

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI.

**BOĞAZ ENFEKSİYONU NEDENİ OLAN A GRUBU BETA
HEMOLİTİK STREPTOKOKLARIN M PROTEİN TİPLERİNİN
“emm” GEN SEKANS ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dr. GÜLÇİN AKCA

171993

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. NEDİM SULTAN

ANKARA, 2006

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesini sağlayan, her zaman içten yardımlarını esirgemeyen, engin tecrübelerinden faydalandığım, eğitimimde ve yetişmemde sonsuz katkıları olan, çok büyük saygı duyduğum değerli hocam **Prof. Dr. Nedim SULTAN**'a,

Eğitimimde büyük katkıları olan değerli hocalarım **Prof. Dr. Sevgi TÜRET**, **Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR**, **Prof. Dr. Turgut İMİR**, **Prof. Dr. Seyyal ROTA** ve **Doç. Dr. Meltem Yalınay ÇIRAK**'a,

Bu çalışmanın planlanması ve yapılmasında birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım, bitmez enerjisi, sabrı ve engin bilgisiyle her zaman desteğini gördüğüm **Öğr. Gör. Dr. Evren Doruk ENGİN**'e,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez izleme jürimdeki katkılarından dolayı **Prof. Dr. Rana OLGUNTÜRK**'e,

Ana bilim dalımızdaki beraber çalıştığım, hep desteklerini gördüğüm tüm asistan ve doktora arkadaşlarıma,

Doktora eğitimim süresince her konuda, her zaman desteklerini ve içten yardımlarını gördüğüm, kopmaz bir bağ kurduğumuza inandığım Mikrobiyoloji rutin laboratuvarının sevgili personeline,

Tez çalışmalarım esnasında gösterdiği sabır ve yardımlardan dolayı eşim, G.A.T.A. Diş Hekimliği Periodontoloji A.D. öğretim üyesi **Yrd.Doç. Dr. Ahmet Eralp AKCA**'ya,

Teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	5
GEREÇLER VE YÖNTEM	47
BULGULAR	56
TARTIŞMA	66
SONUÇ	73
ÖZET	75
SUMMARY	77
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	102

GİRİŞ

İnsanlarda ağız, boğaz, burun, deri, sindirim ve genital sistem gibi çeşitli bölgelerin floralarında bulunabilen streptokoklar çok çeşitli hastalıklara neden olabilirler.^{1,2,3} Streptokoklar “**Streptococcaceae**” ailesinde yer almaktadır. Günümüzde geçerliliğini sürdüren “Lancefield” sınıflamasına göre, **A grubu beta hemolitik streptokok** ailesi içinde olan, *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) bu grubun en önemli türüdür. *S. pyogenes* tarafından oluşturulan enfeksiyonlar ve enfeksiyon sonrası gelişen komplikasyonlar, penisilin tedaviye girmiş olmasına rağmen gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde halen önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir.

A grubu beta hemolitik streptokoklar (AG β HS), tonsillofarenjit ve impetigo/pyoderma gibi akut piyogenik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca daha derin dokuları tutan erizipel, sellülit, nekrotizan fasiit, toksik streptokokal sendrom ve kızıl gibi daha şiddetli enfeksiyonlara, sepsis, pnömoni ve menenjit gibi öldürücü olabilen komplikasyonlara da neden olmaktadır.² Streptokokal enfeksiyon sonrası otoimmüniteye bağlı olarak gelişen, akut poststreptokokal glomerulonefrit (APSGN) ve akut romatizmal ateş (ARA) gibi birçok komplikasyonlardan da sorumlu olan önemli bir mikroorganizma grubudur.^{4,5} Bu komplikasyonlardan ARA, gelişmiş ülkelerde halen edinilmiş kalp hastalıklarının en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir. 1980 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) beklenmedik salgınlara neden olmuştur. 1980’lerin ortalarından 1990’lara kadar A.B.D’de en büyüğü Salt Lake City

(Utah)'da olmak üzere, Pensilvanya, Ohio, Tennessee, Batı Virginia ve San Diego(Kaliforniya) bölgelerinde romatizmal ateş salgınları bildirilmiştir.^{6,7,8} Buna rağmen hem A.B.D. hem de batı dünyası, ARA ve APSGN'in etyopatogenezi hakkında çok detaylı bilgiye sahip değildir.³ Son yıllarda nekrotizan fasiit, myozit ve toksik-şok benzeri sendrom gibi invaziv enfeksiyonlara da neden olduğunu bildiren raporların sayısı artış göstermiştir.^{1,9,10} İsveç ve İngiltere'de de bunlara benzer enfeksiyonların sayısında artış olduğunu gösteren raporlar vardır.⁶

Penisilinin kullanıma girmesiyle, *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) tarafından oluşturulan ölümcül enfeksiyonlara tedavi olanağı sağlanmış ve gelişmiş ülkelerde bu hastalıkların insidansında bir düşüş görülmüştür.¹¹ Ancak son 20-30 yıl içinde bu enfeksiyonlarının sayısında artış görülmesi ile tekrar gündeme gelen bu bakteri grubunun önemi yeniden artmıştır. Günümüzde *S.pyogenes*, halen ciddi klinik tablolara yol açmakta ve salgınlara neden olmaktadır. Bu durum, bakterinin virülansını arttırma eğiliminde olduğunu göstermektedir.

S. pyogenes enfeksiyonlarının tedavisinde ve yayılmalarının önlenmesinde kullanılan penisiline karşı henüz bir direnç gelişimi bildirilmemiştir. Bu durum umut verici gibi görülmesine karşılık, GAS ile oluşan enfeksiyonlar, halen gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olmaya devam etmektedir. Özellikle *S. pyogenes*'e bağlı boğaz ve deri enfeksiyonlarından sonra gelişebilen ARA ve APSGN gibi komplikasyonlar, kalp, eklem ve böbrekleri etkileyerek yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürmekte ve

tedavi maliyetlerini arttırmaktadır. Bu durum birey ve toplum bazında birçok sosyal, psikolojik ve ekonomik sorunu da beraberinde getirmektedir.

GAS enfeksiyonları ve komplikasyonlarının kliniğini etkileyen faktörler tam olarak anlaşılamamıştır. GAS'ların virülansında önemli bir rolü olan M proteini, üzerinde en çok çalışılan faktörlerden biridir.

Başta A.B.D olmak üzere, Kanada, İsrail, İngiltere, Fransa, Çin, Brezilya ve daha birçok ülkede, boğaz enfeksiyonu etkeni olan *S. pyogenes*'in M tiplerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak ülkemizde bu konuda yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buna neden olarak, “M” serotiplerinin antiserumlarının ticari olarak elde edilememesi, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Center of Disease Control (CDC))’nin önerdiği, güvenilir bir yöntem olarak kabul edilen *emm* gen dizi analizine dayalı tanımlamanın zorluğu ve yapım maliyetlerinin yüksek olması düşünülebilir. Bu durumun yanı sıra, antiserumlar ile yapılan tiplendirmelerin, yapısal olarak benzer diğer proteinler ile oluşabilen çapraz reaksiyonlar nedeniyle bilimsel çevreler tarafından güvenilir kabul edilmediği de bildirilen raporlar arasındadır. DNA dizi analizine ve prob hibridizasyon tekniğine dayalı yöntemler ile yapılan tiplendirmelerin daha güvenilir olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kullanılacak olan “*emm*” dizi analizi bu konuda CDC tarafından da önerilen güvenilir bir tanımlama metodu olarak kabul edilmektedir.^{12,13,14}

Bu sayede, hastanemize başvuran hastalardan izole edilen *S.pyogenes* suşlarının M tiplerinin saptanması ülkemizde yapılan ilk çalışma olarak bilimsel bir açığı giderecektir. Ayrıca bu konuda daha ileri çalışmaların yapılmasına da

zemin hazırlayacaktır. Bu çalışmada incelenecek olan A grubu streptokokların M tipleri “emm” dizi analizi ile saptanarak M tipi dağılımı belirlenecektir.

Günümüzde, M tipleri ile streptokok enfeksiyonları sonrası gelişen komplikasyonlar arasındaki ilişki bilinmektedir. Bu komplikasyonların önlenmesi için aşı geliştirme çalışmaları büyük bir hızla sürdürülmektedir.^{4,15,16} Büyük olasılıkla yakın bir zamanda ülkemizde de kullanılabilecek olan bu aşı tiplerinin ülkemizde en sık karşılaşılan *S.pyogenes* M tiplerini kapsayıp kapsamadığı yapılacak bu çalışma ile tespit edilmiş olacaktır.



GENEL BİLGİLER

Geniş bir bakteri grubu olan streptokoklar; gram pozitif boyanma özelliğine sahip olan, yuvarlak veya oval şekilli, tek başına, ikiye bölünebilen gruplar halinde veya zincir yapmış olarak bulunan, 0.6-1 mikrometre büyüklüğünde olan mikroorganizmalardır.

CDC'nin bildirdiği istatistiklere göre A.B.D'de her yıl yaklaşık 10.000-15.000 invaziv GAS vakası görülmekte ve bunların 2000'den fazlası ise ölümle sonuçlanmaktadır. Ek olarak bu invaziv hastalıkların içinde, 500-1500 nekrotizan fasiit ve 2000-3000 Streptokoksik Toksik Şok Sendromu (STSS) vakası olduğu da yayınlanan raporlar arasındadır. Streptokoksik boğaz enfeksiyonu ve impetigo vakalarının sayısı ise milyonlar ile ifade edilmektedir.¹⁷ A.B.D'de, 1995-1999 yılları arasında, 5 merkezli yapılan bir surveyans çalışmasında, invaziv GAS enfeksiyonu oranının her 100.000 kişi için 3.6 olduğu bildirilmiştir. Yaklaşık olarak 9600-9700 vakada 1100 ile 1300'ünün ise ölümle sonuçlandığı rapor edilmiştir. İnvaziv hastalıklar içinde mortalite oranları ise; nekrotizan fasiitte %20, STSS'da %50, diğer enfeksiyonlarda ise %10-15'dir. Bu sayılara ek olarak daha birçok invaziv GAS vakaları veya salgınlarının olduğu öne sürülmüş ancak bunların kayıtsız olmaları nedeniyle tam sayı belirlenememiştir.^{17,18,19,20,21} CDC'ye göre A.B.D.'de 2003 yılında 4844 şiddetli GAS hastalığı görüldüğü rapor edilmiştir(<http://medlineplus.gov> , National Library of Medicine Medline plus).

Araştırmacılara göre *S.pyogenes*'in neden olduğu hastalıklar, sekeller ve komplikasyonların çok çeşitli olmasını nedeni iki ayrı şekilde açıklanabilmektedir:

Birincisi; mikroorganizmanın sahip olduğu çok çeşitli virülans faktörlerinin suştan suşa farklılık göstermesidir.

İkincisi; virülans genlerini düzenleyen mekanizmalarda oluşan değişikliklerdir. Günümüzde artık *S.pyogenes*'in virülans genlerinin ekspresyonunu kontrol eden bir seri düzenleyici genlerin olduğu bilinmektedir.

Vücudun farklı kısımlarındaki sinyal değişiklikleri ve düzenleyici genlerde oluşan değişiklikler, bakterinin virülansını eksprese eden genlerde aktivasyon veya baskılanma şeklinde uyarılara yol açmaktadır. Düzenleyici genlerdeki çeşitliliğe bağlı olarak, organizmanın davranışları, vücudun farklı bölgelerinde değişiklik göstermektedir.²² Bu nedenle aynı suş, farklı kişilerde değişik klinik tablolara yol açabilmektedir. Suşlar arasındaki değişiklikler, hem bakteriye ait virülans faktörlerinin iyi bilinmesi, hem de değişik laboratuvarlarda farklı sonuçların bulunması arasındaki çelişkinin açıklanmasında büyük önem taşımaktadır.

A-TARİHÇE:

İlk olarak 1874’de Billroth tarafından, yara ve erizipel lezyonlarının pürülan eksudalarından izole edilmiş, zincir yaparak üreyen koklar olarak tanımlanmışlardır.^{1,21}

1879’da Pasteur tarafından puerperal (lohusalık) sepsisli bir hastanın kanından izole edilmiştir. Aynı zamanlarda kızıl hastalığına yakalanan bir hastanın boğaz kültüründen de bu bakteriye benzer bir bakteri izole edilmiştir.¹

1881’de Ogston bu bakteriyi cerahat etkeni olarak tanımlamıştır. Aynı yıl Robert Koch “*streptococci*” olarak adlandırılan bu bakterinin erizipel lezyonlarında her zaman bulunduğunu göstermiştir.¹

1882-1883’de Fehleisen, perierizipel lezyonlardan zincir yapan bu mikroorganizmaların saf kültürünü elde etmeyi başarmış, ayrıca gönüllüler üzerinde bu bakteriyi kullanarak erizipel meydana getirmiştir.¹

1884’de Rosebach ise bu mikroorganizmaya “*Streptococcus pyogenes*” ismini vermiştir.¹

1903’de Schottmueller, kanlı agarda hemoliz farklılıklarını göstermiştir.

1919’da J.H. Brown, kanlı agardaki hemolitik aktivitelerine dayanarak streptokokları alfa, beta ve gama hemolitik olarak gruplandırmıştır.

1920’de Dochez, 1924’te ise George ve G.R.Dick, kızıl hastalığına hemolitik streptokokların yol açtığına dikkatleri çekmiştir.¹⁸

1925-1933 yılları arasında Griffith, aglütinasyon yöntemleriyle streptokokların immünolojisini incelemiştir. Aynı yıllarda ise Todd, Anti-Streptolizin O (ASO) cevabını keşfetmiştir.

1933 yılında Rebecca Lancefield streptokokları hücre duvarlarında bulunan karbonhidrat antijenlerine göre serogruplara ayırmıştır. Bu yöntemle A-H ve K-V harfleri ile gösterilen 20 grup tanımlamıştır. A serogrubunda yer alan suşların, insanda hastalık oluşturan streptokokların çoğunluğunu oluşturduğunu belirlemiştir. Lancefield, A serogrubundaki bakterilerin hücre duvarında bulunan **M protein** antijenlerine göre serotiplerinin varlığını göstermiştir. Griffith ise, aglütinasyon reaksiyonu yardımıyla **T protein** serotiplerini göstermiştir. Lancefield, M proteininin *S. pyogenes*'in önemli bir virülans faktörü olduğunu ve tipe özgül bağışıklıktan sorumlu bir faktör olabileceğini savunmuştur.¹

1900'lerin ortalarına doğru *S.pyogenes*'in kızıl, APSGN ve ARA tabloları ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir.¹⁸ A grubu streptokok kökenli farinks enfeksiyonu olan ve tedavi almayan veya uygunsuz tedavi gören kişilerin %3-5'inde çoğunlukla kardiyak hasar ile sonuçlanan ARA gelişebileceği rapor edilmiştir.^{23,24}

1937'de bu konuda çalışan Sherman ise, hemoliz yapma, üreyebildikleri ısı derecesi, bazı biyokimyasal özellikleri ve antijen yapılarına göre streptokokları; pyojenik, viridans, enterokok ve laktik olarak dört gruba ayırmıştır.

S.pyogenes, II. dünya savaşından önce yanıklı hastalardaki ölümlerin en büyük sorumlusu olarak tespit edilmiştir. Streptokokal gangren de denilen, invaziv bir enfeksiyon olan, nekrotizan fasiit oluşturması nedeniyle savaş esnasında yaralı askerler arasında bir çok kişinin ölümüne yol açmıştır.²²

1987-1991 yılları arasında, Kanada, Ontario’da, *S.pyogenes*’e bağlı sporadik bir salgın şeklinde invaziv nekrotizan fasiit olguları görülmüştür. Bu özellikleri nedeni ile son yıllarda “yamyam bakteri” ya da et yiyen bakteri (flesh-eating) adı altında yazılı basında sık sık yer almıştır.^{11,25}

Puerperal sepsis nedeniyle olan ölümlerin de yarısından fazlasına neden olduğu rapor edilmiştir.^{4,11}.

Üzerinde uzun süredir detaylı bir şekilde çalışılmasına rağmen, AGBHS enfeksiyonlarının kliniğini etkileyen faktörler tam olarak anlaşılamamıştır. Çalışmalar sırasında, bu faktörleri etkileyen yapılar arasında, AGBHS’lara ait birçok enzim ve toksinin yer aldığı görülmektedir. Hücre duvar antijenleri, öncelikle bu bakteriye, enfekte dokuda süregen kalma yeteneğini sağlarlar. Ayrıca, bu virülans faktörleri, bakterinin davranış özelliklerinin belirlenmesinde ve kişinin enfeksiyondan korunabilmesinde çok önem taşımaktadır. Hücre duvar antijenlerinden biri olan M proteini en önemli faktörlerden biridir. Bu yapı bakterinin özellikle tipe özgül antikor yokluğunda, parçalı çekirdekli lökositler (PMNL) tarafından fagositoza karşı korunmada önemli bir rol oynamaktadır.²³

B)HÜCRESEL YAPILARI:

I- KAPSÜL:

Kapsül, bakterinin yapısında en dışta bulunan, N- asetilglukozamin ve D-glukuronik asit ünitelerinin dizilimiyle oluşmuş, yüksek molekül ağırlıklı bir polimer olan hyaluronik asit yapısındadır. Daha çok genç kültürlerde bulunur ve üremenin 2-4 saati içinde gösterilebilir.^{1,19} Hyaluronik asit yapımında; hyaluronik asit sentaz (*has*) A, B, C olarak adlandırılan 3 farklı genden oluşan bir operon

görev almaktadır.²⁶ *hasA* hyaluronat sentaz enzimini, *hasB* UDP-glukoz dehidrogenaz enzimini, *hasC* ise UDP-glukoz pirofosforilaz enzimini kodlamaktadır.²⁷ *hasC*'nin , inaktivasyonu kapsül üretimini etkilememektedir, çünkü bu durumda bakteriye, UDP-glukoz'a alternatif olabilecek bir kaynak kullanılmaktadır.²⁸

Streptokoklar kapsül üretimlerine göre çeşitlilik gösterirler.¹⁹ Kanlı agar besiyerinde üretildiğinde, en mukoid görünümlü olanların kapsül üretimi fazladır. Sıvı besiyerlerinde üretildiğinde kapsül üretimi, üremenin erken logaritmik safhasında en fazladır.²⁹

Fagositoya direnç ile kapsülleşme arasındaki ilişki yıllardır bilinen ve çok çalışılan konulardan biridir. Bu konuda modern moleküler biyolojik teknikler kullanılarak fare modelinde yapılan bir çalışmada, kapsülsüz bir izojenik mutant suşun, kapsüllü suşa göre fagositoya direnme yeteneğini kaybettiği ve fare üzerindeki virülansında 100 kat düşüş tespit edildiği rapor edilmiştir.³⁰

Kapsülden ve M proteininden zengin GAS suşlarının insanlar üzerinde oldukça virülan olduğu, mukoid suşların da daha invaziv infeksiyonlara yol açtığı uzun zamandır bilinmektedir. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; bu daha mukoid suşlar, aynı zamanda akut romatizmal ateş salgınının da habercisidirler.^{19,31} Yapılan bir epidemiyolojik çalışmada, komplikasyonsuz farenjite neden olan GAS suşlarının sadece %3'ünde mukoid koloni morfolojisi tespit edilmesine karşılık, normalde steril olan bölgelerde ciddi streptokokal infeksiyona neden olan suşların % 21'inin ve romatizmal ateş görülen vakaların da % 42'sinin mukoid olduğu belirtilmiştir.³²

GAS'ların kapsülünde ve insan bağ dokusunda bulunan hyalüronat, kimyasal olarak birbirine çok benzemektedir. Bu nedenle bu yapı zayıf immünojendir ve insanlar üzerinde GAS'ların hyaluronik asitine karşı antikor oluşumunu göstermek zordur. Bu tip antikorların varlığının, ancak kapsüllü GAS suşu ile bağışıklanmış tavşandan³³ ve lipozoma bağlı hyaluronat ile bağışıklanmış fareden elde edilebilebileceği gösterilmiştir.³⁴

II- HÜCRE DUVARI VE ANTİJENİK YAPILARI:

AGBHS'ların kapsülünün altında bulunan hücre duvarı, birçok antijenik yapının bir arada bulunduğu kompleks bir yapıdır. Bu yapı gruba özgül karbonhidratlar, peptidoglikan tabaka, M, T, R protein antijenleri ve lipoteikoik asit yapılarını içermektedir. Kapsülün arasından lipoteikoik asit ve tipe spesifik M proteini taşıyan pililer(fimbria) dışarı uzanmaktadır. Bunlar streptokokların epitel hücrelerine tutunmalarını kolaylaştıran yapılardır.

A-Hücre duvarının karbonhidrat antijeni:

Viridans streptokoklar dışında bütün streptokoklarda bulunan ve gruba özgül olan bu antijenler polisakkarit yapıdadırlar ve **C karbonhidrat antijeni (C polisakkariti)** diye de adlandırılmaktadır.^{1,2,22} Streptokoklarla bağışıklanmış tavşan serumları ile presipitasyon metodu kullanılarak birbirinden farklı 20 adet C karbonhidratı bulunmuştur. *S.pyogenes* suşları, A'dan H'ye ve K'dan V'ye kadar olan harfler ile adlandırılan serogruplara ayrılmışlardır. Bu yapılar, sulandırılmış hidroklorikasit (HCl), nitrik asit, formamid gibi kimyasal maddeler, pepsin, tripsin gibi litik enzimler ile muamele edilerek veya otoklavlanarak hücre duvarından izole edilebilirler.¹ Bu yöntemle hazırlanan streptokok ekstreleri ve gruba özgü

antiserumlar ile kapiller tüp testi, halka testi, çift difüzyon testi kullanılarak presipitasyon reaksiyonu veya lateks aglütinasyon, koaglütinasyon reaksiyonları ile serogruplandırma yapılabilmektedir.

A grubu streptokokların C polisakkariti, L-ramnoz ve N-asetil-D-glukozamin'in dallanmış polimerlerinden oluşan bir yapıya sahiptir. Mikroorganizmanın kuru ağırlığının %10'unu oluşturur. Diğer gruplarda bu karbonhidrat yapı gruba göre değişiklik göstermektedir. Örneğin; B grubunda ramnoz-glikozamin, C grubunda ramnoz N-asetil-glukozamin, D ve N grubunda gliserol-teikoik asit, F grubunda glukopiranozil-N-asetilgalaktozamin determinantlarından oluşmaktadır. A grubu streptokoklarda, "N terminali" antijen belirleyici bölgedir.

C karbonhidratının molekül ağırlığı 8.000-10.000 daltondur. Ramnoz oranının N-asetil-glukozamine oranı ise ortalama 2/1'dir. A grubu streptokokların neden olduğu enfeksiyonlardan hemen sonra serumda C karbonhidratına karşı oluşan antikorlar saptanabilir ve uzun bir süre serumda saptanmaya devam ederler.

B-Streptokok hücre duvarının yüzey protein antijenleri:

1-T proteini: M proteini ile birlikte bulunan T proteini, pepsin ve tripsin gibi proteolitik enzimlere dayanıklı, fakat asit ve alkalilere duyarlıdır. Alkolde erimeyen bir proteindir. Streptokoksik hastalıkların patogenezinde çok önem taşımayan ve virülansı arttırıcı etkisi olmayan bir antijen olduğu saptanmıştır.¹ Özellikle GAS enfeksiyonlarının epidemiyolojisindeki sürveyans çalışmalarında önem taşıyan bir yapıdır.³⁵ Belirli bir M serotipindeki streptokok kökeni birden

fazla T proteini taşıyabilmekte ve aynı T proteini de farklı M serotiplerinde bulunabilmektedir.¹⁸ *S.pyogenes* suşları 20 farklı kombinasyonda T protein motiflerine sahiptir. GAS suşlarının çoğu 4, 9, 11 numaralı T protein tipini taşımaktadırlar. Fakat bunların invaziv hastalık veya mortalite ile ilişkisi henüz kanıtlanamamıştır. Streptokokların T protein tipleri, ticari olarak sağlanan, anti T serumları kullanılarak aglütinasyon yöntemi ile saptanabilir. T proteinlerine karşı bağışık antiserum elde edilmesi M proteinlerinden daha kolaydır, fakat özgüllüğü daha düşüktür. Aglütinasyon yöntemi ile belirlenmiş, M serotipleri ve T proteinleri arasında, yüksek oranda uyumluluk saptanması, bu proteinlerin önemini daha da arttırmıştır. T proteinlerinin diğer bir fonksiyonu da; M antiserumunun olmadığı ve/veya M proteininin sentezlenemediği durumlarda, serotiplendirmeye yardımcı olabilmesidir. Ayrıca son yıllarda T proteinlerinin moleküler metodlar ile genotipik olarak da belirlenebildiğini gösteren yayınlar vardır.^{18,36}

2-R proteini: Bu protein, A, B, C, G ve L grubu streptokoklar ile ilişkilidir. Pepsine duyarlı, tripsine ise dirençlidir. Tipe özgül değildir. 3R ve 28R olarak adlandırılan 2 tipi belirlenmiştir..

2-a) R28 Proteini: Bu protein ile puerperal sepsis arasında bir korelasyon bulunmaktadır. 18. ve 19. yüzyılda puerperal sepsisten kaybedilen bir çok kadın olmuştur.⁴ Bu hastalık, bilime büyük katkıları olan Semmelweis'in asepsi ve antisepsi üzerine sterilizasyon için yaptığı çalışmalarına da konu olmuştur. Puerperal ateş, şok ve çoklu organ yetmezliği ile seyreden streptokokal toksik şok sendromu (STSS) ile benzerlik gösteren bir tablodur.^{3,4} R28 proteini, bu hastalığın

moleküler mekanizmasının anlaşılmasında ve epidemiyolojisinde önemli bir rol oynar. Genellikle bu hastalık nedeniyle oluşan salgınlardan izole edilen suşların çoğunda bulunmaktadır. Farenjit oluşturan suşların ise az bir kısmında bulunmuştur.³⁷ İlk önce grup B streptokok (GBS)'larda tanımlanmıştır. Çok tekrarlayan yüzey protein ailesinin bir üyesidir. R28 proteini GBS'larda görülen Rib ve α proteinlerine moleküler olarak çok benzerlik göstermektedir.^{38,39,40} R28'i kodlayan gen GBS'da saptanmıştır. R28 proteininin, GBS'un Rib proteini ile benzerliğini açıklamaya çalışan, bir başka hipoteze göre de, bazı GBS suşları R28'e benzer bir protein eksprese etmektedirler. *S.pyogenes*'in R28 proteini ile GBS'ların Rib proteini arasındaki benzerliğin aynı fonksiyona sahip olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. R28 proteini, *S.pyogenes*'in insan servikal epitel hücrelerine bağlanmasını sağlayan bir proteindir. GBS'nin Rib proteini ile GAS'ların R28 proteini arasında, insan genital sistemine bakteri kolonizasyonunu sağlamaları nedeniyle fonksiyonel açıdan da benzerlik bulunmaktadır.⁴¹ R28'den yoksun bir mutant bakterinin genital epitel hücrelere bağlanamadığı görülmüştür. Bu bulgu ile, *S.pyogenes*'in R28 proteininin dokuya tropizmi ve özellikle de kadın genital sistemindeki hücrelere adezyonu sağladığı hipotezine ulaşılmıştır. Bu hipoteze göre, doğum esnasında R28 eksprese eden bir *S.pyogenes* suşu ile temas sonunda, ciddi puerperal ateş enfeksiyonu oluşma riski yüksektir, çünkü R28 taşıyan bakteri yaralanmış dokuda hızla bir enfeksiyon başlatabilir. Diğer yandan *S.pyogenes* suşları ekzotoksin üretirler. Bunlar da puerperal ateşin gelişmesine ve diğer invaziv *S.pyogenes* enfeksiyonlarının oluşmasına katkıda bulunurlar.

2-b) R3 Proteini, Bu protein hakkında fazla bir bilgi yoktur. Virülansta rol oynamayan bir proteindir. ¹

3-M proteini: M proteini, çoğunlukla sadece A grubu streptokoklara özgül olan en önemli virülans faktörüdür. Streptokok hücre duvarında saç benzer çıkıntılar şeklinde görülür. 3500 molekül ağırlığındadır. Isı ve aside dayanıklıdır, alkolde erimektedir ve tripsine duyarlıdır. Bu protein hücre duvarından pH'sı 5.8 olan pepsin (PepM)^{42,43}, iyonik olmayan deterjan ⁴⁴ ve lizin ⁴⁵ kullanılarak ayrılabilir. Bakteriyi, PMNL'ler tarafından fagosite edilmelerinden ve komplemanın etkilerinden koruyan bir proteindir. M proteini olan suşlar, mat veya mukoid koloniler oluştururlar ve insan kanında hızla çoğalarak daha virülan hale geçebilirler. Kolonileri daha parlak olan suşlarda M protein yapımının daha az olduğu, mat koloni oluşturanlarda ise daha fazla olduğu düşünülmektedir. Fimbria ile yakından ilişkili olan M proteini, epitel hücrelerine ve kandaki proteinlere adhere olabilmesinden dolayı bir adezin olarak tanımlanmıştır²². *S. pyogenes* klinik izolatlarının genellikle tümünün M proteini eksprese ettiği bildirilmiştir ⁴. M proteini olmayanların, dolayısı ile fimbriasının da olmadığı düşünülmektedir.

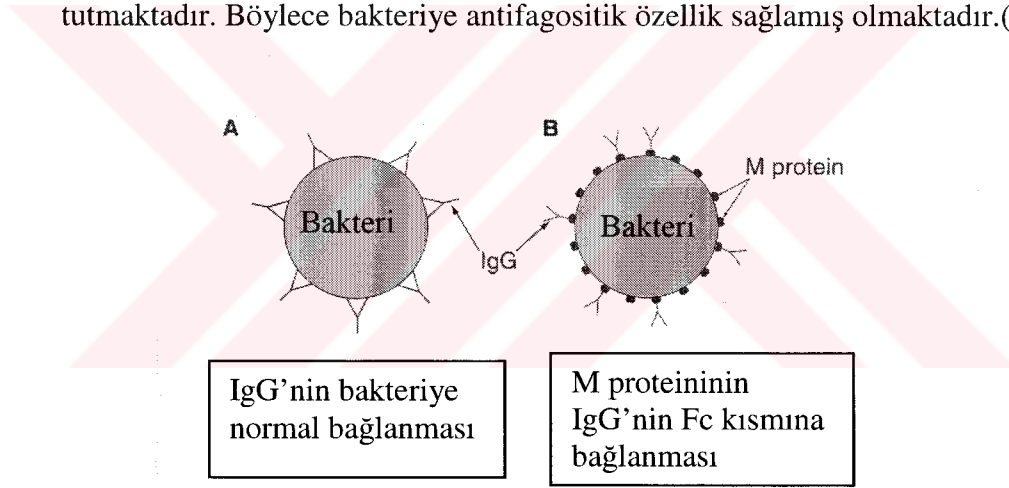
4- Adezinler ve aderens işlemi:

Bir mikrobiyal patojenin insanda hastalık oluşturabilmesi için ilk koşul bir mukozal veya kutanöz yüzeye tutunmasıdır. Böylece normal floradaki mikroorganizmalar ile yarışarak, hücre yüzeylerine tutunmakta, birçok elektrostatik ve mekanik kuvvetleri harekete geçirerek hastalığı başlatabilmektedir. Bu yüzden patojen mikroorganizmalar, konak dokuya adhere olabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar, suştan suşa değişen özgül adherens faktörlerinin genetik yapılarına, seçtikleri doku tipine, lokal ve çevresel faktörlere göre belirlenmektedir.^{19,22} En az 17 tane adezin adayı tanımlanmıştır, fakat içlerinden en çok çalışılan yapı **lipoteikoik asit (LTA)** ve yapışkan matriks moleküllerini tanıyan bakteri yüzey komponentleri (**MSCRAMM=Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules**)dir. Bunlar sadece *S. pyogenes* te değil, "*Staphylococcus aureus*" gibi gram pozitif birçok bakteride bulunabilir. Ayrıca bu proteinler, fibronektin, fibrinojen veya kollajen gibi konak proteinlerine bağlanmaya aracılık ederler. Sitoplazmik membrandan salgılanırlar. Bu proteinlerin çoğu, "**sortaz**" adlı bir enzim yardımıyla peptidoglikana çapraz olarak bağlanan pentaglisine kovalent olarak bağlanırlar. Bu grubun içinde; **M proteini**, **M benzeri proteinler** (bunlar M proteinine benzer amino asit sekansına sahip proteinlerdir) **fibronektin bağlayıcı protein 1 ve 2 (F1 ve F2)** ve **Epa (kollajen bağlayıcı bir protein)** bulunmaktadır.²²

Bakteri duvar yapısında bulunan **LTA**, bakterinin insan bukkal epitel hücrelerinin yüzeyindeki fibronektine bağlanmasını sağlar.⁴⁶ LTA, hidrofobik

etkileşimler ile organizmayı konağın hücreleri ile yakın temasa getirmektedir. Aynı zamanda diğer yüzey yapılarına da yüksek affinitede bağlanmayı başlatmada adezin olarak görev yapmaktadır.⁴⁷

M ve M benzeri proteinler; kollajen ve fibronektin gibi hücre dışı matriks proteinleri, faktör H, IgA, IgG ve fibrinojen gibi proteinlere bağlanabilme özelliğindedirler. M proteinlerinin antikorlara bağlanması, normal bir antikor bağlanması şeklinde olmamaktadır. Bakteriyel yüzey proteinleri, antikorların Fc kısmından bağlanarak, antijenin bağlanma bölgelerini, bakteri yüzeyinden uzak tutmaktadır. Böylece bakteriye antifagositik özellik sağlamış olmaktadır.(Şekil1)²²



Şekil 1: M proteinin antifagositik özelliğinin şematik olarak gösterilmesi

GAS yüzey proteinlerinden **Protein F1 (PrtF1)** üzerinde en çok çalışılan proteinlerden biridir. **Streptokokal fibronektin bağlayıcı protein (Streptococcal fibronectin binding protein) I(Sfb 1)** olarak da adlandırılmaktadır. Bu protein, bakterinin boğaz ve deriye adherensinde önem taşır.⁴⁸ Bu protein aynı zamanda SfbII⁴⁹, FBP5⁵⁰, protein F⁵¹, ve PFBP⁵², ile de ilişkilidir. Protein F1/ Sfb 1 solunum yolu epitel hücrelerine bağlanmayı kolaylaştırır.⁵³ Guzman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, bu protein ile intranasal olarak aşılanan

fareler, virülan GAS'ların ölümcül dozlarına bağışık hale gelmişlerdir. Keratinositlere GAS adherensini M proteini başlatsa da kutanöz langerhans hücrelerine GAS adherensinde en büyük rolü PrtF1/ Sfb1 oynamaktadır.¹⁹ Ayrıca bu adezinlerin ekspresyonunun çevresel faktörler ile düzenlendiğini gösteren çalışmalar yayınlanmıştır.¹⁹ Kutanöz enfeksiyon oluşmasında, bu proteinlerin ekspresyonu için dokudaki parsiyel O₂ ve CO₂ basınç değerlerindeki değişikliklerin etkisi çok önemlidir. O₂'den zengin bölgede protein F1 yapımı daha çok olurken, parsiyel CO₂ basıncının daha yüksek olduğu yerde M proteini yapımı daha çok olmaktadır.⁵⁴ Bu nedenle doğal olarak, organizmanın kutanöz bir yüzeye tutunmasında; derinin epidermis tabakası gibi yüzeye yakın yerlerde, PrtF1 yapımı indüklenmektedir. Fakat fagositik hücrelerin daha çok bulunduğu ve mikroorganizma için bu nedenle daha tehlikeli olan dermis tabakası gibi daha derin dokularda ise M proteininin ekspresyonunun daha çok olacağı varsayılmaktadır.¹⁹

Bir kez adherens aşaması gerçekleştikten sonra **kolonizasyon**, sonra **internalizasyon** safhaları oluşmakta ve enfeksiyon başlamaktadır.

5- Kolonizasyon işlemi:

Mikroorganizma farinks veya deri gibi dokulara bir kez tutunduktan sonra kolonizasyon başlar. Özellikle M proteinine sahip olan suşlar bukkal veya tonsillar epitele tutunurlar ve böylece ilk mikrokoloni oluşumu başlamış olur. Fakat izojenik M protein (-) mutantlarda ise bu tutunma işlemi ve kolonizasyon gerçekleşmemektedir.⁵⁵ Maymunlar ve fareler üzerinde yapılan çalışmalarda ilk adherens için bu protein çok gerekli görülmemiş olsa da orofaringiyal kavitedeki

kriptalarda M(+) suşların M(-) suşlara göre daha uzun süre kalabilmeleri bu durumu açıklamaktadır.⁵⁶ İntranazal olarak inoküle edilmiş kapsüllü GAS suşları ile yapılan hayvan çalışmaları sonucunda, kapsülünü kaybetmiş mutantlara göre boğazda daha uzun süre kalabilmeleri ve oluşan enfeksiyonun da daha yüksek mortalite gösterdiği bildirilmiştir.⁵⁷

6- İnternalizasyon işlemi:

GAS'lar genellikle hücre içi patojenleri olarak düşünülmemektedirler. Ancak yakın zamanda yapılan çalışmalarda, insan solunum epiteli hücre kültürleri GAS ile enfekte edildiğinde GAS'ların bu epitel hücrelerine penetre olabildikleri ve hücre içinde yaşayabildikleri gösterilmiştir.⁵⁸ Bakteriyel adherensi takiben hücre içine penetrasyonda birçok mekanizma yer almaktadır. M proteini ve protein F1 bu işlemde rol oynayan yapılardır.^{59,60} Hücrenin iskelet yapısının yeniden düzenlenmesinde ve konağın integrinleri ve integrin bağları ile streptokokal adezyon arasındaki etkileşimlerde de bu yapılar görev almaktadırlar^{59,60}.

GAS'ın hücre içine girişinin biyolojik önemi bilinmektedir. Bu penetrasyon bakterinin derin dokuya invazyonuna olanak sağlamaktadır. Sonuçta hücre içine giriş; mikroorganizmayı; ökaryot hücre zarını doğrudan geçemeyen penisilin gibi antibiyotiklerin antimikrobiyal etkilerinden korumaktadır. Ayrıca salgısal bağışıklık faktörlerinin ve fagositlerin etkilerinden korumaktadır. Sonuç olarak hücre içinde yaşayabilmesi, canlılığının devamı için bakteriye avantaj sağlar ve epitelin içi bir sığınak olarak kullanılmış olur. Semptomsuz streptokok taşıyıcılarından cerrahi olarak çıkartılmış tonsil dokularından ve enfekte

tonsillerden yapılan biyopsi kültürlerinde benzer oranlarda canlı GAS varlığı tespit edilmiştir.^{61,62}

İnvaziv yumuşak doku enfeksiyonu oluşturulan bir fare modelinde kapsüllü bakteri daha ölümcül etki yaratmıştır. Buna karşılık M proteininin ve PrtFl'in adherensteki etkilerine zıt olarak, hyaluronat kapsül GAS'ların insan keratinositlerine ve Hep-2 hücrelerine, adherensini ve internalizasyonunu engelleyebilmektedir.⁶³ Bu paradoksa getirilen açıklama şu şekildedir: Streptokok kapsülünün insan epitel hücre yüzeyindeki hyaluronik asit bağlayıcı protein olan CD44'e bağlanması ile, mikroorganizmalar epitele penetre olmaktadır. Bunun sonucunda hücre içi bağların bozulması ile hücresel iskelet yeniden düzenlenmekte ve mikroorganizmaların bir kısmı hücre dışı alanda kalmaktadır⁶⁴

C- Peptidoglikan tabaka:

Bu yapı L-alanin-D-glutamil-L-lizin-D-alanin yan zincirleriyle bağlanmış olan ve tekrarlayan N-asetil-D-glukozamin- ve N-asetil-D-muramik asit ünitelerinden yapılmıştır. Streptokoku çevreleyen bu rijid yapı, birçok bakterinin peptidoglikan tabakasına benzerlik göstermektedir. Bu benzerlikler nedeniyle immünolojik olarak çapraz reaksiyonlara da neden olmaktadır.¹

D-Hücre membranı:

Bu yapı %72 protein, %25 lipid ve %2 glukozdan oluşmuştur. Memeli miyokardiyumu ve böbrekteki glomerül bazal membranı ile benzer antijenik determinantlara sahiptir.

E- Hücre dışı ürünler:

A grubu streptokoklar birçok enzim ve toksin üretmektedirler. Günümüzde bunların birçoğunun özellikleri tanımlanmıştır.

1-Hemolizinler:

Streptolizin O (SLO) ve **Streptolizin S (SLS)** olarak isimlendirilen iki adet belirgin hemolizin tanımlanmıştır.

1a) Streptolizin O (SLO) oksijene duyarlıdır ve ismini de bu duyarlılıktan almaktadır. Bu etki oksijen varlığında geri dönüşümlü olarak, kolesterol varlığında ise geri dönüşümsüz olarak inhibe olabilmektedir. Oksijen yokluğunda hemolitik ve ölümcül olmaktadır. Bu hemolizin bakterinin ekildiği besiyerinin altındaki hemolizden sorumludur. İyi korunmuş, por oluşturan sitolizin ailesinin bir üyesidir.¹⁹ Bu hemolizinin sülfidril grupları, alyuvar membranının kolesterol içeren bölgesindeki membran sterollerine bağlanarak, SLO+kolesterol kompleksi yaparak, membran lipitlerinde, 500 Å büyüklüğünde mikroskopik delikler açmaktadır. Bu deliklerden hemoglobin açığı çıkarak, hemoliz meydana gelmektedir.

Eritrositlerdeki oluşturdukları bu toksik etkilerine ek olarak, polimorf çekirdekli lökositler (PMNL), trombositler, doku kültürü hücreleri, lizozomlar, hem memeli hem de amfibyan kalp dokusu hücreleri gibi çok çeşitli hücrelere ve hücresel yapılara da toksik etki yapmaktadır. Ayrıca SLO'nun oluşturduğu bu membran delikleri boyunca, bir başka streptokok sitotoksini olan NAD glikohidrolazın da keratinositlere taşındığı yakın zamanlarda gösterilmiştir.⁶⁵

SLO, GAS'ların tümünde, C ve G grubundaki mikroorganizmaların ise birçoğunda üretilen antijenik bir yapıdır. SLO'ya karşı, antistreptolizin O (ASO) antikorları oluşmakta ve ARA, romatizmal kardit, AGβHS tonsilliti, kızıl ve akut glomerülonefrit gibi birçok hastalıkta yükselerek, tanıda değerli bir laboratuvar testi olarak yer almaktadır.

1b) Streptolizin S (SLS); SLS, kanlı agardaki yüzeyel hemolizden sorumludur. Oksijen karşısında inaktive olmaz ve termolabildir. Eritrosit, lökosit ve protoplastları eritir.^{1,19} Molekül ağırlığı yaklaşık 20.000 daltondur ve yaklaşık 28 amino asitten oluşan bu hemolizin, oksijene dayanıklı küçük bir polipeptiddir.

Bu hemolizin, serumda veya serum albümini, α-lipoprotein ve ribonükleik asit gibi çok çeşitli maddeler varlığında üreyebilen streptokoklar tarafından üretilmektedir. Hücre içi hücre yüzeyine bağlı ve hücre dışı olmak üzere farklı formlarda bulunabilen bu protein, bilinen en güçlü sitotoksinlerden biridir. Hemolitik aktivitesi, serum lipoproteinleri ve fosfolipidler ile inhibe olur. Hemolitik aktivitesini nötralize edebilecek doğal bir antikor varlığı saptanamamıştır. Yani immunojen olmadığı düşünülmektedir. Ancak SLS molekülünün amino asit dizisine benzer amino asit dizisine sahip toksinleri nötralize edebilen ve antikorları anımsatan sentetik polipeptidlerin, bu hemolitik aktiviteyi bir miktar nötralize edebildiği ileri sürülmüştür.^{66,67} SLS, SLO, PMNL'ler ile birlikte trombositler ve hücresel organellerin membranlarındaki hasarı oluştururlar. GAS suşlarının çoğu her iki hemolizini de oluşturmaktadır. Bununla birlikte nadir de olsa, bu hemolizinden sadece birini oluşturabilen veya hiç hemolizin oluşturamayan GAS suşları da vardır.¹⁹

Teorik olarak püyük likefaksiyonunu kolaylaştıran ve karakteristik olarak selülit ve nekrotizan fasiitte olduğu gibi streptokokların dokulara yayılmasını sağlayan birçok hücre dışı ürün vardır: Bunlar; DNA'nın parçalanmasında rol oynayan DNAaz (A, B C ve D), hyalüronidaz, streptokinaz, streptokokal pirojenik ekzotoksin B (Spe B) ve kompleman 5a (C 5a) peptidazdır. Streptokok enfeksiyonlarının serolojik teşhisinde bu ekstraselüler ürünlere karşı üretilen antikorlar kullanılmaktadır. Bunlar SLO, anti-DNAaz B, antihyalüronidaz, anti-NADaz ve antistreptokinazdır.

2-Streptokokların yaptığı kompleman inhibitörü: Streptokokal inhibitör komplement (Sic) M1 suşları tarafından üretilen bu protein, membrandan bağımsız olarak birbirine bağlanan C5b-C6 ve C7'nin, membran üzerindeki bağlanma bölgesine bağlanır ve membran atak kompleksinin oluşmasını engelleyerek bakterinin opsonize olmasını önlemektedir.^{68,69} Kompleman ile gerçekleşen bu etkileşimin yanında Sic, ökaryotik plazma membran proteini olan "Ezrin"ne bağlanarak, patojen bakterinin canlılığını sürdürmesine imkan tanımaktadır. Ayrıca bu etkileşim, çok çekirdekli lökositler tarafından *S. pyogenes*'in öldürülmesinde rol oynayan önemli hücresel işlevleri de değiştirmektedir.

3- DNA'az: Streptodornaz ve Streptokokal deoksiribonükleaz olarak da bilinen DNAaz'ın, A, B, C ve D olmak üzere dört antijenik tipi vardır. Bu enzim, cerahatli eksudayı hızla eritmektedir. B ve D nükleazları, RNA'az aktivitesine sahipken, A ve C nükleazları DNA'az aktivitesine sahiptir.

4- Difosfopiridin nükleotidaz (NAD'az): Nikotinamid nükleotidaz veya nikotinamid adenin dinükleotidaz (NAD'az) olarak da isimlendirilebilen bu enzim, nikotinamidi açığa çıkarır. Molekül ağırlığı yaklaşık 55.000 dalton olan bu enzim daha çok nefritojenik suşlar tarafından üretilmektedir.

5- Hyalüronidaz: Bağ dokusu içinde yer alan hyalüronik asiti, enzimatik olarak depolimerize ederek doku içinde streptokokların yayılımını sağlar. Bağ dokusunun esasını oluşturan bu maddeyi erittiği için, yayılma faktörü olarak da bilinir.¹

6-Streptokinaz (=Fibrinolizin): İnsan plazmasında plazminojenin plazmine dönüşümünü katalize ederek fibrinin erimesine ve protein hidrolizine neden olan bir enzimdir. Bu hücre dışı enzimin elektroforetik hareketleri ve antijenik özellikleri birbirinden farklı olan A ve B olmak üzere 2 tipi vardır. Fibrinolitik sistemi aktif hale getirdiğinden, streptokinaz preparatları yüzeysel infeksiyonlarda debridman ve yara iyileşmesini hızlandırma amaçlı da kullanılmaktadır. Ayrıca bu enzimden fibrinöz eksudaların kaldırılmasında, koroner arter ve venöz trombüslerin ayrıca pulmoner embolinin eritilmesinde de faydalanılmaktadır.^{1,70}

7-Serum opasite faktörü (sOF): GAS'ların yarısından çoğu opasite faktörü üretir. Bu yapı çeşitli memeli serumlarında opasite oluşmasına yol açan bir lipoproteinazdır. OF'ye karşı oluşan antikorlar da M proteinleri gibi tipe özgüdür. Bir OF inhibisyon testi kullanarak OF tipinin belirlenmesi ile GAS'ların M tipleri de belirlenmektedir.⁷¹ sOF'ü GAS'ların en önemli fibronektin bağlayıcı proteindir. İmpetigo, farenjit ve akut glomerulonefrit oluşturan suşlarda olur.

8- Streptokokal pirojenik ekzotoksin(Spe): Streptokokal toksik şok sendromu (STSS) ile ilişkili olduğu düşünülen ve **bakteriyel süperantijen** de denilen bu aile içinde bir çok protein bulunmaktadır. Önceki yıllarda “skarlatinal toksin” veya “eritrojenik toksin” olarak da bilinen bu toksinin bakteriyofaj tarafından kodlanan ve kızıl döküntülerinden de sorumlu olduğu düşünülen, SpeA ve SpeC diye bilinen iki türü bulunmaktadır.⁷² Bu toksine karşı bağışıklığı olmayan kişilerde kızıl hastalık tablosu ortaya çıkmaktadır. Özellikle bu iki türün STSS ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca GAS’ların M proteinlerinin 1 ve 3 tiplerinin bu sendrom ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir.⁷³ Bu toksine karşı bağışık olanlarda ise streptokok enfeksiyonu görülürken kızıl hastalığı tablosu gelişmemektedir. Antitoksine karşı bağışıklık gruba özgüdür. SpeB ise kromozomal olarak kodlanır. Ayrıca, SpeG, SpeH, SpeJ, SpeK, SpeL, streptokokal süperantijen (SSA), streptokokal mitojenik ekzotoksin Z (SMEZ) ve SMEZ 2 de diğer pirojenik ekzotoksinleridir ve kızıl ile ilişkilidirler.

SMEZ-2 gibi süperantijen özelliğine sahip bazı streptokok toksinleri, *S. pyogenes* enfeksiyonuna karşı T hücre cevabının oluşmasında potansiyel düzenleyici olarak rol oynarlar.⁷⁴ SpeL ve SpeH ise ARA oluşturan M protein tip 18’e sahip bir suş tarafından oluşturulmaktadır.⁷⁵ SpeA, C, H, ve SMEZ-2’nin moleküler yapıları tanımlanmıştır. Bu yapıların diğerlerinin yapılarına ve aynı zamanda da stafilokokal süperantijen ailesinin de yapılarına benzerlik gösterdiği bildirilmiştir.⁷⁶ Bu iki toksinin biyolojik aktivitesinin aynı olmasına karşılık, amino asit dizilimleri büyük ölçüde farklıdır. 25.000 dalton molekül ağırlığındaki bu moleküller, MHC sınıf II molekülü ve T hücre reseptörüne (TCR) sahiptir. Her

bir süperantijenin bir çinko bağlama bölgesi bulunmaktadır. Bu çinko moleküllerinin de sınıf II molekülüne bağlanmaya aracılık yaptığı düşünülmektedir.¹⁹ Güçlü immünomodulator olan süperantijenler, MHC sınıf II molekülüne lateral yüzden ve T-hücre reseptörlerinin (TCR) V beta bölümüne bağlanarak, V beta ünitesi oluşturan T hücrelerinin aşırı salınımına yol açarlar. T hücrelerinin de süperantijenle aktivasyonu sonucu tümör nekrozis faktör α (TNF α), interlökin 1 β (IL 1 β) ve interlökin 2 (IL 2) gibi sitokinler ve interferon γ (IFN γ) gibi T hücre mediyatörlerinin salgılanmasında artış olmaktadır. Bu immünomodulatorlerin kontrolsüz salınımı kompleman sistemini aktive edip, koagülasyon ve fibrinolitik yolları harekete geçirerek hipotansiyon ve çoklu-organ yetmezliğiyle bilinen STSS oluşumu ile sonuçlanmaktadır. STSS'in genellikle SpeA üreten suşlar ile oluşan enfeksiyonlar ile ilişkili olduğuna dair yayınlar bulunmaktadır.⁷⁷

SpeB bir sistein proteazdır ve bu toksini kodlayan gen bütün GAS suşlarında bulunmaktadır. Önceleri bir süperantijen olduğuna inanılmasına karşılık günümüzde hastalığa katkısının yalnızca proteaz aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. SpeB'nin, STSS ve şiddetli invazif enfeksiyonda rol aldığını kanıtlayan çok sayıda deneysel çalışma yapılmıştır. SpeB, birçok biyolojik fonksiyona sahiptir. Bu fonksiyonlar; fibronektin, vitronektin ve diğer konak proteinlerine bağlanma ve IL 1, kinin, histamin gibi biyolojik aktif peptidlerin üretimidir.

GAS enfeksiyonunu takiben insan serumunda SpeB'ye karşı oluşmuş antikorlar bulunmaktadır. Genetik mutantlar ile yapılan çalışmalar sonucunda

deneysel olarak invazif GAS infeksiyonu oluşturulan modellerde virülans artışının SpeB ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İnvaziv GAS infeksiyonundan izole edilen klonal olarak M1 tip protein taşıyan suşlar ile hastalığın şiddeti arasında bir ilişki bulunmuştur. Ancak SpeB ekspresyonu ile hastalığın şiddeti arasında zıt bir ilişki olduğu rapor edilmiştir.^{78,79}

Bu yapının yanısıra streptolizin O, lipoteikoik asit, peptidoglikan da sitokinlerin salınımını uyaran yapılardır. Aslında STSS oluşturabilme kapasitesine sahip suşlar ile enfekte olan veya bu suşların kolonize olduğu hastaların az bir kısmında gelişebilen bu sendromun oluşmasında konağa ait faktörler de önemli rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada invaziv hastalığı olanlarda, hem M proteinine karşı antikorların, hem de süperantijeni nötralize eden antikorların konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu rapor edilmiştir.⁸⁰ Bu yüzden STSS gelişimi ile inflamatuvar sitokin cevabının yoğunluğu arasında direk bir korelasyon vardır.⁸¹ Bununla birlikte STSS gelişimine eğilim ile HLA haplotipleri arasında da doğrudan bir korelasyonun olduğu yakın zamanda bildirilen raporlar arasındadır.⁸²

Ayrıca bu süperantijenlerin artrit alevlenmesini tetiklediği veya şiddetlendirdiği ileri sürülmüştür. Bu pirojenik ekzotoksinin tavşanlarda keratinosit proliferasyonuna ve deride reaktivasyona sebep olduğu gösterilmiştir.⁸³

S.pyogenes gram pozitif bir bakteri olduğundan hücre duvarında bulunan lipoteikoik asit, gram negatif bakterilerin yapısında bulunan lipopolisakkaritin (LPS) yaptığı gibi septik şoku başlatabilmektedir. LPS, toksik şok sendromunda toksik şoku başlatmak için *S. aureus*'un süperantijeni ile sinerjistik etki gösterir.

Böylece *S.pyogenes* ve *S.aureus* gibi gram pozitif bakterilerin süperantijenleri ile sinerjistik etki gösteren LTA da büyük olasılıkla aynı yoldan septik şoku başlatmaktadır. Bu durum enfeksiyon sırasında bakterilerin lizisi ile de olabilmektedir.²²

S.pyogenes'in enfeksiyon etyopatogenezinde rol alan bu virülans faktörleri

Tablo-1'de özetlenmiştir.(Tablo-1)

Tablo-1: *S.pyogenes*'in virülans faktörleri ve etyopatogenezdaki rolleri

Virülans faktörü	Konaktaki rolü
Adezinler	
M proteini	Hücre dışı matriks proteinlerini (kollajen, fibrinojen) bağlar
	IgG'nin Fc kısmına bağlanarak antifagositik aktivite de rol oynar
M-benzeri proteinler	Hücre dışı matriks proteinlerini bağlar
	Antikorların Fc kısmına bağlanır
F1 ve F2	Fibronektine bağlanır
Epa	Kollojeni bağlar
Hücre dışı enzimler	
Streptolizin O (SLO)	Eritrositleri parçalar
Streptolizin S (SLS)	Eritrositleri parçalar
Streptokinaz	Plazminojenin plazmine dönüşmesini aktifler, fibrini eritir
Antifagositik faktörler	
M proteini	Fibrinojeni bağlar ve IgG'nin Fc kısmına bağlanır
	Kompleman faktör H'yi bağlar
Hyaluronik asit kapsül	C3b'ye bağlanmayı engeller; bakterinin kendi yapısı gibi görünmesini sağlar
C5a peptidaz	C5a'nın konsantrasyonu düşürür; nötrofiller için kemotaktik sinyalleri azaltır
Sic	Kompleman sisteminde membran atak kompleksinin oluşmasına yol açar

Süperantijenler (SpeA-I)	
SpeA	Ölümcül invaziv enfeksiyonlarda ve toksik şok-benzeri sendroma yol açan suşlarda bulunur
SpeB	Sistein proteaz; bakterinin yayılmasını kolaylaştırır
Diğerleri	Daha az çalışıldığından yeni veri yok
Lipoteikoik asit (LTA)	Sitokin üretimini artırır, septik şoka yol açar, süperantijenler ile sinejistik etki gösterebilir

III-STREPTOKOK GENOMU:

GAS'ların serotiplerinin klinikte bilinen bazı sendromlar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. 1980'lerin ortalarından günümüze kadar ABD'deki Salt Lake bölgesinde izole edilen suşlarda epidemik ARA vakalarından en sık olarak M18 serotipi, nekrotizan fasiit ve STSS olgularında ise daha sık olarak M1 ve M3 serotiplerinin izole edildiği gözlenmiştir.^{16,19} Genetik yapılarıyla da ilişkili olarak spesifik sendromlar oluşturan ve streptokokları invaziv suşlar haline getiren etkinin genetik alt yapılarındaki farklılıklardan kaynaklandığı ileri sürülmüştür.¹⁹

GAS genomunun büyüklüğü 1.85 ile 1.9 Mb arasında değişmektedir. G+C değeri %38.5-%38.6'dır. 1752 ile 1895 açık okunan bölge (ORF) arasında 6 adet rRNA operonu vardır. Bu ORF'lerin çoğunluğu (yaklaşık 1500 tanesi) korunmuştur. Her serotip kendine özgül, yaklaşık 100-200 ORF'nin küçük bir alt ünitesine sahiptir. Her suşun bakteriyel kromozomları; sistein proteaz için SpeB, SLO, SLS; hyalüronik kapsül için *has* operonu ve çok yüksek oranda değişken M proteinini kodlayan genleri içermektedir.¹⁹ Genetik varyasyonda uzun süre kalıcı oldukları gözlenen fajlar bu çeşitliliğin oluşmasında büyük önem taşırlar. Ayrıca toksinleri ve diğer virülans ile ilişkili protein yapılarını kodlayan genlerin

oluşumu da sıklıkla fajların transdüksiyon ile yapıya girmeleriyle olmaktadır.⁸⁴ Bakteriyel kromozom başına faj genomunun 4/6'sı büyüklüğünde bir kısım geçer ve bu genomlar canlı faj partiküllerini oluşturabilirler.

Son yıllarda M1, 3 ve 18 olmak üzere üç *S.pyogenes* tipinin genomik sekansının tamamen çözüldüğü bildirilmiştir.¹⁹ Bu genomları tanımlanan 3 suş için genom yapısındaki fajın DNA'sının M3'ün genomunun %12.5'ini, M1'in genomunun %7.1'ini, M18'in genomunun ise %10.8'ini oluşturduğu bildirilmiştir.

Her bir faj genomu bir hyalüronidazı kodlar. Ek olarak pirojenik ekzotoksinler, SpeA, SpeC, SpeH, SpeI, SpeK, SpeL, SpeM, SSA, streptodornaz (DNA'az), bir nükleaz olarak varsayılan mitojenik faktörler (MF2,MF3,MF4 ve Sla) ve streptokokal fosfolipazın genlerinin herbiri çeşitli faj genomları üzerine yer almaktadır. Yapılan dizi analizleri ile, insersiyon olaylarının genom üzerinde farklılaşmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Genetik yapılarında insersiyon olan suşların DNA'larında bazı yeni düzenlemeler olmaktadır.¹⁹

IV- STREPTOKOK VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN SALINIMININ GENETİK DÜZENLENMESİ:

Zamana bağlı olarak ve zıt çevresel koşullar altında, bilinen virülans faktörlerinin ekspresyonunun kontrolü karmaşık bir genetik regülasyon sistemine dayanmaktadır. GAS'larda bilinen transkripsiyonal düzenleyicileri içinde, en çok çalışılan **Mga** (multiple gen regulator) ve M protein ekspresyonunun regülatörüdür. Bunlardan başka; **CsrRS** (kapsül sentezleyen regülatör) ve

alternatif olarak kapsül ve birçok ekzotoksinin sentezinden sorumlu **CovRS** olarak bilinen iki komponentli bir düzenleyici sistem olduğu bilinmektedir.^{85,86}

Mga, M protein ailesini (*emm*, *mrp*, *arp* ve *enn*'yi), C5a peptidazı, serum opasite faktörünü (*sof*, *sbfII*) Sic ve kollajene benzer bir protein olan *SclA*'yı içeren çeşitli virülans genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. Buna ek olarak Mga kendi transkripsiyonunu da düzenler.⁸⁷ Mga; iki tane N terminaliyle helikal yapıdaki DNA'yı bağlayan bir proteindir.⁸⁸ Mga'nın düzenlenmesi çevresel koşullara bağlıdır ve CO₂ konsantrasyonundaki artışa karşılık Mga'ya bağlı ekspresyon da artar.⁵⁴ Adherensde ikinci bir protein olan protein Fl'in düzenlenmesi, azalmış O₂ konsantrasyonuna göre olmakta ve bu proteini kodlayan gen, **RofA** tarafından düzenlenmektedir.⁸⁹ RofA regülatörü, RALP olarak adlandırılan bir regülatör ailesine aittir. Bu ailede M49 tipini taşıyan GAS suşlarında bulunmuş bir baskılayıcı protein olan *Nra* da bulunmaktadır.⁹⁰ Mga'nın ekspresyonu da PrtF2'nin ekspresyonunu sağlayan düzenleyici bir protein olan Nra tarafından yönetilmektedir. Nra, aynı zamanda düzenleyici bir protein olan, fibronektin bağlayan prtF2'yi kodlayan geni ve prtF2'nin ve kollajen bağlayan protein olan **Cpa**'yı kodlayan cpa'nın da ekspresyonunu kontrol eder.²²

CsrRS (CovRS) kendi operonu da dahil, has operonu, streptokinaz, sistein proteaz, SpeB, SLO'yu içeren birkaç tane virülansla ilişkili genlerin ekspresyonunu baskılayıcı iki komponentli bir düzenleyici sistemdir. CsrS bakteriyel bir sensor proteindir. CsrR ise baskılayıcı bir moleküldür. Fare modelinde bu genlerin inaktivasyonu, virülansta artış ile sonuçlanmıştır. CsrRS düzenleyici genler, bakterinin üremesi sırasında farklı eksprese olur ve bu farklı

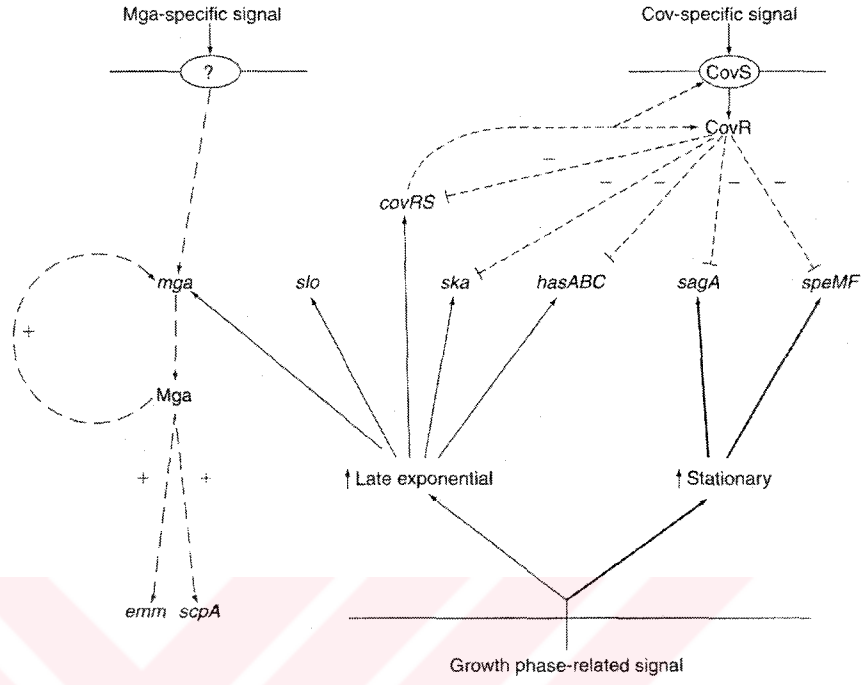
ekspresyonu kontrol eden çevresel sinyaller ve diğer mekanizmalar üzerinde halen çalışılmaktadır.^{91,92} Yeni veriler CsrR'nin yüzeyi ve buradan salınan faktörleri kodlayan genleri de içeren GAS'ların kromozomal genlerinin %15'inin transkripsiyonu etkilediğine dikkat çekmektedir.⁹³

Rgg (veya **RofB**) ise, Mga ve CsrRS regülatörlerini kodlayan birçok genin ekspresyonunu etkileyen global bir düzenleyicidir. Bu düzenleyicilerin ekspresyonunu Rgg (RofB) kontrol ettiği için bir Rgg(-)mutanttaki etkilenmiş genlerin sayısı da fazladır.

Diğer yardımcı regülatörlerden Fas BCA, fibrinojen ve fibronektin bağlayıcı sistemin ekspresyonunu kontrol eden 3 komponentli bir sistemdir.⁹⁴

SLS'yi kodlayan lokusun da (SagA) regülatör aktivitesi olduğu düşünülmektedir.⁹⁵

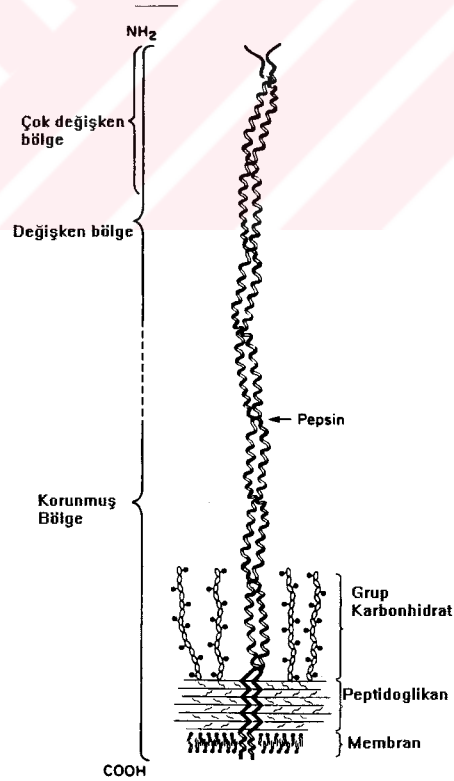
SilA ve SilB ise yeni bulunmuş olan ve enfeksiyon esnasında *S.pyogenes*'in daha derin dokulara yayılmasından sorumlu proteinlerin ekspresyonunu kontrol eden iki komponentli bir düzenleyici sistemdir.⁹⁶ GAS'ların virülans faktörlerinin düzenlenmesi şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2: +işaretili yollar pozitif düzenleyicileri, - işaretili yollar negatif düzenleyicileri, kesik çizgili yollar, CovR'ye bağlı düzenleyicileri, düz çizgiler ise Mga tarafından yapılan düzenlemeyi göstermektedir.²²

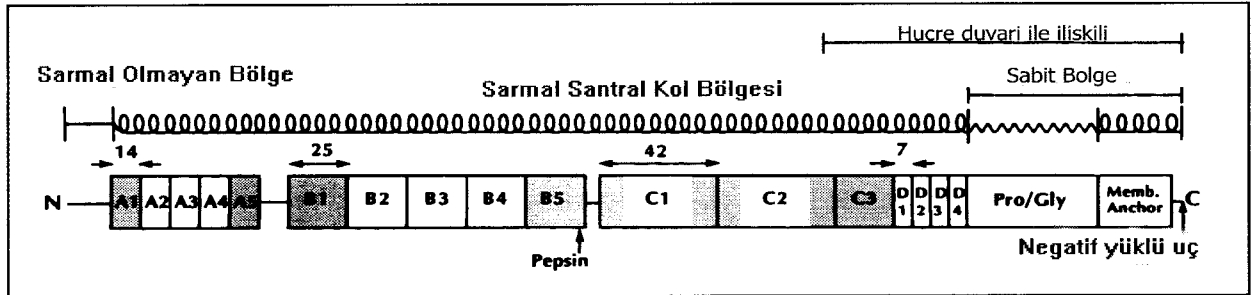
C) M PROTEİNİNİN MOLEKÜLER YAPISI:

M proteini iki polipeptid zincirinden oluşan alfa-helikal sarmal yapıda, filamentöz bir makromoleküldür. Molekül, membrana sıkıca tutunmuş ve hücre duvarını geçerek dışarıya doğru uzanmış olan fibröz proteinlere benzeyen yapıdadır.²³ Proksimal ucundaki karboksi terminalinde çoğu M tipinde ortak olan epitoplar bulunurken, distal ucundaki (N terminal) amino terminalinde değişken tipe özgül epitoplar bulunur. Bu bölge molekülün çok değişken bölgesidir ve elektriksel olarak negatif yüklüdür. Bu bölge helikal yapıda değildir. Bu iki bölge arasında merkezi bir helikal bölge vardır. M proteininin yapısı Şekil-3'de şematik olarak verilmiştir.



Şekil-3: M proteinin şematik yapısı.⁹⁷

M6 proteininin moleküler yapısı şekil-4 'de gösterilmiştir.²³



Şekil-4: M proteinin moleküler yapısı (A, B, C ve D blokları tekrarlayan sekans yerleşimlerini göstermektedir). Bu blokların üzerindeki sayılar blok başına amino asit sayısını vermektedir. Blok C3 C1 ve C2'nin yarısı kadardır. Daha koyu gölgeli bloklar esas sekans yapısından farklılaşmış sekans bölgelerini belirtmektedir. Pro/ Gly, prolin ve glisinden zengin daha çok peptidoglikanda bulunan kısımlardır. Sabit bölge (Membrana gömülü bölge) 19 amino asitten oluşan ve 6 amino asit içeren yüklü uca komşu olan kısımdır. Pepsin ise, amino asit 228 sonrasında pepsine duyarlı olan yeri belirtmektedir. Hücre duvarı ile ilişkili kısım ise; C2 bloğundaki Ala-298'den başlamaktadır.)

Karboksi uçlarındaki küçük farklılıklara bakılarak M proteinleri iki sınıfa ayrılmaktadır:

1-Birinci sınıf M proteinleri: Molekül olarak büyüktürler, tekrarlayan N terminal peptid dizilerine sahiptirler. Bu sınıf proteinler farenjit ve akut romatizmal ateş ile ilişkili suşlarda bulunur. Ayrıca bu M proteinlerinin korunmuş antijenik yapıdaki kısımları hem yapısal hem de immünolojik olarak insan kalp kasındaki sarkolemma, miyozin ve diğer α -helikal yapıdaki sarmal yapıda olan

alfa-tropomiyozin, laminin, vimentin gibi proteinler ile de benzerlik gösterdikleri için çapraz reaksiyonlara neden olabilirler. Bununla birlikte, bu yapıların tip 1 keratin ile de amino asit dizi benzerlikleri saptanmıştır.^{98,99}

2- İkinci sınıf M proteinleri; Moleküler olarak daha küçüktürler ve genellikle cilt enfeksiyonları ile ilişkilidirler. ARA'ya neden olmazlar. Serum OF oluşumundan sorumludurlar.

Yüksek derecede değişken olan immünojenik amino ucundaki farklılıklara göre en az 124 farklı tipleri bulunduğu rapor edilmiştir.^{10,16} Kalia ve ark.ları ise 150'den fazla serotipinin olduğunu bildirmişlerdir.¹⁰⁰

M proteinini kodlayan, *emm* gen bölgesinde, genler arası ve gen içi rekombinasyonlar, nokta mutasyonlar ve kısa nükleotid girişleri antijenik farklılığa neden olur. Her tip bir suş tarafından yapılmaktadır. En sık olarak görülenleri, *emm*1, 6, 18, 48, 49, 75, 95, 103 tipleridir.¹⁶

Belli serotiplerin belli hastalıklarla ilişkili olduğu saptanmıştır. Örneğin M1, M3, M5, M6, M14, M18, M19, M24, M27, M29 tiplerinin boğaz enfeksiyonları ve romatizmal ateş ile ilişkili oldukları ve romatojenik etkiye sahip oldukları belirtilmektedir. Bu farengit ile ilişkili tipler genellikle opasite faktörü(OF) üretmezler. OF(-)'tirler. ve mukoid koloni meydana getirirler. Buna karşılık piyoderma ve akut glomerülonefrit ile ilişkili olan M2, M49, M52, M57, M59, M60 ve M61 gibi M tipleri opasite faktörü üretirler.^{100,101}

Ayrıca M2, M49, M55, M57, M59, M60 ve M61 tiplerinin impetigo gibi cilt lezyonlarını takip eden vakalar ile; M1, M4, M12, M25 tiplerinin ise farengiti takip eden akut post-streptokoksik glomerülonefrit ile ilişkili oldukları

bulunmuştur.² Bunlara ek olarak M55 ve M57 tiplerinin de APSGN ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.¹⁰²

İnvaziv ve toksik streptokokal enfeksiyonlarda (STSS) ise en yaygın olarak M1 ve M3 tipleri görülmekle birlikte, M11, M12 ve M28 tipleri de görülebilmektedir.^{2,103,104} Ayrıca M proteinlerinin süperantijen olduğunu bildiren yayınlarda vardır.

Streptokok enfeksiyonlarından sonra oluşan koruyucu bağışıklık M proteinine karşı gelişen opsonik antikor (Ab) yapımına bağlıdır ve tipe özgüdür.^{105,106}

3- M proteininin diğer memeli proteinleri ile olan benzerliği

Bu konuda yapılan araştırmalar M proteinin birçok insan ve memeli hayvanların dokularındaki protein yapılarının bazıları ile benzer amino asit dizisine sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin; M5, M6, M12, M24 miyozin ağır zinciri tropomiyozin, Tip 1 keratin yapısındaki amino asit dizisi ile benzerlik göstermektedir.¹⁰⁷ Bazı M tiplerinde tespit edilen bu benzerlikler Tablo-2’de gösterilmiştir.

Tablo-2: Bazı M protein çeşitlerinin benzer yapıdaki diğer memeli proteinleri ile olan sekans benzerlikleri ¹⁰⁵

M proteini	Memeli proteini	Benzerlik %'si(uyuşan amino asit sayısı)
M24	Miyozin ağır zinciri (tavşan kalbi)	34 (44)
	Tropomiyozin (insan kalbi)	33 (42)
	Tip 1 Keratin (sığır)	40 (30)
	Lamin (insan)	36 (45)
M5	Tropomiyozin (insan fibroblast)	32 (28)
	Miyozin ağır zinciri (tavşan kalbi)	39 (41)
	Tip 1 keratin (sığır)	43 (30)
	Tropomiyozin (insan kalbi)	33 (45)
M6	Miyozin (fare kalbi)	38 (50)
	Tip 1 keratin (sığır)	44 (32)
	Tropomiyozin (insan kalbi)	38 (50)
M12	Tip 1 keratin (insan)	41 (32)
	Miyozin ağır zinciri (tavşan kalbi)	31 (32)

M protein yapıları ile diğer proteinler arasındaki yapısal benzerliklerin GAS'ların neden olduğu hastalıkların patogenezi ile bağlantılı olabileceği düşünüldüğü için bu yapılar üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu konuda yapılacak ileri çalışmaların bu hastalıkların etyopatogenezinin daha iyi anlaşılmasına oldukça büyük katkılar sağlayacağına inanılmaktadır.^{105,107}

4-M proteini ile diğer Gram-pozitif bakteri molekülleri ve virüsler arasındaki benzerlikler:

Önceleri GAS'ların M ve M benzeri proteinlerinin B, C, E ve G grubu streptokoklarda da olduğunu bildiren yayınlar yapılmıştır.^{108,109,110} Bu grup streptokokların hem serolojik olarak tiplendirilmesinde M proteinine karşı gelişen çapraz reaksiyonlarının olması hem de bu organizmaların fagositoza karşı direnç gösterebilme yeteneklerinin olması nedeniyle bu sonuca varılmıştır. Bugün DNA

hibridizasyon analizi ve DNA dizi analizi gibi moleküler teknikler aracılığı ile sadece C ve G grubu streptokoklarda GAS'lara homolog bir M ve M benzeri protein varlığı gösterilmiştir.

C grubu streptokoklar öncelikle hayvan patojeni olmakla birlikte insanlarda da ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedirler.¹¹¹ G grubu streptokoklar ise kadın genital sistemi, üst solunum yolu ve derinin normal florasında bulunan mikroorganizmalardır. Son yıllarda bu grup mikroorganizmaların insanda hastalık oluşturma oranlarında artış görülmüştür.¹¹² G grubu streptokoklardaki **Protein G**, hem insanlardaki IgG'nin 4 tipini bağlayan hem de albümin bağlayan bir proteindir. Bu proteinin C-terminal ucunun DNA sekans analizi M proteininin C-terminalinin membrana gömülü bölgesi ile % 56 oranında benzerlik gösterdiği bildirilmiştir.^{113,114} Ayrıca moleküler yöntemlerden biri olan DNA problemlerinin kullanılması ile grup G streptokokların G proteini ile GAS'ların M proteini arasındaki benzerlik daha iyi anlaşılmış ve bu iki grup bakterinin insanlarda oluşturdıkları hastalıklarda da yapısal ve fonksiyonel olarak benzer etki gösterebilecekleri bildirilmiştir.¹¹⁵

IgG bağlayan bir protein olan **stafilokokal protein A**'nın da C terminali M proteini ile %22 oranında homoloji göstermektedir.¹¹⁶ Protein A α -helikal ve sarmal yapıda olmasa da tekrarlayan amino asit dizilerinin M ve G proteinlerinin her ikisindeki tekrarlayan kısımlar ile benzerlik göstermesi nedeniyle M ve M benzeri proteinler ile çapraz reaksiyonlar verebilmektedir.

Streptokokal M proteini, bu bakteriyel proteinlerin yanında yapısal ve immünolojik olarak enterovirüslerin yüzeyindeki epitoplara tanıyan monoklonal

antikorlar ile de reaksiyona girebilmekte dolayısı ile çapraz reaksiyonlara neden olabilmektedir.

Virüsler de en az diğer mikrobiyolojik ajanlar kadar otoimmün hastalıklar ile ilişkilidir. Romatizmal kardit ve miyokardite neden olan bir bakteriyel veya viral enfeksiyonun otoimmünite ile de doğrudan bağlantısı olduğunu gösteren kanıtlar vardır.¹¹⁷

Romatizmal karditte kalp dokusuna karşı oluşan antikorların akut farenjit ve ARA'nın etyolojik ajanı olan GAS ile reaksiyona girdikleri gösterilmiştir.¹¹⁷ Streptokokal M protein ile miyozin arasında amino asit diziliminde benzerlik olduğu kadar Cocksackie virüs B3'ün kapsid proteini ile de 14 -15 amino asit'lik bir bölümde % 40 oranında benzerlik olduğu gösterilmiştir. Bu tanımlanan sekans yapılarına sahip sentetik peptidler, streptokokların M proteinleri ile mAb'ların reaksiyonunu engellerler. Böylece bakteriyel ve viral antijenlerin α -helikal yapılarına karşı oluşan antikorların, sitotoksik reaksiyonları başlatmasının otoimmün kalp hastalıklarının oluşum mekanizmalarından biri olabileceği bilinmektedir.¹¹⁷

Grup A streptokokların M proteinleri, insan kalp miyozini ve diğer α -helikal sarmal yapıdaki moleküller ile çapraz reaksiyon veren fare anti-streptokokal mAb'larının Cocksackie virüs B3 ve B4 veya tip1 poliovirüsü nötralize ettiği bulunmuştur.¹¹⁷

5-M proteinin fagositoza dirençteki rolü: *S. pyogenes*'in en çok çalışılan yüzey proteini olan M proteini, nötrofillerin fagositozunu inhibe ederek bakteriye konak organizmada çok hızlı büyüme ve gelişme olanağı sağlar⁴. Buna ek olarak

M proteini epitelyal hücrelere adezyonu da sağlayan bir yapıdır. Primatlar ile yapılan bir çalışmada farinkste kolonizasyonu başlattığı ve epitel hücrelerine adezyonu sağlayarak bakteriyi fagositozdan koruduğu bildirilmiştir.¹¹⁸

M proteini tek bir suş için stabil bir protein yapısındadır. Fakat suşlar arasında DNA dizi analizi yapıldığında çok yüksek oranda çeşitlilik gösterdiği görülmüştür.⁴ Özellikle N-terminali denilen çok değişken bölge, suşun M proteinini belirleyen bölgedir ve bu bölgeye yönelen antikorlar koruyucu olmaktadır. Buna karşı vücutta oluşan immünite de tipe spesifiktir.^{105,106} Bu antijenik çeşitlilik M proteinine dayalı bir aşı geliştirilmesine büyük ölçüde engel oluşturmaktadır.⁴

M proteininin fagositozu tam olarak hangi mekanizma ile inhibe ettiği açıklanamamıştır. Ancak iki mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlardan bir tanesi, bakterinin yüzeyinde fibrinojeni fibrine dönüştürmesi ve presipite olmasını sağlaması sonunda bakterinin opsonize olmasını engellemesidir. Diğerisi ise bu proteinin çok değişken bölgesindeki sekans çeşitliliğidir. Bu çeşitlilik, fagositozu zorlaştırmaktadır. Bu çok değişken bölgenin aynı liganda bağlandığının bulunması ise bu varsayıma bir ipucu olarak ışık tutmuş ve bu konudaki diğer çalışmalara zemin oluşturmuştur. Yapılan çalışmalar ile bu bağlayıcı ligandın insan kompleman 4b bağlayan protein (C4BP) olduğu gösterilmiştir.^{119,120} Bu ligand yaklaşık 570 kDa ağırlığında bir plazma proteindir ve klasik yoldan kompleman aktivasyonunu inhibe eder.¹²¹ C4BP'nin, *S.pyogenes* suşlarının %50'sinin M proteinine bağlandığını gösteren yayınlar yapılmıştır.^{119,120} Buna karşılık bu gruba girmeyen birçok M proteininin C4BP'ye bağlanmadığı da

bilinmektedir. Böylece M proteininin çok değişken bölgesinin fonksiyonu da tam olarak anlaşılamamıştır.

Araştırmacılar M22 tipine sahip bir *S.pyogenes* suşu ile yaptıkları bir çalışmada 2 değişik ligand bağlayıcı bölge belirlemişlerdir.¹²² Bu çalışmada M proteininin çok değişken bölgesinin insan C4BP'ine bağlandığı, bu bölgenin hemen yakınında bulunan yarı değişken bölgenin ise insan immünglobulin A (IgA)'nın Fc kısmına bağlandığını saptamışlardır. Bu çok değişken bölgenin fagositoza dirençte önemli bir rolü vardır. Çünkü bakteriyi bağlayan C4BP'ye bağlanarak komplemanın aktivasyonunu inhibe etmektedir. Böylece kompleman birikimi sonucu opsonizasyon önlenmiş olur.¹²² Buna karşılık M proteininden yoksun *S.pyogenes* suşları (M⁻ fenotipte olanlar), insan serumunda klasik yoldan komplemanın aktivasyonuna yol açarak immüniteyi başlatabilirler.¹²²

İnsan IgA'nın Fc'sini bağlayan yarı değişken bölgenin fagositoza dirençte önemli bir katkısı olsa da bunun nasıl ve ne şekilde olduğu tam açıklığa kavuşturulamamıştır. Muhtemelen IgA'nın Fc bölgesinin fagositler üzerindeki insan IgA- reseptör CD89'a bağlanmasını inhibe ederek etki göstermekte, böylece IgA'nın efektör fonksiyonuna engel olmaktadır.¹²³

M proteininin koruyucu ve koruyucu olmayan epitoplarının varlığı ilk olarak Jones ve Fischetti tarafından tanımlanmıştır.¹²⁴ Bu araştırmacılar örnek olarak protein M6'nın çok değişken bölgesine karşı monoklonal antikorlar kullanmışlardır. Bu antikorlar M proteinin antifagositik fonksiyonunu engellemiş ve koruyucu immünite sağlamışlardır. Bu değişime karşı korunmuş C (sabit) tekrarlayan bölgeye karşı oluşan mAb'ların koruyucu olmadığını belirlenmiştir.

Areschoug ve ark.ları ise, protein M22'nin farklı kısımlarına karşı poliklonal antikorlar kullanarak, koruyucu Ab'ların C4BP ve IgA'nın ligandlara bağlanmasını engelledikleri, koruyucu olmayan Ab'ların ise böyle bir özelliğinin olmadığını göstermişlerdir. Bu nedenle koruyucu Ab'ların en önemli özelliğinin, M proteinin N-terminal değişken bölgesine ligandların bağlanmasını inhibe etmeleri olabileceğini ileri sürmüşlerdir.⁴ M proteininin çok değişken bölgesine karşılık oluşan Ab'lar hem C4BP'nin hem de IgA'nın bağlanmasını yarışma yoluyla engellerler Buna benzer olarak, yarı değişken bölgeye karşı oluşan Ab'lar her iki ligandı da bloke ettikleri için koruyucudur.

M proteininin bu değişken bölgesi ve bunun fonksiyonları incelendiğinde sekanstaki değişim olasılıklarının en az HIV-1 ve Influenza virüslerinde görülen büyük değişiklikler kadar genomik değişim sağlayabilecekleri anlaşılmaktadır.¹²⁰ Genellikle mukozal yüzeylerde *S.pyogenes*'in yol açtığı enfeksiyonlarda plazma proteinleri önemli rol oynamaktadırlar. Plazmanın eksudatif cevabında; ilk basamak savunma sistemini oluşturmak ve nötrofillerin enfeksiyon alanına çekilmesi tarzında gelişir.¹²⁵ C4BP IgA bağlayan M proteinlerinin önemli olduğu kadar bu yapıları bağlayamayan M proteinlerinin de fagositoza nasıl bir direnç gösterdiği henüz bilinmemektedir. Gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalar bu konuya açıklık getirecektir.

5-Tiplendirilemeyen M proteinleri:

Günümüzde, tüm dünya çapında GAS üzerine birçok merkezde çok sayıda moleküler çalışma yapılması ve bu çalışmaların sonucunda belirlenen *emm* tiplerinin CDC ve/veya "GeneBank" genetik veri bankaları tarafından

depolanması sayesinde *emm* tiplerindeki çeşitliliğe ulaşılabilir. Ancak, halen yapılan birçok çalışmada olduğu gibi, en yeni moleküler tekniklerden biri olan *emm* sekans analizi kullanılmasına rağmen, yapılan tiplendirmelerde her zaman başarılı olunamamaktadır.

Bilinen yöntemler uygulanmış, fakat herhangi bir *emm* tipi ile uyuşmamış olan tiplerin tiplendirilemeyen M proteinleri olarak rapor edildiği birçok yayın bulunmaktadır. Tiplendirilemeyen M proteini oranı 1997 yılında % 90 iken 2 yıl içinde %20 oranına gerilediği görülmüştür.¹²⁶ Yagupsky ve Giladi isimli araştırmacılar, bakteriyemili çocuklardan izole ettikleri 13 tane GAS suşunun, 10 tanesinde tiplendirilemeyen M proteini (%77) olduğunu bildirmişlerdir.¹²⁷ İsrail'den yapılan bir başka çalışmada ise 2 yıllık süreç içinde toplanan 409 adet GAS suşunun 133'ünün tiplendirilemeyen M proteini taşıdığı (%33) rapor edilmiştir.¹²⁶ Kanada'da 4760 GAS izolatu ile yapılan bir çalışmada tiplendirilemeyen M proteini oranı % 15.4 olarak bildirilmiştir.¹²⁸ İngiltere'den yapılan bir başka çalışmada ise 16.909 suştan sadece %7.35'inin tiplendirilemeyen M proteini içerdiği rapor edilmiştir.¹²⁹ Tayland'dan yapılan bir başka çalışmada ise çalışılan suşların % 80'inin tiplendirilemeyen M proteini içerdiği bildirilmiştir.¹³⁰ Bu oranın çok yüksek olması, birçok yeni *emm* tiplerinin oluştuğu hipotezi ile açıklanmaya çalışılmıştır. Ayrıca bu suşlar ya M proteini eksprese edemeyen tiplerdendir yada tiplendirilemeyen M proteinleri veya M benzeri proteinleri içermektedir diye düşünülmektedir.

İncelenen çalışmalara göre tiplendirilemeyen *emm* tiplerinin sayısal olarak bu kadar farklı olmasının bir nedeninin de coğrafik dağılımla ilişkili olabileceği

düşünülmektedir.¹²⁶ Asya, Latin Amerika ve Avusturalya gibi farklı kıtalarda yüksek oranda yeni *emm* tiplerinin oluştuğunu ileri süren yayınlar vardır.^{102,130}

D) AŞI ÇALIŞMALARI:

Kuzey Amerika ve Avrupa'da, hayatı tehdit eden invaziv GAS enfeksiyonlarında zamana bağlı olarak belirgin bir artış görülmektedir. Bununla beraber tüm dünyada, özellikle de gelişmekte olan ülkelerde ARA vakaları halen problem olmaya devam etmektedir. Bu nedenlerden dolayı GAS enfeksiyonlarından korunmanın önemi her geçen gün daha iyi anlaşılmaktadır.

Moleküler biyolojide kaydedilen başdöndürücü bilimsel ve teknolojik gelişmeler GAS enfeksiyonlarından korunmak için başarılı aşı geliştirilmesi umutlarını gündeme gelmiştir.

Önceleri M proteini, tüm suşlar tarafından üretildiği ve koruyucu immünite oluşturduğu için uygun bir aşı komponenti olarak görülmekteydi. Fakat farklı suşlar tarafından eksprese edilen M proteinleri arasındaki antijenik çeşitlilik yüzünden aşı adayı olmak için uygunluğu halen tartışmalı konulardandır. Bunun yanısıra, M proteini ile insan dokuları arasındaki olası çapraz reaksiyonlar oldukça problem yaratmaktadır. Buna rağmen, rekombinant teknoloji kullanılarak istenmeyen çapraz reaksiyonlara yol açmayacak birden çok değişken bölgenin kombinasyonunu içeren multivalan bir aşı geliştirilmeye çalışılmıştır.¹⁵ A.B.D.'de formüle edilip geliştirilen bu aşı, 26 farklı tipe özgül GAS M protein(*emm*) kısımları içermektedir. Daha çok farenjit ve invaziv hastalıktan sorumlu M protein tiplerinden 24, 5, 6, 19, 29, 14, 1, 12, 28, 3, 1.2, 18, 2, 43, 13, 22, 11, 59, 33, 89, 101, 77, 114, 75, 76, 92, bu aşının bünyesindeki serotiplerdendir. Bu aşı, 6 veya 7

M protein parçalarını içeren 4 farklı füzyon proteininden oluşmuştur. Mültivalan özellikte olan bu aşının tavşanlar üzerinde oldukça immünojen olduğu bildirilmiştir¹⁵

Başka bir aşı adayı da ScpA'dır. Ancak bu aşının insanlarda koruyucu immüniteyi nasıl sağladığı hakkında çok az bilgi vardır.

Bu yapı gibi aşı adayı olarak çalışılan birçok yüzeyel yapılar vardır. Fakat bu yapılar tüm *S.pyogenes* suşları tarafından eksprese edilemedikleri için aşı adaylıklarından vazgeçilmiştir.¹³¹



GEREÇLER VE YÖNTEM

A – Bakteri izolasyonu ve tiplendirmesi

Ocak 2004 – Ağustos 2005 tarihleri arasında, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran ve boğaz sürüntü kültürlerinden *S.pyogenes* izole edilmiş hastalar çalışma kapsamına alınmıştır. Hastalardan steril eküvyonlu tüpler ile alınan boğaz sürüntü örnekleri Mikrobiyoloji laboratuvarında bekletilmeden %5 oranında koyun kanı içeren kanlı agara ekilmiştir. Kültürler, 37⁰C’de 24 saat inkübe edilmiştir (Nüve, Türkiye). İnkübasyon sonunda beta hemoliz yapan tipik kolonilerden tek koloni alınarak katalaz testi (H₂O₂) uygulanmıştır. Katalaz testi negatif olan koloniler koyun kanlı agara ekilmiş, üzerine 0.04 IU Basitrasin içeren disk (Oxoid) konulmuştur. Basitrasine duyarlı olanlar çalışma kapsamına alınarak, daha sonraki test aşamalarına geçilmiştir. Bu kolonilere doğrulama testi olarak pirolidonil arilamidaz (PYR) testi yapılmıştır

B-Gruplandırma için aglütinasyon testi:

Gruplara göre aglütinasyon testi için SLIDEX StreptoKit^R (BioMérieux, Fransa) ticari kiti kullanılmıştır. Üretici firmanın önerilerine göre hazırlanan bakteri süspansiyonu 0.4 ml ekstraksiyon tamponu içinde 35⁰C’de 10 dakika bekletildikten sonra A, B, C, D, F ve G grup antiserumları ile grublandırılmak için test edilmiştir. A grubu antiserumu ile reaksiyon veren suşlar çalışma kapsamına alınmıştır. Ayrıca bu suşlar API 20STREP (BioMérieux, Fransa) ticari tiplendirme kiti kullanılarak tiplendirilmiş ve *S.pyogenes* oldukları doğrulanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) aşaması öncesi A grubu olarak tanımlanan koloniler, plaktan toplanarak 1 ml TE [100mM Tris-Cl ve 10mM EDTA (pH 8.0)] tampon içinde süspanse edilmiştir. Ayrıca stoklamak için bakteriler %15 gliserol (hacim/hacim) içeren beyin-kalp infüzyon buyyonu içinde süspanse edilerek -80⁰C’de (Sanyo, Japonya) saklanmıştır.

C-Moleküler çalışmalar:

I-Bakteriden DNA izolasyonu:

1 ml TE tamponu içindeki bakteri süspansiyonu 6500 devir/dakika hızda 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş (Hettich 22R, Almanya) ve üst sıvı atılmıştır. Bakteri peleti 3 kez TE tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama sonunda 100µl TE içinde süspanse edilen bakteriler 96°C’de 15 dakika kaynatılmıştır. Kaynatma işleminin ardından hücresel artıklar 13.000 devir/dakika hızında 10 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş, üstte kalan sıvı polimeraz zincir reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılmak üzere temiz tüplere aktarılmıştır.

II-*emm* polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltma aşaması:

Çalışma kapsamına alınan streptokok suşlarının PZR’u için Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control (CDC))’nin önerdiği protokole göre (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/doc.html>) *S. pyogenes* “*emm*” geni 5' ucunu hedef alan özgül primer çiftleri kullanılmıştır (Tablo3)^{12,99,132,133}. PZR, 10 mM Tris-HCl, pH 8.8 (25°C’de), 50 mM KCl, %0.1 Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, dATP, dGTP, dTTP, dCTP’nin her birinden 50 µM, P1 – P2 ya da MF1 – MR2 primer çiftlerinin her birinden 1,4 µM, 5 U/µl Taq DNA polimeraz içeren 35 µl’lik tüplerde gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon tüpleri 2 µl kalıp DNA eklendikten sonra, önceden 95°C'ye ısıtılmış ısıtıl döngü cihazına (Gene Amp PCR System 9700, Applied BioSystems, ABI, USA) yerleştirilmiştir. Tüpler, 95°C'de 3 dakika denatüre edildikten sonra 40 döngü boyunca 95°C'de 15 saniye denatürasyon, Tablo 3'deki her primer çifti için T_m ile belirtilen sıcaklıkta 45 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakikada zincir uzaması aşamalarından geçirilmiştir. Döngülerin bitiminde 72°C'de 7 dakika yarım kalan ürünlerin uzaması için beklenmiştir. Ürünler, elektroforez aşamasına kadar +4°C'de saklanmıştır.

Tablo 3. *emm*'nin çoğaltılmasında ve DNA dizi analizinde kullanılan primerler ve T_m değerleri.

Primer adı	Dizisi	T _m
P1	5'-tatt(c/g)gcttagaaaattaa-3'	46°C
P2	5'-gcaagttcttcagcttggtt-3'	
MF1	5'-ggatccataa ggagcataaa atggcta-3'	65°C
MR2	5'-tgatagctta gttttcttctt ttgcgtttt-3'	
emmseq2	tattcgcttagaaaattaaacagg	55°C



III-PZR ürünlerinin elektroforezi ve görüntülenmesi: PZR sonrası ürünlerin %1,5'luk agaroz jelde Tris – borik asit – EDTA tamponunda elektroforezi yapılmıştır.

a) Tris – Borik Asit – EDTA (TBE) 5x stok çözeltisinin hazırlanması:

TBE 5x stok çözeltisi için 800 ml deiyonize suda 54 g Tris – baz, 27,5 g borik asit ve 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) çözölmüş, çözelti deiyonize su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

b) %1,5 (ağırlık/hacim) agaroz jelin hazırlanması:

5x TBE stok çözeltisi, deiyonize su ile 1x çalışma konsantrasyonuna seyreltilmiştir. 1,125 g elektroforez saflığında toz agaroz (Sigma, Almanya) 75 ml 1xTBE tamponu içinde süspanse edilmiştir. Süspanسیون mikrodalga fırında kaynamayacak şekilde ısıtılarak agaroz tamamen eritilmiştir. 55°C'ye soğutulan agaroz jel eriyiğı, tabaklara dökölmüştür. Yaklaşık 45 dakika oda sıcaklığında polimerize olması beklenen jel, 1xTBE tamponu ile doldurulmuş olan elektroforez tankının içine alınarak 10 dakika tampon ile dengelenmiştir.

c) Elektroforez işlemi:

Her bir reaksiyon tüpünden 2 µl ürün, 2 µl 2.5 mg/ml orange G, 1xTBE ve %30 (hacim/hacim) gliserolden oluşan yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jelin kuyucuklarına yüklenmiştir. Yapılan her sıra yükleme için en az bir jel kulvarı 100 bç merdiven DNA ağırlık standardı ile yüklenmiştir (SeeGene, ABD). Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra, 5 V/cm jel uzunluğu potansiyel farkı ile 45 dakika elektroforez yapılmıştır.

d) Jellerin boyanması ve görüntölenmesi:

Elektroforez işlemi sonrası DNA bantlarının görüntölenmesi amacı ile jel 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren 1x TBE çözeltisi içinde 15 dakika boyanmıştır. Boyanma işlemi sonunda boyama tankından çıkarılan jel 1x TBE ile kısaca

yıkandıktan sonra 305 nm dalga boyunda mor ötesi ışık altında görüntülenmiş ve kaydedilmiştir (Syngene Bio Imaging, Ingenius, İngiltere). DNA moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırıldığında, 600 – 1500 bp ağırlığındaki bantlar özgül *emm* çoğaltma ürünü olarak kabul edilmiştir.

IV-Saflaştırma işlemi:

PZR ile çoğaltma ürünü elde edildiği saptanan tüpler, DNA saflaştırma işlemine alınmıştır. Bu amaçla ticari bir PZR temizleme kiti (Invitek, Invisorb, Almanya) kullanılmıştır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 130 µl tampon P (Invitek, Invisorb, Almanya) ile karıştırılan ürünler filtre kolonuna yüklenmiş, 1 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 10.000 devir/dakika hızında 30 saniye santrifüj edilen kolonlara 700 µl yıkama tamponu konularak aynı hızda ve aynı sürede tekrar santrifüj edilmiştir. Alttaki atık tüpü boşaltıldıktan sonra filtre kolonları 14.000 devir /dakika hızda 3 dakika santrifüj edilerek kurutulmuştur. Santrifüj işlemi sonrasında atık toplama tüpleri atılarak filtre kolonları elüent toplama tüpleri üzerine yerleştirilmiştir. Her bir filtre yüzeyine tüm yüzeyi kaplayacak şekilde 20 µl elüsyon tamponu (TE pH:8.0) eklenerek oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitiminde 10.000 devir/dakika hızında 1 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda filtre kolonları atılmış, saflaştırılmış ürünler sekans reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılmak üzere saklanmıştır.

V- Saflaştırılmış PZR ürünlerinin kontrolü

Sekans reaksiyonları gerçekleştirilmeden önce, saflaştırma işlemi sırasında oluşabilecek DNA kaybı ve yetersiz saflaştırma gibi olumsuzluklara karşı

saflaştırılan ürünler bir kez daha %1,5'luk agaroz jelde yürütülerek, etidyum bromürle boyanıp, 305 nm dalgaboylu mor ötesi ışık altında görüntülenmiştir. Beklenen boyutta, saflaştırma öncesi bandın en az %80'i kadar parlak ve primer bantlarından temizlenmiş olan saflaştırma ürünleri sekans analizine alınmıştır.

VI- DNA dizi analizi için sekans reaksiyonu:

Döngüsel dizileme (Cycle sequencing) reaksiyonu 1x (2 µl) ABI Prism BigDye Terminator v3.1 "cycle sequencing" tamponu (Applied Biosystems, ABD), 0.16 µM emmseq2 (Tablo 3) oligonükleotid primeri, kalıp DNA olarak 2 µl saflaştırılmış PCR ürünü ve son hacim 5 µl olacak miktarda PZR saflığında su içeren tüplerde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan tüpler 25 döngü boyunca 96°C'de 10 saniye, 50°C'de 5 saniye ve 60°C'de 4 dakika tutulmuştur (Gene Amp PCR System 9700, ABD). Elde edilen döngüsel dizileme ürünleri ya hemen presipitasyon işlemine alınmıştır, ya da presipite edilene kadar en fazla 2 hafta olmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

VII-"Cycle sequencing"Döngüsel dizileme ürünlerinin presipitasyonu

Floresan boyalı di-deoksi terminatör nükleotidler ile işaretlenmiş ürünler elektroforez yapılmadan önce 2-propanol ile presipite edilmiş ve deiyonize formamid ile çözülmüştür. Bu amaçla 5 µl'lik sekans reaksiyonu ürünleri deiyonize su kullanılarak 20 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılan ürünlerin üzerine, 80 µl %75'lik 2-propanol eklenmiş ve kısa süreli vortekslenmiştir. Kullanılan %75'lik 2-propanol her defasında %100'lük anhidroz 2-propanol stok çözeltisinden taze olarak hazırlanmıştır. 2-propanol ile karıştırılan ürünler ortalama 1 saat (15 dakika-24

saat) karanlık ortamda ve oda sıcaklığında çökelmeye bırakılmıştır. Sürenin sonunda tüpler 14.000 devir/dakika hızda 20 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı beklemeden hızlı bir şekilde vakum pompası ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra aynı tüplerin üzerine 250 µl %75'lik 2-propanol konularak kısa süreli vortekslenmiştir. Bu tüpler tekrar 14.000 devir/dakika hızda 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Üsteki sıvı aynı şekilde beklemeden vakum pompası ile uzaklaştırılmış ve 1 dakika süreyle 90°C'de tüplerde kalan fazla sıvının uçması sağlanmıştır. DNA pelletleri 25 µl deiyonize formamid (Applied Biosystems, ABD) içinde çözülerek elektroforez aşamasına kadar -20°C'de bekletilmiştir.

VIII-Denatürasyon işlemi:

Formamid içinde çözülmüş durumdaki döngüsel dizileme ürünlerinin elektroforez öncesi sekonder yapılarının açılması ve denatüre olmalarının sağlanması için ısı şoku uygulanmıştır. Bu amaçla tüpler 94°C'de 2 dakika tutulmuştur (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, USA). Hemen buz üstüne alınan tüpler -20°C'de 1 dakika inkübe edilmiştir.

IX-Kapiller tüp elektroforezi:

Denatürasyon işleminin ardından tüpler ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, ABD) cihazına yüklenmiştir. Kapiller her örnek için 1-2 µl “**Performance Optimized Polymer-6**” (POP-6, Applied Biosystems, ABD) ile doldurulmuştur. Örnekler 1,5 kV potansiyel farkı altında 1µA akım ile 30 saniye enjeksiyon süresi boyunca kapillere yüklenmiştir. Ardından 45 dakika boyunca 15 kV potansiyel farkı ve 7 – 8 µA akım ile yürütülen örneklerden elde edilen

kromatogramlar ABI Prism 310 Data Collection Software (Applied Biosystems, ABD) yardımıyla kaydedilmiştir.

Sekans cihazından gelen veriler ABI Prism 310 Data Collection Software yardımıyla toplanmıştır. İşlenen ham veriler yazılım tarafından kromatogram dosyalarına çevrilmiştir. Daha sonra kromatogram dosyaları bilgisayar ortamında görsel olarak düzeltilmiş, nükleotid dizilimi güvenilir olarak okunabilen kısımları ileri analizlerin yapılabilmesi için metin dosya formatında saklanmıştır. *emm* genotiplerinin belirlenebilmesi için referans tiplerin DNA dizilerinden oluşan veri tabanının oluşturulmasında CDC sunucularında yer alan kayıtlardan ve National Centre for Biotechnology Information (NCBI) bünyesindeki Gen Bankası veri tabanından yararlanılmıştır. Dizi analizi yapılan örneklerin bugüne kadar CDC tarafından Gen Bankasına belirli referans numaraları ile numaralandırılarak kayıt edilmiş olan *emm* tipleri ile karşılaştırmasını yapmak için bilgisayar ortamında BLAST (Basic local Alignment Search Tool) programı kullanılmıştır.¹³²

X-Sonuçların analizi:

Elektroforez sonucunda elde edilen kromatogram dosyaları FinchTV v1.3.1 yazılımı (GeoSpiza Inc., ABD) yardımıyla görsel olarak düzeltilmiştir. DNA dizilerinin uygun bölümleri ileri analizlerde kullanılmak üzere FASTA formatına uygun olarak kaydedilmiştir. Tiplendirme işleminde kullanılacak referans DNA dizileri ftp://ftp.cdc.gov/pub/infectious_diseases/biotech/tsemm adresinden indirilmiştir.

“Genetics Computer Group” (GCG) formatında olan dosyalar Readseq (<http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/readseq/java/>) programı yardımıyla

FASTA formatına dönüştürülmüştür. Referans DNA dizileri arasından her *emm* tipini temsil edecek ana tipler seçilerek mtype.fsa metin dosyasında toplanmıştır. Çalışmaya alınan suşların *emm* genotiplerini belirlemek ve filogenetik ağacı oluşturmak amacı ile elde edilen DNA dizileri mtype.fsa dosyasına eklenmiş ve ClustalW v1.7²¹ yazılımı kullanılarak tüm dizileri içeren global hizalama yapılmıştır. Elde edilen dendrogram dosyasından filogenetik ağaç oluşturulması için, TreeView X (<http://darwin.zoology.gla.ac.uk/~rpage/treeviewx/index.html>) yazılımı kullanılmıştır. Lokal hizalama için yerel “Basic Local Alignment Tool” (BLAST) sunucusundan yararlanılmıştır. Kullanılacak veritabanı mtype.fsa dosyası kullanılarak oluşturulmuştur. Çalışmada elde edilen DNA dizileri BLOSUM-62 matrisi kullanılarak veritabanında sorgulanmış, en uygun veritabanı *emm* tipiyle hizalanmış sorgu dizileri ve benzerliğin niceliğini belirten E değerleri bulunmuştur.

İstatistiksel Analiz: Elde edilen *emm* tipleri ile cinsiyet arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için ki-kare analizi kullanılmıştır. Tiplerin yaş dağılımlarının birbiri ile karşılaştırılması için de Mann-Whitney U analizi kullanılmıştır.

BULGULAR

Belirtilen tarihler arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli klinik ve polikliniklerden gelen boğaz sürüntü örneklerinden izole edilip tanımlanan 114 adet *S. pyogenes* suşu çalışmaya alınmıştır. Bu suşların 68'i erkek 46'sı ise kadın hastadan izole edilmiştir. DNA dizi analizi ile *emm* tipleri belirlenebilenlerin 54 tanesi erkek hastalardan, 37 tanesi kadın hastalardan izole edilmiştir. Tiplendirilemeyen 17 suştan 14 tanesi erkek, 9 tanesi de kadın hastalardan izole edilmiştir. “*emm*” tipleri belirlenebilenler ile belirlenemeyenlerin izole dildikleri cinsiyete göre dağılımı Tablo-4’de verilmiştir

(n)	“ <i>emm</i> ” tiplendirilenler(%)*	“ <i>emm</i> ” tiplendirilemeyenler(%)	Toplam(%)
Kadın	37 (40.7)	9 (39.1)	46 (40.4)
Erkek	54 (59.3)	14 (60.9)	68 (59.6)
Toplam(%)	91 (79.8)	23 (20.2)	114(100)

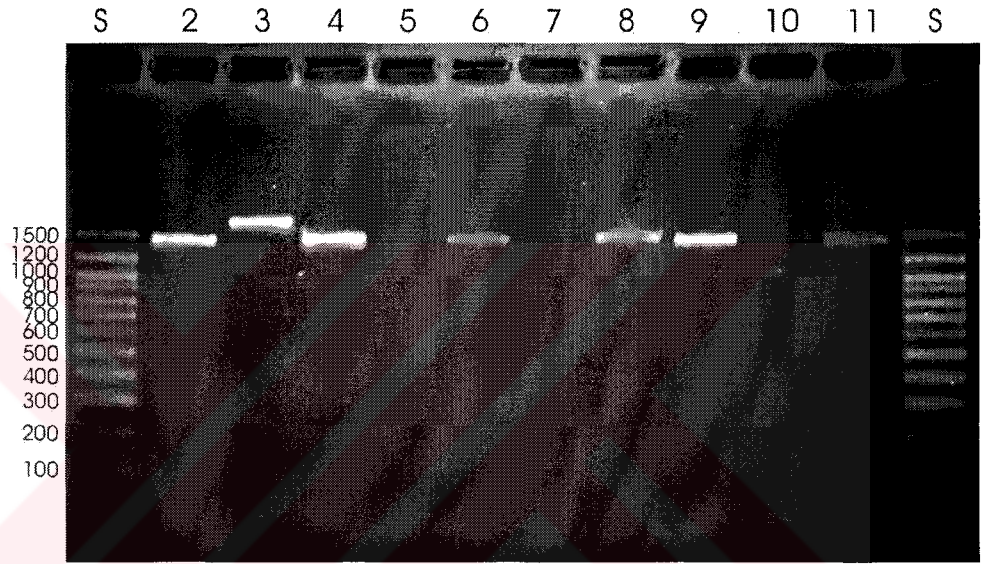
Tablo-4: n:kişi sayısı, *:gruplara göre % değerleri göstermektedir.

:

Bu çalışmaya alınan örneklerin gönderildiği servislere göre dağılımı değerlendirildiğinde; bu örneklerin ait olduğu hastaların %85.9'unun çeşitli pediatri klinik ve polikliniklerinden gönderildiği, bunların dışında kalan örneklerin %14.1'inin ise çeşitli kliniklerden geldiği tespit edilmiştir.

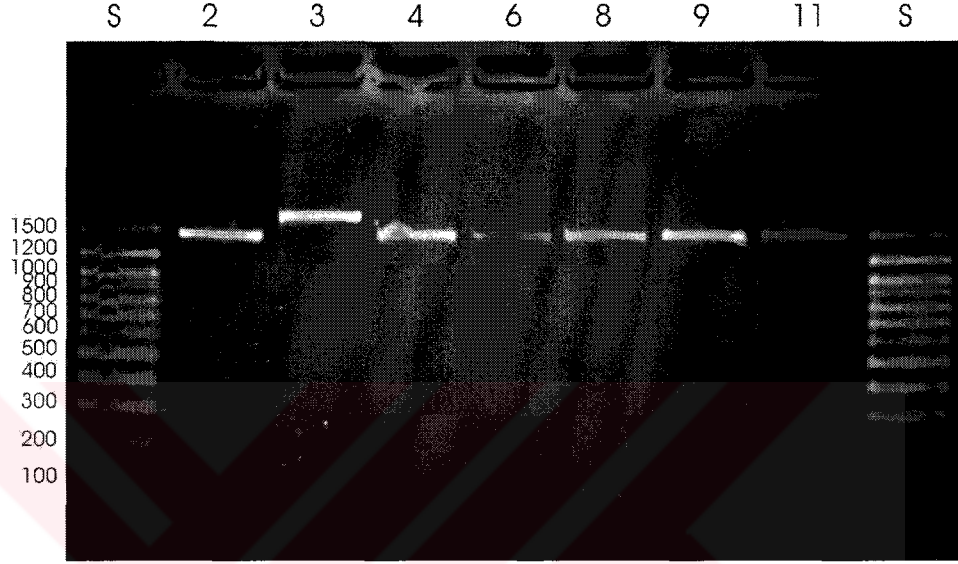
Çalışılan örneklerin alındığı hastaların en küçüğü 6 aylık, en büyüğü ise 58 yaşındadır. Çalışmaya alınan hastalar oldukça geniş yaş dağılımı sergilemektedir.

Çalışma kapsamına alınan 114 suşun 97'sinde(%85) emmP1 ve emmP2 primerleri kullanılarak PZR ile “*emm*” çoğaltma ürünü elde edilebilmiş ve görüntüleme sonrası Şekil-5’de gösterilmiştir.



Şekil-5: emmP1 ve emmP2 primer çifti ile elde edilen çoğaltma ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi **S:** DNA moleküler ağırlık standardı, **2-11:** örnekler (5, 7, 10 *emm* (-) örnekler)

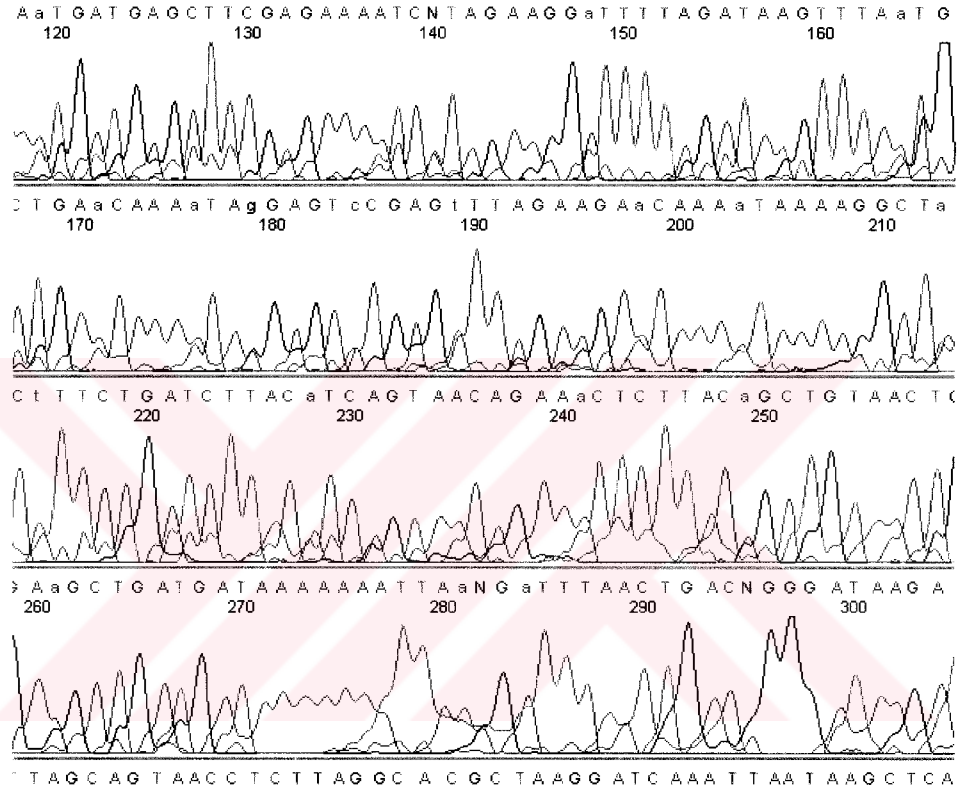
“*emmP1*, *emmP2* primer” çifti ile çoğaltılan DNA ürününün saflaştırması yapıldıktan sonra tekrar görüntülenmesi Şekil-6’da gösterilmiştir.



Şekil-6: *emmP1* ve *emmP2* primer çifti ile elde edilen çoğaltma ürünlerinin saflaştırma işleminden sonra görüntülenmesi **S:** DNA moleküler ağırlık standardı, **2-11:** örnekler

Çalışma kapsamındaki 114 suşun dizi analizi için uygun bulunan 97 tanesinden 91(%93)'inin *emm* tipi belirlenebilmiştir. Kalan 23 tane örneğin 16'sının(%69) seçilen her iki tip primer çifti de kullanılarak, en az 3 kez PZR ile çoğaltma işlemi uygulanmasına rağmen DNA ürünü elde edilememiş ve *emm* tipleri belirlenememiştir. Geriye kalan 7 tanesinden 4'ünün *emmP1*-*emmP2* primer çifti kullanılarak PZR sonrası DNA ürünü elde edilmesine rağmen veri tabanında bulunan standart tiplerden herhangi biri ile uyumlu bulunamamıştır. Diğer 3 tanesinin *emmP1*-*emmP2* primer çifti kullanılarak PZR sonrası DNA ürünü elde edilmesine rağmen döngüsel dizilemede karışık populasyon

sergiledikleri belirlenmiştir. PZR sonrasında elde edilen DNA ürünlerinin döngüsel dizileme cihazında kapiller jel elektroforezi yapıldıktan sonra dizilerin kromotogramlarının görüntüsü Şekil-7’de gösterilmiştir.



Şekil-7::Kapiller jel elektroforezi yapılan bir örneğin kromotogram görüntüsü

Tablo-5 *emm* gen sekans analizine göre belirlenen *emm* tipleri, bu tipleri taşıyan suşlar ve veri bankasına göre kayıtlı olan tiplerle olan homolojisini gösteren “E değeri”

sekans no	M tipleri	E değeri	sekans no	M tipleri	E değeri
seq95		e^{-165}	seq96		e^{-122}
seq106		$e:0$	seq133		e^{-129}
seq144		e^{-161}	seq112	emm29	e^{-105}
seq99		e^{-152}	seq139q		e^{-43}
seq97		e^{-147}	seq111		e^{-67}
seq59	emm 1	e^{-139}	seq041		e^{-37}
seq87		e^{-167}	seq100	emm6	e^{-76}
seq77		e^{-122}	seq120		e^{-117}
seq179		e^{-127}	seq129		e^{-52}
seq70		e^{-169}	seq24		e^{-130}
seq136		e^{-50}	seq187	emm24	e^{-71}
seq113	emm1?	e^{-3}	seq178		e^{-95}
seq005	emm?	?	seq194		e^{-38}
seq20	emm103	$e^{-3} (0,075)$	seq165	emm111	e^{-5}
seq170	emm111	$7 e^{-4}$	seq006		e^{-21}
seq155	emm102	$5 e^{-17}$	seq181	emm?	e^{-32}
			seq101		e^{-125}
			seq125		$e:0$
seq182	emm77	e^{-116}	seq118		$e:0$
seq180		e^{-168}	seq127		e^{-133}
			seq141		e^{-131}
			seq143		e^{-127}
seq159	emm112	$3 e^{-50}$	seq151	emm3	e^{-139}
seq188	emm9	e^{-117}	seq128		e^{-156}
seq93	emm118	e^{-145}	seq130		e^{-141}
seq40	emm90	$2 e^{-96}$	seq140		e^{-100}
seq122		$e:0$	seq146		e^{-144}
seq067		e^{-12}	seq14		e^{-92}
seq089	emm4	e^{-120}	seq88		e^{-111}
seq157		$3 e^{-99}$	seq86		e^{-124}
seq028		e^{-130}	seq76	emm?	
			seq35		e^{-78}
			seq001		e^{-97}
seq161	emm22	e^{-143}	seq15		e^{-100}
seq162		e^{-87}	seq134		e^{-148}
seq033	emm11	$e:0$	seq19		e^{-158}
seq23		e^{-157}	seq164		e^{-136}
seq32		e^{-172}	seq91		e^{-150}
seq34	emm75	e^{-149}	seq69	emm12	e^{-157}
seq98		e^{-173}	seq192		e^{-95}
seq85		$e:0$	seq92		e^{-177}
seq110		e^{-171}	seq102		e^{-167}
seq68	emm48	$e:0$	seq94		e^{-151}
seq177		$e:0$	seq18		e^{-167}
seq60	emm33	e^{-152}	seq17		e^{-45}
seq154	emm43	e^{-138}	seq012		e^{-12}
seq103	emm14	e^{-135}	seq163		$e^{-2} (0,07)$
seq150	emm18	$3 e^{-93}$	seq78	emm2	e^{-17}

Şekil-8: 14 numaralı örneğin DNA ürününü kromotogram dizisinin fasta formatında BioEdit programı ile veri tabanında kayıtlı standart tipler ile olan uyumunun karşılaştırması

```
Query= seq14
      (395 letters)

Database: C:\BioEdit\database\emmdb.fsa
          117 sequences; 49,075 total letters

Sequences producing significant alignments:

                                Score   E
                                (bits) Value
emm3                           329    1e-092
emm31                           96     3e-022
emm108                          26     0.23
emm80                           26     0.23
emm26                           24     0.90

>emm3
      Length = 391

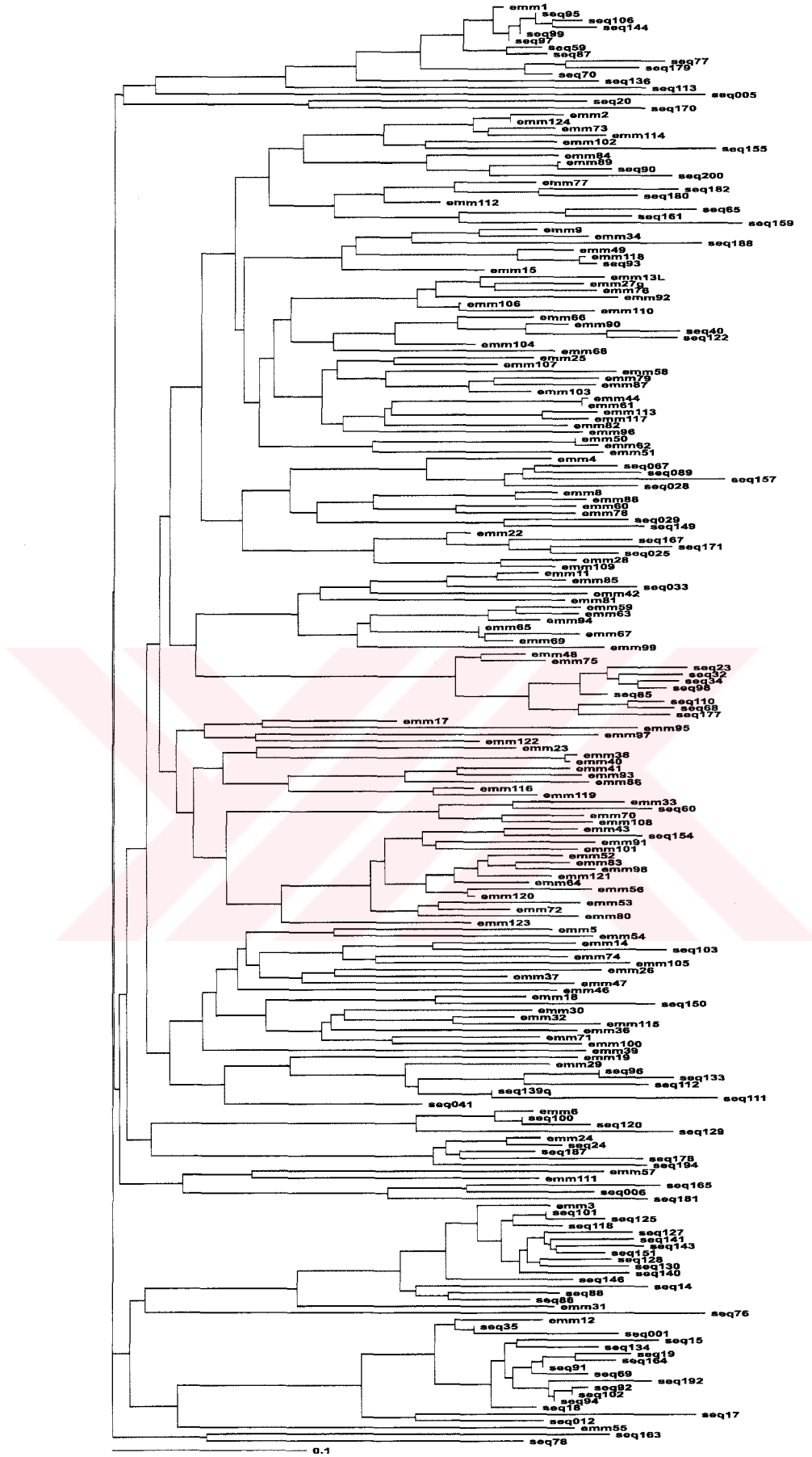
Score = 329 bits (166), Expect = 1e-092
Identities = 221/239 (92%), Gaps = 2/239 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 8  aagggagatgctgggagtggtactggagagtttcctagacttgttaaattaaaaaacgaa 67
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 64  aaggcagatgctaggagtggtaatggagagtttcctagacatgttaaattaaaaaatgaa 123

Query: 68  attgagaacttgtagatcagggttacacantttttaataaacctaatagtatttaccan 127
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 124 attgagaacttgtagatcagggttacacaattatataataaacataatagtaattaccaa 183

Query: 128 caatataatgcccaagctggcagacttgacctgagacaaaagggtgaatatctaaaaggc 187
          ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 184 caatatagtcacaagctggcagacttgacctgagacaaaagggtgaatatctaaaaggc 243

Query: 188 cttaatgattgggctgagaggctgttacaagagtttaactgggagaagatgtaaaaaaa 246
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 244 cttaatgattgggctgagaggctgttacaagagttaaa--tggagaagatgtaaaaaaa 300
```



Şekil-9: ClustalW v1.7 (21) yazılımı kullanılarak tüm dizileri içeren global hizalama sonrasında elde edilen filogenetik dendrogram

Hastalardan izole edilen boğaz enfeksiyonu etkeni olan suşların dizi analizi sonuçlarının veri tabanındaki standartlar ile karşılaştırılması sonunda *emm* tipleri belirlenmiştir. Bu çalışmada incelenen ve tiplendirilebilen suşların **1, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 14, 18, 22, 24, 29, 33, 43, 48, 75, 77, 78, 89, 90, 102, 112 ve 118** numaralı *emm* tiplerinde oldukları saptanmıştır. 23 çeşit olan bu *emm* tipleri arasında en sık oranda belirlenenler *emm* **1, 3 ve 12** tipinde olduğu bulunmuştur.. En az olarak da *emm* 9, 11, 14, 18, 33, 43, 48 53, 77, 78, 90, 102, 112 ve 118 tipleri tanımlanmıştır. Bu örneklerin izole edildiği kişilerin cinsiyeti ile belirlenen *emm* tipleri arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı bulunmuştur. ($p>0.05$).

En sık belirlenen tiplerin yaş gruplarına göre dağılımı Tablo-6’de gösterilmiştir.

Tablo-6: En sık görülen *emm* tipleri ve sıklıkla tespit edildikleri yaş aralığı

<i>emm</i> tipleri Dağılım	Görülme sıklığı (adet)	En fazla görüldüğü yaş
1	11	6-10 11 suşun 8 tanesi
3	14	8-18 14 suşun 12 tanesi
12	15	8-12 15 suşun 10 tanesi
75	5	10-11 5 suşun 3 tanesi
29	5	0 5 suşun 3 tanesi

Bu çalışmada kullanılan suşların *emm* tiplerinin izole edildikleri kişilerin yaş grupları ile bir ilişki olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; en sık olarak saptanan *emm* tiplerinden tip1, 4, 6 ve 24 daha çok 6 ve daha küçük yaşlarda olan kişilerde belirlenmiştir. ($p\leq 0.05$). Bu sonuca dayanarak bu grub *emm* tiplerini taşıyan suşların daha çok oyun çağı dönemindeki çocuklarda

görüldüğü söylenebilir. En sık olarak bulunan *emm* tiplerinden tip3'ün en sık görüldüğü yaş grubu 8-18 yaş aralığı olmakla beraber dağılımın en yoğunlaştığı alan 10-14 yaş aralığı olmuştur.Tablo-6'da belirtilen en sık görülen *emm* tiplerinin dışında 4 adet suşla daha az görülen *emm* tip75 ve tip89'un ise daha çok 9-13 yaşlarındaki çocukları enfekte ettiği sonucuna ulaşılmıştır. *emm* tip1, 4, 6 ve 24 bir grup olarak ele alınınca enfekte ettikleri hasta yaş grubu açısından diğer gruplardan anlamlı olarak farklı bir özellik göstermektedir. ($p \leq 0.05$). Buna karşılık *emm* tip3 ve12 grubu ile tip75 ve89 gruplarının arasında, enfekte ettikleri bireylerin yaş durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Ayrıca bu çalışmanın sonuçlarına göre belirlenen *emm* tiplerinin A.B.D'de geliştirilip yakın zamanda kullanıma hazır hale getirilen 26VV aşısının içerdiği 26 adet M protein/*emm* tiplerinden *emm* 1, 3, 6, 11, 12, 14, 18, 22, 24, 29, 33, 43, 75, 77, 89 olmak üzere 15 tanesini içerdiği saptanmıştır.

Çalışmada belirlenen tüm *emm* tiplerinin sayısı esas alındığında, 26VV'nin bu 15 adet serotipin görüldüğü 70 örneği %76.9 oranında kapsadığı bulunmuştur.

TARTIŞMA

A grubu streptokoklar, tüm dünyada yaygın bir dağılım göstermektedirler. Bu grubun tek üyesi olan *S.pyogenes*, insanlarda patojen olan bakteriler arasında enfeksiyonlarına en sık rastlanan mikroorganizmadır. Bu türün biyolojik olarak kullandıkları tek konak insandır.¹⁰⁰ Bu çalışmada *S.pyogenes* kaynağı olarak boğaz enfeksiyonu olan kişilerin seçilmesinin nedeni, birçok *S.pyogenes* suşunun en sık olarak boğaz yada deride hafif ve orta şiddette enfeksiyonlara neden olmalarıdır. Her iki doku da bu türler için esas rezervuar olarak görev yaparlar. GAS'lar bu dokularda birincil olarak başlayan hafif enfeksiyonlara neden olurlar. Bazı hastalarda daha sonra STSS gibi hayatı tehdit eden hastalıklara yol açabilmektedirler. Bazı hastalarda ise ARA gibi otoimmün bozuklukları tetikleyebilmektedirler.¹⁰⁰

S.pyogenes'in dokulara adezyonunda, solunum yolları epiteline kolonizasyonunda ve konağın bağışıklık sisteminden kaçışında en önemli virülans faktörlerinden biri olan M proteinleri, bu yüzden tüm dünyada birçok araştırmacı tarafından en çok çalışılan konulardan biri olmaktadır. Son yıllarda hergün baş döndürücü bir hızla gelişen moleküler yöntemler sayesinde M proteinlerinin moleküler konfigürasyonu ve amino asit dizisi açığa kavuşturulmuştur. M proteinlerindeki antijenik çeşitliliğin gösterilmesinde serolojik tiplendirmeler yetersiz kalmaya başlamış ve güvenilirliklerini yitirmişlerdir. Günümüzde gelişmiş merkezlerde bu yöntemler terk edilmeye başlanmıştır. Ticari amaçlarla serum üreten bazı şirketler de bu yöntem için kullanılan antiserumların

üretiminden vazgeçmişlerdir.³⁵ Bu tiplendirme yerine *emm* geni nükleotid dizisinin analizinin yapılması ile *emm*/M tiplendirmesi yapılabilmektedir. Hızlı bir tiplendirme yöntemi olan *emm* sekanslama metodunun (*emm* tiplendirme diye de bilinmektedir) kullanılması ile, bu önemli patojen bakteri üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmaların doğruluğu ve etkinliği arttırılmıştır.³⁵ Bu yeni yöntem sayesinde bilinen *emm* tipleri ile yeni suşların *emm* tipleri lokal ve global olarak karşılaştırılarak daha birçok yeni *emm* tipleri belirlenebilecektir. Ayrıca *emm* tiplerinin kendi aralarında çok küçük alelik değişiklikleri de belirlenebilmekte böylece belirli *emm* tiplerinin alt tipleri de saptanabilmektedir. Birçok araştırmacı, moleküler yöntemleri kullanarak *S.pyogenes*'in M proteininin tipleri üzerinde çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Sonuçta elde edilen *emm* tipleri ve alt tipleri CDC'nin gen bankasında toplanarak veri tabanı oluşturulmuştur.

Bu araştırmacılardan Beall ve arkadaşları³⁵ Brezilya, Yeni Gine, Gambiya, Etopya ve Malezya'da ki hastalardan izole ettikleri suşların yeni *emm* gen sekanslarını belirlemişlerdir. İlk kez saptanan bu *emm* tiplerinin bugüne kadar bilinen ve Avrupa ülkelerinden izole edilmiş *emm* tiplerinden farklı oldukları belirtilmiştir. Bu anlamda, her yeni çalışmanın yeni *emm* tipleri belirlemeye aday olabileceği düşünülebilir. Bu sonuçlara göre *emm* tipi belirlenemeyen suşların oranının Afrika'da İngiltere'den daha yüksek olduğu belirtilmektedir.³⁷ Örneğin; Brandt ve arkadaşlarının Almanya'nın kuzeybatı bölgesindeki Aachen bölgesinde yaptıkları bir araştırmada, boğaz enfeksiyonlarından izole edilen 216 adet *S.pyogenes* suşunun tümünün *emm* gen dizi analizi ile *emm* tipi belirlenebilmiştir. Kuzeybatı Almanya'nın en sık görülen *emm* tipleri; *emm*1(%18.5), 12(%15.7),

3(%14.4) ve 28(%13.9) olarak belirtilmiştir.¹³³ Aynı şekilde Meksika’da, Espinosa ve arkadaşları, farenjit enfeksiyonu olan 282 adet çocuk hastadan izole ettikleri GAS suşlarının aynı yöntemle *emm* tipleri belirlemişler ve saptanma sıklıklarına göre sırasıyla *emm* 1 (%17.4), 12 (%17.4), 3 (%7.8), 75 (%7.8), 4 (%6.4), 2 (%6.0), 77 (%6.0), 22 (%5.7), 6 (%6.2), 9 (%3.2) tipleri olduğunu bulmuşlardır¹⁶.

Ankara bölgesinde yapılan bu çalışmada ise en yüksek oranda belirlenen *emm* tipleri; *emm* 12 (%16.48), 3 (%15.38), 1 (%12.08), 75, 29 (%5.49) ve 6 (%4.3) dır. Tiplendirilebilen *emm* tiplerinin dağılımı değerlendirildiğinde, belirlenen tiplerin hem Brandt, hem de Espinosa ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumlu oldukları görülmektedir.

S.pyogenes suşlarının coğrafik dağılıma göre çeşitlilik ve suştan suşa değişiklik göstermelerine bağlı olarak her bölgede farklı yeni tipler ortaya çıkabilmektedir.¹⁸ Teixeira ve ark.ları¹⁸, Brezilya’nın güneydoğu bölgesinden 37 adet GAS izolatının fenotipik ve genotipik olarak *emm* tiplerinin ortaya çıkarılmasını amaçlayan çalışmalarında, 13 GAS izolatının, daha önce CDC’nin gen bankasında kayıtları olmayan yeni tiplere ait olduklarını belirlemişlerdir. Bu yeni tipler farklı referans numaraları ile kayıtlara geçirilmişlerdir.

Brezilya gibi önceden incelenmemiş birçok bölgenin, *emm* tipleri açısından zengin ve büyük bir havuz olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre ülkemizde de aynı şekilde *emm* tiplerinin çeşitliliği açısından bir zenginlik olabileceği, daha ileri çalışmalar yapılarak daha zengin *emm* tip dağılımına ulaşılabilceği söylenebilir.

Bununla birlikte değişik ülkelerde yapılan çalışmalar ile değişik *emm* tipleri bulunsa da belli bazı *emm* tiplerinin görülme sıklığının bölgelere göre benzerlik gösterdiği de görülmüştür. Örneğin; Brandt ve arkadaşları,¹³⁴ Almanya'nın Aachen bölgesinde yaptıkları bir çalışmada boğaz enfeksiyonlarından izole ettikleri *S.pyogenes* suşlarının *emm* gen dizi analizi ile tiplendirilmesi sonucu 216 suşun içinde *emm* 1 tipini en yüksek oranda (%18.5) belirlemişlerdir. Aynı şekilde Espinosa ve arkadaşları¹⁶ da çalışmalarında en sık *emm* 1 tipini (%17.4) belirlemişlerdir Bu çalışmada ise, tiplendirilebilen suşlar arasında *emm* 1 tipinin görülme oranının (%12.08) yüksek bulunması, ülkemizdeki *S.pyogenes* suşlarının *emm* tiplerinin genotip olarak Avrupa ve Kuzey Amerika'dakiler ile benzerlik gösterdiğini düşündürmektedir.

Belirlenen tiplerin bilgisayar programları kullanılarak gen bankasındaki referans olarak belirlenen tipler ile olan homolojisine dayanarak dağılımları yapılmış ve böylece küçük bir bölgede de olsa Türk toplumundaki *emm* tipi dağılımının belirlenmesi amacına ulaşılmıştır. Bu dağılıma bakıldığında, 1 yıllık süreç içinde henüz bölgesel de olsa bulunan *emm* tipleri ve bu tiplere sahip izolat oranlarının, Amerika ve Avrupa'da bugüne kadar belirlenmiş olan ve belirli referans numaraları ile gen bankasına kayıt edilmiş *emm* tiplerinin dağılımı ve suşlara göre oranları ile büyük ölçüde uyumlu olduğu bulunmuştur.

Bu sonuçlara dayanarak, invaziv hastalıklar ve komplikasyonlar ile daha önceden ilişkili olduğu bilinen *emm* 1, 12, 3, 24 gibi *emm* tiplerinin daha sıklıkta saptanması bakımından da bu çalışmanın sonuçlarının diğer çalışmaların sonuçları ile benzerlik gösterdiğini söyleyebiliriz.

Hartas ve arkadaşları¹⁰² çalışmalarında, Avusturalya'nın tropikal kuzey kesimindeki yerli halktan izole edilen *S.pyogenes* suşlarını tiplendirmişlerdir. *S.pyogenes* enfeksiyonu sonrası endemik olarak gelişen ciddi akut glomerulonefrit (AGN) vakalarından izole edilen suşların *emm* tipleri nefritojenik olarak suçlanan *emm* 1 ve 12 olarak belirlenmiş ve en sık görülen suş olarak tanımlanmıştır. Bunun yanında *emm* 55 ve 5 tipleri de görülmüştür.¹³⁴ Bu sayede, belirli *emm* tiplerini taşıyan suşların daha sonra invaziv hastalıklara neden olabileme ihtimalinin yüksek olduğu göz önüne alınarak bu tiplerin belirlenmesi ile tedavi seçeneği ve/veya profilaksi uygulanması da sağlanabilmektedir.

GAS enfeksiyonlarına karşı kullanılan antimikrobiyal ajanlar ve bunların duyarlılıkları ile ilgili ülkemizde birçok çalışma yapılmıştır.^{135,136,137,138,139} Bu çalışmalara da dayanarak GAS enfeksiyonlarına karşı çok yaygın olarak kullanılan başta penisilin olmak üzere birçok antimikrobiyal ajan olmasına rağmen STSS gibi invaziv hastalıklar, ARA ve APSGN gibi otoimmün bozukluklar ile sonuçlanan komplikasyonlar önlenememiş değildir. Antibiyotiklerin doğru ve zamanında kullanılması bu sorunlara çözüm getirebilir. Ancak bu her zaman mümkün olamamaktadır. Bu yüzden *S.pyogenes* enfeksiyonlarının önlenmesi için gerekli daha ileri bilimsel çalışmalara ve özellikle aşı geliştirme çabalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda, bu konuda hızlı aşamalar kaydedilmiş olsa da tam olarak uygun bir aşı geliştirilememiştir. Bu konuda son 7 yıldır Arjantin, Şili, Meksika, Batı Avrupa, Asya, ve Kuzey Amerika gibi ülkelerde seçilen hedef bölgelerde yapılan çalışmalarda elde edilen *emm* tiplerinin dağılımı ile ABD'deki *emm* tiplerinin dağılımı arasında %97-100

oranında bir benzerlik bulunmuştur.^{140,141,142} Bu araştırmacıların sonuçlarına dayanarak geliştirilen M proteinine dayalı multivalent bir aşının (26VV), bu bölgelerdeki *emm* tiplerine karşı kullanılabileceği düşünülmektedir. Buna karşılık, Yeni Zelanda, Avusturalya, Şili, Malezya, Hindistan, Nepal, Mısır, Yeni Gine gibi bölgelerdeki klinik izolatlardan soyutlanan başka *emm* tipleri ABD’de en sık görülen *emm* tipleri ile tam bir uyum sergilememektedir.^{142,143}

Bu çalışmada izole edilen suşlar sadece bölgesel olduğu için, *emm* tiplerindeki çeşitliliğin sayısını etkilemiş ve 23 adet *emm* tipi belirlenebilmiştir. Espinosa ve arkadaşlarının raporunda¹⁶ işaret edilen Hong Kong’da yapılan başka bir çalışmada belirlenen 32 çeşit *emm* tipi, Dicuonzo ve arkadaşlarının¹⁴¹ Roma’da yaptıkları bir çalışmada ise 22 çeşit *emm* tipi, Almanya’ da yapılan bir çalışmada¹⁴⁰ 216 izolat için 18 *emm* tipi olarak, Meksika’da yapılan başka bir çalışmada¹⁴⁴ ise 31 adet farklı *emm* tipi bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise 23 adet olarak belirlenen *emm* tipi sayısına göre alınan sonuç, diğer araştırmaların sonuçları ile uyumlu olarak bulunmuştur. Bu sonuç sadece ülkemizdeki bir bölgeyi temsil etse de iyi bir sonuç olarak tanımlanabilir.

Bu çalışmadaki izolatların 23 tanesinin (%20.2) tiplendirilemeyen M proteini taşıdıkları belirlenmiştir. Diğer araştırmacılar da tiplendirilemeyen M proteini sayısının farklı coğrafik bölgelerde farklı oranlarda bulmuşlardır.

Ülkemizde, Topkapı ve arkadaşlarının çocuklardaki üst solunum yolu enfeksiyonlarından izole edilen GAS’ların T proteinlerinin sadece polivalan antiserumlar ile aglütinasyon metodu kullanılarak tiplendirdikleri bir çalışma¹⁴⁵ hariç bu konuda başka çalışma bulunamamıştır. Bu nedenle ülkemizdeki hedef

bölge içinde belirlenen *emm* tipi dağılımını belirlemek amacıyla yapılan bu çalışma, tüm ülke çapında yaygınlaştırılarak ileride yapılacak olan diğer çalışmalara temel oluşturacak ve bu çalışma sayesinde tüm ülke çapında *emm* tiplerinin dağılımı elde edilebilecektir. Bununla birlikte bu çalışma ile, örneğin 26 valentli aşının¹⁵ (26VV) ülkemizdeki suşların *emm* tipleri üzerindeki etkinliği açıklığa kavuşturulmuştur.

Çok yakın bir zamanda bir çok bölgede kullanılabilecek olan bu 26VV özellikle *S.pyogenes* enfeksiyonu sonrasında gelişen invaziv hastalıkların profilaksisinde oldukça başarılı bulunmuş bir aşıdır.¹⁶ M protein tiplerinden 1, 12, 3, 75, 2, 77, 22, 6, 5, 18, 28, 89, 92, 76, 33, 11, 59 bu aşının bünyesindeki serotiplerdendir. Espinosa ve arkadaşları¹⁶ Meksika'da yaptıkları çalışmada, 282 adet farinksten izole edilen GAS suşları için 27 adet *emm* tipi tanımlamışlardır. 26VV'nin içerdiği *emm* tiplerinin %88 oranında bu *emm* tiplerini de kapsadığı belirtilmiştir. Dolayısı ile, bu aşının bu bölgede başarı oranı oldukça yüksek bulunmuştur.

Bu çalışmada belirlenen *emm* tiplerinden *emm* 1, 3, 6, 11, 12, 14, 18, 22, 24, 29, 33, 43, 75, 77, 89 olmak üzere¹⁵inin 26VV aşısının bünyesinde de bulunduğu ve belirlenen 23 adet *emm* tipinin, bulunduğu örnek sayısı dikkate alınarak %76.9 oranında 26 VV'in bünyesindeki *emm* tiplerini kapsadığı görülmüştür. Ayrıca bu bulguya ek olarak en sık oranda belirlenen ve önemli komplikasyonlardan veya süpüratif hastalıklardan sorumlu tutulan *emm* tip 1, 3, ve 12'nin de 26VV aşısının kapsadığı tipler içinde yer aldığı gözlenmiştir.

Diğer araştırmacıların sonuçları ile benzerlik gösteren bu çalışma, yakın bir gelecekte ülkemizde de komplikasyonların ve invaziv hastalıkların profilaksisinde bu tür aşılardan kullanılabilmeleri açısından oldukça ümit vericidir. Bununla birlikte, bu çalışmada sekans analizi ile belirlenen nükleotid dizilerinin ABD’de bulunan gen bankasındaki kayıtlı *emm* tipleri ile olan homolojilerinin yüksek oranda uyumlu bulunması da bu tip aşılardan ülkemizde kullanımını mümkün kılacak bir durumdur. Ancak bu oranın, örneklem sayısının artırılması ve çalışmanın farklı bölgelere genişletilmesi ile değişebileceği düşünülmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada hastaların boğaz kültürlerinden izole edilen 114 *S.pyogenes* suşunun *emm* gen dizi analizi ile M tipleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu suşlardan 91 tanesinin *emm* tipi belirlenebilmiş, 23 tanesi ise tiplendirilememiştir. Bu çalışmada incelenen izolatların 1, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 14, 18, 22, 24, 29, 33, 43, 48, 75, 77, 78, 89, 90, 102, 111, 112, 118 *emm* tiplerinden oldukları anlaşılmıştır. En sık olarak sırasıyla, 12, 3, 1 tipleri olmak üzere daha az sıklıkta 75, 29, 4, 6, 24, 22, 77, 89 *emm* tipleri olduğu belirlenmiştir. İnvaziv enfeksiyonlara ve streptokok enfeksiyonu sonrası ciddi komplikasyonlara neden olan 1, 3, 12 gibi serotiplerin tamamının bu çalışmada bulunduğu belirlenmiştir.

Ayrıca bulunan *emm* tiplerinin %76.9 oranında 26VV aşısını kapsadığı tespit edilmiştir. Özellikle bu çalışmada en sık oranda belirlenen, invaziv hastalık ve komplikasyonlardan sorumlu tutulan *emm* 1, 3 ve 12'nin de bu aşının kapsamında olması, bu tür durumların oluşmasının önlenmesinde oldukça ümit verici bir sonuçtur.

Günümüzde ülkemizde kullanılmıyor olsa da bir çok merkezde GAS'ların M serotiplerinin belirlenmesinde kullanılan serolojik yöntemler, moleküler yöntemlerin geliştirilmesiyle geçerliliklerini yitirmişlerdir. M serotiplendirme yöntemlerinde yanlış tiplendirmeler ve henüz belirlenememiş tiplerin ortaya çıkarılamaması döngüsel dizileme yöntemlerini altın standart durumuna getirmiştir. Bu moleküler yöntemler ile şimdiye kadar bilinmeyen yeni *emm*

tiplerinin belirlenebilmesi de mümkün olacaktır. Günümüzde M tiplerinin belirlenebilmesi için prob hibridizasyon ve *emm* dizi analizi gibi moleküler yöntemlerin kullanılmasının gerekli olduğu ileri sürülmektedir. Böylece farklı coğrafik yerleşim bölgelerine göre *emm* tiplerinin dağılımının bilinmesi bu bölgelerdeki invaziv hastalık ve komplikasyonların da dağılımının önceden belirlenebilmesi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca bu dağılımın bilinmesi bölgelere göre oluşan GAS infeksiyonlarına karşı korunmada çok önemli bir adım olan aşı geliştirme çalışmaları için de yol gösterici olacaktır. Bu nedenle ülkemizde ilk kez yapılan bu çalışmanın ülkemizin tümünü kapsayacak boyutlarda genişletilmesi ile ülkemizde *S.pyogenes* M tiplerinin dağılımı daha iyi bir şekilde belirlenmiş olacaktır

ÖZET

Özellikle *Streptococcus pyogenes* (*S.pyogenes*)'e bağlı boğaz enfeksiyonlarından sonra çok çeşitli virülans faktörlerine bağlı olarak invaziv hastalıkların gelişebileceği bilinmektedir. Bu virülans faktörlerinden en önemlisi M proteinidir. Birçok ülkede boğaz enfeksiyonu etkeni olan *S.pyogenes*'in M tiplerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen, ülkemizde bu konuda yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada boğaz enfeksiyonu olan bireylerden alınan boğaz kültürlerinden izole edilen A grubu beta hemolitik streptokok (*S.pyogenes*) suşlarının M tiplerinin *emm* gen sekans analizi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli klinik ve polikliniklerden gelen boğaz sürüntü örneklerinden izole edilip konvansiyonel yöntemler ve API 20STREP kiti ile tanımlanan 114 adet *S. pyogenes* suşu çalışmaya alınmıştır. Bu suşların 97'sinde (%85) CDC'nin önerdiği emmP1 (5'-tatt(c/g)gcttagaaaattaa-3') ve emmP2 (5'-gcaagttcttcagcttggtt-3') primerleri kullanılarak *emm* geni çoğaltma ürünü elde edilmiştir. Elde edilen bu ürünlerden 91 tanesinin(%93) DNA dizi analizi yapıp, ClustalW v1.7 yazılımı kullanılarak tüm dizileri içeren lokal ve global hizalaması yapılmıştır. Hizalama için yerel BLAST sunucusundan yararlanılmıştır. Filogenetik dendrogram çizilmiş ve *emm* tipleri belirlenmiştir. Bu *emm* tiplerinin: **1, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 14, 18, 22, 24, 29, 33, 43, 48, 75, 77, 78, 89, 90, 102, 112, 118**, numaralı tipler olduğu bulunmuştur. 23 çeşit olan bu *emm* tipleri arasında en çok oranda

belirlenenlerin ise sırasıyla, *emm* 12, 3, 1, 75, 29 olduğu saptanmıştır. Geriye kalan 23 örnek tiplendirilemeyen M proteinleri olarak kabul edilmiştir. En çok görülen 5 adet *emm* tipinin daha çok 10 yaş altı ve okul çağı çocuklarından izole edildikleri görülmüştür.

Ayrıca, en sık görülen *emm* 1, 3 ve 12 tipleri de dahil olmak üzere, bu çalışmada bulunan *emm*/M tiplerinin 15 tanesinin GAS'a karşı geliştirilen 26 VV aşısının içerdiği M serotiplerinin kapsamında olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, bu aşının, çalışmamızdaki tanımlanmış tüm *emm* tipleri üzerinde % 76.9 oranında etkili olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma az sayıda örnek ile yapılmış bir çalışmadır ve sadece bir merkeze başvuran hastalardan elde edilen suşlarla yapılmıştır. Ancak ülkemizde *S.pyogenes emm* tiplerini belirleyen ilk çalışma olmuştur. Bu çalışma, ülkemiz için bilimsel bir açığı gidererek bu konuda gelecekte yapılacak çalışmalara da zemin hazırlayacak bir ön çalışma olmuştur. Bu tür çalışmaların daha fazla örneklem sayısında gerçekleştirilmesi ile farklı coğrafik yerleşim bölgelerine göre *emm* tiplerinin dağılımı da belirlenebilecektir. Buna ek olarak, bu çalışmalar, farklı bölgelerdeki invaziv hastalık ve komplikasyonların da dağılımının önceden belirlenebilmesine olanak tanınması ve aşı geliştirme çalışmalarında yol gösterici olması açısından da büyük önem taşımaktadır.

SUMMARY

Following *Streptococcus pyogenes* (*S.pyogenes*) related throat infections, invasive diseases may occur due to several virulence factors. The most important virulence factor which leads to these diseases is known as M protein. Although many studies explore M types of *S.pyogenes* which lead throat infections in many countries, an accomplished research has not been found in our country yet.

In this study it was aimed to determine M types of *S.pyogenes* which were isolated from the cultures of individuals who had throat infections, by using *emm* gene cycle-sequencing analyse.

For this purpose, 114 *S.pyogenes* strains which were isolated from the throat cultures were sent to Gazi University, Hospital of Faculty of Medicine, Microbiology laboratory from different clinics and polyclinics and identified with conventional and API methods, were included in this study. “*emm*” specific PCR products were obtained in 97 of the strains (85%) using *emmP1*(5'-tatt(c/g)gcttagaaaattaa-3') and *emmP2* (5'-gcaagttcttcagcttgttt-3') which were suggested by CDC. 91 of these *emm* types were sequenced by DNA cycle-sequencing analyse and local and global alignments which contain all sequences were performed by Clustal W v1.7 software. The BLAST server was used for the alignment. Phylogenetic dendrogram was drawn and *emm* types were identified. The *emm* types were 1, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 14, 18, 22, 24, 29, 33, 43, 48, 75, 77, 78, 89, 90, 102, 112, 118. The most frequent *emm* types among these 23 different *emm* types were 12, 3, 1, 75, 29 respectively. The other 23 types which were not

identified were accepted as nontypeable. M types. The most frequent 5 *emm* types were isolated from school age children who were under 10 years old.

Besides, 15 of *emm*/M types including the most frequently seen *emm* 1, 3 and 12 which were determined in this study, were found that they were also in the contents of M types of 26 VV vaccine developed for GAS. For this reason, this vaccine is suggested to be effective as 76.9 % on all defined *emm* types in our study

In conclusion, this study was carried out with limited samples and performed with strains which were isolated from patients who addressed to only one center. However, this study was the first study in our country which identified *emm* types of *S.pyogenes*. This study will meet the scientific deficit in our country and provide a scientific base which will lead to other researches in the future. The use of great deal of samples in these types of studies will help to determine the distribution of *emm* types according to different geographic regions. In addition, these researches are very important to provide the early determination of the distribution of invasive diseases in different regions and also their complications and to be the guide in vaccine development researches.

KAYNAKLAR

1. MUTLU, G., İMİR, T., CENGİZ, A.T., USTAÇELEBİ, Ş., TÜMBAY, E., METE, Ö.: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Bölüm III, “Bakteriyoloji” (USTAÇELEBİ, Ş., ed.), 349, Güneş Kitabevi Ltd.Şti., Ankara, (1999)
2. CUNNINGHAM, M.W.: Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections, Clin. Microbiol. Reviews, July, 470-511. (2000)
3. STEVENS, D.L., KAPLAN, E.L.: Streptococcal Infections., Clinical aspects, microbiology and molecular pathogenesis, Oxford University Press, New York. (2000)
4. ARESCHOUG, T., CARLSSON, F., STALHAMMER-CARLEMALM, M., LINDAHL, G.: Host-Pathogen Interactions in *Streptococcus pyogenes* Infections, with Special Reference to Puerperal Fever and A Comment on Vaccine Development, Vaccine 22S, 9-14. (2004)
5. GARDINER, Don L., GOODFELLOW, A.M., MARTIN, D.R., SRIPRAKASH, K.S.: Group A Streptococcal Vir Types are M-Protein Gene (*emm*) Sequence Type Specific, J. Clin. Microbiol., April, 902-907. (1998)
6. AYOUB, E.M.: Resurgence of Rheumatic Fever in The United States, Postgrad. Med., 92,133-142. (1992)
7. KAPLAN, E.L., The Resurgence of Group A Streptococcal Infections and Their Sequelae, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 10, 55-57. (1991)

8. VEASY, L.G., WIEDMEIER, S.E., ORSMOND, G.S.: Resurgence of Acute Rheumatic Fever in the Intermountain Area of the United States, N. Engl. J. Med., 316, 421-427. (1987)
9. DESCHEEMAER, P., VAN LOOCK, F. HAUCHECORNE, M., VANDAMME, P., GOOSSENS, H.: Molecular Characterisation of Group A Streptococci from Invasive Disease Episodes in Belgium During 1993-1994, J. Med. Microbiol., vol. 49, 467-471. (2000)
10. HASTY, D.L., COURTNEY, H.S.: Group A Streptococcal Adhesion, All the theories are correct, Toward Anti-Adhesion Therapy for Microbiol Diseases, Kahane and Ofek Plenum Press, New York, (1996)
11. PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P., KLEIN, D.A.: Microbiology, Fourth ed., 770-773, McGraw-Hill Company, U.S.A., (1999)
12. VITALI, L.A., ZAMPALONI, C., PRENNA, M., RIPA, S.: PCR M Typing: a New Method for Rapid Typing of Group A Streptococci, J. of Clin. Microbiol., Feb., 679-681. (2002)
13. DALE, J.B.: Group A Streptococcal vaccines, Infect. Dis. Clin. North Am., 13, 227-243. (1999)
14. DALE, J.B., CLEARY, P.P., FISCHETTI, V.A., KASPER, D.L., MUSSER, J.M., ZABRISKIE, J.B.: Group A and Group B Streptococcal Vaccine Development: a Round Table Presentation, Adv. Exp. Med. Biol., 418, 863-868. (1997)

15. HU, M.C., WALLS, M.A., STROOP, S.D., REDDISH, M.A., BEALL, B., DALE, J.B.: Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine, *Infect. Immun*, April, 70(4), 2171-2177. (2002)
16. ESPINOSA, L.E., ZHONGYA, L., DEMOSTENES, G.B., JAIMES, E.C., RODRIGUEZ, R.S., SAKOTA, V., FACKLAM, R.R., BEALL, B.: M Protein Gene Type Distribution Among Group A Streptococcal Clinical Isolates Recovered in Mexico, from 1991 to 2000, and Durango, Mexico, from 1998 to 1999: Overlap with Type Distribution within the United States, *J. of Clin. Microbial.*, January, 373-378. (2003)
17. http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/groupastreotococcal_g.htm
Group A Streptococcal Disease-General -Information
18. TEIXEIRA, L.M., BARROS, R.R., D.CASTRO, A.C., PERALTA, J.M., CARVALHO, M.G.S., TALKINGTON, D.F., VIVONI, A.M., FACKLAM, R.R., BEALL, B.: Genetic and Phenotypic Features of *Streptococcus pyogenes* Strains Isolated in Brazil That Harbor New *emm* Sequences, *J.of Clin. Microbiol.*, September, 3290-3295. (2001)
19. BISNO, A.L., BRITO, M.O., COLLINS, C.M.: Molecular Basis of Group A Streptococcal Virulence (Reviews), *The Lancet Infectious Diseases*, Vol 3, April, 191-200. (2003)
20. O'BRIEN, K.L., BEALL, B., BARRETT, N.L., et al.: Epidemiology of Invasive Group A Streptococcal Disease in the United States, 1995-1999, *Clin. Infect. Dis.*, 35, 268-276. (2002)

21. <http://www.ninds.nih.gov>, How Common is Invasive Group A Streptococcal Disease?; National Institute of Neurological Disorders and Stroke (Office of Communications and Public Liaison)
22. SALYERS, A.A., WHITT, D.D.: Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach, Second ed., s:234-235, ASM press, Washington D.C., (2002)
23. BREESE, B.B., and HALL, C.B.: Beta Hemolytic Streptococcal Diseases, Houghton Mifflin, Boston, (1978)
24. WANNAMAKER, L.W.: The Chains That Link The Throat To The Heart, Circulation, 48, 9-18. (1973)
25. DEMERS, B., SIMOR, A.E., VELLEND, SCHLIEVERT, H.P., BYRNE, S., JAMIESON, F., WALMSLEY, S., LOW, D.E.: Severe Invasive Group A Streptococcal Infections In Ontario, Canada: 1987-1991, Clin. Infect. Dis, 16, 792-800. (1993)
26. CRATER, D.L., van de RIJN, I.: Hyaluronic Acid Synthesis Operon (*has*) Expression in Group A Streptococci, J. Biol. Chem., 270, 18.452-18.458. (1995)
27. ALBERTI, S., ASHBAUGH, C.D., WESSELS, M.: Structure of the *has* Operon Promoter and Regulation of Hyaluronic Acid Capsule Expression in Group A Streptococcus, Mol. Microbiol., 28, 343-353. (1998)
28. ASHBAUGH, C.D., ALBERTI, S., WESSELS, M.: Molecular analysis of the capsule gene region of Group A Streptococcus: the *hasAB* genes are sufficient for capsule expression, Journal of Bacteriology, 180, 4955-59. (1998)

29. WHITNACK, E., BISNO, A.L. BEACHY, E.H.: Hyaluronate Capsule Prevents Attachment of Group A Streptococci to Mouse Peritoneal Macrophages, *Infect. Immun*, 31, 985-91. (1981)
30. WESSELS, M.R., MOSES, A.E., GOLDBERG, J.B., DiCESARE, T.J.: Hyaluronic Acid Capsule is a Virulence Factor for Mucoid Group A Streptococci, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88, 8317-21.(1991)
31. STOLLERMAN, G.H.: The Nature of Rheumatogenic Streptococci, *Mt. Sinai J. Med.*, 63, 144-158. (1996)
32. JOHNSON, D.R., STEVENS, D.L., KAPLAN, E.L.: Epidemiologic analysis of Group A Streptococcal Serotypes Associated with Severe Systemic Infections, Rheumatic Fever, or Uncomplicated Pharyngitis, *J. Infect. Dis.*, 166, 374-382. (1992)
33. FILLIT, H.M., McCARTY, M., BLAKE, M.: Induction of Antibodies to Hyaluronic Acid, by Immunization of Rabbits with Encapsulated Streptococci, *J. Exp. Med.*, 164, 762-776. (1986)
34. FILLIT, H.M., BLAKE, M., MacDONALD, C., McCARTY, M.: Immunogenicity of Liposome-Bound Hyaluronate in Mice: At Least Two Different Antigenic Sites on Antibodies, *J. Exp. Med.*, 168, 971-982. (1988)
35. BEALL, B., FACKLAM, R., HOENES, T., SCHWARTZ, B.: Survey of *emm* Gene Sequences and T-Antigen Types from Systemic *Streptococcus pyogenes* Infection Isolates Collected in San Francisco, California;

- Atlanta, Georgia; and Connecticut in 1994-1995, J. of Clin. Microbiol., May, 1231-1235. (1997)
36. BEALL, B., GHERARDI, M., LOVGREN, R.R., FACKLAM, B.A., FORWICK, B.A., TYRELL, G.J.: *emm* and *sof* Gene Sequence Variation in Relation to Serological Typing of Opacity-Factor-Positive Group A Streptococci, Microbiology, 146, 1195-1209. (2000)
37. COLEMAN, G., TANNA, A., EFSTRATIOU, A., GAWORZEWSKA, E.T.: The Serotypes of *Streptococcus pyogenes* Present in Britain During 1990 and Their Association with Disease, J. Med. Microbiol, 39 (3), 165-178. (1993)
38. WÄSTFELT, M., STÅLHAMMER-CARLEMALM, M., DELISSE, A.M., CABEZON, T., LINDAHL, G.: Identification of a Family of Streptococcal Surface Proteins with Extremely Repetitive Structure, J. Biol. Chem., 271(31), 18892-18897. (1996)
39. STÅLHAMMER-CARLEMALM, M., STENBERG, L., LINDAHL, G.: Protein Rib: a Novel Group B Streptococcal Cell Surface Protein That Confers Protective Immunity and is Expressed by Most Strains Causing Invasive Infections, J. Exp. Med., 177(6), 1593-1603. (1993)
40. MICHEL, J.L., MADOFF, L.C., OLSON, K., KLING, D.E., KASPER, D.L., AUSUBEL, F.M.: Large Identical Tandem Repeating Units in the C Protein Alpha Antigen Gene, *bca*, of Group B Streptococci, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(21), 10060-4. (1992)

41. STÅLHAMMER-CARLEMALM, M., ARESCHOUG, T., LARSSON, C., LINDAHL, G.: The R28 Protein of *Streptococcus pyogenes* is Related to Several Group B Streptococcal Surface Proteins, confers Protective Immunity and Promotes Binding to Human Epithelial Cells, Mol. Microbiol., 33(1), 208-219. (1999)
42. BEACHEY, E.H., GRAS-MASSE, H., TARTER, A., JOLIVET, M., AUDIBERT, L., CHEDID, L., SEYER, J.M.: Opsonic Antibodies Evoked by Hybrid Peptide Copies of Types 5 and 24 Streptococcal M Protein II. Extraction of M Antigen from Group A Streptococci with Pepsin, Infect. Immun., 9, 891-896. (1974)
43. CUNNINGHAM, M.W., BEACHEY, E.H.: Peptic Digestion of Streptococcal M Protein I. Effect of Digestion at Suboptimal pH upon the Biological and Immunological Properties of Purified M Protein Extracts, Infect. Immun., 9, 244-248. (1974)
44. FISCHETTI, V.A., GOTSCHLICH, E.C., SIVIGLIA, G., ZABRISKIE, J.B.: Streptococcal M Protein Extracted by Nonionic Detergent I Properties of the Antiphagocytic and Type Specific Molecules, J. Exp. Med., 144, 32-53. (1976)
45. FISCHETTI, V.A., GOTSCHLICH, E.C., BERNHEIMER, A.W.: Purification and Physical Properties of Group C Streptococcal Phage-Associated Lysin, J. Exp. Med., 133, 1105-1117. (1971)

46. BEACHEY, E.H., SIMPSON, W.A.. The Adherence of Group A Streptococci to Oropharyngeal Cells: The Lipoteichoic Acid Adhesion and Fibronectin Receptor, *Infection*, 10, 107-111. (1982)
47. HASTY, D.L., OFEK, I., COURTNEY, H.S., DOYLE, R.J.: Multiple Adhesins of Streptococci, *Infect. Immun.*, 60, 2147-2152. (1992)
48. HANSKI, E., CAPARON, M.: Protein F, a Fibronectin Binding Protein, is an Adhesion of the Group A Streptococcus, *Streptococcus pyogenes* , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6172-6176. (1992)
49. KREIKEMEYER, B., TALAY, S.R., CHHATWAL, G.S.: Characterization of a Novel Fibronectin-Binding Surface Protein in Group A Streptococci, *Mol. Microbiol.*, 17, 137-145. (1995)
50. COURTNEY, H.S., DALE, J.B., HASTY, D.L.: Differential Effects of the Streptococcal Fibronectin-Binding Protein, FBP54, on Adhesion of Group A Streptococci to Human Buccal Cells and HEp-2 Tissue Culture Cells, *Infect. Immun.*, 64, 2415-2419. (1996)
51. JAFFE, J., NATANSON-YARON, S., CAPARON, M.G., HANSKI, E.: Protein F2, a Novel Fibronectin-Binding Protein from *Streptococcus pyogenes*, Possesses Two Binding Domains, *Mol. Microbiol.*, 21, 373-384. (1996)
52. ROCHA, C.L., FISCHETTI, V.A.: Identification and Characterization of a Novel Fibronectin-Binding Protein on the Surface of Group A Streptococci, 67, 2720-2728. (1999)

53. HANSKI, E., HORWITZ, P.A., CAPARON, M.G.: Expression of Protein F, the Fibronectin- Binding Protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in Heterologous Streptococcal and Enterococcal Strains Promotes Their Adherence to Respiratory Epithelial Cells, *Infect. Immun.*, 60, 5119-5125. (1992)
54. CAPARON, M.G., GEIST, R.T., PEREZ-CASAL, J., SCOTT, J.R.: Environmental Regulation of Virulence in Group A Streptococci: Transcription of the Gene Encoding M Protein is Stimulated by Carbon Dioxide, *J. Bacteriol.*, 174, 5693-5701. (1992)
55. CAPARON, M.G., STEPHENS, D.S., OLSEN, A., SCOTT, J.R.: Role of M Protein in Adherence of Group A Streptococci, *Infect. Immun.*, 59, 1811-1817. (1991)
56. ASHBOUGH, C.D., MOSER, T.J., SHEARER, M.H., WHITE, G.L., KENNEDY, R.C., WESSELS, M.R.: Bacterial Determinants of Persistent Throat Colonization and the Associated Immun Response in a Primate Model of Human Group A Streptococcal Pharyngeal Infection, *Cell Microbiol.*, 2, 283-292. (2000)
57. ELLEN, R.P., GIBBONS, R.J.: Parameters Affecting the Adherence and Tissue Tropisms of *Streptococcus pyogenes* , *Infect. Immun.*, 9, 85-91. (1974)
58. LA PENTA, D., RUBENS, C., CHI, E., CLEARY, P.P.: Group A Streptococci Efficiently Invade Human Respiratory Epithelial Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 91, 12115-12119. (1994)

59. CUE, D., DOMBEK, P.E., LAM, H., CLEARY, P.P.: *Streptococcus pyogenes* Serotype M1 Encodes Multiple Pathways for Entry into Human Epithelial Cells, *Infect. Immun.*, 66, 4593-4601. (1998)
60. DOMBEK, P.E., CUE, D., SEDGEWICK, J., et al.: High Frequency Intracellular Invasion of Epithelial Cells by Serotype M1 Group A *Streptococci*: M1 Protein Mediated Invasion and Cytoskeletal Rearrangements, *Mol. Microbiol.*, 31, 859-870. (1999)
61. OSTELUND, A., ENGSTRAND, L.: Intracellular Penetration and Survival of *Streptococcus pyogenes* in Respiratory Epithelial Cells in Vitro, *Acta. Otolaryngol.*, 115, 685-688. (1995)
62. OSTERLUND, A., ENGSTRAND, L.: An Intracellular Sanctuary for *Streptococcus pyogenes* in Human Tonsillar Epithelium-Studies of Asymptomatic Carrier and in vitro Cultured Biopsies, *Acta. Otolaryngol.*, 117, 883-888. (1997)
63. JADOUN, J., EYAL, O., SELA, S.: Role of CsrR, Hyaluronic acid, and SpeB in the Internalisation of *Streptococcus pyogenes* M Type 3 Strain by Epithelial Cells, *Infect. Immun.*, 70, 462-469. (2002)
64. SCHRAGER, H.M., ALBERTI, S., CYRWES, C., DOUGHERTY, G.J., WESSELS, M.R.: Hyaluronic acid Capsule Modulates M protein-Mediated Adherence and Acts as a Ligand for Attachment of Group A *Streptococcus* to CD 44 on Human Keratinocytes, *J. Clin. Invest.*, 101, 1708-1716. (1998)

65. MADDEN, J.C., RUIZ, N., CAPARON, M.: Cytolysin Mediated Translocation (CMD): A Functional Equivalent of Type III Secretion in Gram-Positive Bacteria, *Cell*, 104, 143-152. (2001)
66. DALE, J.B., CHIANG, E.Y., HASTY, D.L., COURTNEY, H.S.: Antibodies against a Synthetic Peptide of SagA Neutralize the Cytolytic Activity of Streptolysin S from Group A Streptococci, *Infect. Immun.*, 70, 2166-2170. (2002)
67. CARR, A., SLEDJESKI, D.D., PODBIELSKI, A., BOYLE, M.D., KREIKEMEYER, B.: Similarities Between Complement Mediated and Streptolysin S-Mediated Hemolysis, *J. Biol. Chem.*, 276, 41790-41796. (2001)
68. FERNIE-KING, B.A., SEILLY, D.J., DAVIES, A., LACHMANN, P.J.: Streptococcal Inhibitor of Complement Inhibits Two Additional Components of the Mucosal Innate Immune System: Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor and Lysozyme, *Infect. Immun.*, 70, 4908-4916. (2002)
69. FERNIE-KING, B.A., SEILLY, D.J., WILLERS, C., WURZNER, R., DAVIES, A., LACHMANN, P.J.: Streptococcal Inhibitor of Complement (SIC) Inhibits the Membrane Attack Complex by Preventing Uptake of C5b-9 onto Cell Membranes, *Immunology*, 103, 390-398. (2001)
70. MURRAY P.R., ROSENTHAL, K.S., KOBAYASHI, C.S., PFALLER, M.A.: *Medical Microbiology* 4th ed., 189, Mosby, USA,. (2002)

71. WIDDOWSON, J.P., MAXTED, W., GRANT, D.Y.: The Production of Opacity in Serum by Group A Streptococci and Its Relationship with the Presence of M Antigen, *J.Gen. Microbiol.*, 61, 343-353. (1970)
72. BAKER, M., GUTMAN, D.M., PAPAGEORGIOU, A.C., COLLINS, C.M., ACHARYA, K.R.: Structural Features of a Zinc Binding Site in the Superantigen Streptococcal Pyrogenic Exotoxin A (SpeA1): Implication for MHC Class II Recognition, *Protein Sci.*, 10, 1268-1273. (2001)
73. ESPINOSA, L.E., KIHLEBERG, B.M., COLLIN, M., OLSEN, A., BJÖRCK, L.B.: Protein H, an Antiphagocytic Surface Protein in *Streptococcus pyogenes*, *Infect. Immunity*, 67, 1708-1714. (1999)
74. UNNIKRISHNAN, M., ALTMANN, D.M., PROF, Y. et al.: The Bacterial Superantigen Streptococcal Mitogenic Exotoxin Z is the Major Immunoactive Agent of *Streptococcus pyogenes*, *J. Immunol.*, 169, 2561-2569. (2002)
75. SMOOT, L.M., McCORMICK, J.K., SMOOT, J.C., et al.: Characterization of Two Novel Pyrogenic Toxin Superantigens Made by an Acute Rheumatic Fever Clone of *Streptococcus pyogenes* Associated with Multiple Disease Outbreaks, *Infect. Immun.*, 70, 7095-7104. (2002)
76. PAPAGEORGIOU, A.C., ACHARYA, K.R.: Microbial Superantigens: from Structure to Function, *Trends Microbiol.*, 8, 369-375. (2000)
77. HAUSER, A.R., SEVENS, D.L., KAPLAN, E.L., SCHLIEVERT, P.M.: Molecular Analysis of Pyrogenic Exotoxins from *Streptococcus pyogenes*

- Isolates Associated with Toxic Shock-Like Syndrome, *J.Clin. Microbiol.*, 29, 1562-1567. (1991)
78. LUKOMSKI, S., BURNS, E.H.J., WYDE, P.R., et al.: Genetic Inactivation of an Extracellular Cysteine Protease (SpeB) Expressed by *Streptococcus pyogenes* Decreases Resistance to Phagocytosis and Dissemination to Organs, *Infect Immun.*, 66, 771-776. (1998)
79. KUO, C.F., WU, J.J., LIN, K.Y., et al.: Role of Streptococcal Pyrogenic Exotoxin B in the Mouse Model of Group A Streptococcal Infection. *Infect. Immun.*, 66, 3931-3935. (1998).
80. BASMA, H., NORRBY-TEGLUND, A., GUEDEZ, Y., et al.: Risk Factors in the Pathogenesis of Invasive Group A Streptococcal Infections: Role of Protective Humoral Immunity, *Infect. Immun.*, 67, 1871-1877. (1999)
81. NORRBY-TEGLUND, A., CHATELLIER, S., LOW, D.E., McGEER, A., GREEN, K., KOTB, M.: Host Variation in Cytokine Responses to Superantigens Determine the Severity of Invasive Group Streptococcal Infection, *Eur. J. Immunol.*, 30, 3247-3255. (2000)
82. KOTB, M., NORRBY-TEGLUND, A., McGEER, A., et al.: An Immunogenetic and Molecular Basis for Differences in Outcomes of Invasive Group A Streptococcal Infections, *Nat. Med.*, 8, 1398-1404. (2002)
83. SCHLIEVET, P.L.: Role of Superantigens in Disease, *J. Infect. Dis.*, 167, 997-1002. (1993)

84. WAGNER, P.L., WALIR, M.K.: Bacteriophage Control of Bacterial Virulence, *Infect. Immun.*, 70, 3985-3993. (2002)
85. PEREZ-CASAL, J., CAPARON, M.G., SCOTT, J.R.: Mry a Trans-Acting Positive Regulator of the M Protein Gene of *Streptococcus pyogenes* with Similarity to the Receptor Proteins of Two-Component Regulatory Systems, *J.Bacteriol.*, 173, 2617-2624. (1991)
86. LEVIN, J.C., WESSELS, M.R.: Identification of csrR/csrS, a Genetic Locus that Regulates Hyaluronic Acid Capsule Synthesis in Group A *Streptococcus*. *Mol. Microbiol.*, 30, 209-219. (1998)
87. OKADA, N., GEIST, R.T., CAPARON, M.G.: Positive transcriptional Control of mry Regulates Virulence in the Group A *Streptococcus*, *Mol. Microbiol.*, 7, 893-903. (1993)
88. McIVER, K.S., MYLES, R.L.: Two DNA-Binding Domains of Mga are Required for Virulence Gene. *Mol. Microbiol.*, 43, 1591-1601. (2002)
89. FOGG, G.C., GIBSON, C.M., CAPARON, M.G.: The Identification of rofA, a Positive-Acting Regulatory Component of prtF Expression: Use of an M-Gamma-Delta-Based ShuttleMutagenesis Strategy in *Streptococcus pyogenes*, *Mol. Microbiol.*, 11, 671-684. (1994)
90. PODBIELSKI, A., WOISCHNIK, M., LEONARD, B.A., SCHMIDT, K.H.: Characterization of mra a Global Negative Regulator Gene in Group A *Streptococci*, *Mol. Microbiol.*, 31, 1051-1064. (1999)

91. MILLER, A.A., ENGLEBERG, N.C., DIRITA, V.J.: Repression of Virulence Genes by Phosphorylation-Dependent Oligomerization of CsrR at Target Promoters in *S.pyogenes*, Mol. Microbiol., 40, 976-990. (2001)
92. FEDERLE, M.J., SCOTT, J.R.: Identification of Binding Sites for the Group A Streptococcal Global Regulator CovR, Mol. Microbiol., 43, 1161-1172. (2002)
93. GRAHAM, M.R., SMOOT, L.M., MIGLIACCIO, C.A., et al.: Virulence Control in Group A Streptococcus by a Two-Component Gene Regulatory System: Global Expression Profiling and in vivo Infection Modeling, Proc. Natl. Acad. Sci USA., 99, 13885-13860. (2002)
94. KREIKEMEYER, B, BOYLE, M.D., BUTTARO, B.A., HEINEMANN, M., PODBIELSKI, A.: Group A Streptococcal Growth Phase Associated Virulence Factor Regulation by a Novel Operon with Homologies to Two-Component-Type Regulators Requires a Small RNA Molecule, Mol. Microbiol., 39, 392-406. (2001)
95. LI, Z., SLEDJESKI, D.D., KREIKEMEYER, B., PODBIELSKI, A., BOYLE, M.D.: Identification of *pel*, a *Streptococcus pyogenes* Locus that Affects Both Surface and Secreted Proteins, J. Bacteriol., 181, 6019-6027. (1999)
96. HIDALGO-GRASS, C., RAVINS, M, DAN-GOOR, M., JAFFE, J., MOSES, A.E., HANSKI, E.: A locus of Group A Streptococcus Involved in Invasive Disease and DNA Transfer, Mol. Microbiol., 46, 87-99. (2002)

97. FISCHETTI, V.A., PARRY D.A.D., TRUS, B.L., HOLLINGSHEAD, S.K., SCOTT, J.R., MANJULA, B.N.: Conformational Characteristics of the Complete Sequence of Group A Streptococcal M6 Protein, *Proteins Struc. Func. Genet.*, 3, 60-69. (1988)
98. BARNETT, L.A., CUNNINGHAM, M.W.: A New Heart-Cross-Reactive Antigen in *Streptococcus pyogenes* is not M Protein, *J. Infect.Dis.*, 162, 875-882. (1990)
99. BEALL, B., FACKLAM, R.R., ELLIOTT, A., FRANKLIN, A.R., HOENES, T., JACKSON, D., LACLAIRE, L, THOMPSON, T., VISWANATHAN, R.: Streptococcal *emm* Types Associated with T-AgglutinationTypes and the Use of Conserved *emm* Gene Restriction Fragment Patterns for Subtyping Group A Streptococci.: *J. med. Microbiol.*, 47, 893-898. (1998)
100. KALIA, A., SPRATT, B.G., ENRIGHT, M.C., BESSEN, D.E.: Influence of Recombination on Niche Separation on the Population Genetic Structure of the Pathogen *Streptococcus pyogenes*, *Infect. Immun.*, Apr, 1971-1983. (2002)
101. STOLLEMAN, G.H.: Rheumatic Fever, *Lancet*, 349, 935-942. (1997)
102. HARTAS, J., SRIPRAKASH, K.S.: *Streptococcus pyogenes* Strains Containing *emm12* and *emm15* Possess a Novel Gene Coding for Distantly Related Sic Protein, *Microbial, Pathogen.*, 26, 25-33. (1999)
103. CLEARY, P.P., KAPLAN, E.L., HANDLEY, J.P., WLAZLO, A., KIM, M.H., HAUSER A.R., SCHLIEVERT, P.M.: Clonal Basis for

Resurgence of Serious *Streptococcus pyogenes* Disease in the 1980s, Lancet, 339, 518-521. (1992)

104. COCKERILL, F.R., THOMPSON R.L., MUSSER, J.M., et al.: Molecular, Serological, and Clinical Features of 16 Consecutive Cases of Invasive Streptococcal Disease, Clin. Infect., 26, 1448-1458. (1998)
105. FISCHETTI, V.A.: Streptococcal M Protein: Molecular Design and Biological Behaviour, Clin. Microbiol. Reviews, July, 285-314. (1989)
106. LANCEFIELD, R.C.: Persistence of Type-Specific Antibodies in Man Following Infection with Group A Streptococci, J. Exp. Med., 110(2), 271-292. (1959)
107. HOSEIN, B., McCARTY, M., FISCHETTI, V.A.: Amino Acid Sequence and Physicochemical Similarities Between Streptococcal M Protein And Mammalian Tropomyosin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3765-3768. (1979)
108. WOOLCOCK, J.B.: Purification and Antigenicity of an M-like protein of *Streptococcus equi*, Infect. Immun., 10, 116-122. (1974)
109. DAYNES, R.A. and ARMSTRONG, C.H.: An Antiphagocytic factor associated with Group E Streptococci, Infect. Immun., 7, 298-304. (1973)
110. MAXTED, W.R. and POTTER, E.V.: The Presence of Type 12 M-Protein Antigen in Group G Streptococci, J. Gen. Microbiol., 49, 119-125. (1967)

111. MOHR, D.N., FEIST, D.J., WASHINGTON, J.A., HERMANS, P.E.:
Infections due to Group C Streptococci in Man, *Am. J. Med.*, 66, 450-456. (1979)
112. BAKER, C.J.: Unusual Occurrence of Neonatal Septisemia due to Group G Streptococcus, *Pediatrics*, 53, 568-570. (1974)
113. FAHNESTOCK, S.R., ALEXANDER P., NAGLE, J., FILPUIA, D.:
Gene for an Immunoglobulin-Binding Protein from a Group G Streptococcus, *J. Bacteriol.*, 167, 870-880. (1986)
114. OLSSON, A., ELIASSON, M., GUSS, B., NILSSON, B., HELLMAN, U., LINDBERG, M., UHLEN, M.: Structure and evolution of the Repetitive Gene Encoding Streptococcal Protein G, *Eur. J. Biochem.*, 168, 319-324. (1987)
115. SIMPSON, W.J., ROBBINS, J.C., CLEARY, P.P.: Evidence for Group A Related M Protein Genes in Human but not Animal Associated Group G Streptococcal Pathogens, *Microbiol. Pathol.*, 3, 339-350. (1987)
116. GUSS, B., ELIASSON, M., OLSSON, A., UHLEN, M., FREJ, A.K., JORNVALL, H., et al.: Structure of the IgG-Binding Regions of Streptococcal Protein G, *EMBO. J.*, 5, 1567-1575. (1986)
117. CUNNINGHAM, M.W., ANTONE, S.M., GULIZIA, J.M., McMANUS, B.M., et al.: Cytotoxic and Viral Neutralizing Antibodies Crossreact with Streptococcal M Protein, Enteroviruses, and human Cardiac Myosin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 1320-1324. (1992)

118. ASHBAUGH, C.D., MOSER, T.J., SHEARER, M.H., WHITE, G.L., KENNEDY, R.C., WESSELS, M.R.: Bacterial Determinants of Persistent Throat Colonization and the Associated Immune Response in a Primate Model of Human Group A Streptococcal Pharyngeal Infection, *Cell, Microbiol.*, 2(4), 283-292. (2000)
119. JOHNSON, E., THER, A., DAHLBACK, B, HEDEN, L.O., et al.: A Highly Variable Region in Members of the Streptococcal M Protein Family Binds the Human Complement Regulator C4BP, *J. Immunol.*, 157(7), 3021-3029. (1996)
120. MORFELDT, E., BERGGARD, K., PERSSON, J., DRAKENBER, T., JOHNSON, E., LINDAHL, F., et al.: Isolated Hypervariable Regions Derived from Streptococcal in Proteins Specifically Bind Human C4b-Binding Protein: Implications for Antigenic Variation, *J. Immunol.*, 167(7), 3870-3877. (2001)
121. SCHARFSTEIN, J., FERREIRA, A., GIGLI, I., NUSSENZWEIG, V.: Human C4-Binding Protein I Isolation and Characterization, *J.Exp.Med.*, 148(1), 207-222. (1978)
122. CARLSSON, F., BERGGARD, K., STALHAMMAR-CARLEMALM, M. LINDAHL, G.: Evasion of Phagocytosis Through Cooperation Between Two Ligand-Binding Regions in *Streptococcus pyogenes* M Protein, *J. Exp. Med.*, 198(7), 1057-1068. (2003)
123. PLEASS, R.J., ARESCHOUG, T., LINDAHL, G., WOOF, J.M.: Streptococcal Ig A Binding Proteins Bind in the C2-C3 Interdomain

region and Inhibit Binding of Ig A to Human CD89, J. Biol. Chem., 276(11), 8197-8204. (2001)

124. JONES, K.F., FISCHETTI, V.A.: The Importance of the Location of Antibody Binding on the M6 Protein for Opsonization and Phagocytosis of Group A M6 Streptococci, J. Exp. Med., 167(3), 1114-1123. (1988).
125. PERSSON, C.G., ERJEFALT, J.S., GREIFF, L., et al.: Contribution of Plasma Derived Molecules to Mucosal Immune Defense, Disease and Repair in the Airways, Scand. J. Immunol., 47(4), 302-313. (1998)
126. MOSES, A.E., HIDALGO-GRASS, C., DAN-GOOR, M., JAFFE, J., SHETZIGOVSKY, I., RAVINS, M., KORENMAN, Z., COHEN-PORADOSU, R., NIR-PAZ, R.: *emm* Typing of M Nontypeable Invasive Group A Streptococcal Isolates in Israel, J. of Clin. Microbiol., 41(10), 4655-4659. (2003)
127. YAGUBSKY, P., GILADI, Y.: Group A Beta-Hemolytic Streptococcal Bacteremia in Children, Pediatr. Infect. Dis. J., 6, 1036-1039 (1987)
128. TYRELL, G. J., LOVGREN, B., FORWICK, N. P. H., MUSSER, J. M., TALBOT, J. A.: M Types of Group A Streptococcal Isolates Submitted to the National Centre for Streptococcus (Canada) from 1993 to 1999, J. Clin. Microbiol. 40, 4466-4471. (2002)
129. COLMAN, G., TANNA, A., EFSTRATIOU, A., GAWORZEWSKA, E. T.: The Serotypes of *Streptococcus pyogenes* Present in Britain During 1980-1990 and Their Association with Disease, J. Med. Microbiol., 39, 165-178. (1993)

130. PRUKSAKORN, S., SITTISOMBUT, N., PHORNPHUTKUL, C., PRUKSACHATKUNAKORN, M. F. G., BRANDT, E.: Epidemiological Analysis of Non-M-Typeable Group A Streptococcus Isolates from a Thai Population in Northern Thailand, *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1250-1254. (2000)
131. DALE, J.B., CHIANG, E.Y., LIU, S., COURTNEY, H.S., HASTY, D.L.: New Protective Antigen of Group A Streptococci, *J. Clin. Invest.*, 103(9), 1261-1268. (1999)
132. FACKLAM, R., BEALL, B., EFSTRATIOU, A., et al.: emm TYPING AND Validation of Provisional M Types for Group A Streptococci, *Synopses*, 5, 247-253. (1999)
133. BRANDT, C.M, HAASE, G., SPELLERBERG, B., HOLLAND, R., LUTTICKEN, R.: drs (Distantly Related sic) Gene Polymorphisms among emm12-Type Streptococcus pyogenes Isolates, *J.Clin. Microbiol.*, Apr, 1794-1797. (2003)
134. MARTIN, D.R., SRIPRAKASH, K.S.: Epidemiology of Group A Streptococcal Disease in Australia and New Zealand. *Recent. Adv. Microbiol, Aust. Soc. Microbiol.*, 4, 1-40. (1996)
135. ÇİFTÇİ, E., DOĞRU, Ü., GÜRİZ, H., AYSEV, A.D., İNCE, E.: Investigation of Penicillin Tolerance in Group A Beta Hemolytic Streptococci Isolates from Throat Cultures of Children with Tonsillopharyngitis, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 36, 147-152. (2002)

136. ÖZTOP, A.Y., ŞANLIDAĞ, T., ERANDAÇ, M.: Üst Solunum Yolu Enfeksiyonlu Çocuklardan İzole Edilen Beta-Hemolitik Streptokokların Gruplandırılması ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması, Türk Mikrobiyol. Cem. Dergisi, 30, 73-76. (1999)
137. YAZGI, H., ERTEK, M., AKTAŞ, A.E.: Erythromycin Resistance of Group A Beta-Hemolytic Streptococci Isolated from Patients with Upper Respiratory Tract Infections, Mikrobiyoloji Bülteni, 36, 11-14. (2002)
138. BERKİTEN, R., GÜROL, S.D.: Solunum Yolu Enfeksiyonlarından İzole Edilen Beta- Hemolitik Streptokoklar ve Eritromisin Direnci, Türk Mikrobiyol. Cem. Dergisi, 30, 20-22. (1999)
139. GÜRDOĞAN, K., ŞENOL, E., ARSLAN, H., KARAKUŞ, R., ÇAĞLAR, K.: Investigation of Penicillin Tolerance in Group A Beta-Hemolytic Streptococci by Beta-Lactamase Disk Method and in-vitro Resistance Patterns to Some Antibiotics, Mikrobiyoloji Bülteni, 33, 105-110. (1999)
140. BRANDT, C.M., SELLERBE, M., HONSCHA, N.D., et al.: Typing of Streptococcus pyogenes Strains Isolated from Throat Infections in the Region of Aachen, Germany, Infection, 3, 163-165. (2001)
141. DICUNZO, G., GHERARDI, G., LORINO, S., et al.: Group A Streptococcal Genotypes from Pediatric Throat Isolates in Rome, Italy, J. Clin.Microbiol., 39, 1687-1690. (2001)
142. MARTIN, D.R., VOSS, L.M., WALKER, J., LENNON, D.: Acute Rheumatic Fever in Auckland New Zealand: Spectrum of Associated

- Group A Streptococci Different from Expected, *Pediatr.Infect. Dis.*, 13, 264-269. (1994)
143. BRANDT, E.R., SRIPRAKASH, K.S., HOBBS, R.I., et al.: New Determinant Strategy for a group A Streptococcal Vaccine Designed for the Australian Aboriginal Population, *Nat. Med.*, 6, 455-459. (2000)
144. PEREA-MEJIA, L.M., INZUNZA-MONTIEL, A.E., CRAVIOTO, A.: Molecular Characterization of Group A Streptococcus Strains Isolated During a Scarlet Fever Outbreak, *J. Clin.Microbiol.*, Jan, 278-280. (2002)
145. TOPKAYA, A.E., YILDIRIM, T., ARSAN, S.: Isolation Ratio and T-Serotyping of Group A Streptococci from Pediatric Upper Respiratory Tract Infections in Turkey, *Anadolu Kardiyol. Derg.*, Dec; 5 (4), 302-304. (2005)

ÖZGEÇMİŞ

1968 yılında Ankara’da doğdum. 1978 yılında Ankara Atatürk Anadolu Lisesinde orta ve lise öğretimimi tamamladım. 1986’da Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesini kazanarak tıp eğitimime başladım. 1993 yılında iyi derece ile tıp fakültesinden mezun olduktan sonra T.C Sağlık Bakanlığı tarafından mecburi hizmetimi yapmak üzere Ankara Dr. Muhittin Ülker Acil Yardım ve Travmatoloji Hastanesi Acil Servisine pratisyen hekim olarak atandım. 3 yıl 6 ay acil serviste ve 2 yıl da aynı hastanenin Anestezi ve Yoğun Bakım ünitesinde olmak üzere pratisyen doktor olarak görev yaptım. Bu süre içinde Ankara Tabip Odasının açmış olduğu ve Hacettepe Üniversitesi öğretim üyeleri tarafından eğitimi verilen “ilk yardım eğiticileri eğitmenliği kursu”nu tamamlayarak “ilk yardım eğiticileri eğitmenliği” sertifikası aldım . Ankara içinde çeşitli kurum ve kuruluşlarda çalışan kişilere yönelik 1. basamak acil ilk yardım ve yaşam desteği kurslarına eğitmen olarak katıldım. Vakıfbank bünyesinde kurulan “VAKUR” ilk yardım, arama ve kurtarma ekibini kurulmasında çeşitli branşlardan meslektaşlarımla beraber aktif bir şekilde yer aldım ve bu kurum bünyesinde 200’aşkın kişinin yetiştirilmesinde çalıştım. 1998- 1999 güz yarı döneminde Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D’nın yapmış olduğu sınavı kazanarak doktora öğrencisi olmaya hak kazandım. 2000 yılı güz yarı döneminde doktora öğrencisi olarak eğitimime devam ederken Gazi Üniversitesinin Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde açılmış olan araştırma görevlisi kadrosuna uygun görülerek bu kurum elemanı olarak doktora programına devam ettim. 2005 senesinde “*Boğaz Enfeksiyonu Etkeni Olan A Grubu Beta Hemolitik Streptokokların M Proteinlerinin emm Gen Sekans Analizi ile Tiplendirilmesi*” konusunda seçilen tez çalışmamı tamamladım. İyi derecede İngilizce, orta derecede Almanca ve İspanyolca bilmekteyim. Evliyim.