

# İlkokul Çocuklarında *Streptococcus pyogenes* Taşıyıcılığı: M-Protein Tipleri, Pirojenik Toksin Genleri ve İzolatlar Arası Klonal İlişkinin Araştırılması\*

## Carriage of *Streptococcus pyogenes* in Primary School Children: M-Protein Types, Pyrogenic Toxin Genes, and Investigation of the Clonal Relationships Between the Isolates

Barış OTLU<sup>1</sup>, Cemşit KARAKURT<sup>2</sup>, Yaşar BAYINDIR<sup>3</sup>, Üner KAYABAŞ<sup>3</sup>, Yusuf YAKUPOĞULLARI<sup>1</sup>, Harika GÖZÜKARA BAĞ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

<sup>1</sup> Inonu University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Malatya, Turkey.

<sup>2</sup> İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Kardiyoloji Bilim Dalı, Malatya.

<sup>2</sup> Inonu University Faculty of Medicine, Department of Pediatric Cardiology, Malatya, Turkey.

<sup>3</sup> İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

<sup>3</sup> Inonu University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Malatya, Turkey.

<sup>4</sup> İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Malatya.

<sup>4</sup> Inonu University Faculty of Medicine, Department of Biostatistics, Malatya, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 26.01.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 09.03.2015

\* Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından (Protokol no :2008/30) onaylanmış olup, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

### ÖZ

M-proteini ve pirojenik toksinler *Streptococcus pyogenes*'in en önemli virülans faktörleri olup, bu faktörler sırasıyla akut romatizmal ateş ve kızıl hastalığının patofizyolojisinde önemli rol oynarlar. Bu çalışmada, ilköğretim okulu çocuklarının farengeal *S.pyogenes* taşıyıcılık durumları, suşlar arasındaki klonal ilişki, izolatların M-protein tipleri ve pirojenik toksin gen varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, bölgemizdeki iki ilköğretim okulunda bulunan 668 çocuktan (yaş aralığı: 6-16 yıl) alınan boğaz kültürü örnekleri dahil edilmiştir. İzole edilen grup A streptokok suşları arasındaki klonal ilişki DiversiLab (BioMérieux, Fransa) yöntemiyle araştırılmış ve tespit edilen klonal ilişkiler PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) yöntemi ile doğrulanmıştır. İzolatların M-protein (*emm*) tiplmesi Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından önerilen DNA dizi analizi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Pirojenik toksin kodlayan genlerden *speA* ve *speC*'nin varlığı in-house multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada toplam 134 (%20.05) öğrencinin boğaz kültüründen *S.pyogenes* izole edilmiştir. 10 yaş ve üzeri öğrencilerin GAS taşıyıcılık oranı, 7-9 yaş grubu öğrencilerine göre istatistiksel

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Barış Otlu, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye. Tel (Phone): +90 533 371 0780, E-posta (E-mail): botlu@yahoo.com

olarak daha yüksek bulunmuştur (%22'ye karşı %16.4;  $p < 0.05$ ). Dizi analizi ile bu izolatlardan 123'ünün M protein geni tiplendirilebilmiş ve 20 farklı *emm* tipi saptanmıştır. En sık tespit edilen *emm* tipi *emm1* ( $n = 38$ , %30.9) olmuş, bunu sırasıyla *emm12* ( $n = 18$ , %14.6), *emm89* ( $n = 10$ , %8.1), *emm118* ( $n = 8$ , %7.3) ve *emm4* ( $n = 7$ , %5.7) izlemiştir. Toplam 25 (%18.6) izolatta pirojenik toksin geni bulunmuş; bunların 11'inde (%8.2) *speA*, 12'sinde *speC* (%8.9) ve ikisinde (%1.5) her iki gen birden saptanmıştır. DiversiLab yöntemi ile 134 *S.pyogenes* suşu içerisinde 62 farklı Rep (Repetitive extragenic palindromic)-PCR profili belirlenmiştir. Klonal olarak ilişkili 36 izolat, 13 farklı küme içerisinde yer almıştır. Suşların kümeleşme oranı %26.9 olarak bulunmuş; aynı küme içerisinde yer alan izolatların tümü arasındaki klonal ilişki, PFGE yöntemi ile de doğrulanmıştır. Çalışmamızda, bölgemizdeki ilköğretim çocukları arasında GAS taşıyıcılığının yüksek olduğu ve M-protein tiplerine göre suşların 30 valanlı aşı tarafından kapsanma oranının %90'nın üzerinde olduğu tespit edilmiştir. İzolatların yaklaşık beşte birinde pirojenik toksin geni bulunması, taşıyıcılarda da kızıl hastalığı riskinin yüksek olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, izolatlar arasında tespit edilen klonal ilişki oranı, okul içi GAS yayılımının risk oluşturabileceği lehine yorumlanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Streptococcus pyogenes*; grup A streptokok; *emm* tipi; streptokokal pirojenik toksin; DNA parmak izi analizi.

## ABSTRACT

M-protein and pyrogenic toxins are the most important virulence factors of *Streptococcus pyogenes*, and they play significant role in the pathophysiology of acute rheumatoid fever and scarlet fever, respectively. In this study, the pharyngeal carriage of *S.pyogenes* of the primary school children, clonal relationship of the strains, M-protein types, and the presence of pyrogenic toxin genes were aimed to be investigated. A total of 668 throat cultures obtained from children (age range: 6-16 years) in two primary schools in our region, were included in the study. The clonal relationships of the isolated group A streptococci (GAS) strains were investigated by DiversiLab assay (BioMérieux, France), and the clonal relatedness was confirmed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) method. M-protein (*emm*) typing was performed by DNA sequencing as suggested by Centers for Disease Control and Prevention (CDC). The genes encoding pyrogenic toxins, *speA* and *speC*, were investigated by an in-house multiplex polymerase chain reaction (PCR) method. *S.pyogenes* was isolated from 134 (20.05%) of the throat samples. The GAS carriage rate of the students aged  $\geq 10$  was statistically higher than those 7-9 years age group (%22 vs %16.4,  $p < 0.05$ ). The M protein gene could be characterized only among 123 isolates by DNA sequencing, and 20 different *emm* types were detected. The most frequent *emm* type was *emm1* ( $n = 38$ , 30.9%) followed by *emm12* ( $n = 18$ , 14.6%), *emm89* ( $n = 10$ , 8.1%), *emm118* ( $n = 9$ , 7.3%), and *emm4* ( $n = 7$ , 5.7%). Pyrogenic toxin genes were found in 25 (18.6%) of the isolates, including *speA* in 11 isolates (8.2%) and *speC* in 12 isolates (8.9%) and both genes were detected in 2 isolates (1.5%). Sixty-two different Rep (Repetitive extragenic palindromic)-PCR profiles were detected in 134 *S.pyogenes* isolates by DiversiLab method. Thirteen different clusters were formed by a total of clonally related 36 isolates revealing a strain clustering ratio of 26.9%. Clonal relationship of all isolates in the same cluster was confirmed by PFGE method. In this study, relatively high percentage of GAS carriage was observed among primary school children in our region. The coverage rate of the 30-valent vaccine was determined to be over 90% with respect to M-protein types. Since the pyrogenic toxin-encoding genes were found in one fifth of the isolates from the studied subjects, we concluded that the carrier population may also have high risk for scarlet fever. We also concluded that, the clonal relationship ratio determined among the isolates may be a risk in school transmission of GAS.

**Keywords:** *Streptococcus pyogenes*; group A streptococci; *emm* type; streptococcal pyrogenic toxin; DNA fingerprinting.

## GİRİŞ

Grup A streptokoklar (*GAS*; *Streptococcus pyogenes*) alt solunum yolu enfeksiyonları, yumuşak doku enfeksiyonları (impetigo, erisipel, selülit), kızıl, nekrotizan fasiit, streptokoksik toksik şok sendromu, bakteriyemi ve sepsis gibi hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olabilmektedir<sup>1,2</sup>. Tonsillo-farenjit, *GAS*'ın toplumda en sık rastlanan enfeksiyonu olup, bu atakları takiben gelişen akut romatizmal ateş (*ARA*), *GAS*'ın neden olduğu en önemli sağlık sorunudur<sup>2,3</sup>. Bunun yanında, yetişkinlerde daha az olmakla birlikte, okul çağındaki çocuklarda %15-20 oranlarında farenkste *GAS* taşıyıcılığı bildirilmektedir<sup>4,5</sup>.

Yapılan çalışmalar *GAS*'ın en önemli virülans faktörünün M-proteini olduğunu göstermiş olup, M-proteini olmayan suşlar avirulan olarak kabul edilmektedir<sup>6</sup>. *GAS* enfeksiyonu sonrasında M-proteinine karşı oluşan immünoglobulinlerin, akut eklem romatizması gelişiminde önemli bir faktör olduğu saptanmıştır<sup>2</sup>. M-proteinini kodlayan gen bölgesi (*emm* geni), yüksek derecede değişken olup yapılan dizi analizi çalışmalarında şu ana kadar 250'den fazla *emm* gen tipi tespit edilmiştir<sup>7</sup>. Birçok çalışmada, *GAS*'ın yol açtığı farklı klinik tablolarda *emm* tiplerinin belirleyici olduğu ileri sürülmektedir<sup>2,6,7</sup>. Bunun yanında, bu durumun tamamen *emm* tiplerine bağlı olmadığı, patojen ile konağın immün yanıtı arasındaki ilişkilerin de araştırılmasının gerektiğini bildiren çalışmalar vardır<sup>8</sup>. Bu nedenle, sağlıklı taşıyıcıların belirlenmesi ve *emm* tiplerinin saptanması, duyarlı konaklarda etkenin neden olabileceği sağlık sorunlarını önlemek için stratejiler geliştirilmesini sağlayacaktır. Bununla birlikte yaygın *emm* tiplerinin belirlenmesi aşı çalışmaları açısından da oldukça önem taşımaktadır.

Streptokokların diğer bir önemli virülans faktörü de ürettiği toksinlerdir. Özellikle *speA* ve *speC*'nin lizojenik bir bakteriyofaj aracılığıyla bakteriye taşındığı ve hücre duvarında yer alan *emm* tipinin bakteriyofaj tarafından suşun seçiminde etkili olduğu öne sürülmektedir<sup>9</sup>. Aynı zamanda *speA* ve *speC*'nin, en önemli ekzotoksin olan pirojenik toksini kodladığı ve bu toksinlerin kızıl hastalığının gelişiminde kritik faktörler olduğu gösterilmiştir<sup>9,10</sup>.

Grup A streptokok enfeksiyonları, tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Gelişmekte olan ülkelerde *GAS*'a bağlı ciddi hastalıkların (akut romatizmal ateş, romatizmal kalp hastalığı, post-streptokokal glomerülofrit ve invazif enfeksiyonların) prevalansının, Kuzey Amerika ve Batı Avrupa ülkelerine göre yaklaşık 10 kat (0.3/1000 olgu/yıl'a karşı 2.5-3.2/1000 olgu/yıl) fazla olduğu öngörülmektedir<sup>1</sup>. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, *GAS* enfeksiyonlarına karşı mevcut kontrol stratejilerinin güçlendirilmesi ve yeni primer kontrol stratejilerinin geliştirilmesi için moleküler epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır<sup>1</sup>. Ancak, ülkemizden bu alanda yapılmış çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, *GAS* taşıyıcısı ilköğretim çocuklarında *emm* tiplerinin, pirojenik toksin genlerinin ve izolatlar arasındaki klonal ilişkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Çalışma Grubu ve Suşların Tanımlanması

Bu çalışma, 2010-2011 yılları arasında, Malatya ilinde bulunan iki ilköğretim okulunda eş zamanlı olarak gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen ilköğretim okulları, benzer sosyoekonomik düzeye sahip iki farklı bölgeden seçildi. Bu ilköğretim okullarında okuyan

yaşları 6 ile 16 arasında değişen, toplam 701 öğrenci (okul A: 461 öğrenci, okul B: 240 öğrenci) çalışmanın evreni olarak saptandı. Enfeksiyon hastalıkları ve pediatri uzmanları tarafından öğrencilerin muayeneleri yapılarak, herhangi bir akut sağlık sorunu ve enfeksiyonu olmadığı saptanan 668 öğrenci çalışmaya dahil edildi.

Tüm öğrencilerin her iki tonsil ve posterior orofarenks bölgesinden steril eküvyonla boğaz sürüntüsü alındı. Elde edilen örnekler, %5 koyun kanlı agara (Oxoid, İngiltere) ekilerek 35°C'de 24 saat inkübe edildi. Kanlı agar besiyerinde üreyen beta-hemolitik kolonilerden yapılan boyamada gram-pozitif kok morfolojisinde olanlar ileri tanımlama testlerine alındı. Gerekliğinde şüpheli koloninin saflaştırılması için kanlı agar plaklarına alt kültürler yapıldı.

Katalaz reaksiyonu negatif, basitrasine duyarlı, trimetoprim/sülfametoksazole dirençli, PYR testi (DrySlide Kit, BBL, USA) pozitif ve lateks aglütinasyon (Slidex; Bio Mérieux, Fransa) testinde A grubu olarak sınıflandırılan streptokok türleri, *S.pyogenes* olarak tanımlandı. Elde edilen suşlar, skim milk besiyeri (Oxoid, UK) içine inoküle edilerek ileri moleküler çalışmalar için -80°C'de saklandı.

### ***SpeA* ve *SpeC* toksin genlerinin belirlenmesi**

*Streptococcus pyogenes* olarak tanımlanan suşların taşıdıkları *speA* ve *speC* pirojenik ekzotoksin genlerinin varlığı, Schmitz ve arkadaşlarının<sup>10</sup> tasarladıkları primerler (*speA* 5'-TAA GAA CCA AGA GAT GG ATT CTT GAG CAG TTA CC-3', *speC* 5'-AAG AAG CAA AAG ATA GC TGG TAG AAG TTA CGT CC-3') kullanılarak multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile araştırıldı. Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu, kolon temelli hazır kit (DNA mini kit, Qiagen, Almanya) ile yapıldı. *SpeA* ve *speC* genlerini çoğaltmak için kullanılacak primer karışımı, her bir primerin son konsantrasyonu 0.2 µM olacak şekilde tek tüp içerisinde hazırlandı. Multipleks PCR reaksiyonu için hazır amplifikasyon karışımı kullanılarak (Qiagen, Almanya), amplifikasyon koşulları; 95°C'de 15 dakika başlangıç denatürasyonun ardından, 35 döngü olmak üzere; 94°C'de 30 saniye, 60°C'de 90 saniye, 72°C'de 90 saniye ve 72°C'de 10 dakika olarak uygulandı. Elde edilen amplifikasyon ürünleri %1.5'lük agaroz jelde, 60 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforezden sonra DNA bantlarının görüntülenmesi amacıyla jel, 0.5 µg/mL etidyum bromür içeren 1xTBE tamponu içinde 15 dakika boyandı ve bantlar UV transilüminator ile görüntüledi.

### **M-proteini (*emm*) Tiplendirilmesi**

M-protein (*emm*) tiplendirilmesi için Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından önerilen metot kullanıldı (<http://www.cdc.gov/streplab/M-ProteinGenotyping.html>). Bu yöntemle göre M-protein gen bölgesi P1 5'-TAT TCG CTT AGA AAA TTA A-3' ve P2 5'-GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT-3' primer çifti ile çoğaltıldı. Çoğaltılan PCR ürünlerinin dizi analizi, *emmseq2*- 5'-TAT TCG CTT AGA AAA TTA AAA ACA GG-3' primeri kullanılarak *BigDye terminator 3.1* (Applied Biosystems, USA) kiti ve ABI prism 310 (Applied Biosystems, ABD) otomatik dizi analiz cihazı ile yapıldı. Elde edilen *emm* dizilerinin tiplendirilmesi için CDC'nin veri bankasındaki referans DNA dizileri kullanılarak, *ClustalW* v2.1 yazılımı ile tüm dizileri içeren global hizalama yapıldı ve *emm* tipleri belirlendi.

## Suşlar Arasındaki Klonal İlişkinin Belirlenmesi

İzole edilen *S.pyogenes* suşları arasındaki klonal ilişkinin araştırılmasında, Rep-PCR (Repetitive extragenic palindromic-Polymerase chain reaction) tabanlı otomatize DiversiLab (Bio Mérieux, Fransa) sistemi kullanıldı. İlişkili saptanan izolatlar arasındaki olası klonal yakınlığın doğrulanması, değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE; Pulsed-field gel electrophoresis) yöntemi ile yapıldı.

DiversiLab metodu (Streptokok kiti), üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı. Kısaca, amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve elektroforezi için, *Diversilab DNA LabChip kiti* (Bio Mérieux, Fransa) ile Agilent 2100 Bioanalyzer (BioMérieux, Fransa) cihazı kullanıldı. Oluşan bant profillerinin analizi, DiversiLab Software (V3.4) kullanılarak gerçekleştirildi. Bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Pearson korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de UPGMA (Unweighted pairwise grouping mathematical averaging) yöntemi kullanıldı. Benzerlik oranları > %90'nın üzerinde olan suşlar klonal olarak ilişkili olarak değerlendirildi.

PFGE ile genotiplendirme için Elliott ve arkadaşlarının<sup>11</sup> önerdiği yöntem, minör değişikliklerle uygulandı. Genomik DNA'lar 20 U XbaI (Fermantas Corporation, ABD) ile kesildikten sonra agaroz kalıplar CHEF DR II (Bio-Rad Laboratories, Belçika) sisteminde elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez koşulları başlangıç vuruş süresi 5 saniye, bitiş vuruş süresi 40 saniye, akım 6 V/cm<sup>2</sup>, sıcaklık 14°C, süre 18 saat olacak şekilde ayarlandı. Bant profilleri GelCompar Software (V6.0; Applied Maths, Belçika) ile değerlendirildi. İzolatlar arası benzerlik analizi için *Dice* benzerlik katsayısı ve kümeleşme analizi için de UPGMA metodu kullanıldı. *Dice* benzerlik katsayısına göre, izolatlar arası benzerlik sınırı %80 kabul edildi.

## İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS (V13.0) programı kullanılarak yapıldı. Çalışma sonucunda elde edilen GAS taşıyıcılığının ve tespit edilen *emm* tiplerinin; suşların izole edildiği okula, yaşa ve cinsiyete göre dağılımlarını değerlendirmek için *Pearson* ki-kare ve *Fisher* kesin ki-kare testleri uygulandı. Tüm karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Boğaz sürüntüsü alınan 668 öğrencinin 134'ünde (%20.05) grup A streptokok üretilmiştir. İzolat sayılarının her bir okul için dağılımı Tablo I'de verilmiştir. Okullar arasında GAS taşıyıcılığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ). Çalışmaya dahil edilen öğrencilerin yaş ortalaması 11.6 yıl olup, 71'i (%53) erkek ve 63'ü (%47) kızdır. Çalışmamızda 10 yaş ve üzeri öğrencilerde GAS taşıyıcılık oranı, 7-9 yaş grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (%22'ye karşı %16.4,  $p < 0.05$ ). Cinsiyetlere göre GAS taşıyıcılığı arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

Yapılan dizi analizi sonucunda; taşıyıcılara ait 134 izolattan 123'ünün *emm* tipi belirlenebilmiştir. Geriye kalan 11 izolatın 3'ünde PCR ürünü elde edilemezken, 9'unda ise elde

edilen dizi, referans tiplerden herhangi birisi ile uyumlu bulunmamıştır. En sık saptanan *emm* tipleri, 38 (%30.9) izolatta *emm1*, 18 izolatta (%14.6) *emm12*, 10 izolatta *emm89* (%8.1), 9 izolatta *emm118* (%7.3) ve 7 izolatta *emm4* (%5.7) olmuştur (Tablo II). Bu tiplerin dışında çalışmamızda; *emm77*, *emm5*, *emm3*, *emm28*, *emm11*, *emm75*, *emm44*, *emm29*, *emm85*, *emm18*, *emm71*, *emm24*, *emm9*, *emm22* ve *emm78* tipleri de saptanmıştır. Tespit edilen *emm* tiplerinin okullara göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo I). Bununla birlikte *emm* tipleri ile cinsiyet ve yaş grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ).

Toplam 134 GAS izolatının 25'inde (%18.6) pirojenik toksin genlerinden *speA* ve *speC*'nin varlığı saptanmıştır. Buna göre 134 izolatın 11'inde (%8.2) *speA* ve 12'sinde *speC* (%8.9) geni bulunurken, izolatların 2'sinde (%1.5) her iki gen birden tespit edilmiştir.

Suşlarda saptanan toksin genlerinin gösterildiği PCR jel ürünü Şekil 1'de verilmiştir. Çalışılan suşların *emm* tipleri ve toksin genlerine göre dağılımı Tablo II'de gösterilmiştir.

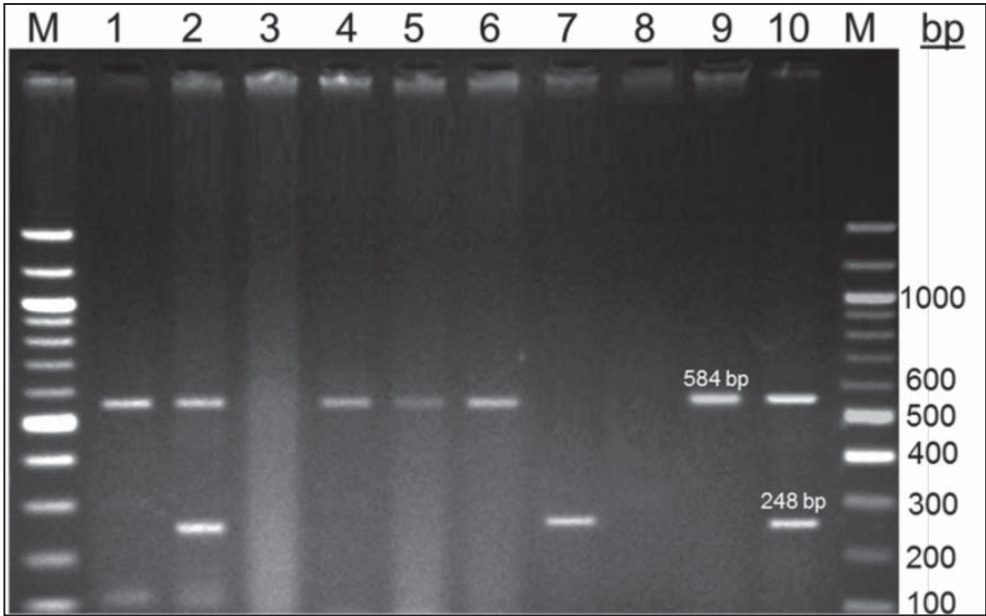
DiversiLab yöntemi ile yapılan genotiplendirme sonucunda 134 *S.pyogenes* suşu, 62 farklı rep-PCR profili göstermiştir. Klonal yönden ilişkili 36 izolat, 13 farklı küme içerisinde yer almıştır. Suşların kümeleşme oranı; A okulunda %25 ve B okulunda %26.6 olarak bulunmuştur. Tüm suşlar birlikte değerlendirildiğinde, kümeleşme oranı %26.9 olarak saptanmıştır. En büyük küme (P-kümesi) altı izolattan oluşmuş, bunu her biri dört izolat içeren C, K ve L kümeleri izlemiştir. Diğer dokuz kümenin her birinde ise iki izolat mevcuttur. Suşların klonal ilişkileri Şekil 2'de gösterilmiştir. Sadece klonal olarak ilişkili bulunan

**Tablo I.** Grup A streptokok taşıyıcılığının, en sık görülen beş *emm* tipinin ve toksin genlerinin okullara göre dağılımı

Okul	Öğrenci Sayısı	GAS Taşıyıcısı n (%)	En sık görülen 5 <i>emm</i> tipi					Pirojenik toksin geni		
			1	12	89	118	4	<i>SpeA</i>	<i>SpeC</i>	<i>SpeA+SpeC</i>
A	408	80 (19.6)	26	11	5	3	6	8	9	2
B	260	54 (20.7)	12	7	5	6	1	3	3	-
Toplam	668	134 (20.05)	38	18	10	9	7	11	12	2
P değeri		0.715	0.339	0.992	0.523	0.098	0.257	0.542	0.385	0.524

**Tablo II.** En sık görülen 14 *emm* tipi ve toksin genlerinin tiplere göre dağılımı

	<i>emm</i> tipi													
	1	12	89	118	4	77	5	3	28	11	75	44	29	85
İzolot sayısı	38	18	10	9	7	6	6	6	4	3	2	2	2	2
Tüm izolatlar içinde %	30.9	14.6	8.1	7.3	5.7	4.9	4.9	4.9	3.3	2.4	1.6	1.6	1.6	1.6
Toksin geni														
<i>SpeA</i>	8	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>SpeC</i>	3	6	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>SpeA + SpeC</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



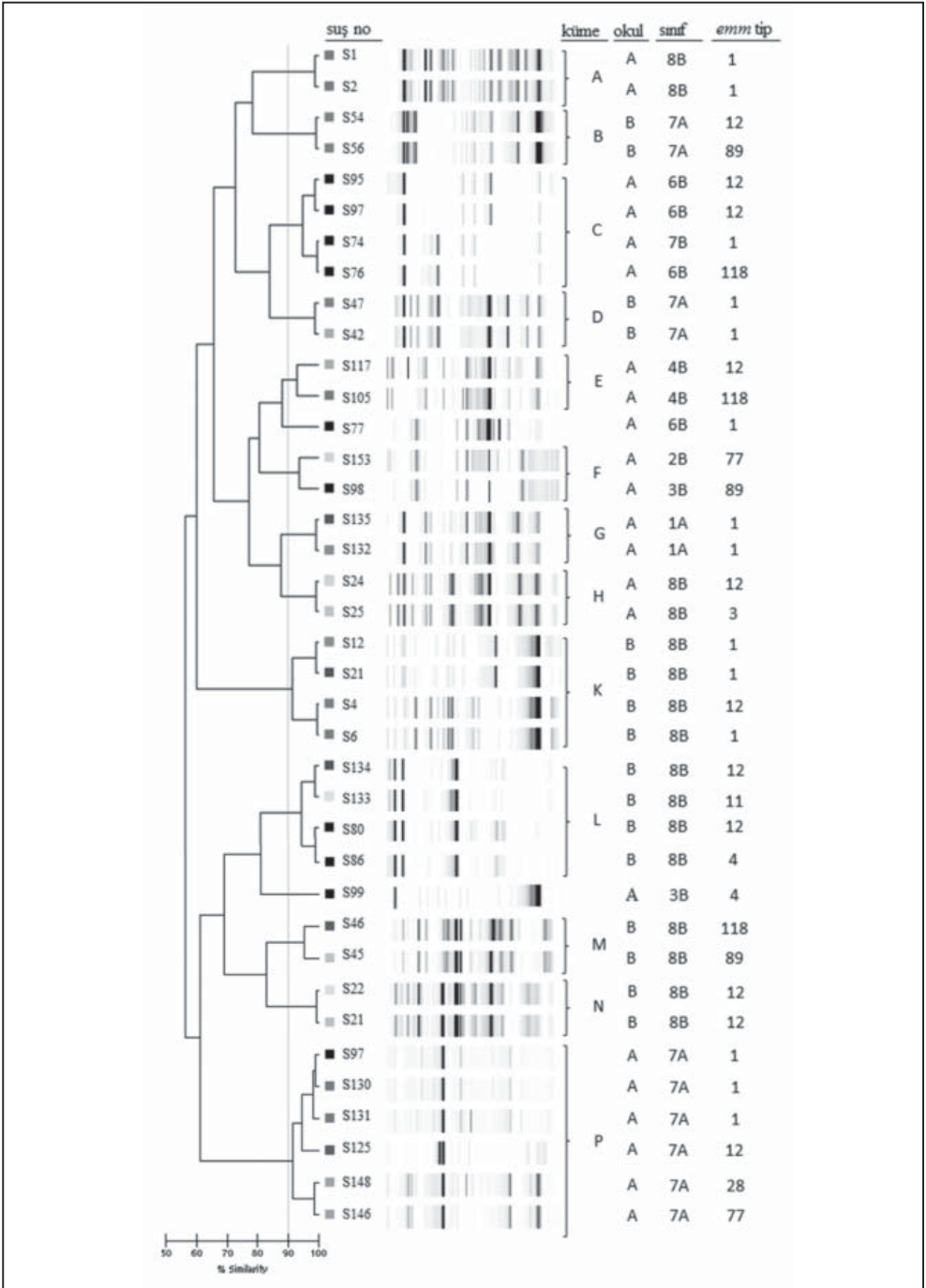
Şekil 1. Multipleks PCR ile *speA* ve *speC* genlerinin tespiti. Hat 1, 4, 5, 6: *speC*+; Hat 2: *speA*+ ve *speC*+; Hat 7: *speA*+; Hat 8: Negatif kontrol; Hat 9: *speC*+ kontrol; Hat 10: *speA*+ ve *speC*+ kontrol; Hat M; 100 bp DNA Leader (New England Biolabs, ABD). (Pozitif kontroller, dizi analizi ile doğrulanmış klinik örneklerdir.)

suşlar için PFGE tiplendirmesi yapılmış ve bu yöntemde benzerlik sınırı %80 ve üzeri alındığında (Dice benzerlik katsayısına göre), tüm sonuçlar DiversiLab sistemi ile uyumlu bulunmuştur (Şekil 3).

## TARTIŞMA

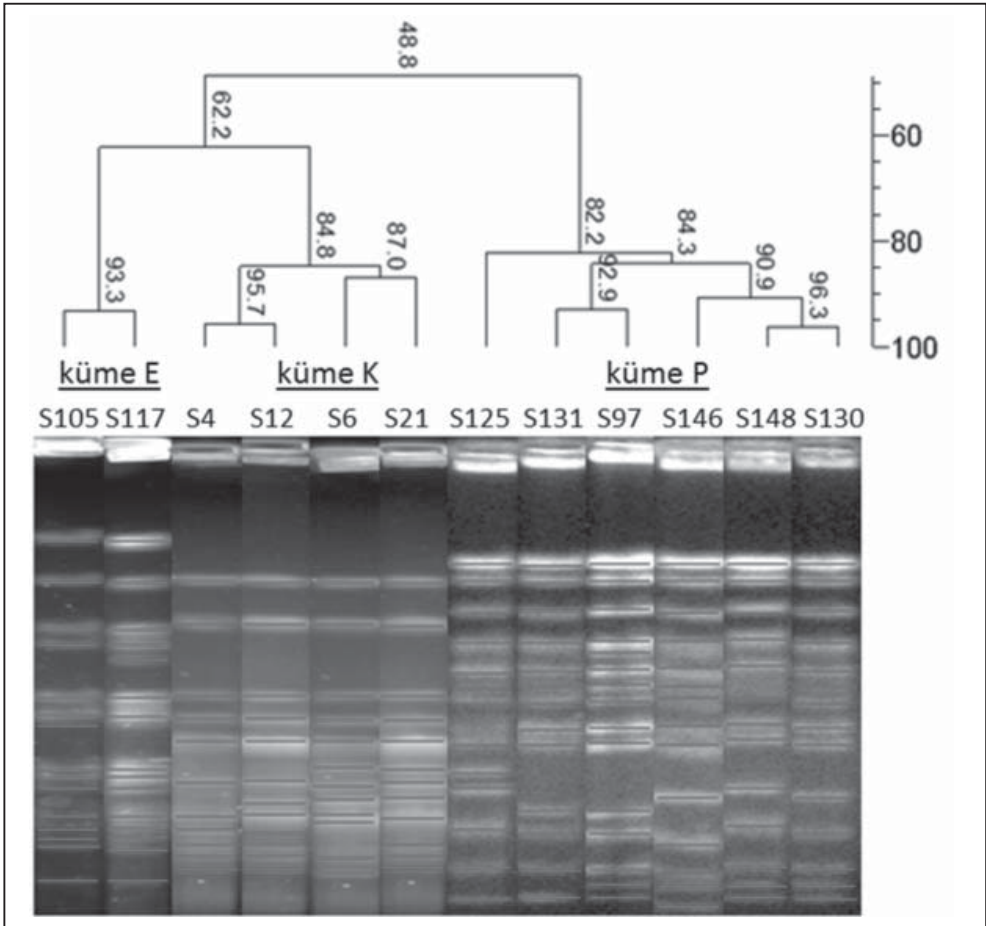
*S.pyogenes*, hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyonlardan, asemptomatik taşıyıcılığa kadar değişen geniş bir klinik görünümüne sahip, virülansı yüksek bir bakteridir<sup>5,12,13</sup>. Özellikle akut romatizmal ateş, romatizmal kalp hastalığı ve post-streptokokal glomerülo nefrit gibi GAS'a bağlı ciddi hastalıklar tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur. Bu hastalıkların dünya çapında prevalans ve insidans değerlerinin sırasıyla 18.1 ve 1.78 milyon olduğu ve bunlardan yıllık en az 517 bin kişinin hayatını kaybettiği öngörülmektedir<sup>1</sup>. GAS'a bağlı enfeksiyonlara karşı önlem alınabilmesi ve korunma stratejilerinin geliştirilebilmesi için; etken mikroorganizmanın tespiti, bulaş yollarının araştırılması, virülanslarından sorumlu genlerin ve izolatlar arası klonal ilişkilerin belirlenmesini de kapsayan moleküler epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır. Bununla birlikte aşı ile ilişkili antijenik determinantların belirlenmesi de, moleküler epidemiyolojik çalışmaların bir parçasıdır<sup>14</sup>.

Yapılan çalışmalarda, GAS taşıyıcılık oranlarının; yaşa, mevsime, ülkelerin ve bölgelerin sosyoekonomik gelişmişlik oranlarına göre değiştiği görülmektedir<sup>15</sup>. Çalışmamızda, ortalama sosyoekonomik düzeydeki sağlıklı ilköğretim öğrencilerinin, yaklaşık beşte birinin GAS taşıyıcısı olduğu bulunmuş ve bu oranın yaş ile artış gösterdiği saptanmıştır. Çalışmalarda, *S.pyogenes* taşıyıcılık oranının dokuz yaşından sonra arttığı ve özellikle beş yaşın



Şekil 2. Klonal yönden ilişkili 36 izolatın Rep-PCR ile oluşturulmuş dendogramı. Benzerlik katsayısı %90 ve üzeri olan suşlar klonal olarak ilişkili olarak kabul edilmiştir.





Şekil 3. Rep-PCR ile klonal olarak ilişkili bulunan E, K ve P kümelerinin PFGE ile doğrulanması. Dice benzerlik katsayısı %80 ve üzeri olan suşlar klonal olarak ilişkili olarak kabul edilmiştir.

altındaki çocuklarda taşıyıcılığın anlamlı derecede düşük olduğu bildirilmektedir<sup>15,16</sup>. Bunun nedeni olarak anneden geçen koruyucu antikorların varlığı gösterilmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, GAS taşıyıcılık oranları %2.8 ile %25.9 arasında değişiklik göstermektedir<sup>17-19</sup>. Asemptomatik çocuklardaki GAS taşıyıcılığının değerlendirildiği ve tüm dünyadan 21 çalışmanın incelendiği bir meta-analizde, taşıyıcılık oranlarının %3-26 arasında olduğu saptanmıştır<sup>15</sup>. Buna göre, bulduğumuz taşıyıcılık oranı literatür bilgilerine göre yüksek sınırlara yakındır.

M-proteini, grup A streptokokların hücre duvarında yer alan en önemli virülans faktörüdür ve suşa özgü immün yanıtın gelişiminden sorumludur. Yapılan çalışmalarda, GAS'ın yol açtığı farklı klinik tablolarda farklı *emm* tiplerinin rol oynadığı ileri sürülmektedir<sup>8,13</sup>. Çalışmamızda, en sık olarak *emm1* (%30.9) tipi tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla; *emm12* (%14.6), *emm89* (%8.1), *emm118* (%7.3) ve *emm4* (%5.7) izlemektedir. Ülkemizde ta-

şu yığılara ait izolatların *emm* tiplerinin araştırıldığı tek çalışma vardır. Mengeloğlu ve arkadaşlarının<sup>18</sup> 60 izolat ile yaptıkları bu çalışmada; en sık *emm12* (%25), *emm89* (%15), *emm77* (%10), *emm1* (%8.3) ve *emm5.7* (%5) tipleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada en sık görülen, beş *emm* tipinin dördü (*emm1*, *emm12*, *emm 77*, *emm 89*), bizim çalışmamızda tespit edilen *emm* tipleri ile ortaktır ve söz konusu *emm* tipleri her iki çalışmada da toplam suşların %60'ından fazlasını oluşturmaktadır. Ülkemizin farklı bölgelerinden klinik izolatlar ile yapılan çalışmalar bir araya getirildiğinde, toplam 266 izolatta en sık olarak *emm1* (%15.8) ve *emm12* (%12.4) tiplerinin tespit edildiği görülmektedir. Bunu *emm3* (%9.8), *emm4* (%6.8) ve *emm89* (%6.4) tipleri izlemektedir<sup>18,20-22</sup>. Bizim sonuçlarımız ile birlikte ülkemizden yapılan tüm çalışmalar göz önüne alındığında, Türkiye'de *emm1* ve *emm12* tiplerinin (tüm örneklerin yaklaşık 1/3'ü) yaygın olduğu görülmektedir.

Toplam 38.081 GAS izolatını içeren 102 çalışmanın sonuçlarının değerlendirildiği bir meta-analizde, dünya genelinde de en sık görülen *emm* tiplerinin *emm1* (%18.3) ve *emm12* (%11.1) olduğu görülmüştür<sup>23</sup>. Birçok farklı ülkede, asemptomatik çocuklardan izole edilen suşlarla yapılan çalışmalarda da, yine en sık olarak *emm1* ve *emm12* tipleri saptanmıştır<sup>24,25</sup>. Bu bulgular, çalışmamızda saptadığımız verilerle uyumludur.

Yapılan çalışmalarda, *S.pyogenes*'in *emm 1, 3, 5, 6, 12, 14, 18, 19, 24, 27* ve *29* tiplerini taşıyan suşlarının romatojenik komplikasyonlarla ilişkili olduğu bildirilmektedir<sup>8,13,26</sup>. Buna göre, çalışmamızda bulunan 20 farklı *emm* tipi içerisinde beşinin (%20) romatojenik türler arasında olduğu görülmüştür. Ancak, saptanan türlerin oransal ağırlığı dikkate alındığında; *emm* tipi belirlenebilen 123 izolatın 92'si (%74.7) romatojenik gruptadır. Son yıllarda, romatizmal ateşin gelişiminde *emm* tiplerinin yanında, konak immün yanıtının rolü de araştırılmaktadır. Bu araştırmaların odak noktasını, doğal immün yanıtın aktivasyonunda ve sinyalizasyon yollarında meydana gelebilecek hatalar oluşturmaktadır. Picard ve arkadaşları<sup>27</sup>, MyD88/IRAK-4 eksikliği olan bireylerde, invazif GAS hastalığının sağlıklı bireylere göre daha fazla görüldüğü tespit etmişlerdir. Fernandez ve arkadaşları<sup>28</sup> da, etkene karşı gelişen MyD88/IRAK-4'e bağımlı immün yanıtın, virülans faktörlerinin ve toksinlerin klinik seyir ile ilişkisini araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonucunda, klinik görünüm ile *emm* tipleri veya virülans faktörleri arasında bir korelasyon olmadığı, buna karşın konak immün yanıtının belirleyici olduğu vurgulanmıştır<sup>28</sup>. Uchiyama ve arkadaşları<sup>29</sup> ise, GAS ile ilişkili farklı virülans faktörlerini ve bunların immün sistemle olan ilişkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, yakın zamanda keşfedilen bir diğer GAS virülans faktörü olan streptodornaz (Sda1)'in, doğal immün yanıtın bir parçası olan Toll benzeri reseptör-9 (TLR-9) üzerine olan etkisini tespit etmek için, deneysel hayvan modeli oluşturulmuştur. Sonuç olarak, Sda1'in TLR-9 aracılı immün yanıtı baskıladığı ve bu sayede GAS'ın, makrofajların bakterisidal etkilerinden kaçabildiği belirlenmiştir<sup>29</sup>. Ne var ki, bütün bu araştırmalara karşın, GAS'a karşı gelişen immün yanıtın bireyler arasında neden bu kadar farklı olduğu net olarak cevaplanamamıştır.

Bölgemizde GAS taşıyıcılığının yüksek olması ve izolatların *emm* tiplerinin romatojenik olarak bilinen suşlar içinde yer alması, toplumumuzun akut romatizmal ateş yönünden taşıdığı riskin yüksek olabileceği konusunda uyarıcı bir bulgudur. Bununla birlikte sonuçlarımız, ülkemizin *emm* tipleri açısından genel durumunun ortaya konulması için daha

geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermiştir. Toplumda *S.pyogenes* eradikasyonu yapılması ve önleyici girişimlerin artırılmasına ihtiyaç duyulabilir. Bu amaçla GAS'a karşı koruyucu aşı çalışmaları yürütülmektedir. En son, Kuzey Amerika ve Avrupa'da yaygın olan *emm* tiplerini içeren 30 valanlı aşının potansiyel etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, üretilen aşının kapsadığı tüm tiplere yönelik antikor üretimini sağlayabildiği; ayrıca, içermediği 24 *emm* tipine karşı da bakterisidal antikor ürettirebildiği tespit edilmiştir<sup>30</sup>. Aynı çalışmada bildirilen *emm* tipleri dikkate alındığında, çalışmamızda bulunduğumuz *emm* tiplerinin kapsanma oranı %92.8 (13/14 suş) olarak bulunmaktadır. Bu sonuca göre, üretilen bu son aşının toplumumuzda *S.pyogenes* enfeksiyonlarının ve buna bağlı gelişebilen romatolojik komplikasyonların önlenmesinde faydalı olabileceği tarafımızdan öngörülmüştür.

Grup A streptokokların toplumdaki yayılım dinamiklerinin ve salgınların tespit edilmesi için izolatlar arasındaki klonal ilişkilerin araştırılması gereklidir. Yapılan çalışmalar, okul ve işyeri gibi kalabalık yaşama ortamlarının, etkenin yayılımında önemli olduğunu göstermektedir<sup>15-18</sup>. Çalışmamızda, örneklerin toplandığı her iki okulda da baskın bir salgın izolatı tespit edilmemiştir. Tüm izolatlar birlikte değerlendirildiğinde, suşlar arasındaki kümeleşme oranı %26.9 olarak saptanmış ve klonal ilişkilerin tamamı PFGE ile doğrulanmıştır. Farklı okullardan izole edilen suşların hiçbirisi, birbirleriyle klonal olarak ilişkili bulunmamıştır. Aynı küme içerisinde yer alan izolatlar, büyük oranda (%91.6) aynı sınıfta olan öğrencilerden izole edilmiştir (Şekil 2). Bu durum, GAS yayılımının okul çağındaki çocuklarda önemli bir risk oluşturduğunu göstermektedir. Bölgemizden yapılan diğer bir çalışmada, asemptomatik 130 okul çocuğundan izole edilen suşlar arasındaki klonal ilişki oranı %36.1 olarak bulunmuş ve sonuçlar klasik epidemiyolojik verilerle de doğrulanmıştır<sup>17</sup>. Mengeloğlu ve arkadaşları<sup>18</sup> ise, taşıyıcılardan izole edilen GAS izolatları arasındaki klonal ilişkiyi, %80.4 gibi oldukça yüksek bir oranda bulmuşlardır.

Grup A streptokokların diğer önemli virülans faktörleri arasında pirojenik ekzotoksinler yer almaktadır. Süperantijen yapısındaki bu toksinler, şok ve yaygın organ hasarı ile sonuçlanabilecek proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretilmesine neden olabirler<sup>9-10</sup>. Bunlardan *SpeA* ve *speC* geni tarafından kodlanan pirojenik toksinler, bakteriyofaj tarafından transdüksiyon ile bakteriye aktarılırlar. Çalışmamızda toplam 134 GAS izolatının 11'inde *speA* (%8.2), 12'sinde *speC* (%8.9) ve ikisinde (%1.5) her iki toksin geni birlikte tespit edilmiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada Mengeloğlu ve arkadaşları<sup>18</sup>, 79 klinik ve 60 taşıyıcıdan izole ettikleri 139 GAS izolatında *speA* ve *speC* dahil olmak üzere beş farklı toksin genini araştırmışlardır. Taşıyıcılardan izole edilen suşların %35'inde *speA*, %48.3'ünde *speC* pozitif bulunurken, klinik izolatların %26.6'sında *speA* ve %50.6'sında ise *speC* pozitif bulunmuştur. Bu oranlar bizim çalışmamızdan oldukça yüksektir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre, bölgemizdeki ilkökul çocuklarında GAS taşıyıcılığının yüksek olduğu saptanmış; ancak herhangi bir salgın izolatı tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, M-protein türlerine göre izolatların yaklaşık 3/4'ünün romatogenik olarak tanımlanan suşlar arasında olması; ayrıca, suşların yaklaşık 1/5'inin toksin geni taşıması ve okul içi GAS yayılımının tespit edilmesi endişe vericidir. Ülkemizin GAS yönünden risk durumunun saptanarak, korunma ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi için daha geniş ve toplum merkezli çalışmalara gereksinim olduğu görülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis* 2005; 5(11): 685-94.
2. Metzgar D, Zampolli A. The M protein of group A *Streptococcus* is a key virulence factor and a clinically relevant strain identification marker. *Virulence* 2011; 2(5): 402-12.
3. Ralph AP, Carapetis JR. Group A streptococcal diseases and their global burden. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 368:1-27.
4. Fazeli MR, Ghaemi E, Tabarraei A, et al. Group A streptococcal serotypes isolated from healthy schoolchildren in iran. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22(8):475-8.
5. Martin JM, Green M. Group A *streptococcus*. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006; 17(3): 140-8.
6. Olive C, Schulze K, Sun HK, et al. Enhanced protection against *Streptococcus pyogenes* infection by intranasal vaccination with a dual antigen component M protein/Sfbl lipid core peptide vaccine formulation. *Vaccine* 2007; 25(10):1789-97.
7. Smeesters PR, McMillan DJ, Sriprakash KS. The streptococcal M protein: a highly versatile molecule. *Trends Microbiol* 2010; 18(6): 275-82.
8. Ayoup E, Kotb M, Cunningham M. Rheumatic Fever Pathogenesis, pp:102-32. In: Stevens D, Kaplan E (eds), *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology and Molecular Pathogenesis*. 2000, Oxford University Press, New York.
9. Wu PC, Lo WT, Chen SJ, Wang CC. Molecular characterization of group A streptococcal isolates causing scarlet fever and pharyngitis among young children: a retrospective study from a northern Taiwan medical center. *J Microbiol Immunol Infect* 2014; 47(4): 304-10.
10. Schmitz FJ, Beyer A, Charpentier E, et al. Toxin-gene profile heterogeneity among endemic invasive European group A streptococcal isolates. *J Infect Dis* 2003; 188(10): 1578-86.
11. Elliott JA, Farmer KD, Facklam RR. Sudden increase in isolation of group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulsed-field gel electrophoresis type. *J Clin Microbiol* 1998; 36(7): 2115-6.
12. Martin JM, Barbadora KA. Continued high caseload of rheumatic fever in western Pennsylvania: Possible rheumatogenic *emm* types of *Streptococcus pyogenes*. *J Pediatr* 2006; 149(1): 58-63.
13. Bryant PA, Robins-Browne R, Carapetis JR, Curtis N. Some of the people, some of the time: susceptibility to acute rheumatic fever. *Circulation* 2009; 119(5): 742-53.
14. Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer S. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* 1999; 283(5403): 806-9.
15. Shaikh N, Leonard E, Martin JM. Prevalence of streptococcal pharyngitis and streptococcal carriage in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2010; 126(3): 557-64.
16. Vijaya D, Sathish JV, Janakiram K. The prevalence of group a streptococci carriers among asymptomatic school children. *J Clin Diagn Res* 2013; 7(3): 446-8.
17. Durmaz R, Durmaz B, Bayraktar M, et al. Prevalence of group A streptococcal carriers in asymptomatic children and clonal relatedness among isolates in Malatya, Turkey. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11): 5285-7.
18. 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.
19. Toprak D, Demirdal T, Aşçı Z, Orhan S, Çetinkaya Z, Demirtürk N. Sağlıklı okul çocuklarında nazofarinksde A grubu beta hemolitik streptokok taşıyıcılığı. *Düzce Tıp Fakültesi Derg* 2008; 2: 26-9.
20. Akça G. Boğaz enfeksiyonu nedeni olan A grubu beta hemolitik streptokokların M protein tiplerinin "emm" gen sekans analizi ile belirlenmesi. Doktora Tezi, 2006. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
21. Arslan U, Oryasin 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. Çakmak A. İstanbul'da 2007-2009 döneminde çocuk hastaların boğaz kültürlerinden izole edilen A grubu beta hemolitik streptokokların M proteini (*emm*) geni tiplendirilmesi. Uzmanlık Tezi, 2009. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul.
23. Steer AC, Law I, Matatolu L, Beall BW, Carapetis JR. Global *emm* type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *Lancet Infect Dis* 2009; 9(10): 611-6.
24. Chang H, Shen X, Fu Z, et al. Antibiotic resistance and molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* isolated from healthy schoolchildren in China. *Scand J Infect Dis* 2010; 42(2): 84-9.
25. Pires R, Rolo D, Morais A, et al. Description of macrolide-resistant and potential virulent clones of *Streptococcus pyogenes* causing asymptomatic colonization during 2000-2006 in the Lisbon area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(5): 849-57.
26. Erdem G, Mizumoto C, Esaki D, et al. Group A streptococcal isolates temporally associated with acute rheumatic fever in Hawaii: differences from the continental United States. *Clin Infect Dis* 2007; 45(3): 20-4.
27. Picard C, Casanova JL, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IkappaBalpha deficiency. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24(3): 490-7.
28. Fernandez I, Brito RM, Bidet P, et al. Invasive group A Streptococcus disease in French-Canadian children is not associated with a defect in MyD88/IRAK4-pathway. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2014; 10(1): 9.
29. 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.
30. Dale JB, Penfound TA, Chiang EY, Walton WJ. New 30-valent M protein-based vaccine evokes cross-opsonic antibodies against non-vaccine serotypes of group A streptococci. *Vaccine* 2011; 29(46): 8175-8.