

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KLİNİK İZOLATLARININ TANIMLANMASINDA PNÖMOKOKAL YÜZEY ANTİJEN A VE OTOLİZİN GENLERİNİN GÖSTERİLMESİNİN YERİ*

VALUE OF DEMONSTRATION OF PNEUMOCOCCAL SURFACE ANTIGEN A AND AUTOLYSIN GENES FOR THE IDENTIFICATION OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* CLINICAL ISOLATES

Alper ERGİN¹, Özgen KÖSEOĞLU ESER², Burçin ŞENER², Gülşen HASÇELİK²

¹ Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Programı, Ankara. (ozgen@tr.net)

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Streptococcus pneumoniae, çocuk ve yetişkinlerde toplum kökenli pnömoni, menenjit, sinüzit, bronşit ve otitis media gibi enfeksiyonların önemli etkenleri arasında yer almaktadır. Pnömokokların laboratuvar tanısında konvansiyonel yöntemler bazen yetersiz kalmakta ve bu durum özellikle serotiplendirilemeyen *S.pneumoniae* suşları varlığında güçlük yaratmaktadır. Bu çalışma, solunum yolu örneklerinde *S.pneumoniae* tanımlanmasında kullanılan klasik yöntemler ile yüzey antijeni A (*psaA*) ve otolizin (*lytA*) gen varlığını saptayan moleküler yöntemlerin karşılaştırılması ve izolatların serotip dağılımının belirlenmesi amacıyla planlanmıştır. Çalışmada, 2000-2006 yılları arasında pnömokoksik pnömoni tanısı almış hastaların (yaş aralığı: 1-79 yıl) solunum yolu örneklerinden izole edilen rastgele seçilmiş 62 *S.pneumoniae* izolatı kullanılmıştır. Tüm izolatların tanısı, Gram boyama, %5 CO₂'li ve normal atmosferde optokin duyarlılık testi ve safrada çözünürlük testi gibi klasik laboratuvar testleri ile konulmuştur. Kapsül tiplendirilmesi, lateks aglutinasyon yöntemi (Statens Serum Institut, Denmark) ile yapılmış; bu yöntemle belirlenemeyen izolatlar için Quellung reaksiyonu (Statens Serum Institut, Denmark) yöntemi uygulanmıştır. Virülans faktörleri; pnömokok yüzey antijeni A (*psaA*) ve otolizin (*lytA*) gen varlığı, sırasıyla *psaA1* (5'-CTT TCT GCA ATC ATT CTT G) ile *psaA2* (5'-GCC TTC TTT ACC TTG TTC TGC) ve *lytAF* (5'-ACG CAA TCT AGC AGA TGA AGC) ile *lytAR* (5'-TGT TTG GTT GGT TAT TCG TGC) primerleri kullanılarak, "in house" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gösterilmiştir. Altmış iki *S.pneumoniae* izolatının 26 ayrı kapsül serotipine sahip olduğu bulunmuş; en sık saptanan iki serotip sırasıyla serotip 14 (n= 6) ve 19A (n= 5) olarak belirlenmiştir. Dört izolatın kapsül tipi kullanılan testlerle tespit edilememiştir. Seçilen tüm izolatların %5 CO₂'li ve normal atmosfer ortamında optokine duyarlı ve safrada çözünür olduğu tespit edilmiş (%100) ve hepsi-

* Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiş (Proje no: 05 D05 406 001) ve IUMS Kongresi'nde (5-9 Ağustos 2008, İstanbul) bildiri olarak sunulmuştur.

nin (%100) *psaA* ve *lytA* geni içerdiği saptanmıştır. *S.pneumoniae*'nin laboratuvar tanısı için kullanılan klasik ve moleküler yöntemler arasında fark gözlenmemiştir. Sonuç olarak, *S.pneumoniae* izolatlarında, özellikle "serotiplendirilemeyen" suşların kesin ve doğru laboratuvar tanısında klasik testlerin yanısıra, *psaA* ve/veya *lytA* gen bölgesine yönelik moleküler yöntemlerin uygulanmasının, sonuçların güvenilirliği açısından değer taşıdığı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Streptococcus pneumoniae*, serotip, pnömokok yüze antijeni A (*psaA*), otolizin (*lytA*).

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is one of the most frequent causative agents of community acquired pneumoniae, meningitis, sinusitis, bronchitis and otitis media both in children and adults. Conventional laboratory methods may sometimes fail to identify *S.pneumoniae*. The aims of this study were *i*) to compare the conventional methods and molecular methods which detected pneumococcal surface antigen A (*psaA*) and autolysin (*lytA*) genes; *ii*) to determine the serotype distribution of *S.pneumoniae* isolated from the respiratory samples. Randomly chosen 62 *S.pneumoniae* strains isolated from respiratory samples of patients with clinically proven pneumococcal pneumonia (age range: 1-79 years) between years 2000-2006, were included in the study. Classical microbiological analysis for the isolates included Gram staining, optochin sensitivity test performed in 5% CO₂ and ambient air and bile solubility test. Capsular serotyping was performed by using latex particles sensitized with mono-specific typing sera (Statens Serum Institut, Denmark). Quellung reaction (Statens Serum Institut, Denmark) was used for serotyping the isolates that gave equivocal results using latex agglutination. Pneumococcal surface antigen A and autolysin genes were detected by in-house polymerase chain reaction (PCR) using *psaA1* (5'-CTT TCT GCA ATC ATT CTT G), *psaA2* (5'-GCC TTC TTT ACC TTG TTC TGC), *lytAF* (5'-ACG CAA TCT AGC AGA TGA AGC) and *lytAR* (5'-TGT TTG GTT GGT TAT TCG TGC) primers. Twenty six different serotypes were detected in 62 *S.pneumoniae* isolates. The most prevalent capsule serotype was 14 (n= 6), followed by 19A (n= 5). Four isolates could not be typed by the available antisera. All the isolates were optochin sensitive with or without carbondioxide incubation and were bile soluble. All the isolates included in the study have harboured (100%) *psaA* and *lytA* genes. No difference was found between the classical and molecular methods for the identification of *S.pneumoniae* isolates. In conclusion, detection of *psaA* and/or *lytA* genes by molecular methods is of value especially in "nonserotypeable strains" when they are performed with conventional methods in clinically proven *S.pneumoniae* isolates.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, serotype, pneumococcal surface antigen A (*psaA*), autolysin (*lytA*).

GİRİŞ

Streptococcus pneumoniae, yetişkinlerde ve çocuklarda toplum kökenli pnömoni, menenjit, sinüzit, bronşit ve otitis medianın en önemli etkenleri arasında yer almaktadır¹. *S.pneumoniae*'nin klasik laboratuvar tanısı, bakterinin kanlı agardaki hemoliz özelliği, optokine duyarlılığı, kapsül şişme testi (Quellung reaksiyonu) ve safrada çözünürlük testi ile yapılmaktadır². Özellikle solunum yolu gibi karışık flora içeren örneklerde pnömokok tanısında sorunlarla karşılaşmaktadır. Yapılan çalışmalarda, optokine duyarlı viridans streptokoklar ve safrada çözünmeyen ya da optokine dirençli pnömokoklar rapor edilmiştir^{2,3}. Klasik ve serolojik yöntemler laboratuvar tanısı açısından bazen yetersiz kalmakta ve bu durum özellikle serotiplendirilemeyen *S.pneumoniae* suşları varlığında güçlük yaratmaktadır. Bu tip sorunları çözmek amacıyla, günümüzde *S.pneumoniae*'nin laboratuvar tanısında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır^{3,4}.

Pnömonokların otolizin ve yüzey adezin proteinleri, kolonizasyon ve invazyonu artırarak bakterinin patogeneğinde rol oynayan önemli virülans faktörleridir⁵. Otolizin geninin (*lytA*) dizi analizi sonucunda, bu gen bölgesinin tür düzeyinde yüksek derecede korunduğu gözlenmiş, bu nedenle klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda tür düzeyinde tanımlama için ideal bir hedef olduğu düşünülmüştür⁶. Bu gen bölgesi sayesinde *S.pneumoniae* genotipik olarak benzerlik gösterdiği *S.mitis* ve *S.oralis* gibi viridans streptokoklardan ayırt edilebilmektedir^{6,7}. Pnömonokokal yüzey antijeni A geni (*psaA*) ise, 37 kDa ağırlığında olan ve moleküler tanıda kullanılan bir diğer proteini kodlamaktadır. Monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalarda *S.pneumoniae*'nin 90 serotipinin tümünde bu antijenin varlığı gösterilmiştir⁸. *S.mitis* ve *S.oralis*'in pnömonoklardaki *psaA*'ya %94-95 oranında benzerlik içeren gen varlığına sahip oldukları düşünülse de, bu bakterilerde *psaA* gen diziliminden elde edilen primerlerin, hiçbirisiyle bu genin varlığı gösterilememiştir⁹.

Bu çalışmada, solunum yolu örneklerinde *S.pneumoniae* tanımlanmasında klasik yöntemler ile *psaA* ve *lytA* gen varlığının gösterildiği moleküler yöntemlerin karşılaştırılması ve izolatların serotip dağılımının belirlenmesi planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar

Çalışmada, 2000-2006 yılları arasında pnömonokoksik pnömoni tanısı almış hastaların (yaş aralığı: 1-79 yıl) solunum yolu örneklerinden rastgele seçilmiş 62 *S.pneumoniae* şüpheli izolat kullanıldı. Hastaların 43'ü erişkin, 19'u çocuk hasta olarak belirlendi. Tüm izolatlar %5 CO₂'li ortam ve normal atmosferde %5 koyun kanlı agarda optokin duyarlılık testi ve safrada çözünürlük testi uygulandı.

Kapsül Serotiplendirmesi

Lateks aglütinasyon tiplendirme sistemi Pneumotest-Latex (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) kullanılarak yapıldı. Bu yöntemle serotiplendirilemeyen izolatlar için Quellung reaksiyonu (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) uygulandı.

Virülans Faktörlerinin Moleküler Analizi

Yüzey antijeni A (*psaA*) ve otolizin (*lytA*) gen varlığı için genomik DNA ekstraksiyonu QIAamp (Qiagen, Hilden, Almanya) DNA ekstraksiyon sistemi kullanılarak yapıldı. *psaA* gen (838 bp) bölgesini çoğaltmak için Morrison ve arkadaşları⁷ tarafından geliştirilen *psaA1* (5'-CTT TCT GCA ATC ATT CTT G) ve *psaA2* (5'-GCC TTC TTT ACC TTG TTC TGC) primerleri kullanıldı. Son tepkime karışımı 30 µl olacak şekilde, 1 x PCR tamponu 200 µM dNTP karışımı, 1 U Taq polimeraz, her bir primerden 1.6 µM ve 1 µl bakteri DNA'sı konularak hazırlandı. Kalıp DNA'lar 95°C'de 5 dakika denatürasyon sonrası, toplam 30 döngü 94°C ve 52°C'de 30'ar saniye, 72°C'de 2 dakika ve son olarak 72°C'de 8 dakika bekletildi. *lytA* gen (101 bp) bölgesini çoğaltmak için McAvin ve arkadaşları⁷ tarafından geliştirilen *lytAF* (5'-ACG CAA TCT AGC AGA TGA AGC) ve *lytAR* (5'-TGT TGT GTT GGT TAT TCG TGC) primerleri kullanıldı. Son tepkime karışımı 30 µl olacak şekilde, 1 x PCR tamponu, her bir primerden 1 µM, 200 µM dNTP karışımı, 1 U Taq polimeraz

Tablo I. *S.pneumoniae* İzolatlarının Serotip Dağılımı ve Sıklığı

Serotipler	Her bir serotip için görülmeye sıklığı (sayı)
14	6
19A	5
6B, 9N, 11A, 15A, 19F, 23F, 35A, 35B	3
6A, 8, 9V, 21, 23A, 31, 38	2
3, 7C, 7F, 16F, 17C, 18, 20, 22F, 34	1
Serotiplendirilemeyen	4

ve 1 µl bakteri DNA'sı konularak hazırlandı. Çoğaltma işlemi için kalıp DNA'lara 95°C'de 5 dakika denatürasyon sonrası, 35 döngü 95°C, 60°C ve 72°C'de 30'ar saniye ve son olarak 72°C'de 8 dakika polimerizasyon uygulandı.

PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp, jel etidyum bromür ile boyandıktan sonra *psaA* ve *lytA* genlerinin varlığı araştırıldı. Bütün testlerde kalite kontrol suşu olarak *S.pneumoniae* ATCC 49619 kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan tüm izolatların (n= 62), %5 CO₂'li ortamda ve normal atmosferde optokine duyarlı ve safrada çözünür olduğu ve yine tümünün (%100) *lytA* ve *psaA* geni içerdiği tespit edilmiştir. *S.pneumoniae*'nin laboratuvar tanısı için kullanılan klasik ve moleküler yöntemlerin uyumlu sonuç verdiği gözlenmiştir. Klinik örneklerden izole edilen *S.pneumoniae* suşlarının, 26 ayrı kapsül serotipi gösterdiği saptanmış, 4 izolat ise kullanılan testlerle serotiplendirilememiştir (Tablo I).

TARTIŞMA

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında pnömonokokların kesin ve doğru tanısı ile antibiyotik duyarlılık sonuçları, hastaya uygulanacak olan tedavi yönünden büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle klasik tanı yöntemlerinin yanı sıra, gerektiğinde moleküler yöntemlerin de kullanılması önerilmektedir. Morrison ve arkadaşlarının⁸ yaptıkları çalışmada, *psaA* genini saptamak amacıyla PCR ile 90 örneğin 89'unda 838 baz çiftlik *psaA* gen bölgesi amplifiye edilmiş ve *psaA* PCR yönteminin *S.pneumoniae* tanısında yer almasının önemi vurgulanmıştır. Messmer ve arkadaşlarının¹⁰ çalışmasında, 40 adet kapsüllü *S.pneumoniae* suşu, konjunktivitli kişilerden elde edilmiş 4 adet tiplendirilemeyen pnömonokok suşu, 16 adet atipik streptokok suşu, 35 adet viridans grup streptokok suşu ve yöntemin özgüllüğünü saptamak için 5 adet *Dolosigranulum pigrum* olmak üzere 100 suş, *lytA*, *psaA* ve pnömolizin geni (*ply*) açısından PCR yöntemi ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar *lytA* PCR yöntemiyle, bütün kapsüllü pnömonokok suşlarını, tiplendirilemeyen suşları ve safra çözünürlüğü pozitif olan 6 atipik suşu %100 duyarlılıkla saptamışlar ve bu yöntemi en etkili yöntem olarak

bildirmişlerdir¹⁰. Buna karşın, *psaA* PCR yönteminin özgüllüğü %99; *ply* IAIB PCR yönteminin özgüllüğü %50; *ply* IIAIB PCR yönteminin özgüllüğü ise bütün atipik suşlarda amplifikasyon verdiği için "0" olarak saptanmıştır¹⁰. Neeleman ve arkadaşlarının¹¹ çalışmasında, 38 ayrı merkezden elde edilen ve *S.pneumoniae* olarak tanımlanan makrolide dirençli 141 suş, AFLP (amplified fragment length polymorphism) ve 16S rRNA dizi analizi ile tekrar tanımlanmış ve 91'i *S.pneumoniae*, 32'si *S.mitis*, 18'i ise sadece streptokok türleri olarak adlandırılmıştır. Bu suşlarda *lytA* ve *ply* gen varlığı PCR ile araştırılmış; 91 *S.pneumoniae* suşunun hepsi *lytA* geni pozitif, pnömokok olmayan 50 suş ise *lytA* geni negatif olarak bulunmuş ve *lytA* PCR yönteminin özgüllük ve duyarlılığı %100 olarak tespit edilmiştir¹¹. *ply* PCR yöntemi ise 31 adet viridans ve 10 adet tür adı verilemeyen streptokok suşu da dahil olmak üzere suşların yaklaşık %94'ünde (132/141) pozitif sonuç vermiştir. Bu nedenle *ply* geninin *S.pneumoniae*'ya özgül olmadığına karar verilmiş; tiplendirilen bütün pnömokok suşlarını doğru olarak tanımlayan, tiplendirilemeyen suşları atipik streptokoklardan ayırt ettiren ve viridans streptokoklarla çapraz reaksiyon vermeyen *lytA* ve *psaA* PCR yöntemlerinin *S.pneumoniae* tanımlamasında en etkili yöntemler olduğu belirlenmiştir¹¹. Bu veriler göz önüne alınarak, çalışmamızda rastgele seçilen *S.pneumoniae* izolatlarında *psaA* ve *lytA* gen varlığı araştırılmış ve tüm izolatlarda pozitif olduğu görülmüştür.

S.pneumoniae'nin epidemiyolojik açıdan dağılımını belirleyen yöntemlerin başında kapsül serotiplendirmesi gelmektedir. Serotip dağılımını bilmek, pnömokok aşlarının etkinliğini değerlendirmek açısından önem taşımaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, 7 değerli pnömokokal konjuge aşının (PCV-7), aşı serotiplerine bağlı invaziv hastalıklardan korumadaki etkinliği %94'tür¹². Ülkemizde yapılan İliki ve arkadaşlarının¹³ çalışmasında, solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda en sık görülen serotiplerin sırasıyla 19F, 6B, 3 ve 23F olduğu belirlenmiş ve bu suşların PCV-7 aşısının içerdiği serogrupların %35.8'i, 9 değerli konjuge pnömokok aşı içeriğinin %40'ı, 11 değerli aşı içeriğinin ise %46.7'si ile örtüştüğü saptanmıştır. Fırat ve arkadaşlarının¹⁴ menenjitli hastalardan izole edilen *S.pneumoniae* suşlarında yaptıkları çalışmada, en sık görülen serogruplar 23, 19 ve 14 olarak belirlenmiş ve polisakkarid aşının bu suşların %94'ünü kapsadığı saptanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmaların derlendiği bir meta-analizde, PCV-7 aşısının çalışmalarda yer alan invaziv pnömokokların %37'sini kapsadığı belirtilmiştir¹⁵.

Çalışmamızda en sık görülen ilk iki serotip sırasıyla 14 ve 19A olmuştur (Tablo I). Çalışmamıza dahil edilen suşlar invaziv olmayan örneklerden izole edildiği için, izolatların sadece %29'unun PCV-7'de mevcut serotipler olan serotip 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F ve 23F'yi kapsadığı görülmüştür. Türkiye'de pnömokok aşlarının rutin aşı programında yer almıyor olması, aşı serotiplerinin ülkemizde halen sık olarak görülmelelerinin nedeni olabilir. Bu durum, bu çalışmada en sık saptanan serotipin, serotip 14 olmasını açıklayabilir.

Pnömokoklarda giderek artan antibiyotik direnci ve kullanımda olan aşı serotiplerinin dışında kalan serotiplerle gelişen enfeksiyonların artışı, gündemdeki aşların gelecekte yerlerini yeni protein aşlarına bırakacağını düşündürmektedir. Yeni protein aşı geliştirilmesinde pnömokokal yüzey proteini A (pspA), pnömolin ve pnömokokal yüzey adezi-

ni (*psaA*) yeni hedefler olarak önem kazanmıştır. Bunlar içinde *psaA*, yüksek korunmuş yapısı ve tüm yaş gruplarında immünojenik olması nedeniyle aşı geliştirilmesinde en büyük aşı antijeni adayı durumundadır¹⁶. Nitekim, çalışmamızda tüm izolatlarımızda *psaA* geninin pozitif bulunması bu proteinin geçerli bir aşı hedefi olduğunu desteklemektedir.

Serotiplendirilemeyen pnömokok izolatları *S.pneumoniae* tanısı açısından şüphe yaratabilmektedir. Çalışmamızda 4 adet *S.pneumoniae* izolatı serotiplendirilememiş ancak tümünde de *lytA* ve *psaA* genleri gösterilerek pnömokok tanısı doğrulanmıştır. Bu veriye dayanarak serotiplendirilemeyen şüpheli izolatlarda kesin *S.pneumoniae* tanısı için bu genlere yönelik moleküler yöntemlere başvurulabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda, 26 farklı serotip dağılımına sahip pnömokok izolatlarında yüzey antijeni ve otolizin varlığı gen düzeyinde araştırılmış, hepsinde her iki gen varlığı yönünden pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu çalışma *S.pneumoniae* tanımlaması için uygulanmakta olan klasik yöntemlerin moleküler tanımlama yöntemleriyle uyumlu sonuçlar verdiğini göstererek, klinik olarak anlamlı *S.pneumoniae* izolatlarının kesin ve doğru laboratuvar tanısında klasik testlerin yanı sıra, *psaA* ve *lytA* gen varlığının da gösterilmesinin önem taşıdığını vurgulamaktadır. Solunum yolu gibi steril olmayan bölgelerden alınan klinik örneklerde, bakterinin özellikle pnömokok benzeri viridans streptokok ve *S.pseudopneumoniae* gibi diğer streptokoklardan ayırımında doğru tanıyı sağlayabilmek için *psaA* ve/veya *lytA* gen bölgesine yönelik moleküler yöntemlerin uygulanması, sonuçların güvenilirliği açısından değer taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, et al. Bacterial meningitis in the United States in 1995. N Engl J Med 1997; 337: 970-6.
2. Rouff K, Whiley RA, Beighton D. *Streptococcus*, pp: 405-21. In: Murray PR, Barron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
3. Martin-Galiano AJ, Balsalobre L, Fenoll A, Campa AD. Genetic characterization of optochin-susceptible viridans streptococci. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3187-94.
4. Sheppard CL, Harrison TG, Morris R, Hogan A, George RC. Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in clinical samples. J Med Microbiol 2004; 53: 189-95.
5. Jedrzejewski MJ. Pneumococcal virulence factors: structure and function. Microbiol Mol Biol Rev 2001; 65: 187-207.
6. Lopez R, Garcia E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes and bacteriophage. FEMS Microbiol Rev 2004; 28: 553-80.
7. McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM, et al. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. J Clin Microbiol 2001; 39: 3446-51.
8. Morrison KE, Lake D, Crook J, et al. Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis. J Clin Microbiol 2000; 38: 434-7.
9. Scott JA, Marston EL, Hall AJ, Marsh K. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by *psaA* PCR analysis of lung aspirates from adult patients in Kenya. J Clin Microbiol 2003; 41: 2554-9.
10. Messmer TO, Sampson JS, Stinson A, Wong B, Carlone GM, Facklam RR. Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 49: 249-54.

11. Neeleman C, Klaassen CH, Klomberg DM, de Valk HA, Mouton JW. Pneumolysin is a key factor in misidentification of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and is a putative virulence factor of *S.mitis* and other streptococci. J Clin Microbiol 2004; 42: 4355-7.
12. Black S, Shinefield H, Fireman B, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Pediatr Infect Dis J 2000; 19: 187-95.
13. İlki A, Akbenliođlu C, Yağcı A, Söyletir G, Bakır M. Solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda nazofarenksinde *Streptococcus pneumoniae* kolonizasyon epidemiyolojisi. Mikrobiyol Bul 2004; 38: 1-7.
14. Fırat M, Ersoy Y, Eşel D, Bayraktar M, Çaylan R, Durmaz R. Menenjitli hastalardan izole edilen pnömokokların serotip dağılımı ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Mikrobiyol Bul 2006; 40: 169-77.
15. Erdem H, Sener B. Pneumococcal seroepidemiology in Turkey: implications for vaccine coverage. Vaccine 2008; 26: 1271-3.
16. Anderton JM, Gowrisankar R, Romero-Steiner S, et al. E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. Microbial Pathogen 2007; 42: 225-36.