

Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesinden Tanımlanmış İnvazif A Grubu Streptokokların Serotipleri ve Antimikrobiyal Duyarlılıkları

Serotypes and Antimicrobial Susceptibilities of Invasive Group A Streptococci Identified in Eastern Black Sea Region of Turkey

Gülçin BAYRAMOĞLU¹, Aynur E. TOPKAYA², Ahmet BALIKCI², Faruk AYDIN¹

¹ Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

¹ Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Turkey.

² Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² Maltepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 14.01.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 19.04.2011

ÖZET

İnvazif A grubu streptokok (AGS) enfeksiyonlarının sıklığı son 20 yıldır tüm dünyada artmaktadır. Koruyucu önlemlerin alınması ve uygun tedavilerin başlanabilmesi için, bu klinik tablolardan sorumlu serotiplerin ve antibiyotik duyarlılıklarının bilinmesi gerekir. Bu çalışmada, hastanemizde üç yıllık süre içinde izole edilen invazif AGS suşlarının serotiplerinin saptanması ve tedavi seçeneklerinde yer alan bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları ile indüklenebilir klindamisin direncinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farabi Hastanesine Mart 2006-Mart 2009 tarihleri arasında başvuran hastaların (14'ü erkek, 8'i kadın; yaş aralığı: 3-82 yıl, median yaş: 59) klinik örneklerinden [steril vücut sıvıları (periton, plevra, perikard, eklem ve beyin omurilik sıvısı), kan, doku biyopsisi] izole edilen 22 invazif AGS suşu dahil edilmiştir. AGS suşlarının serotiplerini saptamak için, serum opasite faktörü (SOF), T proteinleri ve M proteinleri araştırılmıştır. SOF üretimi, mikroplak yöntemiyle insan serumu kullanılarak spektrofotometrik okuma ile belirlenmiş, SOF tiplerinin tespitinde özgül antiserumlarla SOF-inhibisyon testi uygulanmıştır. T protein tipleri polivalan anti-T serumları kullanılarak aglütinasyon yöntemiyle, M serotipleri ise M antiserumları kullanılarak kapiller presipitasyon yöntemiyle saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri, CLSI önerilerine göre disk difüzyon yöntemi ile uygulanmıştır. İzolatların 9 (%41)'unda SOF pozitif bulunmuş ve T antiserumu ile en sık T (n= 8) ve U (n= 7); M antiserumu ile en sık M1 (n= 4) ve M2 (n= 3) serotipleri saptanmıştır. İnvazif 22 AGS suşunun 15 (%68)'i antibiyotiklere duyarlı, 7 (%32)'si ise dirençli bulunmuş; benzilpenisilin, seftriakson, vankomisin, levofloksasin ve linezolide dirençli suş saptanmamıştır. Dört (%18) suş tetrasikline, 3 (%13.5) suş kloramfenikole dirençli bulunurken, 9 (%41) suş tetrasikline ve 1 (%4.5) suş eritromisine

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Faruk Aydın, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 532 285 7487, **E-posta (E-mail):** faraydin@yahoo.com

orta duyarlı olarak bulunmuştur. Yalnızca bir izolatta indüklenebilir klindamisin direnci tespit edilmiştir. Serotiplendirme sonuçlarımıza göre, mevcut aşıardan hegzavalan aşının, invazif serotiplerimizin %33'ünü, 26 valanlı aşının ise %62'sini içerdiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, invazif enfeksiyonlardan izole edilen AGS suşlarının serotiplerini belirlemek ve ülkemizde yaygın olan serotipleri içeren aşılardan geliştirilmesine katkı sağlamak için çok merkezli epidemiyolojik çalışmaların planlanması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Grup A streptokok; *Streptococcus pyogenes*; invazif; serotiplendirme; T proteini; M proteini; antibiyotik duyarlılık.

ABSTRACT

Frequency of invasive group A streptococcus (GAS) infections is increasing worldwide in recent 20 years. Serotypes responsible for these clinical manifestations and their antibiotic susceptibilities should be known in order to establish preventive measures and initiate appropriate treatment. This study was aimed to determine the serotypes, antibiotic susceptibilities and inducible clindamycin resistance among invasive GAS isolated between 2006-2009 period. A total of 22 GAS strains isolated from clinical samples [sterile body fluids (peritoneal, pleural, pericardial, joint and cerebrospinal fluids), blood, tissue biopsy] of the patients (14 male, 8 female; age range: 3-82 years, median age: 59) who admitted to Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Farabi Hospital located in Trabzon province (Eastern Black Sea Region of Turkey), between March 2006 and March 2009 were included in the study. GAS serotypes were determined by the investigation of serum opacity factors (SOF), T proteins and M proteins. SOF production was investigated by microplate method using human serum and SOF types were determined by SOF-inhibition test using specific antisera. T protein types were detected by agglutination method using polyvalent anti-T sera, and M serotypes were detected by capillary precipitation method using M antisera. Antimicrobial susceptibility tests were performed by disk-diffusion method according to CLSI recommendations. SOF were positive in 9 (41%) samples. Use of T antiserum yielded T (n= 8) and U (n= 7) types and M antiserum M1 (n= 4) and M2 (n= 3) types. The overall antibiotic susceptibility rate of the isolates was 68% (15/22) and overall resistance rate was 32% (7/22). All of the GAS strains were found susceptible to benzylpenicillin, ceftriaxone, vancomycin, levofloxacin and linezolid, however 9 (41%) were intermediate susceptible to tetracycline and 1 (4.5%) was intermediate susceptible to erythromycin. Four (18%) strains were found resistant to tetracycline, while three strains (13.5%) were found resistant to chloramphenicol. Inducible clindamycin resistance was found positive only in one strain. The serotypes determined in this study indicated that 33% of our invasive serotypes were covered by the hexavalent vaccine and 62% by the 26-valent vaccine. Multi-center surveillance studies are required to determine the serotype distribution of invasive GAS in Turkey and to provide valuable information for the development of appropriate vaccines in our country.

Key words: Group A streptococci; *Streptococcus pyogenes*; invasive; serotyping; T protein; M protein; antimicrobial susceptibility.

GİRİŞ

Streptokok enfeksiyonları, halen tüm dünya ülkelerinde önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. A grubu streptokoklar (*Streptococcus pyogenes*), farenjit, impetigo, orta kulak iltihabı gibi akut enfeksiyonlara; toksik şok sendromu, menenjit, pnömoni, nekrotizan fasiyet gibi yaşamı tehdit eden invazif enfeksiyonlara ve romatizmal ateş ve glomerülo nefrit gibi poststreptokokal komplikasyonlara neden olabilmektedir.

Yaklaşık 80 yıldır A grubu streptokok (AGS) enfeksiyonlarının patogenezi ve epidemiyolojisini araştırmaya yönelik çalışmalar yapılmasına rağmen halen açıklığa kavuşmamış birçok konu vardır. Tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmeler ile akut AGS enfeksiyonlarının doğru ve hızlı tedavisi sağlanmış olmakla birlikte, invazif AGS enfeksiyonlarının sıklığı, gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada, özellikle son 20 yıl içinde artış göstermiştir. Bu artıştan AGS'lerin değişen epidemiyolojik özellikleri ve serotipleri sorumlu tutulmaktadır¹⁻³.

AGS'lerin hücre duvarında bulunan M proteinleri en önemli virülans faktörüdür. Bu protein AGS'leri fagositozdan korumaktadır ve nötralizan antikorların M proteinine karşı üretildiği bilindiğinden aşı çalışmaları bu noktada yoğunlaşmıştır. M protein epitoplarını içeren multivalan AGS aşılı geliştirilmiştir⁴⁻⁷. AGS'lerin M proteinindeki antijenik farklılıklara göre, bugün için bilinen 100'den fazla serotipi vardır. Serotiplerin tümünü içeren etkili bir aşının oluşturulması teknik olarak olanaksızdır. Bu nedenle aşı çalışmaları, en sık saptanan farejit etkenlerine, invazif enfeksiyonlara ve romatizmal ateş ya da glomerülofrit gibi komplikasyonlara neden olan serotipleri hedeflemiştir. Aşıların içereceği M tiplerine karar verilirken, epidemiyolojik çalışmaların sonuçları göz önünde bulundurulmaktadır. Mevcut aşılardan uygulanmasıyla, yurdumuzda saptanan invazif enfeksiyonların ne ölçüde önlenebileceğinin öngörülmesi, invazif serotiplerin belirlenmesine bağlıdır. AGS'lerin serotiplendirme çalışmaları, moleküler veya immünolojik yöntemlerle serum opasite faktörü, T proteini ve M proteininin saptanmasıyla yapılabilir⁸.

Daha önce yaptığımız çalışmalarda, farejit etkeni olan AGS serotipleri ve antimikrobiyal duyarlılıkları belirlenmiştir^{9,10}. Bu çalışmada ise, hastanemizde invazif AGS enfeksiyonlarından izole edilen suşların serotiplerinin immünolojik yöntemlerle araştırılması hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu retrospektif çalışmada, yaklaşık üç yıllık süre içinde, invazif AGS izole edilen örneklerle ilgili, hasta yaşı, cinsiyeti, enfeksiyonu kolaylaştıran faktörler, bakteri suşunun izole edildiği tarih ve örneğin cinsi gibi hastaya ve örneğe ait bilgiler kaydedildi.

Örnekler

Çalışmamıza, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi (KTÜTF), Farabi Hastanesine Mart 2006-Mart 2009 tarihleri arasında başvuran hastaların örneklerinden izole edilen 22 invazif AGS suşu dahil edildi. Aynı hastanın birden fazla örneğinde üreyen AGS suşlarından yalnızca ilk izole edilen çalışmaya alındı. Normalde steril olan vücut bölgelerinden (periton, plevra, perikard, eklem ve beyin omurilik sıvısı gibi), kandan veya doku biyopsi örneklerinden izole edilen suşlar invazif AGS olarak kabul edildi.

AGS tanısı ve izolatların serotiplendirmesi

%5 koyun kanlı agarda, beta-hemoliz oluşturan bakterilere klasik yöntemler uygulandı. Sırasıyla, Gram boyama, katalaz, basitrasin ve trimetoprim-sülfametoksazol duyarlılığı ve serogrupsu (Streptex, Remel Inc., KS, ABD) testleri uygulanarak AGS tanımlama-

sı yapıldı. İnvazif AGS olarak tanımlanan suşlar, defibrine koyun kanı eklenmiş Todd-He-with buyyonda üretilerek saklandı. Serotiplendirme ve antibiyotik duyarlılık çalışmaları, KTÜTF Streptokok Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Serum opasite faktörü (SOF), mikropalak yöntemiyle, insan serumu kullanılarak ve spektrofotometrik okuma ile saptandı¹¹. SOF kaynağı olarak, kültür süpernatantları veya HCl ekstraktları kullanıldı¹². Suşların SOF üretimi +/- ile ++++ arasında değerlendirildi. SOF üreten izolatlar SOF-inhibisyon yöntemiyle tiplendirildi. Bu yöntemde, daha önceden antikor profilleri belirlenmiş olan insan serumlarıyla oluşturulan çeşitli paneller kullanıldı¹¹.

Serolojik çalışmalar için homojen streptokok süspansiyonları hazırlandı ve spontan aglütinasyonu önlemek için süspansiyonlar tripsin ile işleme tabi tutuldu. T protein tiplendirmesi, polivalan anti-T serumları (T, U, W, X, Y, Z) (Denka Seiken Co., Japonya) kullanılarak aglütinasyon yöntemiyle; M protein tiplendirmesi ise M antiserumları kullanılarak kapiller presipitasyon yöntemiyle yapıldı^{8,9}.

İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine göre çalışıldı ve yorumlandı¹³. Penisilin, seftriakson, vankomisin, eritromisin, tetrasiklin, levofloksasin, kloramfenikol, klindamisin ve linezolid duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle saptandı. İndüklenebilir klindamisin direnci disk yakınlştırma yöntemiyle çalışıldı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesi, Mann Whitney-U ve Fisher's exact testleri ile yapıldı.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 22 invazif AGS suşunun izole edildiği hastaların 14'ü erkek, 8'i kadın olup, yaşları 3-82 arasında (median: 59) değişmektedir (Tablo I). Suşların çoğunun kan (n= 9) ve yumuşak doku (n= 6) örneklerinden izole edildiği görülmüştür (Tablo I).

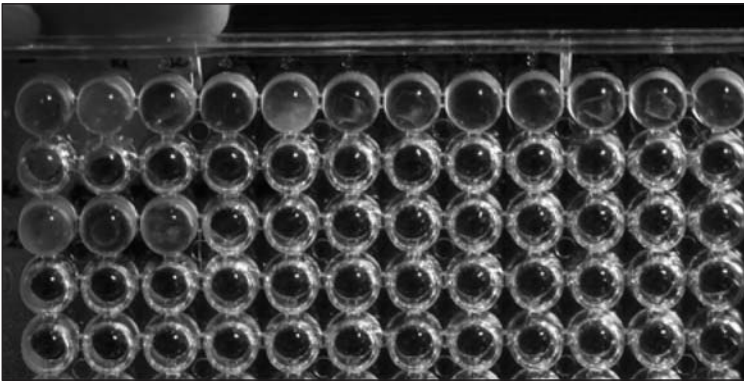
Serotiplendirme çalışmaları sonunda, invazif AGS suşlarından 9 (%41)'unun SOF ürettiği saptanmış (Resim 1); bir izolat hariç diğer tüm suşlar T ve M antiserumları ile tiplendirilebilmiştir (Tablo I). Buna göre polivalan T antiserumu ile en sık T (n= 8) ve U (n= 7) grubu; M antiserumu ile en sık M1 (n= 4) ve M2 (n= 3) serotipleri saptanmıştır (Tablo I).

Klinik örneklerden izole edilen invazif 22 AGS suşunun 15 (%68)'i antibiyotiklere duyarlı, 7 (%32)'si ise dirençli bulunmuştur. Çalışılan antibiyotiklerden penisilin, seftriakson, vankomisin, levofloksasin ve linezolide dirençli izolat saptanmamıştır. Dört (%18) suş tetrasikline, 3 (%13.5) suş kloramfenikole dirençli bulunurken; 9 (%41) suş tetrasikline, 1 (%4.5) suş eritromisine orta duyarlı olarak bulunmuştur. Yalnızca bir izolatta indüklenebilir klindamisin direnci saptanmıştır. Antibiyotiklere duyarlı suşların altısında (6/15; %40), antibiyotiklere dirençli suşların ise üçünde (3/7; %42.8) SOF üretimi olduğu belirlenmiş; ancak antibiyotik direnci ile SOF pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p= 1.000).

Tablo 1. İnvazif A Grubu Streptokok Suşlarının İzole Edildiği Hasta ve Örnekler Ait Bilgiler ve Serotiplendirme Sonuçları

Suş no	Yaş/ cinsiyet	Servis	Örnek	İzolasyon tarihi	SOF Üretimi	Tipi	T protein	M serotip
1	73/K	Nöroloji	Plevra sıvısı	11.03.06	-		Y	M15
2	72/K	Acil	Kan	13.07.06	+	2	U	M2
3	44/E	Acil	YD	02.01.07	-		T	M74
4	71/K	Acil	Kan	07.01.07	-		X	M14
5	71/K	Acil	Kan	13.02.07	-		T	M1
6	71/E	Cerrahi YBÜ	Kan	17.02.07	-		T	M1
7	23/E	Cerrahi YBÜ	Plevra sıvısı	17.02.07	-		NT	NT
8	82/K	Kardiyoloji	Kan	06.04.07	+++	2	U	M2
9	5/E	Pediyatri	YD	18.04.07	+++	13	T	M13
10	72/E	Acil	Eklemler sıvısı	30.07.07	-		U/W	M6
11	56/E	Göz	Korneal sürüntü	21.12.07	-		X	M14
12	3/K	Pediyatri	Plevra sıvısı	07.01.08	-		W	M5
13	10/E	Pediyatri	YD	06.03.08	+	59	T	M59
14	4/K	Pediyatri	YD	12.03.08	-		T	M1
15	11/E	Pediyatri	Kan	13.03.08	+	13	T/Y	M13
16	73/E	KBB	Plevra sıvısı	15.03.08	-		U	M6
17	64/E	Onkoloji	Kan	17.03.08	+	4	U	M4
18	9/K	Pediyatri	Eklemler sıvısı	09.05.08	+/-	5	W	M5
19	42/E	Nöroloji P*	YD	13.06.08	-		T	M1
20	62/E	Nöroloji YBÜ	Kan	14.07.08	+	27	W	M27
21	78/E	Acil	Kan	03.02.09	+/-	2	U	M2
22	11/E	KBB	YD	18.03.09	-		U	M4

K: Kadın, E: Erkek, YD: Yumuşak doku, P*: Poliklinik, KBB: Kulak burun boğaz, YBÜ: Yoğun bakım ünitesi, NT: Tipendirilemeyen.



Resim 1. SOF mikroyağında sonuçların görünümü.

TARTIŞMA

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, akut AGS enfeksiyonları ve sonrasında gelişen akut romatizmal ateş ve akut glomerülo nefrit gibi sekeller, halk sağlığı sorunu olarak önemini halen korumaktadır. Yapılan çalışmalar, belirli M serotiplerinin, enfeksiyonların tipi ve se-kelleriyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Örneğin; M5, 6, 18, 19, ve 24 serotipleri roma-tojenik; M1, 4, 12, 49, 55, 57 ve 60 serotipleri nefritojenik olarak tanımlanırken; M1, 3, 4, 6, 11, 12, 18 ve 28 daha çok invazif enfeksiyon etkeni olarak bildirilmiştir^{11,14-17}. Serotip M1, 3, 5, 6, 19 ve 24'ü içeren bir hekszavalan ve 26 serotipi içeren bir de polivalan aşı üretilmiş ve bu aşuların immünojenite ve etkinliklerini belirleyen çalışmalarda olumlu sonuç alınmıştır⁴⁻⁷. Çalışmamız, aşuların, yurdumuzda saptanan invazif AGS enfeksiyonlarını önlemedeki başarısını öngörmek amacıyla yapılan ilk serotiplendirme çalışmasıdır.

Çalışmamızda değerlendirilen invazif AGS suşlarının çoğu kan (n= 9; %41) ve yumuşak doku (n= 6; %27) örneklerinden izole edilmiş; çeşitlilik göstermekle birlikte izolatların en sık M1 ve M2 (toplam yedi suş; %32) serotiplerine ait olduğu tespit edilmiştir (Tablo I). Serotiplerin örnekler göre dağılımına bakıldığında, M2 serotiplerinin tamamının (n= 3) kan örneklerinden izole edildiği dikkati çekmiş, diğer serotiplerin dağılımında herhangi bir özellik saptanmamıştır. Avrupa ve Kanada'da yapılan çalışmalarda, ilk sırayı yumuşak doku enfeksiyonları ve buna eşlik eden streptokokal toksik şok sendromu almakta, ikinci sıklıkta ise bakteremilere rastlandığı ifade edilmektedir^{17,18}. Almanya'da yapılan altı yıllık bir surveyans çalışmasında, invazif suşların %53'ünün kan örneklerinden izole edildiği belirtilmiştir¹. Delgado ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, M serotipleri ile klinik örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır¹⁸.

Çalışmamızda, izolatlarımızdan %41 (9/22)'inin serum opasite faktörü (SOF) oluşturduğu saptanmış; bu oranın daha önceki çalışmamızda⁹ üst solunum yolu örneklerinden izole ettiğimiz AGS suşları ile benzer olduğu izlenmiştir. Aynı şekilde, bu çalışmada elde ettiğimiz invazif suşların serotip özelliklerinin de, önceki çalışmamızda⁹ farejit etkeni olan AGS'lerin serotip özellikleriyle benzerlik gösterdiği belirlenmiştir⁸. Ancak değerlendirmeye aldığımız suş sayısının kısıtlı olması nedeniyle, enfeksiyon tipleri ile serotipler arasındaki olası ilişkinin açıklık kazanması için, ülkemizde romatizmal ve nefritojenik serotiplerin belirlenmesine yönelik daha geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

Çalışmada test edilen antibiyotikler arasında, en yüksek direnç oranı (%18) tetrasikline karşı saptanmış; bunu kloramfenikol direnci (%13.5) izlemiş ve yalnız bir suş eritromisine orta duyarlı saptanırken aynı suшта indüklenebilir klindamisin direnci de tespit edilmiştir. Matsumoto ve arkadaşları¹⁹ Japonya'da yaptıkları çalışmada, 1967 ile 1987 yılları arasında tetrasiklin direncinin %40'dan %72'ye çıktığını; kloramfenikol direncinin de, bu kadar yüksek olmamakla birlikte aynı paralele arttığını bildirmişlerdir. Yıllar arasındaki direnç oranları ve serotip değişimi birlikte irdelendiğinde, direnç artışının serotip dağılımıyla ilişkili olduğu belirlenmiş, T4 ve T12 serotiplerinin aynı zaman dilimlerinde giderek artan oranlarda saptandığı izlenmiş ve bunun moleküler temeli ortaya konmuştur²⁰. Powis ve arkadaşları²⁰ da, 1992-1993 ve 2003 yıllarında izole edilen invazif AGS suşlarının kinolon direncini ve bunun serotiplerle ilişkisini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar

dirençli suş bulamamış ancak 1993-2003 yılları arasında minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri 2 µg/ml'ye ulaşan suşların oranının %1.3'ten %4.4'e çıktığını vurgulamışlardır²⁰. MİK değeri artmış olan izolatların tümünde parC mutasyonu belirlenmiş ve dokuz suştan sekizinin serotip M6 olduğu saptanmıştır²⁰. Bizim çalışmamızda dirençli suşların SOF üretimi ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 1.000).

Sonuç olarak, ülkemizde invazif AGS enfeksiyonlarının önlenmesi için uygun stratejilerin geliştirilebilmesi; enfeksiyonların sıklığına, risk faktörlerine yönelik epidemiyolojik çalışmalara ve AGS izolatlarının serotiplerinin belirlenmesine bağlıdır. Çalışmamızın sonuçlarına göre, mevcut aşılardan heksavalan aşının, invazif serotiplerimizin %33'ünü, 26 valanlı aşının ise %62'sini içerdiği saptanmıştır. Daha önce yayınladığımız farenjit etkeni AGS serotipleri de göz önünde bulundurulduğunda polivalan aşısı, etken serotiplerin çoğunu içermekle birlikte, epidemiyolojik verilerimizin birikmesi adına, serotiplendirme ve direnç çalışmalarının paralel olarak sürdürüldüğü çok merkezli çalışmaların planlanması gerektiği açıktır.

TEŞEKKÜR

M antiserumları ve standart suşları sağladıkları ve deneyimlerini paylaştıkları için Dr. Edward Kaplan ve Dwight Johanson ve tüm Minnesota Üniversitesi 820. Laboratuvar çalışanlarına; insan serumları için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ve Tıbbi Biyokimya öğretim üyeleri ve çalışanlarına, çalışmanın yapılması sırasındaki destekleri için laboratuvar teknisyenimiz Seher Gürlü ve araştırma görevlimiz Zeliha Belaş'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Wahl RU, Lütticken R, Stanzel S, van der Linden M, Reinert RR. Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Germany, 1996-2002: results from a voluntary laboratory surveillance system. Clin Microbiol Infect 2007; 13(12): 1173-8.
2. Strömberg A, Romanus V, Burman LG. Outbreak of group A streptococcal bacteremia in Sweden: an epidemiologic and clinical study. J Infect Dis 1991; 164(3): 595-8.
3. Martin PR, Høiby EA. Streptococcal serogroup A epidemic in Norway 1987-1988. Scand J Infect Dis 1990; 22(4): 421-9.
4. Hu MC, Walls MA, Stroop SD, Reddish MA, Beall B, Dale JB. Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine. Infect Immun 2002; 70(4): 2171-7.
5. Kotloff KL, Corretti M, Palmer K, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant multivalent group A streptococcal vaccine in healthy adults: phase 1 trial. JAMA 2004; 292(6): 709-15.
6. McNeil SA, Halperin SA, Langley JM, et al. Safety and immunogenicity of 26-valent group A streptococcus vaccine in healthy adult volunteers. Clin Infect Dis 2005; 41(8): 1114-22.
7. Steer AC, Batzloff MR, Mulholland K, Carapetis JR. Group A streptococcal vaccines: facts versus fantasy. Curr Opin Infect Dis 2009; 22(6): 544-52.
8. Johnson DR, Kaplan EL, VanGheem A, Facklam RR, Beall B. Characterization of group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*): correlation of M-protein and emm-gene type with T-protein agglutination pattern and serum opacity factor. J Med Microbiol 2006; 55(4): 157-64.
9. Topkaya AE, Yıldırım T, Arsan S. Isolation ratio and T- serotyping of group A streptococci from pediatric upper respiratory tract infections in Turkey. Anadolu Kardiyol Derg 2005; 5(4): 302-4.

10. Özakkas F, Aksungar FB, Topkaya AE. Examination of antibiotic susceptibility of group A beta-hemolytic streptococci. ANKEM 2007; 21(1): 10-3.
11. Johnson DR, Kaplan EL. Microtechnique for serum opacity factor characterization of group A streptococci adaptable to the use of human sera. J Clin Microbiol 1988; 26(10): 2025-30.
12. Rehder CD, Johnson DR, Kaplan EL. Comparison of methods for obtaining serum opacity factor from group A streptococci. J Clin Microbiol 1995; 33(11): 2963-7.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th Informational Supplement. CLSI/NCCLS Document M100-S19, 2009. CLSI, Wayne, Pennsylvania.
14. Watanabe-Ohnishi R, Aelion J, LeGros L, et al. Characterization of unique human TCR V beta specificities for a family of streptococcal superantigens represented by rheumatogenic serotypes of M protein. J Immunol 1994; 152(4): 2066-73.
15. Johnson DR, Stevens DL, Kaplan EL. Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngitis. J Infect Dis 1992; 166(2): 374-82.
16. Wannemaker LW. Differences between streptococcal infections of the throat and of the skin. N Engl J Med 1970; 282(2): 78-85.
17. Lamagni TL, Darenberg J, Luca-Harari B, et al. Epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. J Clin Microbiol 2008; 46(7): 2359-67.
18. Hollm-Delgado MG, Allard R, Pilon PA. Invasive group A streptococcal infections, clinical manifestations and their predictors, Montreal, 1995-2001. Emerg Infect Dis 2005; 11(1): 77-81.
19. Matsumoto M, Sakae K, Ohta M, et al. Molecular mechanisms of high level tetracycline-resistance in group A streptococcal isolates, T serotypes 4 and 11. Int J Antimicrob Agents 2005; 25(2): 142-7.
20. Powis J, McGeer A, Duncan C, et al. Prevalence and characterization of invasive isolates of *Streptococcus pyogenes* with reduced susceptibility to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(5): 2130-2.