

# *Streptococcus pyogenes* İzolatlarının Virülans Faktörlerinin Araştırılması ve “Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Fingerprinting (MLVF)” Yöntemi ile Tiplendirilmesi

## Investigation of *Streptococcus pyogenes* Virulence Factors and Typing by Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Fingerprinting (MLVF) Method

Hatice TÜRK DAĞI<sup>1</sup>, Şerife YÜKSEKKAYA<sup>2</sup>, Tuba SEYHAN<sup>1</sup>, Duygu FINDIK<sup>1</sup>, İnci TUNCER<sup>1</sup>, Uğur ARSLAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

<sup>1</sup> Selçuk University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Konya, Turkey.

<sup>2</sup> Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Konya.

<sup>2</sup> Konya Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Konya, Turkey.

\*Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (Proje no: 13101131) desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 19.01.2018 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 29.04.2018

### ÖZ

*Streptococcus pyogenes*, konağın boğaz ve cildini kolonize eden, farenjit, tonsillit ve impetigo gibi hafif enfeksiyonların yanı sıra streptokoksik toksik şok sendromu, septisemi ve nekrotizan fasiit gibi şiddetli invaziv enfeksiyonlara neden olan ve çeşitli virülans faktörleri üreten önemli bir bakteriyel patojendir. Bu çalışmada tonsillo-farenjitli hastaların boğaz kültürlerinden elde edilen *S.pyogenes* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması, virülans faktörlerinin [pirojenik ekzotoksin genleri (*speA*, *C*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L*, *M*, *smeZ* ve *ssa*), deoksiribonükleaz genleri (*sdaB*, *spd3*, *sdc* ve *sdaD*), proteaz genleri (*speB*, *spyCEP* ve *scpA*) ve inhibitör genlerinin (*mac* ve *sic*)] belirlenmesi ve “multiple locus variable number tandem repeat fingerprinting (MLVF)” yöntemiyle tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada 150 adet *S.pyogenes* izolatı konvansiyonel yöntemler ve streptokok grup A lateks kiti (Biomerieux, Fransa) ile tanımlanmış, antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle “Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI” önerilerine göre çalışılmış ve değerlendirilmiştir. DNA izolasyonu, ticari bir DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Virülans genleri multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle belirlenmiş, MLVF analizi bakteri genomu içinde yer alan tekrarlayan dizilere özgül primerler kullanılarak multipleks PCR yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda *S.pyogenes* izolatlarının tamamının penisilin G, sefotaksim, seftriakson, eritromisin, klindamisin,

**İletişim (Correspondence):** Doç. Dr. Hatice Türk Dağı, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 42131, Selçuklu, Konya, Türkiye. Tel (Phone): + 90 505 253 3638, E-posta (E-mail): haticeturkdagi@yahoo.com

levofloksasin, kloramfenikol, vankomisin ve linezolidde duyarlı olduğu belirlenmiştir. Pirojenik ekzotoksin genleri arasında en sık *smeZ* (%90.0), ardından *speG* (%88.0), *speC* (%58.7), *ssa* (%42.7), *speA* (%33.3), *speJ* (%24.0), *speK* (%18.7), *speH* (%14.0), *speI* (%13.3), *speL* ve *speM* (%9.3) saptanmıştır. Deoksiribonükleaz genlerinden *sdaB* tüm izolatlarda (%100) saptanırken *spd3*, *sdC*, *sdaD* genleri sırasıyla %64.7, %36.0 ve %24.7 oranlarında tespit edilmiştir. Proteaz genleri (*speB*, *spyCEP*, *scpA*) ve inhibitör genlerinden *mac*, izolatların tamamında pozitifken *sic* geni yalnız 3 (%2.0) izolatta pozitif olarak belirlenmiştir. MLVF analizinde her birinde iki veya daha fazla izolatın yer aldığı 32 farklı patern belirlenmiştir. İzolatların 91'i 32 farklı paternin herhangi birinde yer alırken, 59'u sporadik izolat olarak tanımlanmıştır. Sonuç olarak, semptomatik tonsillo-farenjitli hastaların boğaz kültürlerinden elde edilen *S.pyogenes* izolatlarının tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu ve çok yüksek oranda virülans faktör geni taşıdıkları, ancak izolatların çoğunlukla klonal olarak ilişkisiz ve sporadik olduğu saptanmıştır. Bu çalışma, *S.pyogenes* izolatlarının MLVF yöntemiyle tiplendirildiği ve çok sayıda virülans faktörünün araştırıldığı Türkiye'de yapılmış ilk araştırmadır.

**Anahtar sözcükler:** *Streptococcus pyogenes*; virülans faktörleri; MLVF yöntemi.

## ABSTRACT

*Streptococcus pyogenes* is an important bacterial pathogen that colonizes the throat and skin of human beings and causes a wide variety of diseases ranging from mild infections like pharyngitis, tonsillitis and impetigo to severe invasive infections such streptococcal toxic shock syndrome, septicemia, and necrotizing fasciitis, and produces a wide variety of virulence factors. The aim of this study was to investigate the antibiotic resistance, virulence genes; [pyrogenic exotoxin genes (*speA*, *C*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L*, *M*, *smeZ* and *ssa*), deoxyribonuclease genes (*sdaB*, *spd3*, *sdC* ve *sdaD*), protease genes (*speB*, *spyCEP* ve *scpA*) and inhibitor genes (*mac* and *sic*)] of *S.pyogenes* strains isolated from throat cultures of patients with symptomatic tonsillo-pharyngitis and typing by multiple locus variable number tandem repeat fingerprinting (MLVF) method. One hundred and fifty *S.pyogenes* isolates were identified by conventional methods and streptococcus group A latex kit (Biomerieux, France). Antibiotic susceptibility tests were performed by Kirby-Bauer disk diffusion method as recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute. DNA isolation was performed by using a commercial DNA isolation kit (Qiagen, Germany) in accordance with manufacturer's recommendations. The virulence genes were determined by multiplex PCR. MLVF method was performed with multiplex PCR using specific primers for repeated sequences within bacterial genome. All of the *S.pyogenes* isolates were susceptible to penicillin G, cefotaxime, ceftriaxone, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, levofloxacin, vancomycin and linezolid. Among streptococcal pyrogenic exotoxin genes the most frequent gene was *smeZ* (90.0%) followed by *speG* (88.0%), *speC* (58.7%), *ssa* (42.7%), *speA* (33.3%), *speJ* (24.0%), *speK* (18.7%), *speH* (14.0%), *speI* (13.3%), *speL* and *speM* (9.3%). Of the DNase genes, *sdaB* was detected in all strains (100%), *spd3*, *sdC*, *sdaD* genes were determined as 64.7%, 36.0%, 24.7% respectively. Protease genes (*speB*, *spyCEP*, *scpA*) and *mac* gene from the inhibitor genes were positive in all strains, and *sic* gene was positive in only 3 (2.0%) of the isolates. Thirty-two different patterns that contained two or more isolates were determined by MLVF analysis. Ninety one isolates were included in any of the 32 different patterns, while 59 isolates were defined as sporadic isolates. In conclusion, *S.pyogenes* isolates collected from throat cultures of patients with symptomatic tonsillo-pharyngitis in Konya/Turkey were susceptible to all antibiotics studied and have carried a very high rate of virulence factors. However the isolates were mostly clonally unrelated and sporadic. This study is the first report in Turkey, in which *S.pyogenes* isolates were typed by the MLVF method and a large number of virulence factors were investigated.

**Keywords:** *Streptococcus pyogenes*; virulence factors; MLVF method.

## GİRİŞ

Beta-hemolitik streptokoklar içinde patojenitesi en yüksek olan A grubu beta-hemolitik streptokokların (AGBHS) tek üyesi *Streptococcus pyogenes* geniş enfeksiyon yelpazesi nedeniyle klinik, laboratuvar ve epidemiyolojik olarak araştırılan bir mikroorganizma olmuştur. *S.pyogenes*, insanlarda boğaz ve cildi kolonize ederek farenjit, tonsillit ve impetigo gibi hafif enfeksiyonların yanı sıra streptokoksik toksik şok sendromu, septisemi ve nekrotizan fasiit gibi şiddetli invaziv enfeksiyonlara ve akut romatizmal ateş (ARA), akut glomerülonefrit (AGN) gibi sekellere neden olan çeşitli virülans faktörlerine sahip önemli bir bakteriyel patojendir<sup>1,2</sup>.

*S.pyogenes* yüzeyle ilişkili, sekretuar faktörler ve toksinler gibi önemli virülans faktörlerine sahiptir. *S.pyogenes*'in *speA*, *C*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L*, *M*, *smeZ* ve *ssa* genlerince kodlanan çok sayıda pirojenik ekzotoksin (Spe) tanımlanmıştır. Spe'ler süper antijen olup konvansiyonel antijen işleme yollarını atlayan ve tümör nekroz faktörü (TNF)-alfa, interlökin (IL)-1, TNF-beta, IL-2, interferon (IFN)-gama gibi sitokinlerin salınımını indükleyerek çok sayıda T hücrelerini aktive eden protein yapıda hücre dışı toksinlerdir. Özellikle *speA*, *speK*, *smeZ* ve *ssa* genlerince kodlanan Spe'lerin streptokoksik toksik şok sendromuna neden oldukları düşünülmektedir. Kızıl hastalığındaki döküntülerin ortaya çıkışında da *SpeA* ve *SpeC*'nin rolü bulunmaktadır<sup>3,4</sup>.

*S.pyogenes*'in salgıladığı enzimlerden deoksiribonükleaz (DNaz) DNA'yı depolimerize etmektedir. DNaz, enzimatik debridman yaparak ortamın akıcılığını artırmakta ve bakterinin yayılmasını sağlamaktadır. İmmünolojik-elektroforetik olarak A, B, C, D şeklinde dört farklı tipe ayrılan DNaz'lar, B ve D nükleazları ayrıca ribonükleaz (RNaz) aktivitesine sahiptir<sup>5,6</sup>. *speB*, *spyCEP* ve *scpA* genlerinin kodladığı proteazlar ise *S.pyogenes* tarafından salgılanan ve doku yıkımına neden olan enzimlerdir. Önceden pirojenik ekzotoksin olduğu düşünülerek yanlış isimlendirilen *speB*, komplemanın C3b faktörünü ve IL-1 ve immünglobulinler gibi immün yanıtta rol oynayan diğer birçok konakçı faktörü inaktive edebilen bir sistein proteazdır. *scpA* geni tarafından kodlanan C5a peptidaz, *S.pyogenes*'in yüzeyinde bulunan bir C5a'ya spesifik serin proteazdır ve bakterinin kompleman sisteminden ve dolayısıyla nötrofillerin fagositozundan kaçmasını sağlamaktadır<sup>7,8</sup>.

*S.pyogenes* enfeksiyonlarında tedavinin amacı klinik iyileşmeyi sağlamakla birlikte, ARA gelişmesini, süpüratif komplikasyonları ve bakterinin yayılmasını önlemektir. Tedavide ilk seçenek penisilin grubu antibiyotiklerdir. Günümüzde bu grup bakterilerde henüz penisilin direnci saptanmamıştır. Penisilin allerjisi olanlarda eritromisin veya diğer makrolidler kullanılabilir. *S.pyogenes* suşlarında makrolid direnci özellikle makrolidlerin sık kullanıldığı ülkelerde yüksektir<sup>9</sup>.

*S.pyogenes*'in farklı coğrafi bölgelerde virülans faktörleri ve antibiyotiklere direnç profilindeki değişiklikler, etken olduğu enfeksiyonların değişen epidemiyolojisini açıklayabilir. Bu çalışma, tonsillofarenjitli hastaların boğaz kültürlerinden izole edilen *S.pyogenes* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması, virülans genlerinin [pirojenik ekzo-

toksin genleri (*speA*, *C*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L*, *M*, *smeZ* ve *ssa*), DNaz genleri (*sdaB*, *spd3*, *sdc* ve *sdaD*), proteaz genleri (*speB*, *spyCEP* ve *scpA*) ve inhibitör genleri (*mac* ve *sic*) belirlenmesi ve "multiple locus variable number tandem repeat fingerprinting (MLVF)" yöntemiyle tiplendirilmesi amacıyla yapılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 29.01. 2013 ve Karar No: 2013/01).

Çeşitli kliniklere başvuran ve tonsillofarenjit ön tanısı alan hastaların boğaz sürüntü örneklerinden elde edilen 150 adet *S.pyogenes* izolatu çalışmaya alındı. Boğaz sürüntü örnekleri %5 koyun kanlı Columbia agara (Biomerieux, Fransa) ekilerek 35°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda beta-hemoliz yapan kolonilere katalaz testi uygulandı. Katalaz negatif kolonilere Gram boyama yapıldı. Gram-pozitif boyanan kolonilerden %5 koyun kanlı agara ekim yapılarak basitrasin diski (0.04 ünite) ve trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SXT) diski (1.25 µg trimetoprim + 23.75 µg sülfametoksazol) yerleştirildi. Aerop koşullarda, 35°C'de bir gece inkübe edilerek basitrasin diski etrafında inhibisyon zonu bulunan ancak TMP-SXT diski etrafında inhibisyon zonu bulunmayan plaklardaki bakteriler olası AGBHS olarak tanımlandı. AGBHS olarak düşünülen, streptokok grup A lateks kiti (Slidex Strepto Plus A, Biomerieux, Fransa) ile aglütinasyon veren bakteriler AGBHS olarak doğrulandı.

Antibiyotik duyarlılık testi Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda çalışıldı ve değerlendirildi. Kalite kontrol olarak *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 suşu kullanıldı<sup>10</sup>.

DNA izolasyonu ticari bir DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda yapıldı. *S.pyogenes* suşlarında 20 virülans faktör geni (*spd3*, *sdc*, *sdaB*, *sdaD*, *speB*, *spyCEP*, *scpA*, *mac*, *sic*, *speL*, *K*, *M*, *C*, *I*, *A*, *H*, *G*, *J*, *smeZ* ve *ssa*) Tablo I'de belirtilen özgül primerler kullanılarak multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırıldı. Amplifikasyon ürünleri %1.5 SeaKemLE agaroz jelde yürütüldükten sonra etidyum bromür ile boyandı ve çalışılan genlere uygun baz çifti amplikon varlığı pozitif olarak değerlendirildi. *sdaB*, *speB*, *spyCEP*, *scpA* ve *mac* genlerinin primerleri tüm AGBHS suşlarında bulunan kromozomal genleri tespit etmesi nedeniyle PCR amplifikasyonu sırasında pozitif kontrol olarak kullanıldı<sup>11</sup>.

MLVF yöntemi için bakteri genomu içinde yer alan tekrarlayan sekanslara özgül Tablo II'de verilen primerler kullanılarak multipleks PCR yapıldı<sup>12</sup>. Amplifikasyon ürünleri %2.5 NuSieve agaroz jelde yürütüldükten sonra etidyum bromür ile boyandı. DNA bant profillerinin dendrogramı "Gel Compar II" yazılımı (versiyon 6.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belçika) kullanılarak çizildi ve "clusterler Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)" yöntemiyle belirlendi.

**Tablo 1.** *Streptococcus pyogenes* Suşlarının Virülans Genlerinin Saptanması İçin Kullanılan Primerler

	Virülans geni	Primer sekans (5'-3')	Baz çifti
Miks 1	<i>speL</i>	CCTGAGCCGTGAAATCCCA ACACCAGAATTGTCGTTTGGT	657
	<i>speK</i>	CCTTGTGTGTATCGCTTGC TTGCTGTCCCCATCAAAC	568
	<i>speM</i>	ATCGCTCATCAAACCTTTTCCT CCTTGTGTGTATCGCTTGC	496
	<i>speC</i>	GCCAAATTCGATTCTGCCGC TGCAGGGTAAATTTTTCAACGACA	405
	<i>smeZ</i>	TTTCTCGTCTGTGTTTGGGA TTCCAATCAAATGGGACGGAGAA- CA	246
	<i>speI</i>	TTCATAGACGGCGTTCAACAA TGAAATCTAGAGGAGCGGCCA	176
Miks 2	<i>ssa</i>	AAGAATACTCGTTGTAGCATGTGT AATATTGCTCCAGGTGCGGG	678
	<i>speA</i>	AGGTAGACTTCAATTTGGCTTGTGT GGGTGACCCTGTACTCAGC	576
	<i>speH</i>	TGAGATATAATTGTGCGCTACTCACAT CCTGAGCGGTTACTTTCCGT	480
	<i>speG</i>	TGGAAGTCAATTAGCTTATGCAG GCGAACAACCTCAGAGGGCAA	384
	<i>speJ</i>	TCCTTGACTAGATGAGGTTGCAT GGTGGGTTACACCATCAGT	286
Miks 3	<i>spd3</i>	ATCGTCGTAATTTGGCAAGGTT GCCGCTTCTTCAAACCTTTCC	784
	<i>sdc</i>	AAGCTTAGAACTCTCTCGCCA AGTTCAGTAATAGCGTTTTTCCGT	600
	<i>sdaB</i>	TATAGCGCATGCCGCCTTTT TGATGGCGCAAGCAAGTACC	440
	<i>sdaD</i>	TTTACGCTGAATCGGGCACT GGCTCTGGTTTGCCTTCCCA	295
Miks 3	<i>speB</i>	AGACGGAAGAAGCCGTCAGA TCAAAGCAGGTGCACGAAGC	952
	<i>spyCEP</i>	GATCCGGCCCATCAAAGCAT AGCTGCCACTGATGTTGGTG	786
	<i>scpA</i>	GCTCGGTTACCTCACTTGTC CAATAGCAGCAAACAAGTCAAC	622
	<i>mac</i>	TCTTGCCCTGTTGAAAGTGT CGAGGTGGTATTTTTGACGCC	389
	<i>sic</i>	TTACGTTGCTGATGGTGTATATGGT TTTGATAGAGGTTTTTCAGCTGGC	150

## BULGULAR

Çalışmada kullanılan izolatların elde edildiği hastaların yaş aralığının 6-25 yıl arasında olduğu belirlenmiştir. Hastaların yaş dağılımı; 6-10 yaş grubunda 33 (%22) hasta, 11-15 yaş grubunda 76 (%51) hasta, 16-20 yaş grubunda 29 (%19) hasta ve 20-25 yaş grubunda 12 (%8) hasta olarak saptanmıştır. Hastaların cinsiyete göre dağılımı da incelenmiş ve 76 (%51) hastanın kadın, 74 (%49) hastanın ise erkek olduğu tespit edilmiştir.

Boğaz kültürlerinden izole edilen 150 adet *S.pyogenes* izolatının tamamının penisilin G, sefotaksim, seftriakson, eritromisin, klindamisin, levofloksasin, kloramfenikol, vankomisin ve linezolidde duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Pirojenik ekzotoksin genleri arasında en sık *smeZ* (%90.0) geni, ardından *speG* (%88.0), *speC* (%58.7) ve en az sıklıkta ise *speL* ve *speM* genleri (%9.3) saptanmıştır (Tablo III). DNaz genlerinden *sdAB* tüm izolatlarda saptanırken *spd3* 97 (%64.7), *sdC* 54 (%36.0) ve *sdAD* 37 (%24.7) izolatta tespit edilmiştir. Proteaz genleri (*speB*, *spyCEP*, *scpA*) ve inhibitör genlerinden *mac* izolatların tamamında pozitifken *sic* geni sadece 3 (%2.0) izolatta pozitif olarak belirlenmiştir. Multipleks PCR ile saptanan virülans genlerinin örnek jel görüntüleri Resim 1-4'te gösterilmiştir.

MLVF yöntemi ile tiplendirilen 150 *S.pyogenes* izolatında, MLVF paternleri en az üç banttandır (altı izolat) oluşmuştur. En yaygın paternler 4 (56 izolat) ya da 5 (58 izolat) bant içermektedir. Bütün primerlerin pozitif olduğu yedi bant içeren iki izolat ve altı bant

**Tablo II.** MLVF Yöntemi İçin Kullanılan Primerler

Primer adı	Primer dizisi (5'-3')
Spy1F	AGTTGCCGGTGCAGCATCAG
Spy1R	AGCGCAGCAGCTGTAAGAA
Spy2F	CAGCTGCTGAAGATGGCTTATCAG
Spy2R	GCGTTGGGGTAACGAGTATAGC
Spy3F	AGGTGCAAGTGCCGGTTAAGG
Spy3R	GTCGTGAGCTGCCGGTGTITTTG
Spy4F	CCTGATCACTATTAGTAACAGACTTAAC
Spy4R	ACTGCATGATGACTGGGTACAC
Spy5F	GCCAACTAAGGGTTCAGGTCAG
Spy5R	TCTGGTTCCTTGTATCAAAGTGA
Spy6F	CTCACGTAAGCCGCTGATGA
Spy6R	CTCCCAAAGACCAGTCGTCTC
Spy7F	TAAATTCTCAAACATCTTATCAGTTTCATTTGAG
Spy7R	CTCAAACAACGATGATGCTGACAGAGACTATG

**Tablo III.** *Streptococcus pyogenes* İzolatlarında Pirojenik Ekzotoksin Genlerinin Sıklığı

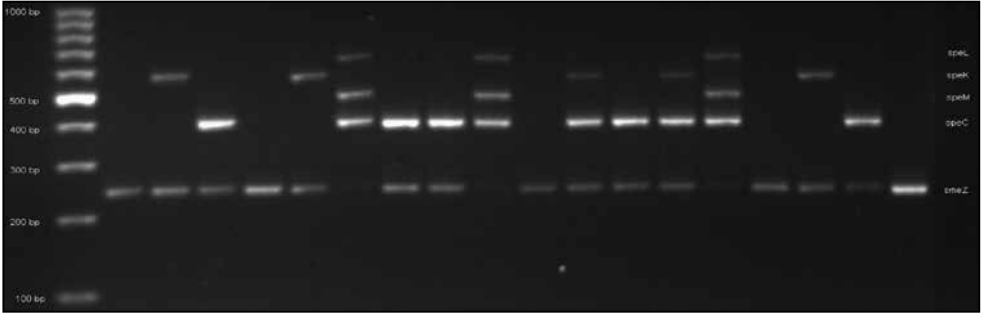
Virülans geni	Pozitif suş	
	Sayı	Yüzde
<i>smeZ</i>	135	90.0
<i>speG</i>	132	88.0
<i>speC</i>	88	58.7
<i>ssa</i>	64	42.7
<i>speA</i>	50	33.3
<i>speJ</i>	36	24.0
<i>speK</i>	28	18.7
<i>speH</i>	21	14.0
<i>speI</i>	20	13.3
<i>speL</i>	14	9.3
<i>speM</i>	14	9.3

içeren 28 izolat saptanmıştır. MLVF analizinde iki veya daha fazla izolatin yer aldığı 32 farklı patern belirlenmiştir. İzolatların 91'i 32 farklı paternin herhangi birinde yer alırken, 59'u sporadik izolat olarak tanımlanmıştır. En büyük iki küme 19 ve 24, sırasıyla altı ve beş izolattan oluşmuştur (Şekil 1). İzolatların MLVF paternleriyle virülans özellikleri arasında ilişki saptanmamıştır. MLVF yöntemi ile aynı paternde yer alan izolatların virülans genleri farklı bulunmuştur.

## TARTIŞMA

*S. pyogenes*, farenjitten şiddetli invaziv enfeksiyonlara ve nekrotizan fasiite kadar değişen çeşitli klinik durumlara neden olan önemli bir bakteriyel patojendir. Türkiye'de AGBHS enfeksiyonlarının klinik, epidemiyolojik ve mikrobiyolojik özellikleriyle ilgili çalışmalar yetersizdir. İnvaziv AGBHS enfeksiyonlarıyla ilgili olarak ülkemizde yapılan ilk toplum kökenli sürveyans çalışmasında, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Avrupa ülkeleri ile karşılaştırıldığında invaziv AGBHS hastalıklarının Türkiye'de düşük endemisyete sahip olduğu görülmüştür<sup>13</sup>.

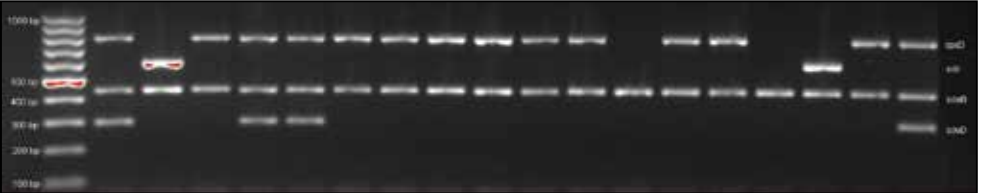
*S. pyogenes* farenjitinin doğru tanısı ve uygun antimikrobiyal tedavisi, ARA ve süpüratif komplikasyonların önlenmesi, klinik belirti ve bulguların iyileştirilmesi, bulaşıcılığın hızla düşürülmesi, aile üyeleri ve hastanın diğer temas ettiği kişilere geçişin azaltılması için önemlidir. Tedavide dar antibakteriyel spektrumu ve düşük maliyeti dikkate alındığında



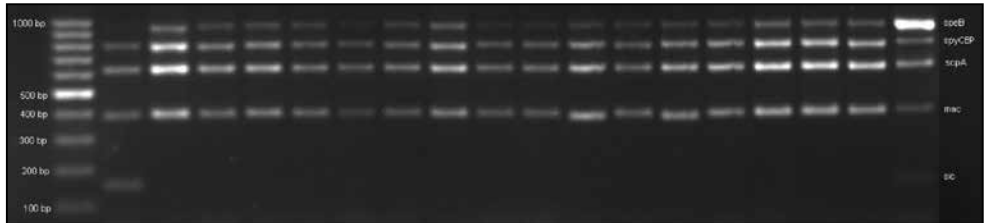
**Resim 1.** Miks 1 primer seti ile yapılan multipleks PCR çalışmasında saptanan virülans genlerinin örnek jel görüntüsü.



**Resim 2.** Miks 2 primer seti ile yapılan multipleks PCR çalışmasında saptanan virülans genlerinin örnek jel görüntüsü.

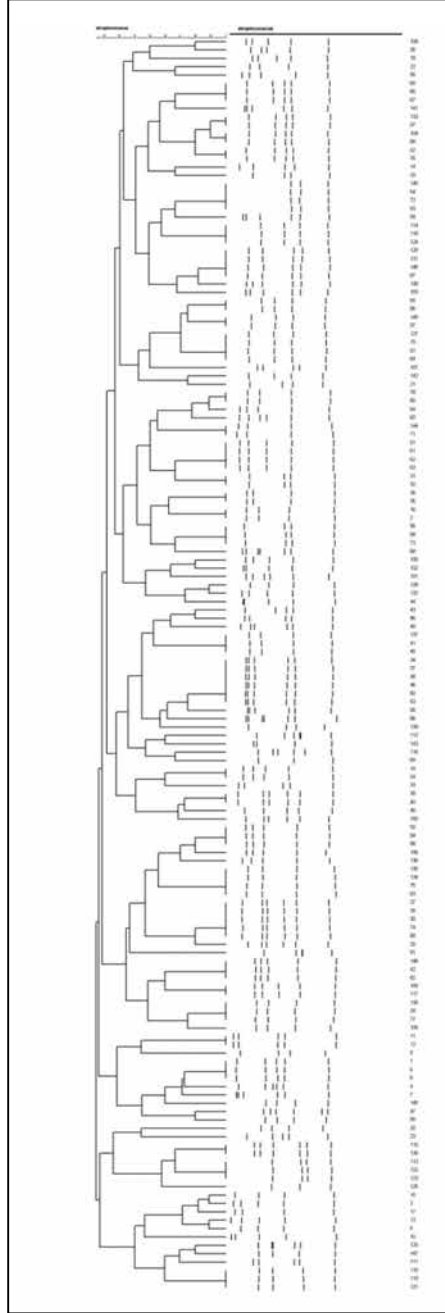


**Resim 3.** Miks 3 primer seti ile yapılan multipleks PCR çalışmasında saptanan virülans genlerinin örnek jel görüntüsü.



**Resim 4.** Miks 4 primer seti ile yapılan multipleks PCR çalışmasında saptanan virülans genlerinin örnek jel görüntüsü.





Şekil 1. *Streptococcus pyogenes* izolatlarının MLVF bant paternlerinin dendrogram analizi.

ilk tercih olarak penisilin, penisilin allerjisi olan bireylerde birinci kuşak sefalosporinler (anafilaksisi olmayanlar için) veya makrolidler önerilmektedir. *S.pyogenes* suşlarında henüz penisiline direnç bildirilmemiştir ancak makrolidlere karşı direnç dünyanın bazı bölgelerinde oldukça yaygındır ve tedavi başarısızlığına neden olmaktadır. Coğrafi bölgeler ve yıllara göre direnç oranları değişiklik göstermektedir. İspanya'da 1994-2006 yılları arasında eritromisin direnci %32.8 oranında saptanırken, 2005-2012 yılları arasında %7.0'a, 2012 yılında ise %2.8'e düştüğü bildirilmiştir<sup>14,15</sup>. Van Heerstraeten ve arkadaşları<sup>16</sup> Belçika'da 1999-2009 yılları arasında tonsillofarenjit ve invaziv hastalıklardan izole edilen 11.189 *S.pyogenes* izolatını incelemişler, 1999-2006 yılları arasında makrolid direncinin %13.5'ten %3.3'e düştüğünü, sonraki yıllarda da aynı düzeyi koruduğunu belirtmişlerdir. Çin'de yapılan bir çalışmada 2011 yılında kızıl ve tonsillit olgularından izole edilen 71 AGBHS izolatının tamamının eritromisine dirençli olduğu tespit edilmiştir<sup>17</sup>.

Ülkemizde Kara ve arkadaşları<sup>18</sup> tarafından yapılan sekiz merkezin katıldığı çalışmada eritromisine orta derecede duyarlılık oranı %2, direnç oranı ise %1.3 olarak bildirilmiştir. Bayramoğlu ve arkadaşları<sup>19</sup> tarafından yapılan bir çalışmada da 22 invaziv izolattan 1 (%4.5)'i eritromisine orta duyarlı bulunmuştur. Akgün Karapınar ve arkadaşları<sup>20</sup> tarafından yapılan çalışmada, eritromisine direnç oranları 2009 yılında %2.8, 2010 yılında %3.4, 2011 yılında %2.8, 2012 yılında %5.1 ve 2013 yılında %3.6 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda tonsillit olgularından elde edilen 150 *S.pyogenes* izolatının tamamının penisilin G, sefotaksim, seftriakson, eritromisin, klindamisin, levofloksasin, vankomisin ve linezolidde duyarlı olduğu belirlenmiştir. Daha önce yaptığımız bir çalışmada da çeşitli klinik örneklerden elde edilen 35 izolatın hiçbirisinde penisilin, eritromisin, linkomisin, gentamisin, vankomisin ve linezolid direnci saptanmamış; altı izolatta levofloksasin direnci tespit edilmiştir<sup>21</sup>. Ülkemiz verilerine bakıldığında zaman zaman yüksek direnç oranları bildirilmesine rağmen genel olarak Avrupa ülkeleri ile uyumlu direnç oranları izlenmektedir. Bunun nedeni, son yıllarda antibiyotik direnci konusunda bilincin artması veya ampirik tedavide eritromisinin sık tercih edilmemesi olabilir.

*S.pyogenes* virülansını artıran birçok faktöre sahiptir; yüzey antijenleri, toksinler ve enzimler. *S.pyogenes*'in virülans faktörlerini belirlemek ve şiddetli *S.pyogenes* enfeksiyonlarının gelişmesiyle ilişkili mekanizmaları anlamak için birçok çalışma yapılmaktadır. Rivera ve arkadaşlarının<sup>22</sup> çalışmasında invaziv ve noninvaziv enfeksiyonlardan izole edilen 126 AGBHS izolatının süperantijen gen profilini araştırmış, *speB* ve *speF* genlerini tüm izolatlarda *speA*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speL*, *speM*, *ssa* ve *smeZ* genlerini sırasıyla %31.7, %44.4, %84.1, %23.8, %19, %33.3, %8.7, %32.5, %28.6 ve %91.7 oranlarında bulunmuştur. Meisal ve arkadaşları<sup>23</sup> 262 invaziv izolat ile yaptıkları çalışmada, süperantijen genlerinden *speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *smeZ* ve *ssa* sıklığını sırasıyla %26.3, %99.6, %68.7, %98.1, %89.3, %29.0, %27.9, %41.2, %19.8, %3.4, %22.9, %98.5 ve %20.6 olarak tespit etmiştir. Çin'de 71 AGBHS izolatının moleküler özellikleri üzerine yapılan bir çalışmada 10 virülans geni araştırılmış, *speC*,

*smeZ* ve *slo* genleri bütün izolatlarda saptanırken, *speF* ve *ssa* genleri %97.2'sinde, *speG* geni %95.8'inde, *speH* ve *spel* genleri %80.3'ünde, *speA* geni %15.5'inde ve *speJ* geni %12.7'sinde tespit edilmiştir<sup>17</sup>.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, hastalardan ve taşıyıcılardan izole edilen AGBHS'lerin tümünde *speB* geni saptanırken *speA*, *speC*, *speG* ve *smeZ* genleri sırasıyla %30.2, %49.6, %80.6 ve %19.4 oranlarında tespit edilmiştir. Taşıyıcılar ve hastalar arasında virülans gen varlığı açısından fark bulunmamıştır<sup>24</sup>. Bir başka çalışmada, 134 öğrencinin boğaz kültüründen *S.pyogenes* izole edilerek toplam 25 (%18.6) izolatta pirojenik toksin geni bulunmuş; bunların 11 (%8.2)'inde *speA*, 12 (%8.9)'sinde *speC* ve 2 (%1.5)'sinde her iki gen birden saptanmıştır<sup>25</sup>. Bizim çalışmamızda pirojenik ekzotoksin genleri arasında en sık *smeZ* (%90), ardından *speG* (%88), *speC* (%58.7), *ssa* (%42.7), *speA* (%33.3), *speJ* (%24), *speK* (%18.7), *speH* (%14), *spel* (%13.3), *speL* ve *speM* (%9.3) belirlenmiştir. Çalışmamızda diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla uyumlu olarak *smeZ* ve *speG* genleri en sık saptanan genler olmuştur. Ancak ülkemizde yapılan *smeZ* ve *speG* genlerinin araştırıldığı tek çalışmada *smeZ* geni oldukça düşük oranda (%19.4) bulunurken *speG* gen (%80.6) varlığı çalışmamızla ve literatürle benzer olarak saptanmıştır<sup>24</sup>. Bu durum çalışmanın yapıldığı bölgenin, hasta grubunun ve o bölgede endemik olarak bulunan izolatların farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Streptokoksik toksik şok sendromu ve kızıl ilişkili olduğu düşünülen ve en çok araştırılan *speA* geni de çalışmamızda Avrupa verileri<sup>22,23</sup> ve ülkemizden Cengelolu ve arkadaşları<sup>24</sup> tarafından yapılan çalışma ile uyumlu olarak izolatların %33'ünde saptanmıştır. Ancak, Otlu ve arkadaşları<sup>25</sup> tarafından yapılan çalışmada *speA* oldukça düşük oranda (yaklaşık %10) bulunmuştur. Bunun nedeni söz konusu çalışmanın hastalardan değil, taşıyıcılardan elde edilen izolatlardan yapılması olabilir.

Çalışmamızda DNaz genlerinden *sdaB* tüm izolatlarda saptanırken *spd3*, *sdc*, *sdaD* genleri sırasıyla %64.7, %36.0 ve %24.7 oranlarında tespit edilmiştir. Proteaz genleri (*speB*, *spyCEP*, *scpA*) ve inhibitör genlerinden *mac* suşların tamamında, *sic* geni ise sadece 3 (%2.0) izolatta pozitif olarak tespit edilmiştir. *sdaB*, *speB*, *spyCEP*, *scpA* ve *mac* genleri tüm AGBHS izolatlarında kromozomal olarak kodlanan genler olduğu için tüm izolatlarda pozitif olarak saptanmaktadır<sup>11</sup>. Bu genlerden en çok çalışılan *speB* geni çalışmamızda olduğu gibi birçok çalışmada da %100 oranında saptanmıştır<sup>22,24</sup>.

MLVA/MLVF izolatlar arasındaki klonal ilişkiyi belirlemek için kullanılan PCR tabanlı bir yöntemdir. Yöntemin prensibi genom içindeki tekrarlayan dizileri ve tekrar sayısının saptanmasıdır. Bu yöntem çeşitli gram-pozitif ve gram-negatif bakterileri tiplendirmek için kullanılmaktadır<sup>26,27</sup>. *S.pyogenes* izolatlarının moleküler özelliklerinin araştırılması için *emm* tiplendirmesi ve "pulsed field gel" elektroforezi (PFGE) sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda *Streptococcus agalactiae* veya *S.pyogenes* gibi streptokokları tiplendirmek için de MLVA/MLVF yöntemleri geliştirilmiştir<sup>12,28</sup>. *S.pyogenes* izolatlarında MLVA/MLVF kullanımını veya faydalarını belirten dünyada birkaç çalışma bulunmaktayken

ülkemizde bu konuda herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bizim çalışmamızda 150 *S.pyogenes* izolatının MLVF analizinde iki veya daha fazla izolatın yer aldığı 32 farklı patern belirlenmiştir. İzolatların 91'i 32 farklı paternin herhangi birinde yer alırken, 59'u sporadik izolat olarak tanımlanmıştır. İzolatların MLVF paternleriyle virülans özellikleri arasında ilişki saptanmamıştır. MLVF yöntemiyle aynı paternde yer alan izolatların virülans faktörleri farklı bulunmuş, başka bir deyişle aynı virülans faktörlerine sahip izolatlar farklı MLVF paternlerinde yer almıştır. Sırbistan'da yapılan bir çalışmada da 103 *S.pyogenes* izolatının klonal ilişkisi *emm* tiplendirme, MLST, MLVA, faj ve virülans faktörü profillemeye yöntemleriyle araştırılmış, MLVA analizi ve virülans faktörleri profillemeye yöntemleri ile farklı paternler belirlenmiştir<sup>29</sup>.

Bu çalışmanın kısıtlılığı proje bütçesi nedeniyle klonal ilişki araştırmak için altın standart yöntem olan PFGE ile MLVF'nin karşılaştırılamamasıdır. Ancak daha önceki çalışmalarımızda uyguladığımız *emm* tiplendirme, MLST ve PFGE ile kıyasarsak MLVF yöntemi uygulaması kolay, çözünürlüğü yüksek, özel ekipman gerektirmeyen, emek ve zaman açısından avantajlı ve ucuz bir yöntemdir. Çin'de yapılan bir çalışmada çeşitli klinik örneklerden ve farklı bölgelerden izole edilen *S.pyogenes* izolatları çeşitli yöntemlerle genotiplendirilmiş, *emm* tiplendirme ve PFGE ile karşılaştırıldığında MLVA/MLVF'nin izolatlar arasında daha iyi ayırım sağladığını, PFGE profilleri içerisindeki çeşitliliği tespit edebildiğini bildirmiştir<sup>30</sup>.

Sonuç olarak, çalışmamızda semptomatik tonsillofarenjitli hastaların boğaz kültürlerinden elde edilen *S.pyogenes* izolatları tüm antibiyotiklere duyarlıdır ve yüksek oranlarda virülans genleri taşımaktadır. Ancak izolatların çoğunlukla klonal olarak ilişkisiz ve sporadik olduğu saptanmıştır. Bu çalışma, *S.pyogenes* izolatlarının MLVF yöntemiyle tiplendirildiği ve çok sayıda virülans geninin araştırıldığı Türkiye'de ilk araştırmadır. Değişik boyuttaki çeşitli gen bölgelerinin amplifikasyonu ve üretilen bant paternlerinin karşılaştırılması esasına dayanan MLVF yöntemi, uygulaması kolay ve ayırım gücü yüksek bir yöntemdir. Düşük çözünürlüğe sahip, pahalı, uzun zaman alan ve yoğun emek harcanan yöntemlere göre avantajlıdır.

## KAYNAKLAR

1. Koneman E, Winn W, Allen SD, et al. The gram positive cocci Part II: Streptococci, Enterococci, and the "Streptococci-Like" bacteria, pp: 672-764. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2006, 6<sup>th</sup> ed. Lippincot Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
2. Özenci H. Streptococcus. pp: 412-29. In: Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology, 9<sup>th</sup> ed, 2007 çevirisi). Başustaoğlu AC (Çeviri ed.). 2009. Atlas Kitapçılık, Ankara.
3. Taylor AL, Cross EL, Llewelyn MJ. Induction of contact-dependent CD8+ regulatory T cells through stimulation with staphylococcal and streptococcal superantigens. Immunology 2012; 135(2): 158-67.
4. Commons RJ, Smeesters PR, Proft T, Fraser JD, Robins-Browne R, Curtis N. Streptococcal superantigens: categorization and clinical associations. Trends Mol Med 2014; 20(1):48-62.
5. Uchiyama S, Andreoni F, Schuepbach RA, Nizet V, Zinkernagel AS. DNase Sda1 allows invasive M1T1 Group A *Streptococcus* to prevent TLR9-dependent recognition. PLoS Pathog 2012; 8(6): e1002736.

6. Anbalagan S, Chaussee MS. Transcriptional regulation of a bacteriophage encoded extracellular DNase (Spd-3) by Rgg in *Streptococcus pyogenes*. PLoS One 2013; 8(4): e61312.
7. Hynes W. Virulence factors of the group A streptococci and genes that regulate their expression. Front Biosci 2004; 9: 3399-433.
8. Terao Y. The virulence factors and pathogenic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*. J Oral Biosci 2012; 54(2): 96-100.
9. Chiappini E, Regoli M, Bonsignori F, et al. Analysis of different recommendations from international guidelines for the management of acute pharyngitis in adults and children. Clin Ther 2011; 33(1): 48-58.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania USA, 2013.
11. Borek AL, Obszanska K, Hryniewicz W, Sitkiewicz I. Detection of *Streptococcus pyogenes* virulence factors by multiplex PCR. Virulence 2012; 3(6): 529-33.
12. Obszanska K, Borek AL, Hryniewicz W, Sitkiewicz I. Multiple locus VNTR fingerprinting (MLVF) of *Streptococcus pyogenes*. Virulence 2012; 3(6): 539-42.
13. Topkaya AE, Balıkcı A, Aydın F, et al. Epidemiology, clinical and microbiological characteristics of invasive streptococcal infections in Turkey, 2010-2011. Mikrobiyol Bul 2014; 48(1): 1-13.
14. Rubio-López V, Valdezate S, Álvarez D, et al. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994-2006). BMC Microbiol 2012; 12: 215.
15. Montes M, Tamayo E, Mojica C, García-Arenzana JM, Esnal O, Pérez-Trallero E. What causes decreased erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes*? Dynamics of four clones in a southern European region from 2005 to 2012. J Antimicrob Chemother 2014; 69(6): 1474-82.
16. Van Heirstraeten L, Samuel Coenen, Christine Lammens, Hens N, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Antimicrobial drug use and macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*, Belgium. Emerg Infect Dis 2012; 18(9): 1515-8.
17. Wang HB, Song YY, You YH, et al. Molecular epidemiological analysis of group A *Streptococci* isolated from children in Chaoyang District of Beijing, 2011: emm types, virulence factor genes and erythromycin resistant genes. Biomed Environ Sci 2013; 26(9): 782-4.
18. Kara A, Özkaya Parlakay A, Gür D, et al. Grup A beta hemolitik streptokok Türkiye makrolid direnç değerlendirmesi pilot çalışma sonuçları. J Pediatr Inf 2011; 5(3): 96-9.
19. Bayramoğlu G, Topkaya AE, Balıkcı A, Aydın F. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of invasive group A streptococci identified in eastern Black Sea region of Turkey. Mikrobiyol Bul 2011; 45(3): 446-53.
20. Akgün Karapınar DB, Yılmaz M, Özbayrak A, Kaygusuz A, Gürler N, Salman N. *Streptococcus pyogenes*'te eritromisin direnci: 2009-2013. ANKEM Derg 2015; 29(1): 26-30.
21. Arslan U, Oryaşın E, Eskin Z, et al. Distribution of emm genotypes and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pyogenes* strains: analogy with the vaccine in development. Mikrobiyol Bul 2013; 47(2): 318-23.
22. Rivera A, Rebollo M, Miro E, et al. Superantigen gene profile, emm type and antibiotic resistance genes among group A streptococcal isolates from Barcelona, Spain. J Med Microbiol 2006; 55(8): 1115-23.
23. Meisal R, Andreasson IKG, Hoiby EA, Aaberge IS, Michaelsen TE, Caugant DA. *Streptococcus pyogenes* Isolates Causing Severe Infections in Norway in 2006 to 2007: emm Types, Multilocus Sequence Types, and Superantigen Profiles. J Clin Microbiol 2010; 48(3): 842-51.
24. Mengelöglü FZ, Aktas E, Otlu B, et al. Evaluation of emm gene types, toxin gene profiles and clonal relatedness of group A streptococci. Bosn J Basic Med Sci 2013; 13(3): 163-9.
25. Otlu B, Karakurt C, Bayındır Y, Kayabaşı Ü, Yakupoğulları Y, Gözükara Bağ H. İlkokul çocuklarında *Streptococcus pyogenes* taşıyıcılığı: M-protein tipleri, pirojenik toksin genleri ve izolatlar arası klonal ilişkinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2015; 49(3): 301-13.
26. Luczak-Kadlubowska A, Sabat A, Tambic-Andrasevic A, Payerl-Pal M, Krzyszton-Russjan J, Hryniewicz W. Usefulness of multiple-locus VNTR fingerprinting in detection of clonality of community- and hospital-acquired *Staphylococcus aureus* isolates. Antonie Van Leeuwenhoek 2008; 94(4): 543-53.

27. Jabalameli F, Mirsalehian A, Sotoudeh N, et al. Multiple-locus variable number of tandem repeats (VNTR) fingerprinting (MLVF) and antibacterial resistance profiles of extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing *Pseudomonas aeruginosa* among burnt patients in Tehran. *Burns* 2011; 37(7): 1202-7.
28. Radtke A, Lindstedt BA, Afset JE, Bergh K. Rapid multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) for genotyping of *Streptococcus agalactiae*. *J Clin Microbiol* 2010; 48(7): 2502-8.
29. Opavski N, Gajic I, Borek AL, et al. Molecular characterization of macrolide resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from pharyngitis patients in Serbia. *Infect Genet Evol* 2015; 33: 246-52.
30. You Y, Wang H, Bi Z, et al. Molecular typing of Chinese *Streptococcus pyogenes* isolates. *Mol Cell Probes* 2015; 29(3): 172-6.