

Streptococcus pyogenes Suşlarının *emm* Genotiplerinin Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılığı: Geliştirilmekte Olan Aşı ile Karşılaştırma*

Distribution of *emm* Genotypes and Antibiotic Susceptibility of *Streptococcus pyogenes* Strains: Analogy with the Vaccine in Development

Uğur ARSLAN¹, Erman ORYAŞIN², Zeynep ESKİN², Hatice TÜRK DAĞI¹,
Duygu FINDIK¹, İnci TUNCER¹, Bülent BOZDOĞAN²

¹ Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

¹ Selçuk University Faculty of Selçuklu Medicine, Department of Medical Microbiology, Konya, Turkey.

² Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Aydın.

² Adnan Menderes University Science and Technology Research and Practice Center, Aydın, Turkey

* Bu çalışma, 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (5-8 Haziran 2012, Ankara)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 04.07.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 21.11.2012

ÖZET

Streptococcus pyogenes tonsillofarenjitin en yaygın bakteriyel etkeni olup, ayrıca otitis media, impetigo, nekrotizan fasiit, bakteriyemi, sepsis ve toksik şok benzeri sendrom gibi hastalıklara yol açabilmektedir. Bakterinin önemli virülans faktörü olan M proteini, *emm* geni tarafından kodlanmakta ve bu gen epidemiyolojik çalışmalarda genotiplendirme amacıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, A grubu streptokok (AGS) suşlarında M proteininin *emm* gen dizi analizi yöntemiyle tiplendirilmesi, saptanan M tiplerinin geliştirilmekte olan aşı içeriği ile karşılaştırılması ve izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, laboratuvarımızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen 35 AGS suşu dahil edilmiştir. Kan kültüründe üreyen suşlar invazif, boğaz ve apse kültüründe üreyen suşlar ise noninvazif olarak kabul edilmiştir. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması konvansiyonel yöntemler ve 16S rRNA dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir. *S.pyogenes* olarak tanımlanan suşların *emm* genotiplendirmesi CDC'nin önerdiği şekilde PCR yöntemiyle yapılmıştır. Çalışılan 35 izolatın 23'ünden ampikon elde edilmiş ve bunlara dizi analizi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar CDC'nin *emm* dizi veri bankası ile karşılaştırılmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılık testleri agar dilüsyon yöntemiyle CLSI önerilerine göre yapılmış ve değerlendirilmiştir. Çalışmaya alınan 35 izolattan 23'ünün *emm* tiplendirmesi yapılmış ve 15 farklı *emm* genotipi saptanmıştır. En sık saptanan tipler sırasıyla *emm1* (%22), *emm89* (%13), *emm18* (% 9) ve *emm19* (%9) olarak

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Uğur Arslan, Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 42075 Selçuklu, Konya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 332 241 1550, **E-posta (E-mail):** drarslanugur@gmail.com

belirlenmiştir. Diğer *emm* tipleri (*emm5*, 12, 14, 17, 26, 29, 37, 74, 78, 92, 99) %47 oranında saptanmıştır. Kan kültüründen izole edilen suşların *emm1*, 12, 19, 74, 89 ve 99 tiplerine sahip olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda belirlenen 15 *emm* tipinin 9 (%60)'unun 26 valanlı aşı içeriğinde yer alan tipler (*emm1*, 5, 12, 14, 18, 19, 29, 89, 92) olduğu izlenmiştir. Diğer taraftan, *S.pyogenes* ile enfekte 23 olgudan 17 (%74)'sinin aşı içeriğinde bulunan tipler ile enfekte olduğu ve ayrıca kan izolatlarında tespit edilen dört *emm* tipinin (*emm1*, 12, 19, 89) de geliştirilen aşının kapsamı içinde yer aldığı görülmüştür. Suşların hiçbirisinde penisilin, ampisilin, eritromisin, linkomisin, gentamisin, kloramfenikol, vankomisin ve linezolid direnci saptanmamış; altı suшта levofloksasin (MLK= 4 ve 16 µg/ml), bir suшта ise tetrasiklin direnci (MLK= 16 µg/ml) tespit edilmiştir. Sonuç olarak bölgesel verilerin sunulduğu bu çalışma, az sayıda invazif olan ve olmayan izolat ile yapılmış olup, aşının etkinliğini ve ülkemizdeki suşların ne kadarını kapsadığını belirlemek için çok merkezli ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: *Streptococcus pyogenes*; A grubu streptokok; *emm* tipi; aşı; antibiyotik duyarlılık.

ABSTRACT

Streptococcus pyogenes is the most common bacterial pathogen causing pharyngotonsillitis, and also can lead to diseases such as otitis media, impetigo, necrotizing fasciitis, bacteremia, sepsis and toxic shock-like syndrome. M protein encoded by *emm* gene is an important virulence factor of *S.pyogenes* and it is used for genotyping in epidemiological studies. The aims of this study were to determine the M protein types of group A streptococci (GAS) by using *emm* gene sequence analysis method, to compare the M types in terms of analogy with the vaccine in development and to determine the antibiotic susceptibilities of the isolates. A total of 35 GAS strains isolated from various clinical specimens in our laboratory were included in the study. Strains growing in blood culture were considered as invasive, strains growing in throat and abscess cultures were considered as non-invasive. The isolates have been identified by conventional methods and 16S rRNA sequence analysis at species level. *emm* genotyping of strains identified as *S.pyogenes*, was performed by PCR method as proposed by the CDC. Amplicons were obtained and sequenced in 23 out of 35 isolates. The results were compared with CDC *emm* sequence database. Antibiotic susceptibility of the isolates was performed by agar dilution method and evaluated as recommended by CLSI. Twenty-three out of 35 isolates could be typed and 15 different *emm* genotypes were detected. The most common *emm* types were *emm1* (22%), *emm89* (13%), *emm18* (9%) and *emm19* (9%). The detection rate of other *emm* types (*emm5*, 12, 14, 17, 26, 29, 37, 74, 78, 92, 99) was 47%. Types *emm1*, 12, 19, 74, 89 and 99 were observed in strains isolated from blood cultures. It was detected that nine of the 15 (60%) *emm* types are within the contents of 26 valent vaccine (*emm* 1, 5, 12, 14, 18, 19, 29, 89, 92). It was also observed that 17 (74%) of the 23 cases were infected by vaccine types and the four *emm* types (*emm1*, 12, 19, 89) identified in blood samples were among the vaccine types. All of the strains were found susceptible to penicillin, ampicillin, erythromycin, lincomycin, gentamicin, chloramphenicol, vancomycin and linezolid, however six isolates were resistant to levofloxacin (MIC= 4 and 16 µg/ml) and one isolate was resistant to tetracycline (MIC= 16 µg/ml). In conclusion, this preliminary local study with limited number of invasive and non-invasive *S.pyogenes* isolates, emphasized the need for larger scale multi-center studies to determine the analogy and efficacy of the vaccine in development.

Key words: *Streptococcus pyogenes*; group A streptococci; *emm* type; vaccine; antibiotic susceptibility.

GİRİŞ

Lancefield sınıflandırmasına göre A grubu streptokoklar (AGS) arasında yer alan *Streptococcus pyogenes*, streptokok ailesinde insana özgü önemli patojenlerden biridir. İnsanlarda etken olduğu invazif hastalıklar, özellikle sepsis, pnömoni, nekrotizan fasiit ve strep-

tokokal toksik şok sendromudur. İnvazif olmayan hastalıklar arasında ise farenjit ve orta kulak iltihabı gibi süpüratif ve akut romatizmal ateş ve akut glomerülo nefrit gibi süpüratif olmayan hastalıklar yer almaktadır. *S.pyogenes* enfeksiyonları önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olup, dünya genelinde yılda yaklaşık 500.000 kişinin bu enfeksiyonlardan öldüğü tahmin edilmektedir¹.

M proteini AGS'lerin hücre duvarında bulunan en önemli virülans faktörüdür. Bu protein, bakterileri fagositozdan koruyarak streptokok enfeksiyonlarının gelişmesine yol açmakta, aynı zamanda immün yanıtı tetikleyerek geçirilen enfeksiyona karşı bağışıklık oluşmasını sağlamaktadır. Streptokok enfeksiyonlarında nötralizan antikorların M proteinine karşı olduğu bilindiğinden aşı çalışmaları özellikle bu konuda yoğunlaşmıştır. Yapılan aşı çalışmalarında farenjit, invazif enfeksiyonlar ve romatizmal ateş ya da glomerülo nefrit gibi komplikasyonlara neden olan tipler hedeflenmiştir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde rekombinant teknoloji kullanılarak, patojen mikroorganizma ve konak organizma arasında istenmeyen çapraz reaksiyonlara yol açmayacak multivalan bir aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Söz konusu aşı, 26 valanlı olup streptokoksik farenjit ve invazif enfeksiyonlara neden olan M tiplerinden 1.0, 1.2, 2, 3, 5, 6, 11, 12, 14, 18, 19, 22, 24, 28, 29, 33, 43, 59, 75, 76, 77, 89, 92, 94, 101 ve 114'ü kapsamaktadır^{2,3}. Aşıların kapsayacağı M tiplerine karar verilirken, yapılan epidemiyolojik çalışmaların sonuçları göz önünde bulundurulmaktadır. Bu çalışmada, yeni aşı çalışmalarına ışık tutmak amacıyla, laboratuvarımızda izole edilen AGS'lerin M proteininin *emm* gen dizi analizi yöntemiyle tiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya iki yıllık süre içinde, hastanemize başvuran erişkin ve çocuk hastaların örneklerinden izole edilen 35 AGS suşu dahil edildi. Kan kültüründe üreyen suşlar invazif; boğaz ve apse kültüründe üreyen suşlar ise invazif olmayan suşlar olarak kabul edildi⁴. Bakteriler tür düzeyinde konvansiyonel yöntemler (Gram boyama, katalaz, basitrasin ve trimetoprim-sülfametoksazol) ve 16S rRNA amplikon dizi analiziyle tanımlandı.

Suşlardan genomik DNA izolasyonu, InstaGene matrix (BioRad, ABD) izolasyon kitiyle yapıldı. 16S rRNA amplifikasyonu için 16S20: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' ve 16S1390: 5' GAC GGG CGG TGT GTA CAA 3' primerleri kullanıldı. İzolatların *emm* tiplerinin belirlenmesi için CDC tarafından önerilen EMM1: TATCCCTTAGAAAATTAA ve EMM2: GCAAGTTCTTCAGCTTGTT primerleriyle *emm* gen bölgesi çoğaltıldı. *emm* ve 16S rRNA amplikonları MacroGen (Güney Kore) firmasına gönderilerek DNA dizi analizi gerçekleştirildi. Dizileme, iki yönde ve PCR için kullanılan primerler yardımıyla yapıldı. 16S rRNA dizileri NCBI Nucleotide Blast programı kullanılarak Gen Bankası ile karşılaştırıldı. *emm* tiplerinin belirlenmesinde elde edilen dizi sonuçları CDC'nin *emm* dizi veri bankası (Streptococci Group A Subtyping Request Form Blast 2.0 Server) ile karşılaştırılarak belirlendi.

Antibiyotik duyarlılık testi, %5 koyun kanı içeren Mueller-Hinton besiyeri kullanılarak agar dilüsyon yöntemiyle CLSI kriterlerine göre uygulandı ve değerlendirildi⁵.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 35 AGS suşunun 16S rRNA bölgesinin DNA dizisi gen bankasıyla karşılaştırılmış ve *S.pyogenes* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlardan ampikon elde edilebilen 23'ünün *emm* tiplendirmesi yapılmış ve 15 farklı *emm* genotipi saptanmıştır. En sık saptanan tipler *emm1* (%22), *emm89* (%13), *emm18* (%9) ve *emm19* (%9) olmuş; diğer *emm* tipleri (*emm5*, 12, 14,17, 26, 29, 37, 74, 78, 92, 99) %47 oranında bulunmuştur. Kan izolatlarında ise *emm1*, 12, 19, 74, 89 ve 99 genotipleri gözlenmiştir (Tablo I).

Antibiyotik duyarlılık testinde penisilin, ampisilin, eritromisin, linkomisin, gentamisin, kloramfenikol, vankomisin ve linezolid direnci saptanmamış; altı suшта levofloksasin (MİK= 4 ve 16 µg/ml), bir suшта ise tetrasiklin direnci (MİK= 16 µg/ml) belirlenmiştir. *emm* genotipleri belirlenen suşların örneklere göre dağılımı ve antibiyotik MİK değerleri Tablo I'de görülmektedir.

Tablo I. *emm* Genotipleri Belirlenen *S.pyogenes* Suşlarının Örneklere Göre Dağılımı ve Antibiyotik MİK Değerleri (µg/ml)

Sıra	<i>emm</i>	Örnek	ERM	LCM	PCN	LEV	GEN	CAM	VAN	AMP	TET
1	<i>emm1</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	0.25	4	2	0.125	< 0.06	0.25
2	<i>emm1</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	0.25	4	4	0.125	< 0.06	0.25
3	<i>emm1</i>	Kan	< 0.06	0.25	< 0.06	0.25	8	4	0.125	< 0.06	0.25
4	<i>emm1</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	0.25	4	4	0.125	< 0.06	0.25
5	<i>emm1</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	16	8	4	0.125	< 0.06	0.25
6	<i>emm5</i>	Boğaz	< 0.06	< 0.06	< 0.06	0.5	8	4	0.125	< 0.06	0.25
7	<i>emm12</i>	Kan	< 0.06	< 0.06	< 0.06	0.25	4	2	0.125	< 0.06	0.125
8	<i>emm14</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	4	4	4	0.125	< 0.06	0.25
9	<i>emm17</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	4	8	4	0.125	< 0.06	16
10	<i>emm18</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	0.25	8	2	0.125	< 0.06	0.125
11	<i>emm18</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	0.125	8	4	0.125	< 0.06	0.25
12	<i>emm19</i>	Kan	< 0.06	0.25	< 0.06	16	8	4	0.125	< 0.06	0.125
13	<i>emm19</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	0.125	4	4	0.125	< 0.06	0.5
14	<i>emm26</i>	Apse	< 0.06	0.25	< 0.06	16	8	4	0.125	< 0.06	0.25
15	<i>emm29</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	0.125	8	4	0.125	< 0.06	0.25
16	<i>emm37</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	0.125	4	4	0.125	< 0.06	0.25
17	<i>emm74</i>	Kan	< 0.06	< 0.06	< 0.06	2	4	4	0.125	< 0.06	0.125
18	<i>emm78</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	0.125	4	4	0.125	< 0.06	0.25
19	<i>emm89</i>	Kan	< 0.06	0.25	< 0.06	0.125	4	4	0.125	< 0.06	0.125
20	<i>emm89</i>	Boğaz	< 0.06	0.25	< 0.06	0.5	1	4	0.125	< 0.06	0.25
21	<i>emm89</i>	Kan	< 0.06	0.25	< 0.06	0.25	4	2	0.125	< 0.06	0.25
22	<i>emm92</i>	Apse	< 0.06	0.25	< 0.06	16	8	4	0.125	< 0.06	0.25
23	<i>emm99</i>	Kan	< 0.06	< 0.06	< 0.06	0.5	1	4	0.125	< 0.06	0.25

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu; ERM: Eritromisin; LCM: Linkomisin; PCN: Penisilin; LEV: Levofloksasin; GEN: Gentamisin; CAM: Kloramfenikol; VAN: Vankomisin; AMP: Ampisilin; TET: Tetrasiklin.

TARTIŞMA

S.pyogenes, toplumda beta-hemolitik streptokok enfeksiyonlarının en önemli etkenidir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde AGS'lerin neden olduğu hastalıkların gerek klinik spektrumları gerekse moleküler epidemiyolojik özellikleri farklılık göstermektedir⁶. Örneğin Avustralya'da⁷ bakteriyemilerden izole edilen 132 AGS suşunda en sık *emm1*, *emm92*, *emm89*, *emm8*, *emm12* tipleri saptanırken, Hindistan'da⁸ klinik örneklerden izole edilen *S.pyogenes* suşlarında en sık *emm12*, *emm92*, *emm81* ve *emm70*; Meksika'da⁹ ise farengitli çocuklardan izole edilen *S.pyogenes* suşlarında en sık *emm1*, *emm12*, *emm3* ve *emm4* tipleri saptanmıştır. Shulman ve arkadaşları¹⁰, Kuzey Amerika'da benzer bir çalışma grubunu kapsayan iki yıllık araştırmada, birinci yıl en sık izole edilen tipleri *emm12* (%20.6), *emm1* (%15.5), *emm28* (%13.1) ve *emm4* (%8.3); ikinci yıl ise *emm1* (%22.3), *emm12* (%16.3), *emm4* (%8.4) ve *emm28* (%8.1) olarak belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar, ardışık iki yıl süresince izole edilen suşların aynı *emm* tiplerine sahip olduklarını, ancak izole edilme sıklıklarında değişme olduğunu ifade etmişlerdir¹⁰. Ülkemizde Dünder ve arkadaşlarının¹¹ yaptığı çalışmada, 127 *S.pyogenes* suşunda en sık *emm4*, *emm1*, *emm2*, *emm114* ve *emm89* tipleri bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 15 farklı *emm* genotipi saptanmış; *emm1* (%22), *emm89* (%13), *emm18* (%9) ve *emm19* (%9) en sık saptanan tipler olmuştur. Çalışmamızda kan kültürlerinden izole edilen suşlarda en sık *emm1*, *emm12*, *emm19*, *emm74*, *emm 89* ve *emm 99* tiplerinin saptandığı dikkati çekmiştir.

Bir streptokok aşısının amacı, toplumda dolaşan suşların büyük çoğunluğunu kapsayarak taşıyıcılığı ve AGS ile ilişkili hastalıkları azaltmaktır. İdeal bir aşının, invazif enfeksiyonlara ve poststreptokoksik sekeller gibi hayatı tehdit eden komplikasyonlara yol açan tipleri kapsamaya arzu edilmektedir³. Faz II çalışmaları devam eden 26 valanlı AGS aşısı, ABD'deki farengial ve invazif suşların %80-90'ını kapsamaktadır¹². Yapılan çalışmalarda, aşının toplumda görülen *emm* tiplerini kapsama oranı Nepal'de %23.9, Etiyopya'da %27.6, Danimarka'da %54.3, ABD'de %68.9, Brezilya'da %32 ve Belçika'da %76 olarak bulunmuştur¹³. Bizim çalışmamızda da, saptadığımız 15 *emm* tipinin 9 (%60)'unun (*emm1*, 5, 12, 14, 18, 19, 29, 89, 92) geliştirilen aşının kapsamı içinde olduğu belirlenmiştir. Bir diğer açıdan değerlendirildiğinde, *S.pyogenes* ile enfekte 23 olgudan 17 (%74)'sinin aşı içeriğinde bulunan tipler ile enfekte olduğu ve ayrıca kan izolatlarında tespit edilen 4 *emm* tipinin (*emm1*, 12, 19, 89) de geliştirilen aşının kapsamı içinde yer aldığı görülmüştür (Tablo I).

Grup A beta-hemolitik streptokok enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçilecek antibiyotik penisilindir. Penisilin allerjisi olan hastalarda makrolid grubu antibiyotikler tercih edilmektedir. Yıllardır tüm dünyada yaygın olarak kullanılan penisiline karşı henüz direnç gelişmemiş olmakla birlikte, bazı ülkelerde makrolid direncinin arttığı vurgulanmaktadır. Makrolid direnç oranı Avrupa'da %2-47 arasında değişirken, Taiwan gibi bazı ülkelerde çok yüksek oranda (%63.2) bildirilmektedir¹⁴. Son yıllarda ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalar, in vitro penisilin direncinin oluşmadığını doğrular niteliktedir^{15,16}. Çalışmamızda da, penisilin, ampisilin, eritromisin, linkomisin, gentamisin, kloramfenikol, vankomisin ve linezolid direncine rastlanmamış; altı suşta levofloksasin ve bir suşta tetrasiklin direnci belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ülkemizde AGS enfeksiyonları ve komplikasyonlarının önlenmesi için, enfeksiyonların sıklığı, risk faktörleri ve izolatların genotip veya serotiplerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bölgesel verilerin sunulduğu bu çalışmanın en önemli sınırlaması, invazif olan ve olmayan az sayıda izolatı içermesidir. Bulgularımız, *S.pyogenes* izolatlarında saptanan *emm* tiplerinden %60'ının, 26 valanlı aşının içeriğinde yer aldığını göstermekle birlikte, ülkemiz ile ilgili yeterli verinin elde edilebilmesi için çok merkezli ile-ri çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. O'Loughlin RE, Roberson A, Cieslak PR, et al. The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000-2004. *Clin Infect Dis* 2007; 45(7): 853-62.
2. 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.
3. Richardson LJ, Towers RJ, Cheng AC, et al. Diversity of *emm* sequence types in group A beta-haemolytic streptococci in two remote Northern Territory Indigenous communities: implications for vaccine development. *Vaccine* 2010; 28(32): 5301-5.
4. Wajima T, Murayama SY, Sunaoshi K, Nakayama E, Sunakawa K, Ubukata K. Distribution of *emm* type and antibiotic susceptibility of group A streptococci causing invasive and non-invasive disease. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 11): 1383-8.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth Informational Supplement, M100-S20. 2010. CLSI, Wayne, PA.
6. Pfoh E, Wessels MR, Goldmann D, Lee GM. Burden and economic cost of group A streptococcal pharyngitis. *Pediatrics* 2008; 121(2): 229-34.
7. Harris P, Siew DA, Proud M, Buettner P, Norton R. Bacteraemia caused by beta-haemolytic streptococci in North Queensland: changing trends over a 14-year period. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(8): 1216-22.
8. Menon T, Lloyd C, Malathy B, Sakota V, Jackson D, Beall B. *emm* type diversity of beta-haemolytic streptococci recovered in Chennai, India. *J Med Microbiol* 2008; 57(4): 540-2.
9. Espinosa LE, Li Z, Gomez Barreto D, et al. 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* 2003; 41(1): 373-8.
10. Shulman ST, Tanz RR, Kabat W, et al. Group A streptococcal pharyngitis serotype surveillance in North America, 2000-2002. *Clin Infect Dis* 2004; 39(3): 325-32.
11. Dundar D, Sayan M, Tamer GS. Macrolide and tetracycline resistance and *emm* type distribution of *Streptococcus pyogenes* isolates recovered from Turkish patients. *Microb Drug Resist* 2010; 16(4): 279-84.
12. World Health Organization. Initiative for Vaccine Research (IVR). Bacterial Infections: Group A Streptococcus. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_bacterial/en/index3.html#
13. Smeesters PR, Mardulyn P, Vergison A, Leplae R, Van Melderen L. Genetic diversity of Group A streptococcus M protein: implications for typing and vaccine development. *Vaccine* 2008; 26(46): 5835-42.
14. Binatlı Akçakaya N. Çocukluk çağında tekrarlayan streptokok enfeksiyonları, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Solunum Yolu Enfeksiyonları Sempozyumu, 21 Ocak 2000, İstanbul. Sempozyum Kitabı, s: 37-42.
15. Çiragil P, Gül M, Aral M, Güler İ. Çeşitli örneklerden izole edilen beta-hemolitik streptokokların gruplandırılması ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2003; 17(4): 414-7.
16. Demirel M, Yegane Tosun S, Gündüz T, Aksu S. Çocuklarda yapılan boğaz kültürlerinde A grubu beta-hemolitik streptokok sıklığı ve antibiyotik duyarlılığı. *ANKEM Derg* 2001; 15(4): 744-7.