya servis kullananlara göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu bulgu, otobüs veya servis gibi kalabalık ortamla yolculuk yapan kişilerde daha yüksek olan taşıyıcılık beklentisine ters düşmektedir, ancak söz konusu okullara devam eden öğrencilerin otobüs veya servis yolculuklarının -yerleşim yeri göz önüne alındığında- çok uzun sürmediği ve özellikle sosyoekonomik durumu orta ve ortanın altı olarak düşünülen öğrencilerin okula yakın olan “kenar mahalle” denilen semtlerde oturmalarından dolayı okula yaya olarak devam ettikleri düşünüldüğünde servis-otobüs ulaşımına göre yayalarda taşıyıcılık oranının yüksek çıkması açıklanabilir görünmektedir. Bu görüş, yaya olarak okula devam eden öğrencilerdeki taşıyıcılık oranları bakımından yine İlköğretim Okulu K’da anlamlı olarak yüksek çıkması ile desteklenmektedir ($p=0,001$).

GAS enfeksiyonlarının tedavisinde penisilin ilk seçenektir. Özellikle penisilin allerjisi bulunan kişilerde eritromisin tercih edilmektedir. Şimdiye kadar GAS izolatlarında penisilin direnci bildirilmemiştir. Buna rağmen GAS enfeksiyonlarının tedavisinde başarısızlıklar görülebilmektedir. Bunun en önemli

nedenlerinden biri penisilin toleransıdır (46). Tedavideki başarısızlığın diğer nedenleri arasında asemptomatik taşıyıcılık, boğaz florasında beta-laktamaz üreten çeşitli mikroorganizmaların varlığı, tonsillerdeki kript lezyonlarında enfeksiyonun derinde yerleşmiş olması, antimikrobiyalin üremesi yavaşlamış bakterilere etkisiz kalması ve hastanın tedaviye iyi uyum göstermemesi sayılabilir. (3, 17, 20)

Bizim çalışmamızda izolatların tümü, penisilin, vankomisin, linezolid, kloramfenikol, levofloksasin ve sefepime duyarlı bulunurken, eritromisine, klindamisine ve tetrasikline karşı duyarlı olmayan suşlar saptanmıştır. Çalışmamızda sadece disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi uyguladığımızdan dolayı izolatlardaki penisilin toleransı ile ilgili bir bulgu değerlendirilmemiştir.. Tüm antibiyotikler için izolatların hasta ve taşıyıcı gruplarında duyarlılık oranları arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0,05$). İnvazif grup izolatlarda hiçbir antibiyotiğe karşı direnç bulunmazken, bu grupta az sayıda izolat bulunduğundan bu durum istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmemiştir ($p>0,05$).

Eritromisin 1952 yılında bulunmuştur ve GAS direnci ilk kez 1959'da bildirilmiştir. Çalışmamızda eritromisin direncini, orta duyarlı ve dirençli profilleri “dirençli” olarak kabul ettiğimizde % 5,3 olarak bulundu. Yapılan bazı çalışmalarda eritromisin direnç oranını Açıkğöz ve ark. (48) % 2,6; Akata ve ark. (49) % 2,7; Gündüz-Kaya ve ark. (50) % 4,3; Çolakoğlu ve ark. (51) % 6,8; Başarı ve ark. (52) % 9,7; Erdoğan ve ark. (53) % 5,8; Uyanık ve ark. (54) % 8; Eryılmaz ve ark. (55) % 3,6; Altındış ve ark. (56) % 8; Berkiten ve ark. (57) 1/62; Kılıç ve ark. (58) % 3,8; Çiftçi ve ark. (59) % 3,8; İnan ve ark. (60) 0/133 olarak bildirilmişlerdir.

Ülkemiz dışında yapılan bazı çalışmalara ait veriler ise % 1 ile % 62 arasında değişen eritromisin direnç oranları bildirmiştir (105-114). Bu veriler Tablo 30'da gösterilmiştir.

Tablo 30: Bazı çalışmalara ait saptanan direnç oranları

Araştırmacı	Yıl	Bölge	Eritromisin direnç oranı
Veraldo ve ark. (105)	1999	İtalya	% 42
Spach ve ark. (106)	1998	Japonya	% 61,8
Hsueh ve ark. (107)	2003	Tayvan	% 17-54
Kim ve ark. (108)	2004	Kore	% 32,9
Arvand ve ark. (109)	2000	Almanya	% 12,7
Lopardo ve ark. (110)	2004	Arjantin	% 6,7
Malhotra-Kumar ve ark. (111)	2005	Belçika	% 13
Hassenbein ve ark. (112)	2004	ABD	% 7,7
Ioannidou ve ark. (113)	2003	Yunanistan	% 30,8
Bozdoğan ve ark. (114)	2003	Avrupa	% 1,8-32

Bizim çalışmamızda elde edilen eritromisin direnç oranı literatürle uyumlu olmakla birlikte, direncin düşük görüldüğü çalışmalar arasında yer almıştır. Çalışmalar arasında direnç oranlarının çok geniş aralıklarda çıkması, hasta popülasyonundaki farklılıklar ve antibiyotik kullanım farklılıkları ve uyumu nedeniyle olabilir. Bununla birlikte, indüklenebilir klindamisin direnci bulunan dört izolatın ikisi, eritromisine dirençli yedi izolatın üçü ve tetrasikline dirençli 12 izolatın ikisinde *emm77* tipi olduğu tespit edilmiştir.

GAS enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaya 1948’de başlanan ve 1954’ten sonra direnç geliştiği bildirilen ve bu yüzden sık tercih edilmeyen tetrasikline karşı direnç oranı bizim çalışmamızda % 8,6 olarak bulunmuştur. Bu oranı Eryılmaz ve ark. (55) % 7,3; Başarı ve ark. (52) % 30,6; Akata ve ark. (49) % 22,7; Bayraktar ve ark. (115) % 31; Özakkaş ve ark. (116) % 14; Kocabeyoğlu ve ark. (117) % 31,6; Jasir ve ark. (68) İran’da yaptıkları çalışmada % 42; Uh ve ark. (118) Kore’de % 55,2; Szczypa ve ark. (119) % 43; Betriu ve ark. (120) % 15-17; de Melo ve ark. (121) % 50 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki direnç oranı literatürdeki çalışmaların çoğundan daha düşük bulunmuştur.

Klindamisinine karşı direnç, çalışmamızda yalnızca bir izolatta görüldü. İndüklenebilir klindamisin direnci hasta izolatlarının bir tanesinde, taşıyıcı izolatlarının ise üçünde görüldü, oran bakımından bakımından anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). İndüklenebilir klindamisin direnci belirlenen üç izolatın iköğretim okulu K’dan olduğu gözlemlendi. Bu izolatların hem PFGE profilleri (24, 27,

29), hem de *emm* tipleri (*emm1*, *emm77*, *emm12*) birbirlerinden farklı olduğu gözlemlendi.

Çeşitli çalışmalarda levofloksasin ve kloramfenikole karşı GAS izolatlarının değişen oranlarda direnç durumları bildirilmiş olmasına karşın bizim çalışmamızda bu antimikrobiyallere karşı dirençli suş saptanmamıştır.

GAS'ların en önemli virulans faktörü olarak kabul edilen M proteini *emm* geni tarafından kodlanmaktadır. Çalışmalarda belli *emm* tiplerinin belli hastalıklarla ilişkileri gösterilmiştir. Ayrıca M proteini GAS'lara karşı geliştirilmekte olan aşı çalışmaları için en güncel ve ümit verici adaydır. Bu nedenlerle hasta veya taşıyıcılardan elde edilen GAS izolatlarının *emm* tiplerinin belirlenmesi önemlidir (21, 74).

emm gen dizilerinin analizinde referans merkez olarak CDC'nin veritabanı kullanılmaktadır. Bu veritabanında yer alan *emm* dizileri doğruluğu söz konusu merkez tarafından kontrol edilmiş dizilerden oluşmaktadır. Suşların Lancefield serotiplerinin detaylandırılması ile elde edilen diziler ile oluşturulmuş olan bu veritabanında yaklaşık 350 kadar *emm* gen dizisi bulunmaktadır. CDC kliniklerinde ya da dünyanın değişik bölgelerindeki merkezlerde araştırmacılar tarafından saptanan yeni *emm* gen dizi tip veya alt tipleri veritabanına eklenerek sistem güncellenmektedir (8, 21).

emm gen bölgesi dizisinin 5' terminalinde ufak değişkenlik gösteren bazı suşlar için, *emm*/M protein serotiplendirmesi yapılan referans suşa göre göreceli olarak farklı bir serotip tanımlanmaktadır. Buna benzer şekilde meydana gelen küçük dizi değişiklikleri, M proteinine karşı konak organizma tarafından oluşturulan opsonik karakterdeki tip spesifik antikorlara duyarlılığın derecesinde farklılıklara yol açmaktadır. Bundan dolayı referans suşa göre öngörülen 50 N-terminal M proteini kalıntılarını kodlayan 150 bazlık aminoasit dizisi içerisinde farklılık gösteren dizileri *emm* gen alt tipleri olarak veritabanına eklenmektedir. İncelenen suşların T serotiplerinin bilinmesi, suşların *emm* gen tiplendirilmesinin daha kolay yapılmasına yardımcı olmaktadır. Çünkü bazı M protein ve *emm* gen tipleri ile T protein serotipleri arasında uyumluluk görülmektedir. GAS'ların büyük bir kısmının (>% 95) T protein serotipleri bilinmektedir; bilinen T protein serotiplerinin bazıları ile M protein ve *emm* gen tipleri arasında birebir uyumluluk söz konusudur. M protein geni (*emm* geni) sekans analizi ile birlikte, T serotiplendirilmesinin

kullanılması araştırmacıya incelenen suşlar içerisindeki çeşitliliği belirleme kolaylığı vermektedir. T proteinine karşı oluşmuş bağışık anti-serumların elde edilmesi M proteinlerinden daha kolay olmasına rağmen T protein anti-serumlarının özgüllüğü daha düşüktür (1-2, 21, 25-26).

emm tiplerinin dağılımının zaman ve bölgeye göre değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. ABD’de 1995-1999 yılları arasında en sık görülen *emm* tiplerinin *emm1*, *emm28*, *emm12*, *emm3* ve *emm11* olduğu bildirilirken, 2000-2004 arasında *emm1*, *emm3* ve *emm12* tiplerinin predominan hale geldiği rapor edilmiştir (122). Avrupa’da farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda yine farklı *emm* tiplerinin ne çıktığı görülmektedir (123). Danimarka’da 2001-2004 arasında *emm1* ve *emm28* baskinken, Yunanistan’da *emm1* ve *emm12* tiplerinin 2003-2005 yıllarında daha sık saptandığı bildirilmiştir (40). İsveç’te 2002-2004 yılları arasında yapılan çalışmada *emm89*, *emm81*, *emm28* ve *emm1* tipleri 746 invazif GAS izolatının % 56’sında görülürken (40) Tayvan’da yapılan başka bir çalışmada *emm1* tipinin invazif izolatlarla, *emm12* tipinin ise non-invazif izolatlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. (124).

Çalışmamızda taşıyıcı izolat grubunda en sık saptanan *emm* tipleri sıklık sırasına göre *emm12* (15 izolat), *emm89* (19 izolat), *emm77* (6 izolat) ve *emm1* (5 izolat). Hasta izolat grubunda ise en sık *emm12* (14 izolat), *emm1* (9 izolat), *emm4* (8 izolat), *emm89* (7 izolat), *emm3* (5 izolat) saptanmıştır.

Klinik izolatlarda *emm3* tipi taşıyıcı grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu. *emm3* tipindeki 5 izolatın tamamı sadece klinik izolat grubundaydı. Bu izolatlar klonal olarak birbirlerinden farklı profildeydi. Taşıyıcı grubunda *emm3* tipine rastlanmadı.

İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da *emm4* tipindeki dokuz izolatın sekizi hasta grubunda, yalnızca bir tanesi taşıyıcı grubundaydı. Hasta grubundaki sekiz *emm4* tipi izolat birbirlerinden farklı PFGE profillerindeydi.

En sık saptanan 6 *emm* tipi arasında bulunan *emm89*, bir invazif izolatta saptanırken, *emm3* sadece klinik izolatlarda bulunmuş, taşıyıcı izolatlarında saptanmamıştır. Dokuz *emm4* tipi izolatın ise sadece bir tanesi taşıyıcı izolatlardandır. Hasta ve taşıyıcı izolat grupları arasında diğer *emm* tiplerinin saptanma oranları bakımından anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

Taşıyıcı grubunda altı izolatta bulunmasıyla en sık görülen tiplerden olan *emm77*, hasta grubunda üç izolatta bulundu. Aradaki fark anlamlı değildi. Bununla birlikte, indüklenebilir klindamisin direnci bulunan dört izolatın ikisi, eritromisine dirençli yedi izolatın üçü ve tetrasikline dirençli 12 izolatın ikisinde *emm77* tipi olduğu tespit edilmiştir.

emm1, *emm3* ve *emm28*'in invazif enfeksiyonlarla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (2-40). Özellikle STŞS olgularının *emm1* ve 3 ile sıklıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir (2). Luca-Harari ve ark. (40) 2009'da Avrupa genelinde Strep-EURO programı kapsamında 4353 invazif izolatla yaptıkları çalışmada 104 farklı *emm* tipi saptamışlar, bunlar arasında en yüksek oranda *emm1* (% 19), *emm28* (% 12), *emm3* (% 10), *emm89* (% 8), *emm87* (% 6), *emm12* (% 5), *emm4* (% 5), *emm83*, *emm81* ve *emm5* tiplerini bulmuşlardır. STŞS ve nekrotizan fasit ile *emm1* ve *emm3* arasında bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Fakat yine de tüm STŞS etkeni izolatların % 50'sinin ve nekrotizan fasit izolatlarının % 55'inin *emm1* ve *emm3* dışında başka *emm* tiplerinin etken olduğunu hatta İsveç'teki STŞS izolatlarından hiçbirinin *emm3* olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmaya katılan 11 ülkeden İngiltere'de *emm87* ve *emm83* tipleri yaygın olarak bulunurken, *emm1* tipi ülkelerin çoğunda % 15 ile % 33 arasında değişen oranlarla en sık görülen tip olmuştur. Buna karşın Danimarka, Finlandiya ve İsveç gibi kuzey ülkelerinde *emm28* tipi % 16 ile % 45 arasında değişen oranlarla en yaygın görülen tip olarak saptanmıştır. Romanya'da, çalışma genelinde en sık bulunan 10 *emm* tipinden yalnızca 3 tanesi saptanırken; en sık saptanan 3. tip olan *emm3* Çek Cumhuriyeti, Finlandiya, Yunanistan ve İsveç'te % 1-5 gibi düşük oranlarda bulunmuş, Romanya'da ise hiç saptanmamıştır. Çalışmada *emm43* tipi yalnızca İngiltere'de saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da toplam 4 tane bulunmuş olan *emm118* tipi, söz konusu çalışma dahilinde olan 11 ülke içinde yalnızca İsveç ve Danimarka'da saptanmıştır (40).

O'loughlin ve ark. (123) ABD'de invazif izolatların % 55'inin *emm1*, *emm3*, *emm28*, *emm12* ve *emm89* tiplerinde olduğunu bildirmiştir. Commons ve ark. (38) 2008'de Avustralya'da 107 invazif izolatla yaptıkları çalışmada 22 farklı *emm* tipi saptamışlar, bunlar arasında en sık olarak *emm1*, *emm4*, *emm12*, *emm28* ve *emm75* tiplerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Schmitz ve ark. (36) 2003'te 239 endemik invazif izolatta 43 farklı *emm* tipi saptamışlar, bunlar arasında en sık olarak *emm1* (% 30,1), *emm3* (% 21,3), *emm28*

(% 13,4), *emm12* (% 9,6), *emm22* (% 7,9), *emm89* (% 4,6), *emm6* (% 4,6), *emm81* (% 2,5) ve *emm83* (% 2,1) tiplerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Luca-Harari ve ark. (125) Danimarka 2008 çalışmasında 278 invazif GAS izolatında 29 farklı *emm* tipi saptamış, bunlar arasında en sık oranlarda *emm28*, *emm1*, *emm3*, *emm89* ve *emm12*'nin bulunduğunu bildirmişlerdir. En sık saptadıkları bu 5 *emm* tipi tüm izolatların % 73,5'ini oluşturmuştur.

Luca-Harari ve ark. (41) Romanya'da 33 invazif izolatla yaptıkları çalışmada 19 farklı *emm* tipi saptamışlar, bunlar arasında en sık oranda *emm1*, *emm81*, *emm76*, *emm49* ve *emm78* tiplerinin bulunduğunu, bu *emm* tiplerinin tüm izolatların % 57'sini oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Beall ve ark. (126) ABD'de 2000 yılında 1995-98 yıllarına ait izolatlarla yaptıkları çalışmada en sık *emm12*, *emm28*, *emm11* ve *emm89* tiplerini saptamışlardır.

Jonhson ve ark. (9) 2006'da yaklaşık 50 yıllık birikim sonucu topladıkları 40 bin civarı izolatla ABD'de yaptıkları çalışmada en sık *emm1* (4107), *emm12* (2585), *emm3* (2171), *emm4* (1543), *emm6* (1412) ve *emm28* (1412) tiplerini saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda ise 6 invazif izolatın 2'si *emm3*, 1'i *emm89* iken diğer 3 tanesi tiplendirilemedi. Bazı yayınlarda *emm28*'in invazif enfeksiyonlarla ilişkisi gösterilmiş olmasına rağmen bizim çalışmamızda invazif izolatların az sayıda olması analiz yapılmasını zorlaştırmıştır, tiplendirilebilen 3 izolatla da *emm28*'e rastlanmamıştır (40, 127-128). İnvazif izolat sayısının daha fazla olduğu yeni çalışmalar, bölgemiz veya ülkemizle ilgili *emm* tiplerinin analizini kolaylaştıracaktır.

Su ve ark. (129) Tayvan'da 2009'de 242 GAS izolatı (76 invazif, 89 kızıl, 77 farenjit izolatı) ile yaptıkları çalışmada *emm1*, *emm4*, *emm6*, *emm11*, *emm12*, *emm13*, *emm22*, *emm33*, *emm49*, *emm57*, *emm77*, *emm81*, *emm82*, *emm85*, *emm87*, *emm92*, *emm94*, *emm101*, *emm102* ve *emm123* tiplerini saptamışlar, bunlar arasında en sık görülen *emm* tiplerinin *emm12* (% 43,4), 4, 1 ve 11 olduğunu bildirmişlerdir.

Brandt ve ark. (130) Almanya'da yaptıkları çalışmada 210 GAS suşu içinde en sık görülen *emm* tiplerini *emm1* (% 18,5), *emm12* (% 15,7), *emm3* (% 14,4) ve *emm28* (% 13,9) olarak bildirmişlerdir. Bu dört *emm* tipi tüm izolatların % 62,5'ini oluşturmuştur.

Espinosa ve ark. (32) Meksika'da 282 farenjit izolatı ile yaptıkları çalışmada buldukları 27 farklı *emm* tipi içerisinde en sık *emm1* (% 17,4), *emm12* (% 17,4), *emm3*

(% 7,8), *emm75* (% 7,8) ve *emm4* (% 6,4) tiplerini saptamışlardır. En sık bulunan bu tipler tüm izolatların % 56,8'ini oluşturmuştur.

Shulman ve ark. (131) ABD'de yaptıkları farenjit izolatları ile ilgili çalışmada en sık olarak *emm1* (% 22,3), *emm12* (% 16,3), *emm4* (% 8,4), *emm28* (%8,1), *emm3* (%7,9) tiplerini saptamışlar, bu tiplerin tüm izolatların % 63'ünü oluşturduğunu bildirmişlerdir.

O'brien ve ark. (122) ABD'de 2002 izolatla yaptıkları çalışmada buldukları en sık 10 *emm* tipinin *emm1* (% 20.8), *emm28* (% 9.2), *emm12* (7.6%), *emm3* (7.1%), *emm11* (4.5%), *emm4* (4.1%), *emm114* (3.9%), *emm89* (3.2%), *emm77* (3.1%), ve *emm33* (%2.5) olduğunu, bu 10 *emm* tipinin tüm izolatların % 66'sını, en sık 5 *emm* tipinin ise tüm izolatların % 49,5'ini oluşturduğunu bildirmişlerdir. İzolatların % 80'inin 17 farklı *emm* tipinde olduğunu belirtmişlerdir.

Dicuonzo ve ark. (132) 2002'deyaptıkları çalışmada 109 farenjit izolatının 21 farklı *emm* tipinde olduğunu, bunlar arasında en sık *emm12* (28/109), *emm89* (12/109), *emm4* (11/109), *emm1* (11/109), *emm87* (7/109) ve *emm28* (6/109) tiplerinin saptandığını bildirmişlerdir. Bu 6 *emm* tipi tüm izolatların % 69'unu oluşturmuştur.

Enright ve ark. (133) 2001'deki çalışmalarında 81 izolatın 15 farklı *emm* tipinde bulunduğunu, en sık *emm1*, *emm3*, *emm4* ve *emm18* tiplerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Luca-Harari ve ark. (41) Romanya'da 102 non-invazif izolatın 24 farklı *emm* tipinde olduğunu, bunlar arasında en sık olarak *emm1* (% 25) ve *emm12* (% 23) tiplerinin baskın bulunduğunu belirtmişlerdir.

Lorino ve ark. (134) İtalya'da yaptıkları çalışmada 123 farenjit izolatı içinde en sık *emm75*, *emm1*, *emm6*, *emm12*, *emm22*, *emm4* ve *emm* 5 tiplerini saptamışlar, toplam 19 farklı *emm* tipi bulduklarını bildirmişlerdir.

Hartas ve ark. (135) Avustralya'da yaptıkları çalışmada en sık *emm1* ve 12 tiplerini bulmuşlardır.

Akça ve ark. (11) Ankara'da 2004-2005'te üst solunum yolu enfeksiyon bulguları olan 114 hastanın boğaz kültürlerinden elde edilen izolatlarla yaptıkları çalışmada izolatların 97'si tiplendirilebilmiştir. Çalışmada 23 farklı *emm* tipi saptanmıştır. En sık *emm12* (% 16,5), *emm3* (% 15,4), *emm1* (% 12,1), *emm75* (% 5,5) , *emm29* (% 5,5) ve *emm6* (% 4,3) tipleri bulunmuştur. Çalışmada en sık bulunan *emm12* tipi bizim çalışmamızda da en sık saptanan tiptir. *emm1* tipi de her iki çalışmada

en sık bulunan tipler arasındadır. Bizim çalışmamızda en sık 2. tip olan *emm89* bu çalışmada bulunan en sık *emm* tipleri arasında değildir.

Erkin-Çakmak ve ark. (12) tonsillofarenjit izolatları ile İstanbul'da yaptıkları çalışmada en sık buldukları *emm* tiplerinin *emm1* (% 22,9), *emm3* (% 11,4), *emm4* (% 9,8), *emm5* (% 8,1) ve *emm2* (% 6,5) olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında akut tonsillofarenjit bulgusu olan 2-17 yaş arası 335 çocuk hastadan alınan örneklerden elde edilen izolatları kullanmışlardır. Bizim çalışmamızda en sık görülen *emm12* tipi, Erkin-Çakmak'ın çalışmasında en sık 6. *emm* tipi olarak saptanmıştır. *emm* tiplerinden 12'si hem bizim çalışmamızda hem de bu çalışmada saptanmıştır. Çalışmalarında bulunan *emm14*, *emm19*, *emm26*, *emm63*, *emm87* ve *emm98* tipleri bizim çalışmamızda bulunmayan tiplerdir. Çalışmamızda saptadığımız *emm11*, *emm24*, *emm71*, *emm78* ve *emm85* ise Erkin-Çakmak'ın çalışmasında saptanmamıştır.

Çalışmamızda; *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 toplam 21 ayrı *emm* tipi belirlendi. En sık saptanan *emm* tipleri ise *emm12*, *emm89*, *emm1*, *emm77*, *emm4* ve *emm3* idi. Bunlar tiplendirilebilen tüm izolatların yaklaşık % 73,2'ini oluşturmaktaydı. Çalışmamızda sık bulunan bu *emm* tipleri, literatürde genellikle sık görüldüğü bildirilen tiplerle uyumlu idi.

Streptokokal pirojenik ekzotoksinler, GAS'ların önemli virulans faktörleri arasında yer almaktadır. Bunlar pirojenik olan, endotoksik şoka karşı konak duyarlılığını arttıran, immunoglobulin üretimini baskılayan ve T hücreleri için mitojenik aktiviteleri bulunan hücre dışı protein toksinlerdir (3,17,20). Bu toksinler, bağışıklık sisteminin aşırı aktivasyonuna ve TNF-alfa, interlekin-6, interlekin-2 ve gama interferon gibi şoka ve yaygın organ hasarına yol açabilen proinflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımına neden olur (38).

Kromozomal olarak kodlanmış olan *speB*, *speG*, *speJ* ve *smeZ* dışında süperantijen kodlayan genlerin çoğu bakteriyofaj ilişkilidir. Kromozomal olarak kodlanmış olduğu düşünülen genler çalışmaların çoğunda izolatların % 100'üne yakın oranlarda saptanmışken bazı çalışmalarda daha düşük oranlar bildirilmiştir (38). Bununla birlikte *speG* ve *smeZ*'nin türler arasında horizontal geçiş yapabileceği gösterilmiştir (136-138).

Süperantijenlerin prevalansı bölgesel veya zamana bağlı olarak oldukça değişebilmektedir. GAS süperantijenleri ayrıca özel *emm* tipleri ile de ilişkilidir. Yüzey M proteininin bakteriyofaj taşıdığı genin bakteriye girişi üzerine doğrudan veya dolaylı olarak seçici bir etkisi olduğu öne sürülmüştür (37).

speK, *speL* ve *speM* gibi yeni keşfedilen genlerin akut romatizmal ateşle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (139-140).

Darenberg ve ark. (35) çalışmalarında 9 gen bölgesi araştırmışlar ve bulundurulmuş ortalama gen sayısını invazif izolatlar için 4,0, non-invazif izolatlar için 6,6 bulmuşlardır. Luca-Harari ve ark. (125) 2008'de Danimarka'da 278 invazif izolatla yaptıkları çalışmada yine 9 gen bölgesini araştırmışlar, izolatların % 78'inde 4 gen, % 14'ünde 5 gen ve % 4'ünde de 3 ayrı gen saptamışlardır. Çalışmamızda tüm izolatların araştırılan 5 toksin geninden ortalama 2,78 ($\pm 0,88$) geni bulundurduğu saptanmıştır. Taşıyıcı izolatlarında ortalama 2,70 ($\pm 0,85$) gen bulunurken, klinik izolatlarında ortalama 2,85 ($\pm 0,907$) gen bulunmuştur. Klinik izolatlardan invazif grupta ortalama saptanan gen sayısı 3,33 olarak bulunmuştur. Tüm izolatlar ele alındığında en çok 3 gen bulunduğu görülmüştür.

Çalışmamızda izolatların tümünde *speB* bulunurken, araştırılan diğer genler arasında *speG* % 81 ile en yüksek oranda saptanmıştır. Rivera ve ark. (141) 2006'da 126 GAS izolatı ile yaptıkları çalışmada *speG* oranını % 84,1 olarak bulmuşlardır. Luca Harari ve ark.'nın (125) 2008'de Danimarka'da yaptıkları çalışmada *speB* (% 100) ve *speG* (% 99) en yüksek oranda saptanan genler arasında bulunmuştur. Luca-Harari'nin (41) Romanya'da yaptığı çalışmada da *speB* tüm izolatlarda saptanmıştır. Darenberg ve ark. (35) en çok *speB*, *speG*, *speF* ve *smeZ* genlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Commons ve ark. (38) 107 izolatla yaptıkları çalışmada en çok *speG* (% 90) ve *smeZ* (% 95) saptamışlardır. Rivera ve ark. (141) izolatların tümünde *speB* ve *speF*'nin saptandığını bildirmişlerdir.

Çalışmalar arasında genel olarak saptanma oranları en değişken olan genler *speA* ve *speC* olarak görülmektedir. Bu durumun, her iki genin kromozomal olarak kodlanmamasından ve ayrıca bu genlerle ilgili daha çok sayıda çalışma bulunmasından kaynaklanıyor olabileceği belirtilmiştir (38). Bazı yayınlar ciddi streptokokal enfeksiyonlarla *speA* arasında ilişki bulunduğunu bildirmişler (142-145), bazıları da bu tür enfeksiyonların *speC* ile ilişkisini göstermişlerdir (19, 146). Her iki gen ile ciddi streptokokal enfeksiyonlar arasında ilişki bulunmadığını bildiren yayınlar da mevcuttur

(41, 147). Luca-Harari ve ark. (41) STŞS'li hastalardan izole edilen 30 GAS suşunun 17'sinde *speA* bulurken, geriye kalan 13 suшта ise *speC* saptamışlar, bu oranlar ile STŞS dışındaki izolatlar arasında saptanan bu iki faktörün oranları arasında anlamlı fark bulamamışlardır. Bu durumun non-invazif izolatlarda da benzer şekilde olduğuna dikkat çekerek söz konusu iki faktör ile invazif enfeksiyon arasında bir ilişki bulamadıklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda *speA* saptanma oranımız tüm izolatlar arasında % 30,2 olarak gerçekleşti. Taşıyıcı izolatlarında bu oran % 35, klinik izolatlarda ise % 26,6 idi, gruplar arasında *speA* geni saptanma oranı bakımından anlamlı fark yoktu ($p=0,377$). Bu oranı Schmitz ve ark. % 54; Luca Harari ve ark. (125) Danimarka'da (yalnızca invazif izolatlar içinde) % 40, yine Luca-Harari (41) Romanya'da invazif izolatlarda % 20, kontrol grubunda % 38; aynı araştırmacılar (40) Avrupa genelinde 1127 izolatla yaptığı çalışmada % 30 olarak saptamışlardır. Strep-Euro çalışması dahilinde, *speA* oranının invazif izolatlar içerisinde Finlandiya için % 10, İsveç için % 13 gibi çok düşük düzeylerde bulunduğu belirtilmiş, bu durumun saptanan *emm* tiplerinin dağılımına bağlı olduğu yorumu getirilmiştir (41).

Creti ve ark. (148) 2007'de 107 farenjit etkeni, 79 taşıyıcı ve 79 invazif hastalık etkeni olan GAS izolatı ile yaptıkları çalışmada *speA* oranlarını taşıyıcı grupta % 13,9, farenjit grubunda % 16,8, invazif grupta ise % 25 olarak bulmuşlardır. Texeira ve ark. (18) Brezilya'da 2001'de yaptıkları çalışmada *speA*'yı 37 izolatın 7'sinde saptamışlardır. Tyler ve ark. (149) 1992'de 1940-91 yılları arasına ait 152 izolatla yaptıkları çalışmada % 33,6'lık, Yu ve ark. (150) ise farenjit izolatlarında % 18,4'lük, kızıl izolatlarında ise % 52,6'lık oran bildirmişlerdir.

speC saptama oranımız tüm izolatlar içinde % 49,6 olarak belirlenmiştir. Bu oran taşıyıcı grupta % 48,3, klinik izolat grubunda % 50,6 olarak saptanmış, iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır. *speC* oranını Schmitz ve ark. (36) % 34, Yu ve ark. (150) % 50, Luca-Harari ve ark. (125) Danimarka'da (yalnızca invazif izolatlar içinde) % 58, aynı araştırmacı (41) Romanya'da invazif izolatlarda % 57, kontrol grubunda % 45, Luca-Harari'nin (40) Avrupa genelindeki çalışmasında invazif izolatlarda % 54 olarak saptamışlardır. Sözü edilen son çalışma dahilinde *speC* oranı Finlandiya için % 80 gibi yüksek bir oranda bulunmuş, bu durum yine bu ülkedeki *emm* tipi dağılımının farklılığına bağlanmıştır (40) . Creti ve ark. (148) çalışmasında *speC* oranı farenjit izolatlarında % 55,4, taşıyıcı grubunda % 65,8 bulurken, beklenmeyen bir

şekilde invazif grupta % 30 gibi bir oran saptamışlar, bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Texeira ve ark. (18) *speC* oranını 6/37 olarak bulmuşlardır. Tyler ve ark. (149) bu oranı % 28,9, Yu ve ark. (150) ise farenjit izolatlarında % 30,6, kızıl izolatlarında % 48,7 olarak bildirmiştir.

speA ve *speC* birlikteliği araştırılabilen konulardan biridir. Bizim çalışmamızda birliktelik % 10,8 bulunmuştur. Schmitz ve ark. (36) bu oranı % 18, Tyler ve ark. (149) % 24,4 olarak bildirmişlerdir.

SMEZ toksini eritrojenik ve mitojenik aktivitesi bulunan, aminoasit dizisi ve NH₂- ucu bilinen mitojenlerden farklı olan yüksek derecede polimorfik bir toksindir (140). Çalışmamızda *smeZ* tüm izolatların % 19,4'ünde bulunmuştur.

Luca-Harari ve ark. (41) 2008'de Romanya'da yaptıkları çalışmada tüm invazif izolatlarda *smeZ* bulunduğunu bildirmiştir. Rivera ve ark. (141) bu oranı % 91,7, Commons (38) % 95 olarak bulmuştur.

Streptokokal toksin genleri ile ilgili yapılmış olan bazı çalışmalara ait veriler Tablo 31'de gösterilmiştir.

Tablo 31: Toksin genleri ile ilgili yapılmış bazı çalışmalara ait veriler.

Araştırmacı	Yıl	Bölge	İzolat sayısı	<i>SpeA</i> (%)	<i>speC</i> (%)	<i>speG</i> (%)	<i>smeZ</i> (%)
Bu çalışma	2010	Zonguldak	139	30	50	81	19
Commons ve ark. (38)	2008	Avustralya	107	35	50	90	95
Luca Harari ve ark. (40)	2009	Avrupa (Strep-EURO)	1127	30	54	93	50
Luca Harari ve ark. (41)	2008	Romanya	135	33	48		100
Luca Harari ve ark. (125)	2008	Danimarka	278	40	58	99	
Darenberg ve ark. (35)	2007	İsveç	1519	11	64	90	96
Creti ve ark. (148)	2007	İtalya	265	18,5	51		
Rivera ve ark. (141)	2006	Brezilya	126			84	92
Jing ve ark. (42)	2006	Çin	86	52	51		82
Bianco ve ark. (151)	2006	İtalya	182	19			
Ekelund ve ark. (152)	2005a	Danimarka	553	25	24		
Ekelund ve ark. (153)	2005b	Danimarka	493	34	62		
Creti ve ark. (154)	2005	İtalya	259	48	132		
Norton ve ark. (155)	2004	Avustralya	109	6	20		
Proft ve ark. (140)	2003	Yeni Zelanda	40	31	42	100	92
Schmitz ve ark. (36)	2003	Avrupa	292	54	34		31

Tablo 31: Toksin genleri ile ilgili yapılmış bazı çalışmalara ait veriler. (devam ediyor)

Vlaminckx ve ark. (6)	2003	Hollanda	170	45	42		32
DelVecchio ve ark. (156)	2002	Avustralya	75	7	24		
Haukness ve ark. (157)	2002	ABD	80	75	85		
Murakami ve ark. (158)	2002	Japonya	316	67	76	78	
Nandi ve ark. (159)	2002	Hindistan	60	8			
Texeira ve ark. (18)	2001	Brezilya	37	19	16		
Descheemaeker ve ark. (160)	2000	Belçika	500	25	53		
Mylvaganam ve ark. (37)	2000	Norveç	42	60			
Bessen ve ark. (161)	1999	Dünya-çapında	160	23	46		
Hsueh ve ark. (162)	1997	Tayvan	25	4	96		
Chausse ve ark. (163)	1996	Dünya-çapında	117	44	34		
Black ve ark. (164)	1993	ABD	62	56	27		
Leggiadro ve ark. (165)	1993	ABD	31	26	58		
Cleary ve ark. (166)	1992	ABD	67	57			
Tyler ve ark. (149)	1992	Kanada	152	34	29		
Musser ve ark. (143)	1991	ABD	108	47			
*Bazı çalışmalara ait oranlar tam sayı olarak verilmiştir.							

İlköğretim okullarından elde edilen izolatlarda saptanan toksin genlerinin oranları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Okullardan elde edilen izolatlarda saptanan gen profilleri dağılımları arasında da anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Çalışmamızda invazif izolatlardaki *speA* oranı non-invazif izolatlardakinden anlamlı olarak yüksek oranda bulunmuştur ($p=0,04$). *speA* saptanma oranı % 66,7 olarak bulunan invazif gruptaki toplam izolat sayısı yalnızca 6 olmasına rağmen % 22,3'lük non-invazif gruptaki *speA* oran ile arasındaki fark istatistiksel olarak analiz edildiğinde anlamlı bulunmuştur. İnvazif, noninvazif ve taşıyıcı izolat gruplarında saptanan diğer gen oranları ve gen profilleri dağılımı bakımından anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Schmitz ve ark. (36) yaptıkları çalışmada 43 farklı toksin gen profili saptamışlar, invazif izolatlar ile boğaz kültürü ve yaralardan izole edilen izolatlar arasında profil dağılımı bakımından anlamlı fark bulamamışlar ve bu nedenle özellikle invazif GAS izolatlarının belli bir profilde bulunmadığını belirtmişlerdir.

Schmitz ve ark. (36) yaptıkları çalışmada 9 gen bölgesini (*speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *speG*, *speH*, *speJ*, *ssa*, *smeZ*) araştırmışlar ve ortaya çıkan 48 farklı profil içinde

en sık gördükleri 15 profili göstermişlerdir. Bizim çalışmamız ile karşılaştırılabilir hale getirilmek için, söz konusu çalışmadaki tabloda bizim çalışmamızda araştırılmayan genler çıkarılarak tekrar profilendirme yapıldı. Ayrıca çalışmadaki profil sıklıkları, sadece en sık görülen 15 profil içindeki yüzdesi olarak verildi. Buna göre yapılan karşılaştırmada, bizim çalışmamızda en sık görülen 3 profil (Sırasıyla *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *smeZ* genlerinin saptanmasına göre; ++-+-, -+++-, -+-+), Schmitz ve ark'nın çalışmasında saptanan en sık görülen 4 profil içinde yer almaktadır.

Antibiyotiklere duyarlı ve dirençli izolatlar arasında saptanan gen oranları ve gen profili dağılımları bakımından anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Saptanan gen ve gen profilleri dağılımları, cinsiyet ve yaş grubu bakımından da anlamlı fark göstermemiştir ($p>0,05$).

Çalışmamıza dahil edilen tüm izolatlar için PFGE uygulanmış, altı izolatın PFGE profili belirlenememiş, kalan 133 izolat arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla dendrogram yapılmıştır. Buna göre taşıyıcı izolatlarında K90 ve K122'nin aynı klon olduğu belirlenirken; K62 ile K240, A496 ile A832, K64 ile K65, K216 ile K239, K75 ile K98, K129 ile K180 izolatları % 95'in üzerinde benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Klinik izolat grubunda klonal kümelenme oranı % 77,9; taşıyıcı grupta ise % 80,4 olarak bulundu, iki grup arasında kümelenme bakımından anlamlı fark yoktu ($p=0,901$). Ancak ilköğretim okulu K'dan elde edilen izolatların kümelenme oranı (% 91,2) diğer okullarinkinden (Okul A için % 60,0; okul F için % 71,4) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,036$).

Klonal olarak % 95'in üzerinde yakınlık gösteren izolatların bir kısmı birbirleri ile aynı *emm* tipinde ve aynı toksin gen profilinde idiler, örneğin K216 ve K239 izolatlarının her ikisi de *emm44* tipindeydi ve her ikisinde *speB*, *speC*, *speG* genleri pozitif, *speA* ile *smeZ* genleri negatifti. Aynı şekilde K62 ve K240 izolatlarının her ikisi de *emm12* tipindeydi ve her ikisinde *speB* ile *speC* genleri pozitif, diğer genler negatifti. Ancak bunun tersine, % 95 klonal yakınlıktaki K129 ile K180 farklı *emm* tiplerindeydi (sırasıyla *emm12* ve *emm3.1*), K129'da *speC* geni negatifti K180'de *speC* pozitif.

En sık saptanan 7 PFGE profiline göre süperantijen genlerinin dağılımı tablo'da gösterildi. Tüm izolatların % 31,7'si (44/139) bu yedi profilde toplandı.

PFGE29 profili dokuz elemanlıydı ve tümü taşıyıcı izolatlarıydı, bu dokuz izolatın sekizi okul K'ya aitti. PFGE29 profili izolatların beş tanesi *emm12* idi. Buna

benzer şekilde PFGE35 profilinde bulunan altı izolatın tamamı yine okul K'dan elde edilmişti. PFGE18 profilinde sekiz izolat bulunmaktaydı, izolatların tümü non-invazif klinik etken grubundaydı, fakat bu izolatların *emm* tipleri, toksin gen profilleri veya elde edildikleri hastaların demografik özellikleri arasında bir benzerlik yoktu.

En sık saptanan yedi PFGE profilindeki izolatlarda gözlenen toksin gen profilleri içinde en sık görülen profiller genel dağılımda da en sık gözlenmiş olan profillerdi; 12 izolatta -+ -+ - profili, yedi izolatta ise -+++ - profili saptandı.

En sık saptanan 6 *emm* tipi izolatlarından, *emm1* tipi araştırılan 5 gen içinde saptanan ortalama gen sayılarında en yüksek ortalamaya sahipti, *emm1* tipi hasta izolatlarında saptanan ortalama gen sayısı 4,1 ile anlamlı olarak yüksek bulundu. *emm1* tipinde saptanan ortalama gen sayısının yüksek oluşu Darenberg ve ark.'nın (35) çalışması ile uyumlu idi, söz konusu çalışmada ayrıca *speA* geni en yüksek oranda *emm1* tipi izolatlarında saptanmıştır ve bu da bizim çalışmamızdaki yüksek oran ile uyumludur.

Luca-Harari ve arkadaşlarının (41) Romanya çalışmalarında *emm1* suşlarında *speA*'nın yüksek oranda saptandığı bildirilmiştir. Çalışmada *speA*, öncelikli olarak *emm1* ve *emm3* ile sık birliktelik göstermiştir.

Lorino ve ark.'nın (134) çalışmalarında *emm1* tiplerinin tümünde *speA* pozitifken *speC* negatif olarak gözlenmiştir, *emm1* izolatlarının hiçbirinde *speA* negatif, *speC* pozitif bulunmamıştır.

Commons ve arkadaşlarının (38) 2008, Deschemaecker ve arkadaşlarının (160) 2000 ve Vlamincx ve arkadaşlarının (6) 2003'te yaptığı çalışmalarda *emm1* tipi izolatların çoğunda *speA*, *speG* ve *smeZ* bulunurken *speC*'nin düşük oranlarda saptandığı bildirilmiştir.

Sriskandan ve ark. (167) 2007'de, Szcypa ve ark. (119) ise 2006'da yaptıkları çalışmalarda *emm1* ve *emm49* ile *speA* birlikteliğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda 14 *emm1* tipi izolatın 11'inde *speA* bulunurken yalnızca 4 tanesinde *speC* saptanmıştır, bu veri literatürle uyumludur. Ayrıca *speG* *emm1* tipi izolatların 11'inde, *smeZ* ise 8'inde bulunmuştur. *smeZ* pozitif *emm1* tipi izolatların tümünün hasta grubunda olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda *emm1* tipi, en yüksek oranda *smeZ* saptanan tip olmuştur.

Luca-Harari ve arkadaşlarının (41) Romanya çalışmalarında *speC*'nin *emm12* izolatları arasında yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir.

Jing ve ark. (42) 2006'da *speC* ile *emm12* ilişkisini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda *emm12* izolatlarının % 62,1'inde (18/29) *speC* bulunmuştur. Commons ve ark. (38) çalışmalarında *emm12* tipi izolatların çoğunda *speC*, *speG* ve *smeZ* bulunduğunu bildirmişlerdir, *smeZ* dışındaki genler için bulunan sıklık bizim çalışmamızdaki ile uyumludur.

Çalışmamızda *emm12* izolatlarının % 24,1'inde (7/29) *speA*, % 10,3'ünde (3/29) *smeZ*, % 80'inde *speG* bulunmuştur.

Commons ve arkadaşlarının (38) çalışmasında 10 *emm4* tipi izolatın 9 tanesinde -++-+ profili görüldüğü bildirilmiştir (*speB*, *speC* ve *smeZ* pozitif, *speA* ve *speG* negatif), bu profil bizim çalışmamızdaki *emm4* tiplerinde de en sık oranda saptanan profildir.

Çalışmamızda dokuz *emm4* tipi izolatın sadece birinde (% 11) *speA* ikisinde (% 22) ise *speG* saptanmıştır.

Luca-Harari ve ark'nın (40) Avrupa genelinde yaptıkları çalışmada ayrıca süperantijen toksin genleri de araştırılmış, *speG* geninin *emm4* ve *emm77* izolatlarında düşük oranda bulunduğu belirtilmiştir.

Bu veri bizim çalışmamızdaki ile de uyumludur, çalışmamızda *speG* *emm4*'te 2/9, *emm77*'de ise 5/9 ile diğer *emm* tipleri arasında en düşük oranlarda saptanmıştır. Ayrıca *emm77*'nin 8/9'ünde *smeZ* saptanmamıştır.

Çalışmamızda ayrıca *emm89* izolatlarının % 71'inde *speA*, 13/14'ünde *smeZ* saptanmamış, % 85'inde ise *speG* bulunmuştur..

Luca-Harari'nin çalışmasında (40) *speC* *emm4*, *emm5*, *emm6*, *emm28*, *emm77* ve *emm18* tipleri ile anlamlı oranda birlikte bulunmuştur. *speC*; *emm1*, *emm3*, *emm81* ve *emm12* izolatlarında düşük oranda bulunmuştur. Finlandiya'da sık görülen *emm28* tipi ile birlikte *speC* sıklığı da yüksek oranda bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda *emm3* tiplerinin 4/5'inde *speC* saptanmamıştır, *emm3* izolatlarının 5/5'inde *speG* bulunurken, hiçbirinde *smeZ* saptanmamıştır.

Luca-Harari (41) Romanya'daki çalışmasında *smeZ*'nin *emm49* ve *emm81* dışındaki tüm izolatlarda bulunduğunu bildirmiştir.

Bizim çalışmamızda *smeZ* *emm12* (1/25), *emm77* (1/9), *emm89* (1/14) ve *emm3*'ün (0/5) büyük kısmında saptanmamıştır.

Çalışmamızda 4 *emm118* tipinin hiçbirinde *speA* saptanmamış, 3/4'ünde *smeZ* bulunmuştur.

Luca-Harari ve ark. (125) Danimarka çalışmalarında *emm28*'in % 68'inde *speA* negatif, *speC* pozitif; % 30'unda *speA* pozitif, *speC* negatif; *emm1* tiplerinin ise % 67'sinde *speA* pozitif, *speC* negatif; % 24'ünde *speA* negatif ve *speC* pozitif çıkmıştır. *emm3* suşlarında % 47 oranında *speA* negatif, *speC* pozitif, yine % 47'sinde *speA* pozitif, *speC* negatif olarak görülmüştür. *speA* ve *speC*'nin sadece 6 izolatta aynı anda saptandığını bildirmişlerdir.

Lorino ve ark.'nın (134) çalışmalarında *emm75* izolatlarının 21/29'unda, *emm6* izolatlarının 16/17'sinde, *emm12* izolatlarının 8/10'unda, *emm4* izolatlarının 6/7'sinde *speA* negatif, *speC* pozitif bulunmuştur.

En sık görülen 6 *emm* tipindeki izolatlarda en sık oranlarda saptanan toksin gen profillerinin taşıyıcı ve hasta izolat gruplarına göre dağılımına göre *emm1*'in taşıyıcı izolatlarında ++---, hasta izolatlarında ise +-++ toksin gen profilleri; *emm12*'nin taşıyıcılardaki ++++-, hastalardaki -++++- profilleri, *emm89*'un ise hastalardaki -++++- profili ön plana çıkarken -+++ profile saptanan 3 izolatın tümünün *emm4* tipinde olması dikkat çekicidir. *emm* tipleri içinde hasta ve taşıyıcı grupları arasında öne çıkan bir profil yoktu.

Schmitz'in (36) çalışmasında *emm1* tipinde en sık olarak (bizim çalışmamızda bakılmayan genleri analizden çıkardığımızda) bizimki ile uyumlu bir şekilde +-++ toksin gen profili görülmüştür. Söz konusu çalışmada *emm3* için en sık +-+- toksin gen profili; *emm28* için -++++- profili ve *emm12* için ise yine bizimki ile uyumlu olan -++++- profili görülmüştür. Çalışmamızla uyumlu olan profillerin, çalışmamızdaki hasta izolatları ile uyumlu olduğu dikkati çekmektedir.

Luca-Harari ve ark.'nın (40) Avrupa genelinde yaptıkları çalışmada *emm87* ve *emm28* tipleri kadınlardan elde edilen izolatlarda anlamlı olarak daha yüksek oranlarda bulunmuştur. *emm81* ve *emm83* tipleri ise erkeklerde anlamlı olarak daha yaygın olarak saptanmıştır. *emm12* tipi daha sıcak olan aylarda anlamlı olarak daha sık izole edilmiştir.

İndüklenebilir klindamisin direnci bulunan 4 izolatın 2'si *emm77* idi, *emm77* tiplerinin 2/9'unda bu direnç görüldü. Eritromisine duyarlı olmayan 7 izolatın da 3'ü *emm77* idi, *emm77* tiplerinin 3/9'u eritromisine duyarlı değildi. Tetrasiklin için bu oran 2/12 idi. Çalışmamızdaki *emm77* tipleri farklı klonal profildeydi. Çalışmalarında % 8 oranında tetrasiklin direnci saptayan Luca-Harari ve ark. (40), 10 *emm77* tipi izolatın 7'sinde bu direncin bulunduğunu belirtmişlerdir.

Yirmialtı değerlikli yeni geliştirilmekte olan aşının içeriğinde *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. Lopardo ve ark.'nın (168) 2005'teki çalışmalarında 55 izolattan 36'sının (% 66,7) 26 değerlikli aşı kapsamında olduğu belirtilmiştir. Shulman ve ark.'nın (131) ABD'deki çalışmasında tüm izolatların % 86'sının aşı kapsamında olduğu belirtilmiştir. Luca-Harari ve ark.'nın (40) Avrupa genelinde 2009'da yaptıkları çalışmada bulunan *emm* tipleri bakımından 26 valanlı aşının 16 *emm* tipine etkili olduğunu ve bu tiplerin çalışmadaki tüm izolatların % 69'unu oluşturduğunu belirtmişlerdir. Espinosa ve ark. (32) Meksika'da 282 farenjit izolatu ile yaptıkları çalışmada buldukları 27 *emm* tipinin 15'i 26 değerlikli aşı kapsamındadır.

Çalışmamızda saptanan 21 farklı *emm* tipinden (17 *emm* tipi + 4 alt tip) *emm1*, *emm2*, *emm3*, *emm5*, *emm11*, *emm12*, *emm18*, *emm24*, *emm28*, *emm75*, *emm77* ve *emm89* tipleri 26 valanlı aşı kapsamında yer almaktadır. Bunlar tiplendirilebilen 112 izolatın 87'sini (% 77,7) oluşturmaktadır. Bu alışma, *emm* tipi ile ilgili olan, bölgemizde ilk, ulaşılabildiği kadarıyla da lkemizdeki 3 çalışmadan biridir.

Erkin-akmak ve ark. (12) 2009'da İstanbul'da yaptıkları çalışmada 19 farklı *emm* tipi saptamış, bunlar arasında en sık oranlarda *emm1*, *emm3*, *emm4* ve *emm5* tiplerinin bulunduğunu; tüm tiplendirilebilen *emm* tiplerinden % 77'sinin szu geçen aşı kapsamında olduğunu bildirmişlerdir.

Ayça ve ark. (11) ankara'da yaptıkları çalışmada 23 farklı *emm* tipi bulmuşlar, en sık *emm12*, *emm3* ve *emm1* tiplerini saptamışlardır. 26 değerlikli aşının çalışmalarında bulunan izolatların % 76,9'unu kapsadığını bildirmişlerdir. Bu aşının saptanan *emm* tiplerinden 15'ini içerdiğini belirtmişlerdir.

Tablo 32'de lkemizde *emm* tipleri ile ilgili yapılmış  çalışmada saptanan *emm* tipleri görülmektedir. Buna göre üç çalışmada saptanan toplam 34 *emm* tipinden yedisi her üç çalışmada da bulunmuştur. Bu tipler *emm1*, *emm3*, *emm4*, *emm12*, *emm77*, *emm89* ve *emm118*'dir. Bizim alışmamızda olduğu gibi bu yayınlarda da yüksek oranda saptandığı bildirilen *emm4* tipi, 26 valanlı bu aşı kapsamında değildir, *emm4* bizim çalışmamızda en sık 5., Erkin-akmak ve ark.'nın (12) alışmalarında en sık 3. tip olarak bulunmuştur. Bunun dışında bizde 4 izolatta saptanan *emm118* de bu aşının etki alanında bulunmamaktadır.

Tablo 32: Ülkemizde *emm* tipleri ile ilgili çalışmalarda bulunan *emm* tipleri dağılımı

<i>emm</i> tipi	Bu çalışma	Erkin Çakmak ve ark (12)	Ayça ve ark. (11)	Üç çalışmada ortak saptananlar	Herhangi iki çalışmada saptananlar	26 değerlikli aşı kapsamında bulunanlar
<i>emm1</i>	+	+	+	+		+
<i>emm2</i>	+		+		+	+
<i>emm3</i>	+	+	+	+		+
<i>emm4</i>	+	+	+	+		
<i>emm5</i>	+		+		+	+
<i>emm6</i>		+				+
<i>emm9</i>		+				
<i>emm11</i>	+	+			+	+
<i>emm12</i>	+	+	+	+		+
<i>emm14</i>		+	+		+	+
<i>emm18</i>	+	+			+	+
<i>emm19</i>			+			+
<i>emm22</i>		+	+		+	+
<i>emm24</i>	+	+			+	+
<i>emm26</i>			+			
<i>emm28</i>	+		+		+	+
<i>emm29</i>		+				+
<i>emm33</i>		+				+
<i>emm43</i>		+				+
<i>emm44</i>	+		+		+	
<i>emm48</i>		+				
<i>emm63</i>			+			
<i>emm71</i>	+					
<i>emm75</i>	+	+			+	+
<i>emm76</i>			+			+
<i>emm77</i>	+	+	+	+		+
<i>emm78</i>	+	+			+	
<i>emm87</i>			+			
<i>emm89</i>	+	+	+	+		+
<i>emm90</i>		+				
<i>emm98</i>			+			
<i>emm102</i>		+				
<i>emm112</i>		+				
<i>emm118</i>	+	+	+	+		
34 tip	17	23	19	7	11	20

Ülkemizde yeni araştırılmaya başlanan *emm* tipi ile ilgili çalışmalar, 26 değerlikli aşının % 70-80 civarında ülkemize uyumlu olduğunu göstermektedir. Konu ile ilgili henüz ülkemizde çok az çalışma bulunmasına rağmen mevcut az sayıdaki yayında nispeten sık oranda saptanan bazı *emm* tipleri bu aşı kapsamında bulunmamaktadır. İleride yapılacak yeni çalışmalar ülkemizdeki *emm* tipi dağılımının daha da net görünmesini sağlayacak ve bölgeye uygun aşılarda geliştirilmesine katkı sağlanacaktır.

6. SONUÇLAR

- 1- GAS taşıyıcılık oranı % 11,2 olarak saptanmıştır.
- 2- Çalışmamızda *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 toplam 21 ayrı *emm* tipi saptanmıştır.. En sık saptanan *emm* tipleri sıklık sırasına göre *emm12*, *emm89*, *emm1*, *emm77*, *emm4* ve *emm3* olarak bulunmuştur.
- 3- Taşıyıcı grubunda en sık saptanan *emm* tipleri sıklık sırasına göre *emm12* (15 izolat), *emm89* (19 izolat), *emm77* (6 izolat) ve *emm1* (5 izolat); hasta izolat grubunda ise *emm12* (14 izolat), *emm1* (9 izolat), *emm4* (8 izolat), *emm89* (7 izolat) ve *emm3* (5 izolat) olarak bulunmuştur. *emm3* hasta izolatlarında daha yüksek oranda bulunmuştur. Hasta ve taşıyıcı grupları arasında diğer *emm* tiplerinin saptanma oranları bakımından anlamlı fark bulunamamıştır.
- 4- Klinik ve taşıyıcı izolat gruplarında toksin genlerinin saptanma oranları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bununla birlikte her bir toksin genin varlığı ve/veya yokluğu ile oluşturulan toksin gen profilleri göz önüne alındığında, belli profillerin hasta veya taşıyıcılarda ön plana çıktığı gözlenmiştir.
- 5- İnvazif izolatlarda *speA* saptanma oranı non-invazif izolatlardan anlamlı oranda yüksek bulunmuştur.
- 6- *emm1* tipi hasta izolatlarında saptanan ortalama gen sayısı, taşıyıcı izolatlarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
- 7- *emm1* tipi izolatlarda *speA* ve *smeZ* pozitiflik oranları anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. *smeZ* pozitif *emm1* tipi izolatların tümünün hasta grubunda olduğu gözlenmiştir. *emm4* tipi izolatlardaki *speG* geninin pozitiflik oranı anlamlı olarak düşük bulunmuştur.
- 8- PFGE ile tiplendirilebilen 133 izolat için 61 ayrı profil tespit edilmiştir; 105 izolat, eleman sayısı iki ile dokuz arasında değişen 33 küme oluşturmuş, 28 izolat özgün profil göstermiştir. Hasta ve taşıyıcı gruplarında kümelenme bakımından anlamlı fark bulunamamıştır. Taşıyıcılık oranının yüksek bulunduğu ilköğretim okulunda kümelenme oranı da yüksek bulunmuştur.

9- Saptanan 21 *emm* tipinden 12'si, 26 değerlikli aşı kapsamında yer almaktadır, bunlar tiplendirilebilen izolatların % 77,7'sini oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bu çalışmada sık saptanan *emm* tiplerinden olan *emm4* bu aşı kapsamında değildir.

10- Yapılacak bölgesel ve ulusal çalışmalarla, *emm* geni tiplerinin, eritrojenik toksin gen profilinin, izolatlar arası klonal ilişkinin, bölgedeki klonotipler, *emm* geni tipleri ve toksin gen profili arasındaki ilişkinin non-invazif ve invazif klinik izolatlar ile asemptomatik taşıyıcı populasyon izolatları arasındaki dağılımının belirlenmesi; GAS enfeksiyonların ve virülansının daha iyi anlaşılması ve aşı geliştirme çalışmalarına katkı sağlanması açısından önemlidir

Açıklama:

Bu tez Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nce desteklenmiştir (proje no: 2009-20-01-12).

7. KAYNAKLAR

1. 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, pp.305-391, 2006.
2. Cunningham M. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clin Microbiol Rev, 13:470-511, 2000.
3. Söyletir G, Över U. Beta Hemolitik Streptokoklar. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Kitabevi, Ankara, s. 478-1487, 2002.
4. Hızıl K, Emekdaş G, Coşguner M. Kreş ve İlkokul Çocuklarında A Grubu Beta Hemolitik Streptokok Taşıyıcılığı. T Klin Pediatri, 7:158-160, 1997.
5. Morita JY, Kahn E, Thompson T, Laclaire L, Beall B, Gherardi G, O'Brien KL, Schwartz B. Impact of azithromycin on oropharyngeal carriage of group A *Streptococcus* and nasopharyngeal carriage of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Pediatr Infect Dis J, 19:41-46, 2000.
6. Vlamincx 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, 41:4941–4949, 2003.
7. 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, 25:1789-1797, 2007.
8. CDC (Centers for Disease and Prevention). <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/emmtypes.html> (Erişim tarihi: 10.06.2010).

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, 55:157-164, 2006.
10. 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, 68(6):3523-3534, 2000.
11. Akça G. Boğaz enfeksiyonu nedeni olan A grubu beta hemolitik streptokokların M protein tiplerinin “*emm*” gen sekans analizi ile belirlenmesi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2006.
12. Erkin 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, İstanbul, 2009.
13. Durmaz R. Moleküler epidemiyolojinin prensipleri. [http:// web.inonu.edu.tr/~iozerol/ rdurmaz/ UygMolMikr/ 139.pdf](http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/139.pdf) (Erişim tarihi: 21.05.2010).
14. Pfaller MA. Molecular approaches to diagnosis and managing infectious diseases: Practicality and costs. Emerging Infectious Disease. 7: 312-8, 2001.
15. Durmaz R, Durmaz B, Bayraktar M, Ozerol IH, Kalcioğlu MT, Aktas E, Cizmeci Z. Prevalence of group A streptococcal carriers in asymptomatic children and clonal relatedness among isolates in Malatya, Turkey. J Clin Microbiol 41(11):5285-7, 2003.
16. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovski N. Pulsed-Field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. Current Microbiology, 34:226-229, 1997.
17. 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 pp. 2362–2379, 2005.

18. Teixeira L M, Barros RR, Castro AC, Peralta JM, Carvalho MGS, Talkington DF, Vivoni AM, Facklam R, Beall B. Genetic and phenotypic features of *Streptococcus pyogenes* strains isolated in Brazil that harbor new *emm* sequences. J Clin Microbiol, 39:3290–3295, 2001.
19. Demers B, Simor AE, Vellend H, Schlievert PM, Byrne S, Jamieson F, Walmsley S, Low DE. Severe invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada: 1987-1991. Clin Infect Dis 16:792-800, 1993.
20. Cengiz T. *Streptococcus*. Ed.: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, s.349-363, 1999.
21. Spellerberg B, Brandt C: *Streptococcus*. Ed: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Jorgensen JH. Manual of Clinical Microbiology. 9th Edition. pp.412-430, ASM Press, Washington DC, USA, 2007.
22. Levinson W, Jawetz E. Medical Microbiology and Immunology. 6th Edition, pp. 85-95, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, USA, 2000.
23. Todar's Online Textbook of Bacteriology, <http://www.textbookofbacteriology.net/streptococcus>, (Erişim tarihi 21.05.2010)
24. Fischetti V. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. Clin Microbiol Rev, 2:285-314, 1989.
25. Fischetti V. Streptococcal M protein. Sci Am, 264:58-65, 1991.
26. Hynes WL. Virulence factors of the group A streptococci and genes that regulate their expression. Front. Biosci. 9:3399-3433, 2004.
27. Manjula B, Khandke K, Fairwell T, Relf W, Sriprakash K. Heptad motifs within the distal subdomain of the coiled-coil rod region of M protein from rheumatic fever and nephritis associated serotypes of group A streptococci are distinct from each other: nucleotide sequence of the M57 gene and relation of the deduced amino acid sequence to other M proteins. J Protein Chem, 10:369-84, 1991.
28. Beall B, Facklam R, Elliott J, Franklin A, Hoenes T, Jackson D, Laclaire L, Thompson T, Viswanathan R. Streptococcal *emm* types associated with T-agglutination types and the use of conserved *emm* gene restriction fragment patterns for subtyping group A streptococci. J Med Microbiol, 47:893-8, 1998.

29. Eyal O, Jadoun J, Bitler A, Skutelski E, Sela S. Role of M3 protein in the adherence and internalization of an invasive *Streptococcus pyogenes* strain by epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 38:205-13, 2003.
30. Bessen D, Jones K, Fischetti V. Evidence for two distinct classes of streptococcal M protein and their relationship to rheumatic fever. *J Exp Med*, 169:269-83, 1989.
31. Bessen D, Fischetti V. Differentiation between two biologically distinct classes of group A streptococci by limited substitutions of amino acids within the shared region of M protein-like molecules. *J Exp Med*, 172:1757-64, 1990.
32. Espinosa L, Li Z, Gomez Barreto D, Calderon Jaimes E, Rodriguez R, Sakota V, Facklam R, Beall B. M protein gene type distribution among group A streptococcal clinical isolates recovered in Mexico City, Mexico, from 1991 to 2000, and Durango, Mexico, from 1998 to 1999: overlap with type distribution within the United States. *J Clin Microbiol*, 41:373-8, 2003.
33. 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*, 22:9-14, 2004.
34. 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*, 38:311-5, 1993.
35. Darenberg J, Luca-Harari B, Jasir A, Sandgren A, Pettersson H, Schalen C, Norgren M, Romanus V, Norrby-Teglund A, Normark BH. Molecular and Clinical Characteristics of Invasive group A streptococcal infection in Sweden. *Clin Infect Dis*, 45:450-8, 2007.
36. Schmitz FJ, Beyer A, Charpentier E, Normark BH, Schade M, Fluit AC, Hafner D, Novak R. Toxin-Gene Profile Heterogeneity among Endemic invasive European group A streptococcal isolates. *J Infect Dis*, 188:1578-86, 2003.
37. Mylvaganam H, Bjorvatn B, Osland A. Distribution and sequence variations of selected virulence genes among group A streptococcal isolates from western Norway. *APMIS* 108:771–778, 2000.

38. Commons R, Rogers S, Gooding T, Danchin M, Carapetis J, Robins-Browne R, Curtis N. Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with *emm* types. *J Med Microbiol*, 57:1238-1246, 2008.
39. Ikebe T, Wada A, Inagaki Y, Sugama K, Suzuki R, Tanaka D, Tamaru A, Fujinaga Y, Abe Y. Dissemination of the phage-associated novel superantigen gene *speL* in recent invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* M3/T3 isolates in Japan. *Infect Immun*, 70:3227–3233, 2002.
40. Luca-Harari B, Darenberg J, Neal S, Siljander T, Strakova L, Tanna A, Creti R, Ekelund K, Koliou M, Tassios PT, van der Linden M, Straut M, Vuopio-Varkila J, Bouvet A, Efstratiou A, Schalen C, Henriques-Normark B, the Strep-EURO Study Group, Jasir A. Clinical and Microbiological Characteristics of Severe *Streptococcus pyogenes* Disease in Europe. *J. Clin. Microbiol*, 47:1155-1165, 2009.
41. Luca-Harari B, Straut M, Cretoiu S, Surdeanu M, Ungureanu V, van der Linden M, Jasir A. Molecular characterization of invasive and non-invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Romania. *J Med Microbiol*, 57:1354-1363, 2008.
42. Jing HB, Ning BA, Hao HJ, Zheng YL, Chang D, Jiang W, Jiang YQ. Epidemiological analysis of group A streptococci recovered from patients in China. *J Med Microbiol*, 55:1101–1107, 2006.
43. Swedo S, Leonard H, Rapoport J. The pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection (PANDAS) subgroup: separating fact from fiction. *Pediatrics*, 113:907-11, 2004.
44. American Academy of Pediatrics. Group A streptococcal infections. Ed: Peter G. Red book: report of the Committee on Infectious Diseases. 24th Edition. Ill: American Academy of Pediatrics, Elk Grove Village, USA, 486, 1997.
45. McIsaac WJ, Kellner JD, Aufricht P. Empirical validation of guidelines for the management of pharyngitis in children and adults. *JAMA*, 291:1587–95, 2004.
46. Grahn E, Holm SE, Roos K. Penicillin tolerance in beta streptococci isolated from patients with tonsillitis. *Scand J Infect Dis*, 19: 421-426. 21, 1987.

47. Erkek Z. A grubu beta hemolitik streptokoklarda eski ve yeni makrolid direnç paternlerinin irdelenmesi. Gülhane Askeri Tıp akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikroniyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2000.
48. Açıkgöz ZC, Göçer S, Tuncer S. Macrolide resistance determinants of group A streptococci in Ankara, Turkey. J Antimicrob Chemother, 52:110-2, 2003.
49. Akata F, Öztürk D, Tansel Ö, Tatman-Otkun M, Otkun M, Fitoussi F, Bingen E, Tuğrul M. Resistance to macrolides in GAS from the europe section of Turkey, genetic and phenotypic characterization. Int J Antimicrobiol Agents, 20:461-463, 2002.
50. Gündüz Kaya E, Yücel M, Karakoç AE. A grubu betahemolitik streptokoklarda eritromisin direnç oranlarının ve direnç fenotipinin araştırılması. Mikrobiyol Bült, 40(3):161-8, 2006.
51. Çolakoğlu Ş, Alaçam R, Haşcelik G. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* in Ankara. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 38:456-459, 2006.
52. Başarı F, Bayraktar B, Bulut E. Beta hemolitik streptokokların gruplandırılması ve çeşitli antibiyotiklere dirençleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 38(3-4):106-111, 2008.
53. Erdoğan H, Özgen B, Öksüz L, Gürler N, Töreci K. A grubu beta-hemolitik streptokoklarda antibiyotik direnci ve makrolid direnç fenotipinin saptanması. Ankem Derg, 17: 85-7, 2003.
54. Uyanık MH, Yazgı H. A grubu beta hemolitik streptokoklarda eritromisin direnci. ANKEM Derg, 22(2):85-88, 2008.
55. Eryılmaz M, Akın A, Akan ÖA. Boğaz kültürlerinden izole edilen A grubu beta-hemolitik streptokokların antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg, 20(1):10-2, 2006.
56. Altındış M, Aktepe OC, Çetinkaya Z, Arslan F, Çetinkol Y, Yumlu N. Boğaz Kültürlerinde Saptanan A Grubu Beta Hemolitik Streptokoklar ve Eritromisin Direncinin Yıllara Göre Dağılımı. Kocatepe Tıp Derg, 2:29-32, 2003.

57. Berkiten R, Gürol SD. Solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen beta-hemolitik streptokoklar ve eritromisin direnci. Türk Mikrobiyol Cem Derg, (30):20-2, 2000.
58. Kılıç SS, Felek S, Akbulut A, Aşçı Z. 5-13 Yaş grubu yurt öğrencilerinin boğazlarında patojen bakteri araştırması. Enfeksiyon Dergisi, 4(2):241 – 244, 1990.
59. Çiftçi E, Doru Ü, Güriz H, Aysev AD, İnce E: Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from throat cultures of children with tonsillopharyngitis. J Ankara Medical School, 25(1):15-20, 2003.
60. İnan N, Erdoğan H, Berkiten R. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen beta hemolitik streptokokların gruplandırılması ve direnci. Klimik Dergisi, 16(3):118-120, 2003.
61. Gerber AM, Baltimore RS, Eaton BC, Gewitz M, Rowley AH, Shulman ST, Taubert KA. Prevention of rheumatic fever and diagnosis and treatment of acute streptococcal pharyngitis: A scientific statement from the american heart association rheumatic fever, endocarditis, and kawasaki disease committee of the council on cardiovascular disease in the young, the interdisciplinary council on functional genomics and translational biology, and the interdisciplinary council on quality of care and outcomes research: Endorsed by the american academy of pediatrics. Circ, 119:1541-1551, 2009.
62. Şahin A. Sivas'ta farklı sosyoekonomik düzeye sahip semtlerdeki ilköğretim okulları ve çocuk Yuvası öğrencilerinde A grubu beta hemolitik streptokok taşıyıcılığı ve penisilin direncinin Araştırılması. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Tezi, Sivas, 2005.
63. Metintaş S, Kalyoncu C, Etis S. Çifteler ilçesi ilkokul çocuklarında A grubu beta hemolitik streptokok enfeksiyonları prevalansı. Anadolu Tıp Fakültesi Dergisi, 1:17-27, 1991.
64. Özcan F, Işcan A, Çetinkaya Z, Gönen A, Şengil AZ. İlkokul çocuklarında A grubu beta hemolitik streptokok enfeksiyonu sıklığı. Genel Tıp Dergisi, 7:149-51, 1997.

65. Takeuchi T, Kawakita S: A follow-up study of throat carriers of streptococci among school children in Otsu city. Jpn Circ J, 49 :1254, 1985.
66. Begovac J, Bobinac E, Benic B, Desnica B, Maretic T, Basnec A, Kuzmanovic N. Asymptomatic pharyngeal carriage of beta-haemolytic streptococci and streptococcal pharyngitis among patients at an urban hospital in Croatia. European journal of epidemiology, 9(4):405-10, 1993.
67. Lloyd C, Balakrishnan N, Menon T. vir types of *Streptococcus pyogenes* in Chennai, South India. J Med Microbiol, 57:1176-1177, 2008.
68. Jasir A, Noorani A, Mısırsalehian A, Schalen C. Isolation rates of streptococcus pyogenes in patients with acute pharyngo tonsillitis and among healthy school children in Iran. Epidemiol Infect, 124(1):47-51, 2000.
69. Cengiz AT, Kıyan M, Çiftcioğlu N. A grubu beta hemolitik streptokokların antibiyotiklere duyarlılığı. Mikrobiyol Bült, 23:163-73, 1989.
70. Öztürk CE, Yavuz T, Kaya D, Yücel M. The Rate of Asymptomatic Throat Carriage of Groups A Streptococcus in School Children and Associated ASO Titres in Düzce, Turkey. Jpn J Infect Dis, 57:271-72, 2004.
71. Gökfidan S. Osmaniye Bölgesi İlkokul Çağı Çocuklarında Beta Streptokok Yaygınlığının Saptanması, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilim Uzmanlığı Tezi, Adana, 1989.
72. Durupınar B, Özkuyumcu C. Üst Solunum Yollarında A Grubu Beta Hemolitik Streptokok Taşıyıcılığı, Ondokuz Mayıs Ün Tıp Fak Derg, 5:495-98, 1988.
73. Ryan KJ. *Streptococcus* and *Enterococci*. Ed: Ryan KJ, Ray CG. Sherrig Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases, 4th Edition. McGray-Hill, New York, USA, pp. 273-286, 2003.
74. Hu MC, Walls MA, Stroop SD, Reddish MA, Beall B, Dale JB. Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine. Infect Immun, 70:2171-7, 2002.
75. Dale JB, Penfound T, Chiang EY, Long V, Shulman ST, Beall B. Multivalent group A streptococcal vaccine elicits bactericidal antibodies against variant M subtypes. Clin. Diagn. Lab. Immunol, 12:833-836, 2005.

76. Kalia A, Spratt B, Enright M, Bessen D. Influence of recombination and niche separation on the population genetic structure of the pathogen *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun, 70:1971-83, 2002.
77. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, M2-A9. Wayne, Pa, USA, 2009.
78. Weeks CR, Ferretti JJ. Nucleotide sequence of the type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) gene from *Streptococcus pyogenes* bacteriophage T12. Infect. Immun, 52:144-150, 1986.
79. Mollick J, Miller G, Musser J, Cook R, Grossman D, Rich R. A novel superantigen isolated from pathogenic strains of *Streptococcus pyogenes* with aminoterminal homology to staphylococcal enterotoxins B and C. J Clin Investig, 92:710-719, 1993.
80. Goshorn SC, Schlievert PM. Nucleotide sequence of streptococcal pyrogenic exotoxin type C. Infect. Immun, 56:2518-2520, 1988.
81. Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphyococcus spp.* ve *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Moleküler Tiplemesinde Kullanılacak “Pulsed Field Gel Electrophoresis“ (PFGE) Yöntemlerinin Standardizasyonu ve Kit Formatı Haline Getirilmesi-PulseNet-TÜRKİYE İçin Hazırlık, TÜBİTAK Projesi, 106S211 (SBAG-3459).
82. Durmaz R. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler. Ed: Durmaz R. Uygulamalı Molekül Mikrobiyoloji. s. 229-235, 2001.
83. Raymond J, Schlegel L, Garnier F, Bouvet A. Molecular characterization of *Streptococcus pyogenes* isolates to investigate an outbreak of puerperal sepsis. Infect Control Hosp Epidemiol, 26(5):455-461, 2005.
84. Mastro TD, Farley TA, Elliott JA. An outbreak of surgical-wound infections due to group A *Streptococcus* carried on the scalp. N Engl J Med, 323:968-972, 1990.
85. Viglione A, Nottebart VF, Bodman HA, Platt R. Recurrent group A streptococcal carriage in a health care worker associated with widely separated nosocomial outbreaks. Am J Med, 91:329-333, 1991.

86. Topal T. Okul öncesi bakımevlerinde A grubu beta hemolitik streptokok taşıyıcılığı. Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Tezi, Afyon, 2006.
87. Nussinovitch N, Finkelstein Y, Amir J. V arsonol. Group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis in preschool children aged 3 months to 5 years. Clin Pediatr, 38(6):357-60, 1999.
88. Dawson KP, Nsanze H, Amen AS, Mustafa N. Group A Streptococcal throat colonization is a dynamic phenomenon. Ann Trop Pediatr, 20(1):16-21, 2000.
89. Gonzalez L, Gonzalez JJ, Lupiola P, Tejedor MT. Carriers of beta hemolytic streptococci from groups A,B and C among school children in Las Palmas, Enferm infecc Microbiol Clin, 18(6):271-3, 2000.
90. Toprak D, Demirdal T, Aşçı Z, Orhan S, Çetinkaya Z, Demirtürk N. Sağlıklı Okul Çocuklarında Nazofarinksde A Grubu Beta Hemolitik Streptokok Taşıyıcılığı. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi, 2:26-29, 2008.
91. Topkaya AE, Yıldırım T, Arslan S. Isolation ratio and T- serotyping of group A streptococci from group A streptococci from upper respiratory tract infections in Turkey. Anadolu Kardiol Derg, 5:302-4, 2005.
92. Gür E, Akkuş S, Arvas A, Güzelöz Ş, Can G, Diren Ş, Ercan O, Çifçili S, İlter Ö. Prevalence of Positive of Throat Cultures for Group A Beta-hemolytic Streptococci Among school Children in Istanbul. Indian Pediatr, 39:569-573, 2002.
93. Kurtoğlu MG, Berktaş M, Bozkurt H, Bayram Y, Gülmez S. Gündüz bakımevlerinde A grubu beta hemolitik streptokok ve haemophilus influenzae taşıyıcılığı. Enfeksiyon Dergisi, 17(3):281-4, 2003.
94. Değerli K, Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Akçalı S, Gündüz T, Gazi H, Özbakkaloğlu B. Manisa İli'nde İlkokul Çocuklarında A Grubu Beta-Hemolitik Streptokok Taşıyıcılığının Araştırılması, Enfeksiyon Derg, 15(4):477 – 479, 2001.
95. Steer AC, Jenney AW, Kado J, Good MF, Batzloff M, Magor G, Ritika R, Mulholland KE, Carapetis JR. Prospective surveillance of streptococcal sora throat in a tropical country. Pediatr Infect Dis J. 28(6):477-82, 2009.

96. Navaneeth BV, Ray N, Chawada S, Selverani P, Bhaskar M, Suganthi N. Prevalance of beta hemolytic Streptococcal carrier rate among school children in Salem. *Indian J Pediatr*, 68:985–986, 2001.
97. Pichichero ME, Marcossi SM, Murphy ML, Hoeger W, Gren JL, Sorrento A. Incidence of streptococcal carriers in private pediatric practice. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 153: 624–628, 1999.
98. Ditchburn R, Ditchburn J. Rate of carriage of group A beta haemolytic streptococci. *BMJ*, 311:193, 1995.
99. Strömberg A, Schwan A, Cars O. Throat carrier rates of beta-hemolytic streptococci among healthy adults and children. *Scand J Infect Dis*, 20(4):411-7,1988.
100. Orak S, Kılıç SS, Felik S, Erol G, Güvenç H, Bektaş S. Elazığ şehir merkezi anaokul öğrencilerinde boğaz kültürlerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Derg*. 177-80, 1981.
101. Yazov L, Petros WG, Stump E: Epidemiological studies on rheumatic heart disease and streptococcal carriers among school-children in Addis-Ababa, Ethiopia. Preliminary communication. *Z Rheumatol*, 37(9-10):304-8, 1978.
102. Maekawa S, Fukuda K, Yamauchi T, Yamaguchi T, Takahashi K, Sugawa K. Follow up study of pharyngeal carriers of beta-hemolytic streptococci among school children in Sapporo City during a period of 2 years and 5 months. *J Clin Microbiol*, 13(6):1017-22, 1981.
103. Hoffmann S. The throat carrier rate of group A and other beta hemolytic streptococci among patients in general practice. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*, 93(5):347-51, 1985.
104. Elçi S, Arıkan E, Mete Ö, Gül K. Tonsillo-faranjitis şüpheli 7-17 yaş grubundaki öğrencilerin boğaz kültürlerinden soyutlanan aerob patojen mikroorganizmalar. *Mikrobiyol Bült*, 20:273-83, 1986.

105. Varaldo PE, Debbia EA, Nicoletti G, Pavesio D, Pipa S, Schito GC, Tempera G, and the Artemis-Italy Study Group. Nationwide Survey in Italy of Treatment of *Streptococcus pyogenes* Pharyngitis in Children: Influence of Macrolide Resistance on Clinical and Microbiological Outcomes. Clin Infect Dis, 29:869-73, 1999.
106. Spach DH, Black D. Antibiotic resistance in community-acquired respiratory tract infections: current issues. Ann Allergy Asthma Immunol, 81:293-303, 1998.
107. Hsueh PR, Teng LJ, Lee CM, Huang WK, Wu TL, Wan JH. Telithromycin and Quinupristin Resistance in Clinical Isolates of *Streptococcus pyogenes*: SMART Program 2001 Data. Antimicrob Agents Chemother, 2152-7, 2003.
108. Kim HY, Uh Y. Macrolide Resistance B-Hemolytic Streptococci: Changes after the Implementation of the Separation of Prescribing and Dispensing of Medications Policy in Korea. Yonsei Medical J, 45 (4): 591-597, 2004.
109. Arvand M, Hoeck M, Hahn H, Wagner J. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pyogenes* isolates in Berlin. J Antimicrob Chemother, 46:621-3, 2000.
110. Lopardo HA, Hernandez C, Vidal P, Vazquez M, Rosaenz L, Rubinstein G. Erythromycin-Resistant *Streptococcus pyogenes* in Argentina. Medicina (Buenos Aires), 64: 143-145, 2004.
111. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Chapella S, Wijdooghe M, Piessens J, Herck KV. Macrolide- and Telithromycin-resistant *Streptococcus pyogenes*, Belgium, 1999-2003. Emerging Infect Dis, 11(6):939-942, 2005.
112. Hasenbein ME, Warner JE, Lambert KG, Cole SE, Onderdonk AB, McAdam AJ. Detection of Multiple Macrolide- and Lincosamide-Resistant Strains of *Streptococcus pyogenes* from Patients in the Boston Area. J Clin Microbiol, 1559-1563, 2004.
113. Ioannidou S, Tassios PT, Zachariadou L, Salem Z, Kanelopoulou M, Kanavaki S. In vitro activity of telithromycin (HMR 3647) against Greek *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates with different macrolide susceptibilities. Clin Microbiol Infect, 9:704-707, 2003.

114. Bozdogan B, Appelbaum PC, Kelly LM, Hoellman DB, Tambic-Andrasevic A, Drukalska L. Activity of telithromycin compared with seven other agents against 1039 *Streptococcus pyogenes* pediatric isolates from ten centers in central and eastern Europe. Clin Microbiol Infect, 9:741-5, 2003.
115. Bayraktar B, Başarı F, Bulut E. A grubu beta hemolitik streptokoklarda antibiyotik duyarlılığı ve makrolid direnç fenotipi. ANKEM Derg, 22(3):127-131, 2008.
116. Özakkaş F, Aksungar FB, Topkaya AE. A grubu beta hemolitik streptokokların antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg, 21(1):10-13, 2007.
117. Kocabeyoğlu Ö, Özperçin İ, Koflan E, Mete Z, Birinci İ, Kanmaz M. Azitromisin, klaritromisin ve eritromisin ile diğer bazı antibiyotiklerin beta-hemolitik streptokok suşlarına etkinliği, ANKEM Derg, 8(2):91-2, 1994.
118. Uh Y, Jang IH, Hwang GY, Lee MK, Yoon JK, Kim HY. Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide resistance genes of beta-hemolytic streptococci in Korea. Antimicrob Agents Chemother, 48(7):2716-8, 2004.
119. Szczypa K, Sadowy E, Izdebski R, Strakova L, Hryniewicz W. Group A streptococci from invasive-disease episodes in Poland are remarkably divergent at the molecular level. J Clin Microbiol, 44:3975–3979, 2006.
120. Betriu C, Campos E, Cabronero C, Fernandez A, Picazo JJ, Noriega AR. Penicillin tolerance of group A streptococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 8(9):799–800, 1989.
121. de Melo MC, Sa Figueiredo AM, Ferreira-Carvalho BT. Antimicrobial susceptibility patterns and genomic diversity in strains of *Streptococcus pyogenes* isolated in 1978-1997 in different Brazilian cities. J Med Microbiol, 52(3):251-8, 2003.
122. O'Brien KL, Beall B, Barrett NL, Cieslak PR, Reingold A, Farley MM, Danila R, Zell ER, Facklam R, Schwartz B, Schuchat A. Epidemiology of invasive group a streptococcus disease in the United States, 1995-1999. Clin Infect Dis, 35(3):268-76, 2002.

123. O'Loughlin RE, Roberson A, Cieslak PR, Lynfield R, Gershman K, Craig A, Albanese BA, Farley MM, Barrett NL, NL Spina, Beall B, Harrison LH, Reingold A, Van Beneden C. The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000–2004. *Clin. Infect. Dis*, 45:853–862, 2007.
124. Kao CH, Chen PY, Huang FL, Chen CW, Chi CS, Lin YH, Shih CY, Hu BS, Li CR, Ma JS, Lau YJ, Lu KC, Yu HW. Clinical and genetic analysis of invasive and non-invasive group A streptococcal infections in central Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect*, 38:105-11, 2005.
125. Luca-Harari B, Ekelund K, van der Linden M, Staum-Kaltoft M, Hammerum AM, Jasir A. Clinical and epidemiological aspects of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Denmark during 2003 and 2004. *J Clin Microbiol*, 46:79–86, 2008.
126. Beall B, Gherardi G, Lovgren M, Facklam R, Forwick B, Tyrrell G. *emm* and *sof* gene sequence variation in relation to serological typing of opacity-factor-positive group A streptococci. *Microbiology*, 146:1195–1209, 2000.
127. Siljander T, Toropainen M, Muotiala A, hoe NP, Musser JM, Vuopio-Varkila J. *Emm* typing of invazive T28 group A streptococci, 1995-2004, Finland. *J Med Microbiol*, 55:1701-06, 2006.
128. Eriksson BK, Norgren M, McGregor K, Spratt BG, Normark BH. Group A streptococcal infections in Sweden: a comparative study of invasive and noninvasive infections and analysis of dominant T28 *emm28* isolates. *J Clin Microbiol*, 41(11):5282-4, 2003.
129. Su YF, Wang SM, Lin YL, Chuang WJ, Lin YS, Wu JJ, Lin MT, Liu CC. Changing Epidemiology of *Streptococcus pyogenes emm* Types and Associated Invasive and Noninvasive Infections in Southern Taiwan. *J. Clin. Microbiol*, 47: 2658-2661, 2009.
130. Brandt CM, Haase G, Spellerberg B, Holland R, Lutticken R. Gene polymorphisms among *emm12*-type *Streptococcus pyogenes* isolates. *J Clin Microbiol*, 41:1794-1797, 2003.

131. 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*, 39:325-332, 2004.
132. Dicuonzo G, Fiscarelli E, Gherardi G, Lorino G, Battistoni F, Landi S, De Cesaris M, Petitti T, Beall B. Erythromycin-resistant pharyngeal isolates of *Streptococcus pyogenes* recovered in Italy. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(12):3987-90, 2002.
133. Enright MC, Spratt BG, Kalia A, Cross JH, Bessen DE. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone. *Infect Immun*, 69(4):2416-27, 2001.
134. Lorino G, Gherardi G, Angeletti S, De Cesaris M, Graziano N, Maringhini S, Merlino F, Di Bernardo F, Dicuonzo G. Molecular characterisation and clonal analysis of group A streptococci causing pharyngitis among paediatric patients in Palermo, Italy. *Clin Microbiol Infect*, 12:189-192, 2006.
135. Hartas J, Sriprakash KS. *Streptococcus pyogenes* strains containing *emm12* and *emm15* possess a novel gene coding for distantly related sic protein. *Microbial Pathogen*, 26:25-33, 1999.
136. Sachse S, Seidel P, Gerlach D, Gunther E, Rodel J, Straube E, Schmidt KH. Superantigen-like gene(s) in human pathogenic *Streptococcus dysgalactiae*, subsp *equisimilis*: genomic localisation of the gene encoding streptococcal pyrogenic exotoxin G (*speG*). *FEMS Immunol Med Microbiol*, 34:159–167, 2002.
137. Igwe EI, Shewmaker PL, Facklam RR, Farley MM, van Beneden C, Beall B. Identification of superantigen genes *speM*, *ssa*, and *smeZ* in invasive strains of β -hemolytic group C and G streptococci recovered from humans. *FEMS Microbiol Lett*, 229:259–264, 2003.
138. Hashikawa S, Iinuma Y, Furushita M, Ohkura T, Nada T, Torii K, Hasegawa T, Ohta M. Characterization of group C and G streptococcal strains that cause streptococcal toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol*, 42:186–192, 2004.

139. Smoot JC, Barbian KD, van Gompel JJ, Smoot LM, Chaussee MS, Sylva GL, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Porcella SF. Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A streptococcus strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc Natl Acad Sci*, 99:4668–4673, 2002.
140. Proft T, Webb PD, Handley V, Fraser JD. Two novel superantigens found in both group A and group C *Streptococcus*. *Infect Immun*, 71:1361–1369, 2003.
141. Rivera A, Rebollo M, Miro E, Mateo M, Navarro F, Gurgui M, Mirelis B, Coll P. Superantigen gene profile, *emm* type and antibiotic resistance genes among group A streptococcal isolates from Barcelona, Spain. *J. Med. Microbiol*, 55:1115–1123, 2006.
142. Eriksson BK, Andersson J, Holm SE, Norgren M. Invasive group A streptococcal infections: T1M1 isolates expressing pyrogenic exotoxins A and B in combination with selective lack of toxin-neutralizing antibodies are associated with increased risk of streptococcal toxic shock syndrome. *J. Infect. Dis*, 180:410–418, 1999.
143. Musser JM, Hauser AR, Kim MH, Schlievert PM, Nelson K, Selander RK. *Streptococcus pyogenes* causing toxic-shock-like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 88:2668–2672, 1991.
144. Stevens DL, Tanner MH, Winship J, Swarts R, Ries KM, Schlievert PM, Kaplan E. Severe group A streptococcal infections associated with a toxic shock-like syndrome and scarlet fever toxin A. *N. Engl. J. Med*, 321:1–7, 1989.
145. Talkington DF, Schwartz B, Black CM, Todd JK, Elliott J, Breiman RF, Facklam RR. 1993. Association of phenotypic and genotypic characteristics of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates with clinical components of streptococcal toxic shock syndrome. *Infect. Immun*, 61:3369–3374, 1993.
146. Holm SE, Norrby A, Bergholm AM, Norgren M. Aspects of pathogenesis of serious group A streptococcal infections in Sweden, 1988–1989. *J Infect. Dis*, 166:31–37, 1992.

147. Hsueh PR, Wu JJ, Tsai PJ, Liu JW, Chuang YC, Luh KT. Invasive group A streptococcal disease in Taiwan is not associated with the presence of streptococcal pyrogenic exotoxin genes. *Clin. Infect. Dis*, 26:584–589, 1989.
148. Creti R, Imperi M, Baldassarri L, Pataracchia M, Recchia S, Alfarone G, Orefici G. *emm* types, virulence factors, and antibiotic resistance of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Italy: what has changed in 11 years? *J Clin Microbiol*, 45:2249–2256, 2007.
149. Tyler SD, Johnson WM, Huang JC, Ashton FE, Wang G, Low DE, Rozee KR. Streptococcal erythrogenic toxin genes: detection by polymerase chain reaction and association with disease in strains isolated in Canada from 1940 to 1991. *J Clin Microbiol*, 30:3127–3131, 1992.
150. Yu CE, Ferretti JJ. Molecular epidemiologic analysis of the type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) gene (*speA*) in clinical *Streptococcus pyogenes* strains. *Infect Immun*, 57:3715–3719, 1989.
151. Bianco S, Allice T, Zucca M, Savoia D. Survey of phenotypic and genetic features of *Streptococcus pyogenes* strains isolated in Northwest Italy. *Curr Microbiol*, 52:33–39, 2006.
152. Ekelund K, Darenberg J, Norrby-Teglund A, Hoffmann S, Bang D, Skinhoj P, Konradsen HB. Variations in *emm* type among group A streptococcal isolates causing invasive or noninvasive infections in a nationwide study. *J Clin Microbiol*, 43:3101–3109, 2005.
153. Ekelund K, Skinhoj P, Madsen J, Konradsen HB. Reemergence of *emm1* and a changed superantigen profile for group A streptococci causing invasive infections: results from a nationwide study. *J Clin Microbiol*, 43:1789–1796, 2005.
154. Creti R, Gherardi G, Imperi M, von Hunolstein C, Baldassarri L, Pataracchia M, Alfarone G, Cardona F, Dicuonzo G, Orefici G. Association of group A streptococcal *emm* types with virulence traits and macrolide-resistance genes is independent of the source of isolation. *J Med Microbiol*, 54(Pt 10):913-7, 2005.

155. Norton R, Smith HV, Wood N, Siegbrecht E, Ross A, Ketheesan N. Invasive group A streptococcal disease in North Queensland (1996–2001). *Indian J Med Res*, 119 (Suppl.):148–151, 2004.
156. DelVecchio A, Maley M, Currie BJ, Sriprakash KS. NAD-glycohydrolase production and *speA* and *speC* distribution in group A streptococcus (GAS) isolates do not correlate with severe GAS diseases in the Australian population. *J Clin Microbiol*, 40:2642–2644, 2002.
157. Haukness HA, Tanz RR, Thomson RB, Pierry DK, Kaplan EL, Beall B, Johnson D, Hoe NP, Musser JM, Shulman ST. The heterogeneity of endemic community pediatric group a streptococcal pharyngeal isolates and their relationship to invasive isolates. *J Infect Dis* 185, 915–920, 2002.
158. Murakami J, Kawabata S, Terao Y, Kikuchi K, Totsuka K, Tamaru A, Katsukawa C, Moriya K, Nakagawa I. Distribution of *emm* genotypes and superantigen genes of *Streptococcus pyogenes* isolated in Japan, 1994–9. *Epidemiol Infect*, 128, 397–404, 2002.
159. Nandi S, Chakraborti A, Bakshi DK, Rani A, Kumar R, Ganguly NK. Association of pyrogenic exotoxin genes with pharyngitis and rheumatic fever/rheumatic heart disease among Indian isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol*, 35:237–241, 2002.
160. Descheemaeker P, Van Looek F, Hauchecorne M, Vandamme P, Goossens H. Molecular characterisation of group A streptococci from invasive and non-invasive disease episodes in Belgium during 1993–1994. *J Med Microbiol*, 49:467–471, 2000.
161. Bessen DE, Izzo MW, Fiorentino TR, Caringal RM, Hollingshead SK, Beall B. Genetic linkage of exotoxin alleles and *emm* gene markers for tissue tropism in group A streptococci. *J Infect Dis*, 179:627–636, 1999.
162. Hsueh PR, Teng LJ, Lee PI, Yang PC, Huang LM, Chang SC, Lee CY, Luh KT. Outbreak of scarlet fever at a hospital day care centre: analysis of strain relatedness with phenotypic and genotypic characteristics. *J Hosp Infect*, 36:191–200, 1997.

163. Chaussee MS, Liu J, Stevens DL, Ferretti JJ. Genetic and phenotypic diversity among isolates of *Streptococcus pyogenes* from invasive infections. *J Infect Dis*, 173:901–908, 1996.
164. Black CM, Talkington DF, Messmer TO, Facklam RR, Hornes E, Olsvik O. Detection of streptococcal pyrogenic exotoxin genes by a nested polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes*, 7:255–259, 1993.
165. Leggiadro RJ, Bugnitz MC, Peck BA, Luedtke GS, Kim MH, Kaplan EL, Schlievert PM. Group A streptococcal bacteremia in a mid-south children's hospital. *South Med J*, 86:615–618, 1993.
166. Cleary PP, Kaplan EL, Handley JP, Wlazlo A, Kim MH, Hauser AR, Schlievert PM. Clonal basis for resurgence of serious *Streptococcus pyogenes* disease in the 1980s. *Lancet*, 339:518–521, 1992.
167. Sriskandan S, Faulkner L, Hopkins P. *Streptococcus pyogenes*: insight into the function of the streptococcal superantigens. *Int J Biochem Cell Biol*, 39:12–19, 2007.
168. 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*. 43(2):802-7, 2005.

7. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
ZONGULDAK KARAELMAS ÜNİVERSİTESİ
Uygulama ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu

TOPLANTI TARİHİ : 26.02.2009
TOPLANTI NO : 2009/03

KARARLAR :

14- Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığının “Hasta ve Taşıyıcılardan İzole Edilen Grup A Streptokoklarda emm Geni Tiplerinin, Toksin Gen Profilinin ve Klonal İlişkinin Araştırılması ” konulu başvurusunun Etik kurallara uygun olduğuna,

Oy Birliği ile karar verilmiştir.

A S L I G İ B İ D İ R

Doç.Dr. Banu D. GÜN
Hastane Etik Kurulu Başkanı