

A GRUBU STREPTOKOK İNFEKSİYONLARINDA BAKTERİYOLOJİK TANI

Betigül ÖNGEN

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İSTANBUL

ÖZET

A grubu streptokoklar (GAS) ya da S.pyogenes, geniş infeksiyon yelpazesine sahip, çok virulan bakterilerdir. Genel olarak etkeni olduğu infeksiyonların tedavisinde antibiyoterapi endikasyonu kesindir. Bu nedenle bakteriyolojik tanısının doğru ve hızlı bir şekilde yapılması önem taşır.

GAS'ın bakteriyolojik tanısında başlıca kültür (altın standart), direkt antijen saptayan yöntemler ve son yıllarda nükleik asit testleri kullanılmakta, ayrıca konağın antikor yanıtı son geçirilen bir GAS infeksiyonunu saptamada yardımcı olmaktadır. Bu yazıda, tanıda kullanılan yöntemler, yöntemlerin avantajları, dezavantajları ve bu konuda dikkat edilmesi gereken noktalar gözden geçirilmiş, ayrıca GAS infeksiyonlarının geleneksel bakteriyolojik tanısındaki son değişiklikler ve bu konudaki öneriler irdelenmiştir.

Anahtar sözcükler: bakteriyolojik tanı, GAS tanısı, S.pyogenes

SUMMARY

Bacteriological Diagnosis of Group A Streptococcal Infections

Highly virulent bacteria, group A streptococci (GAS), in another term, S.pyogenes is responsible for a wide variety of infections. Generally, antibiotic therapy is definitely indicated for the infections caused by this bacteria. Therefore, it is particularly important to establish accurate and prompt diagnosis in GAS infections.

Mainly, bacteriologic culture (gold standart), rapid antigen detection tests and recently nucleic acid technics are used in bacteriological diagnosis of S.pyogenes infections and serological tests provide evidence of a recent previous infection. In this article methods used in bacteriological identification of GAS, advantages and disadvantages of these methods and some attention points are reviewed, furthermore progress in the traditional laboratory methods and new recommendations on diagnosis are scrutinized.

Key words: bacteriological identification, GAS, S.pyogenes

S.pyogenes (GAS) tür adını, neden olduğu piyogenik infeksiyonlardan alan kok şeklinde bir bakteridir. Çok geniş bir infeksiyon yelpazesi olması [farinjit ve sonrasında gelişebilen akut romatizmal ateş ve akut glomerulonefrit gibi ciddi komplikasyonlar, alt solunum yolu infeksiyonları (pnömoni), deri infeksiyonları (impetigo, erisipel, sellülit), cerrahi yara infeksiyonları, allograft infeksiyonları, nekrotizan fasiit, streptokoksik şok sendromu gibi hayatı tehdit eden infeksiyonlar] nedeniyle üzerinde yoğun çalışılan bir bakteri olmuştur^(1,6,21).

Antibiyotik tedavisinin kesin olarak endike olduğu en yaygın görülen farinjit, akut GAS farinjitidir⁽⁴⁾. Bu nedenle hekimin akut farinjitli bir hastanın tedavisini düzenlemesinde etkenin GAS olup olmadığı bilmesi önemlidir. GAS'ların hayatı tehdit eden ciddi infeksiyonlarında uygun tedaviye en kısa sürede başlanabilmesi için infeksiyonun doğru ve hızlı tanısı ayrıca önem kazanır⁽⁴⁾. Literatür izlendiğinde her geçen gün yeni ve daha hızlı sonuç alınabilecek bakteriyolojik tanı yöntemleriyle ilgili çalışmaların arttığı görülmektedir.

Klinik önemi nedeniyle, A grubu streptokok dendiğinde genellikle *S.pyogenes* anlaşılmaktadır. Bu yazıda da benzer şekilde kullanılacaktır. Ancak *S.pyogenes*'in bakteriyolojik tanısı yapılırken A grubu içindeki tek tür olmadığı göz önünde bulundurulmalıdır⁽⁸⁾.

GAS'ın bakteriyolojik tanısı başlıca kültür (altın standart), direkt antijen saptayan yöntemler ve nükleik asit testleri ile yapılmakta, ayrıca konağın antikor yanıtı yeni geçirilen bir GAS infeksiyonunu saptamada yardımcı olmaktadır⁽⁵⁾.

Bakterinin özellikleri

S.pyogenes, Gram pozitif, zincir yapmış kok şeklinde bir bakteridir. Beta-hemoliz oluşturur. Lancefield sınıflandırmasına göre A grubunda yer alır⁽⁸⁾. Fakültatif anaerob bakterilerdir ve genellikle dahil oldukları cinsin diğer türlerine göre büyük koloni (>0.5 mm) oluştururlar. Katalaz negatif, basitrasine duyarlı, PYR pozitif olmaları identifikasyonda en önemli ayrıntı özellikleridir^(13,17).

Streptokokların tür ayrımı oldukça komplikedir. Bu mikroorganizmaların sınıflandırılmasında tek bir sistem yeterli olmamakta, 3 ayrı sınıflandırma şeması kullanılmaktadır^(2,17).

Tablo 1: Sık rastlanan streptokokların sınıflandırılması⁽¹⁷⁾.

Biyokimyasal sınıflandırma	Serolojik sınıflandırma	Hemoliz paternine göre sınıflandırma
S.pyogenes	A	Beta
S.anginosus grup	A, C, F, G, gruplandırılmayan	Beta; bazen alfa, non-hemolitik
S.agalactiae	B	Beta; bazen non-hemolitik
S.dysgalactiae	C, G	Beta
S.bovis	D	Alfa; non-hemolitik, bazen beta
Viridans streptokok	gruplandırılmayan	Alfa veya non-hemolitik
S.pneumoniae	gruplandırılmayan	Alfa

Örnek alınması

Farinjit olgularında, çocuklardan eküvyonla boğaz salgısı alınması her zaman çok kolay olmasa da örnek alırken eküvyon kuvvetlice her iki tonsil ve posterior orofarinks bölgesine sürülmeli, bu arada dil bastırılmalıdır. Ağzın anterior bölgelerinde daha az sayıda bakteri bulunur. Ayrıca ağız içi, özellikle tükürük *S.pyogenes*'in üremesini inhibe eden bakterilerle kolonizedir. Bu nedenle dil ve ağız mukozasına temastan kaçınılmalıdır. Dolayısıyla örnek uygun alınmış olsa bile bu şekilde kontamine edilmesi *S.pyogenes* izolasyonunu engelleyebilir^(4,17).

S.pyogenes'in deri infeksiyonlarında, lezyonun hava ile temas eden dış yüzeylerinden yapılan kültürlerde GAS'dan (fakültatif anaerop) daha çok stafilokoklar (aerop) ürer. Diğer bir deyişle, açık, drene olmuş deri fistüllerinden alınan örnekler stafilokoklarla süperinfekte olabileceklerinden uygun değildir. Lezyon kabuklu ise kabuğun kaldırılıp, alttan gelen pürülan materyalin alınması gerekir. Ya da lezyonun taban bölgesinden, derinden gelen sıvının alınması uygundur. Bu şekilde doğru alınmış örneklerin kültürü yapıldığında A grubu streptokokları saf kültür halinde izole etmek mümkündür^(10,17,21).

Ayrıca invaziv infeksiyonların tanısı için kan, BOS, plevra veya periton sıvısı, doku biyopsi örneği, balgam gibi pek çok örnek bilinen antisepsi kurallarına uyularak alınıp incelenir⁽⁴⁾.

Transport

Örnek 2 saat içinde ekilecekse transport besiyerine gerek yoktur. Fakat yine de ideal olanı en kısa sürede ekilmesidir. Daha uzun süre beklemesi gerekiyorsa Amies gibi uygun bir transport besiyeri kullanılabilir^(18,19).

Mikroskopisi

Gram boyama: Streptokoksik farinjitin tanısında Gram boyama önerilmez çünkü preparasyonda normal boğaz florasında bulunan diğer streptokoklar da görülecektir. Normalde steril bölgelerden alınan örneklerden yapılan Gram preparasyonun değeri büyüktür. Yumuşak doku infeksiyonlarında veya pyodermada ya da diğer steril vücut sıvılarında lökositler içinde

Gram pozitif zincir yapmış kokların görülmesi anlamlıdır^(17,19).

İmmunfloresan boyama: Grup A streptokok antijenlerine karşı hazırlanmış konjuge antikorlar ticari olarak sağlanabilmektedir (Becton Dickinson). Bu antikorların kullanıldığı immunfloresan boyama tanıda yararlı olmaktadır^(4,19).

Kültür

GAS infeksiyonlarının tanısında kültür altın standarttır. Eğer örnek uygun alınmışsa tipik klinik belirtileri olan hastaların % 90-95'inde kültürde AGBHS çok sayıda ürer⁽³⁾.

GAS farinjitinde, karşıt görüşler olsa da kültürde üreyen bakteri sayısının infeksiyonun durumunu belirlemede (akut infeksiyon-taşıyıcı) kriter olmadığı bildirilmektedir⁽¹²⁾. Ancak şu da bir gerçektir ki negatif boğaz kültürlerinin yaklaşık % 10'unda, kültür tekrarlandığında az da olsa üreme saptanmaktadır. Bu yalancı negatifliğin anlamı tam olarak açıklanamıyorsa da bu durumun infeksiyondan çok taşıyıcılıktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir⁽⁴⁾. Bu şekilde, bir yalancı negatiflik kuşkusu olduğunda antibiyotik tedavisine başlanmadan önce kültür tekrarlanmalıdır⁽⁴⁾. Kültür sonucu negatif bulunduğunda antibiyotik tedavisine gerek olmadığına karar verilebilir; ancak kültürde üreme olması akut infeksiyon ya da asemptomatik taşıyıcı olup olmadığını göstermez.

GAS'ın neden olduğu hayatı tehdit eden invaziv infeksiyonlarda erken tanı ve erken antibiyotik tedavisinin önemi düşünüldüğünde, kültürün 24-48 saat süre gerektirmesi, ayrıca antibiyotik alan hastalarda negatif sonuç alınması dezavantajları arasında sayılabilir^(3,4).

Kültür için kullanılan besiyerleri

Streptokoklar zengin besiyerlerinde üreyen bakterilerdir. Besiyerlerine koyun kanı, serum gibi zenginleştirici maddelerin ilavesi gerekir. Koyun kanı diğerlerine tercih edilir. Hemoliz en iyi bu besiyerinde ayırt edilebilmektedir. İnsan kanı pek tercih edilmez çünkü insan kanında bulunabilecek tipe özgül antikorlar, streptolizin O antikorları, ya da antibiyotikler bakterinin üremesini inhibe edebilir ya da beta-hemolizi engelleyebilir⁽⁴⁾. Koyun kanının bir diğer avantajı, koyun eritrositlerinde bulunan NADaz enziminin boğazda kommensal olarak bulunan ve beta-hemolitik koloniler oluşturarak karışıklığa neden olabilecek *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parahaemolyticus*'un üremesini engellemesidir, diğer bir deyişle selektif özellik sağlar^(4,13,17,19).

Koyun kanı bazal besiyerine % 5 oranında ilave edilir. Daha düşük oranda kan ilavesi hemolizin görülmesini güçleştirir, daha yüksek oran ise hemolizin görülmesini tamamen engelleyebilir^(13,21).

A grubu streptokok izolasyonunda kullanılacak bazal besiyeri karbonhidrat ilave edilmemiş bir pepton infüzyon besiyeri (örneğin, triptik soy, proteoz pepton, Todd-Hewitt) olmalıdır. Karbonhidratlı, örneğin glukoz ilave edilmiş besiyerlerinde 24 saat sonunda daha büyük koloniler oluşmasına rağmen, glukoz kullanımı sonucu oluşan asit grup A streptokokların streptolizin S'ini inaktive eder ve bakterinin hemolizinin yorumlanmasını engelleyebilir⁽¹³⁾.

Oral bakteri florasını baskılamak için kanlı besiyerlerine trimetoprim (1.25 µg/ml)-sulfametoksazol (23.75 µg/ml) gibi antibiyotikler ilave edilebilir⁽¹⁷⁾. Bu tip selektif besiyerlerinin bazıları ticari olarak da sağlanabilmektedir (*Streptococcus* Selective agar; BD Microbiology Systems, Strep A Isolation Agar; Remel Laboratories)⁽¹³⁾. Orofarinksin normal florası (viridans streptokoklar, mikrokoklar, stafilocoklar, *Neisseria*'lar) bu besiyerlerinde inhibe olur. Böylece, bu bakterilerin üreyememesi sonucu, A ve B grubu streptokokların izolasyonunun daha kolaylaştığı bildirilmektedir⁽¹³⁾. Ancak bazı yazarlar bu tip selektif besiyerlerinin kullanışlı olduğunu kabul etmelerine rağmen, *S.pyogenes*'in bu besiyerlerinde geç ürediğini ve bu nedenle inkübasyon süresinin 2-3 güne kadar uzatılması gerekebileceğini bildirmektedirler⁽¹⁷⁾.

Ekim (inokülasyon)

Örnek (eküvyonla alınan boğaz sürüntüsü, doku örnekleri, kan, diğer steril vücut sıvıları, vb) alınır alınmaz, mümkünse hiç vakit geçirmeden hemen kanlı agara ekilmelidir.

Boğaz salgısı örnekleri besiyerinin birinci bölgesine (ya da Petri kutusunun 1/6'sı kadarına) eküvyon iyice çevrilerek sürülür ve bir öze ile besiyerinin geri kalanına yayılır. Hangi örnek türü olursa olsun ekim yapıldıktan sonra, öze, steril edilmeden önce besiyerine, ekimin en yoğun olduğu birinci bölgeye ve diğer bölgelere birkaç kere batırılmalıdır. Bu şekilde streptolizin O'nun aktivitesi için gerekli olan nispi anaerob koşullar sağlanmış olur ve hemoliz daha iyi görülür^(11,19,21).

İnkübasyon

Ekim yapılan besiyerleri 35-37°C'de inkübe edilirler⁽¹⁹⁾. İlk 24 saatte GAS ürememişse ilave bir 24 saat daha oda ısısında inkübe edilmesi izolasyon oranını % 5-46 artırır⁽¹¹⁾. Bu nedenle sonucun 48 saat sonunda bildirilmesi uygun olur.

Hemen hemen tüm *S.pyogenes* suşları oksijene dayanıklı streptolizin S oluşturduklarından, kültürler aerob ortamda inkübe edilir. Ancak streptokokların hemolizi anaerob koşullarda daha belirgindir. Bu durum, oksijene duyarlı streptolizin O'nun katkısı nedeniyle. Bu nedenle bazı laboratuvarlar rutin olarak kültürleri anaerob koşullarda inkübe ederler. Ancak bu koşullarda, özellikle boğaz salgısı örneklerinde anaerob bakteri sayısı daha fazla olduğundan, endojen flora daha yoğun ürer ve beta-hemolitik streptokokların izolasyon oranı azalır. Kültürlerin CO₂'den zengin ortamda inkübe edilmesi durumunda *S.pyogenes*'e inhibitör etkili bakterilerin ve A grubu dışı beta-hemolitik streptokokların üremesini artacağı bildirilmektedir^(11,17,19).

A grubu beta-hemolitik streptokokların identifikasyonu

Kanlı agar besiyerlerinden GAS'a benzeyen şüpheli beta-hemolitik koloniler incelemeye alınır. Kolonilerin mukoid olup olmadığı kaydedilmelidir⁽²¹⁾.

Koyun kanlı agar besiyerinde farinjit etkeni olduğu bilinen *Arcanobacterium haemolyticum* da ürer. Bu bakteri de *S.pyogenes* gibi beta-hemoliz yapar, katalaz negatiftir ve hatta basitrasine duyarlı bulunur. Ancak Gram preparasyon yapıldığında Gram pozitif çomak oldukları görülerek ayrılır.

edilir⁽¹³⁾. Bu nedenle tüm beta-hemolitik streptokoka benzeyen kolonilerden mutlaka Gram preparasyon yapılmalı ve bakterinin Gram pozitif kok olduğu görülmelidir.

Koloni özellikleri

GAS'lar griden beyaza değişen, genellikle parlak görümlü koloniler oluştururlar. A, C ve G grubu beta-hemolitik piyogenik streptokokların kolonileri diğerlerine göre [küçük koloni oluşturan, beta-hemolitik *S. anginosus* (veya *S. milleri*) grubuna göre] daha büyüktür. 24 saatlik inkübasyon sonunda kolonilerin büyüklüğü >0.5 mm çapına ulaşır ve bazen kolonileri mukoit tarzdadır. *S.pyogenes* kültürlerinde, küçük koloni oluşturan beta-hemolitik streptokok ve *S.anginosus* grubunda bulunan diğer suşların karamela benzetilen kokusu alınmaz. Bu koku bu bakterilerin diasetil oluşturmalarıyla ilişkilidir⁽¹⁹⁾.

Hemoliz

S.pyogenes'in kanlı agarda yaptığı karakteristik beta-hemolizden bakterinin oksijene dayanıklı streptolizin S'i sorumludur. Oksijene duyarlı streptolizin O ise yalnızca anaerob koşullarda üretilen suşlar tarafından oluşturulur. Hemolizinler bakterinin ürettiği bölgede kırmızı kan hücrelerini tamamen eritir ve bakteri kolonisinin etrafında beta-hemoliz veya tam hemoliz denilen şeffaf bir alan oluşmasını sağlar^(17,19).

Katalaz aktivitesi

Streptokoklar katalaz negatiftirler. Bu özellikleri stafilocoklardan kolayca ayrılmasını sağlar. Temiz bir lam üzerine bir öze dolusu taze bakteri kültüründen (eski kültürlerde enzim aktivitesi kaybolabilir) alınıp, üzerine bir damla % 3 H₂O₂ damlatıldığında reaksiyon alınmaz (gaz kabarcıkları oluşmaz). Kırmızı kan hücrelerinde de katalaz aktivitesi olduğundan kanlı besiyerlerinde üreyen kolonilerle çalışıldığında yalancı pozitif sonuç alınabilir. Bu nedenle tipik streptokok morfolojisindeki koloniler katalaz pozitif reaksiyon vermişse, kansız bir besiyerine pasaj yapıp deney tekrarlanmalıdır⁽¹⁹⁾.

Serolojik gruplandırma

A grubu streptokokun kesin identifikasyonu serolojik olarak gruplandırılmasıyla yapılır⁽¹⁷⁾.

Lancefield beta-hemolitik streptokokları hücre duvarı karbonhidratlarındaki (C maddesi) farka göre serolojik olarak gruplandırmıştır. Daha sonra alfa-hemolitik ve non-hemolitik streptokoklar da bu sınıflandırmaya dahil edilmiştir. Lancefield'in gruba özel karbonhidratlarının gösterilmesi için hazır ticari kitler mevcuttur. Bu şekilde, streptokok hücre duvarından ekstrakte edilen gruba özel antijenler spesifik antiserumlar kullanılarak presipitin reaksiyonu, koagülünasyon ya da lateks agglütinasyonu yöntemleri ile belirlenir^(2,13).

Tüm bu sınıflandırma çalışmaları sonucunda bir kısım streptokokların bu şekilde gruplandırılmadığı, gruplandırılanlar için ise Lancefield gruplarının tek bir streptokok türüne özel olmadığı görülmüştür. Örneğin grup A antijeni *S.pyogenes* dışında *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S.anginosus* grubu bakterilerde de bulunur, ancak bu türlere

nadir rastlanmaktadır⁽⁸⁾. Benzer antijenlere sahip bakteriler (ayrıca gruplandırılmayanlar) biyokimyasal testlerle ayırt edilebilmektedir^(8,13,19) (Tablo 2).

Biyokimyasal ve enzimatik deneyler

GAS identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal ve enzimatik deneylerin çoğu, serolojik olarak gruplandırmanın aksine olası identifikasyona (presumptive identification) götürür⁽¹³⁾. GAS ve diğer streptokokların identifikasyonu için klasik yöntemlere göre daha pahalı olan, ancak uygulamada kolaylık sağlayan ticari, hazır identifikasyon kitleri (API 20 Strep, Rapid ID 32 Strep, vb) de mevcuttur⁽¹⁶⁾. İdentifikasyon için yapılan deneylere geçmeden önce izole edilen suşun streptokok morfolojisinde, katalaz negatif ve beta-hemolitik olduğundan emin olunmalıdır.

PYR testi

PYR testi bakteride L-pyrrolidonyl arylamidase (PYRaz) varlığını araştırır ve beta-hemolitik streptokoklardan sadece *S.pyogenes*'de (insanda, klinik örneklerden nadiren izole edilen hayvan kökenli, A grubu dışı iki beta-hemolitik tür dışında) pozitifdir⁽⁸⁾ (Tablo 2). Bu nedenle *S.pyogenes*'in A grubu antijenine sahip *S.anginosus*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ve diğer tüm beta-hemolitik streptokoklardan ayırımı PYRaz enziminin gösterilmesi ile hızlı bir şekilde yapılabilir.

Bu enzim L-pyrrolidonyl-β-naphthylamide'i hidrolize eder. Bu hidroliz sonucunda açığa çıkan β-naphthylamine, spesifik renk indikatörü varlığında, kırmızı bir renk oluşumu ile saptanır. Testin avantajı dakikalar içinde yapılıp sonuç alınabilmesidir ve testte kullanılan diskleri ticari olarak sağlamak mümkündür. Pozitif reaksiyon *S.pyogenes* olduğunu gösterir^(16,17,19). Fakat enterokokların da bu enzimi oluşturdukları ve bazı enterokok suşlarının beta-hemoliz yaptıkları unutulmamalıdır^(16,19).

Basitrasine duyarlılık

S.pyogenes geleneksel olarak basitrasine duyarlılığı ile tanınır. Ancak A grubu dışında C ve G grubu streptokokların (Tablo 2'de gösterilmeyen) % 10'undan fazlası ve B grubu suşların yaklaşık % 5'i basitrasine duyarlı bulunduğundan,

günümüzde A grubu streptokokların identifikasyonunda basitrasine duyarlılık testi önceliğini yitirmiş görünmektedir. Testin performansını arttırmak için, basitrasine duyarlılığı trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) duyarlılığı ile birlikte değerlendirilebilir. Çünkü C ve G grubu suşlar genellikle SXT'e duyarlı, A ve B grubu suşlar ise dirençlidir⁽¹³⁾.

Basitrasine testi ayrıca *S.pyogenes*'i yukarıda bahsedilen, insanda nadir izole edilen A grubu dışı PYR pozitif beta-hemolitik türlerden ayırmada kullanışlı bir deneydir^(8,9,17,19) (Tablo 2).

Bu yöntemde 3-4 koloniden alınarak yoğun streptokok inoküle edilmiş kanlı agar besiyerinin ortasına 0.004 U basitrasine diski yerleştirilir. 35°C' de bir gecelik inkübasyondan sonra, basitrasine diski etrafında saptanan herhangi bir zon suşun basitrasine duyarlı olduğunu gösterir^(17,19). Yorumlama SXT için de aynı şekilde yapılır.

VP (Voges-Proskauer) testi

A grubu antijenlerine sahip *S.anginosus* grubu ile *S.pyogenes*'in ayırımında kullanışlı bir testtir. *S.pyogenes* VP negatif, *S.anginosus* grubu VP pozitif bulunur^(16,19).

Direkt antijen saptayan testler (hızlı tanı testleri)

Boğaz salgılarından A grubu streptokokların direkt tanısında kullanılan antijen saptayan testler yaklaşık yirmi yılı aşkın süredir bilinmesine rağmen, son yıllarda klinisyenler tarafından oldukça rağbet edilen ve yaygın kullanılan testler olmuştur. Bu testler kısa sürede uygulanır ve sonuç alınır, hatta hekimin muayenehanesinde bile uygulanabilir. Ticari olarak mevcut çeşitli hızlı tanı kitleri bulunmaktadır^(15,18,21).

Boğaz salgısından direkt olarak bakteri hücre duvarında bulunan grup spesifik karbondhidratı saptayan bu testlerde kullanılan yöntemler değişmekle birlikte [lateks aglütinasyonu (LA), enzim immunoassay (EIA), koaglütinasyon, liposomal ve optik immunoassay yöntemleri] en sık EIA ve LA yöntemleri kullanılmaktadır^(5, 13,17).

Genellikle, eküvyon üzerindeki materyal kimyasal (örneğin nitroz asidi) veya enzimatik (örneğin pronaz) ekstraksiyon solüsyonuna alınır. Kısa bir inkübasyon süresinden sonra süspansiyon içindeki antijen, bir filtre membran üzerine (Enzim

Tablo 2: Beta-hemolitik streptokokların identifikasyonu⁽⁸⁾.

Tür	Lancefield grup	PYR	Basitrasine	VP	CAMP	Orijin
<i>S.pyogenes</i>	A	+	+	-	-	İnsan
<i>S.agalactiae</i>	B	-	-	-	+	İnsan, sığır
<i>S.dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	A,C,G,L	-	-	-	-	İnsan, hayvan
<i>S.equi</i>	C	-	-	-	-	Hayvan, insan
<i>S.canis</i>	G	-	-	-	+	Köpek, insan
<i>S.anginosus</i> grup	A,C,G,F	-	-	+	-	İnsan
<i>S.constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i>	C	-	-	+	-	
<i>S.porcinus</i>	E,PU,V,-	+	-	+	+	Domuz, insan (nadir)
Yeni türler						
<i>S.iniae</i>	-	+	-	-	+	Yunus, balık, insan (nadir)
<i>S.phocae</i>	C,F	-	+	-	-	Fok
<i>S.didelphis</i>	-	-	-	-	-	Keseli sıcağiller

immuno assay–EIA) veya lateks partiküllerine (lateks aglütinasyonu) tespit edilmiş spesifik antikorlarla muamele edilir. EIA'da pozitif indikatör oluşması veya lateks partiküllerinin aglütinasyonu pozitif sonuç olarak değerlendirilir^(17,19).

Direkt antijen saptayan hızlı tanı testlerin özgüllüğü (spesifitesi) çok yüksektir. Kullanılan birçok kitte özgüllük % 95'in üzerinde bulunmuştur. Ancak bu testlerle ilgili duyarlılık problemleri mevcuttur. Duyarlılık çeşitli kitlere göre değişmek üzere % 50-90 arasında bildirilmektedir. Dolayısıyla hızlı antijen saptayan testler kullanıldığında yalancı negatif sonuç elde etme oranının yüksek olduğu söylenebilir^(16,21). Bu nedenle hızlı tanı kitleriyle elde edilen negatif sonuçların kültürle konfirme edilmesi gerekir^(3,5,17,20,21). Duyarlılığın düşük olması, muhtemelen sadece kullanılan yöntemle değil aynı zamanda örnekteki mevcut streptokok sayısına da bağlıdır⁽¹⁹⁾. Böylece çalışılan materyalin miktarı artırıldığında örneğin, iki ayrı eküvyonla boğaz sürüntüsü alınıp, bir arada (tek örnek olarak) çalışıldığında direkt tanı testinin duyarlılığının anlamlı şekilde arttığı bildirilmektedir⁽¹⁴⁾.

Son birkaç yıldır erişkin streptokok farinjitinin laboratuvar tanısında durum tartışmalı hale gelmiştir. Pediatrik Amerikan Akademisi-Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Cemiyeti (ACP-ASIM), Amerikan Kalp Birliği raporlarına göre tanıda önerilen boğaz kültürüdür⁽²¹⁾. Ancak Amerikan Aile Hekimliği Akademisi, Amerikan İç Hastalıkları Cemiyeti, Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) ise erişkinlerde akut streptokok farinjitini yönünden rutin değerlendirmede boğaz kültürü yapılmasına veya hızlı tanı testlerinin duyarlılığı % 80'in üzerinde ise bu testlerden negatif sonuç alındığında da kültür konfirmasyonuna gerek olmadığını bildirilmektedirler^(5,7,21). Çünkü A grubu streptokoklar erişkinde farinjitlerin ancak % 10 kadarından sorumludurlar. Çocuklarda olduğu gibi enfeksiyonun ciddi komplikasyonları erişkinde pek görülmez veya çok nadirdir, enfeksiyon genellikle kendiliğinden iyileşme eğilimindedir ve A grubu beta-hemolitik streptokok enfeksiyonlu erişkinler için antibiyotik tedavisine gerek yoktur. Rutin uygulamada tanı klinik kriterler ve hızlı antijen testleri yardımıyla konup, semptomatik tedavi uygulanması önerilmektedir. Böylece erişkinde boğaz kültürü, salgıların araştırılmasında, bu bakterilerde gelişen ve yayılan antibiyotik direncinin takibinde ya da gonokok gibi beta-hemolitik streptokok dışında başka bir potansiyel farinjit etkeni bakteri düşünüldüğünde önerilmektedir^(7,20).

Direkt tanı testlerinin streptokokların piyodermal enfeksiyonlarında da kullanılabileceği bildirilmektedir⁽¹⁰⁾.

Nükleik asit testleri

Boğaz salgısı örneklerinde GAS'u saptayan iki farklı nükleik asit testi geliştirilmiştir ve bunlar ticari olarak sağlanabilmektedir. Bunlardan biri ve üzerinde en çok çalışılan DNA prob yöntemidir (Group A Strep Direct Test ;Gen-Probe, San Diego, Calif). Bu yöntemde A grubu streptokokun rRNA sekansına komplementer bir DNA probu kullanılarak boğaz salgısından hazırlanan ekstrakta direkt tanıya gidilir. Çeşitli çalışmalarda kültürle karşılaştırıldığında özgüllük % 97.8-100, duyarlılık ise % 88.6-94.8 bulunmuştur⁽⁵⁾. Diğer yöntem

(LightCycler Strep-A assay; Roche Applied Science, Indianapolis, Ind.) ise bakterinin nükleik asitinin amplifiye edilerek saptandığı bir PCR yöntemidir⁽²²⁾. Son yapılan bir çalışmada bu testin duyarlılığı % 93, özgüllüğü ise % 98 bulunmuştur. Günümüzde bazı laboratuvarlar negatif sonuç alınan hızlı antijen testlerinin konfirmasyonunda nükleik asit testlerini tercih etmektedirler⁽⁵⁾.

Daha da önemlisi son yıllarda nükleik asit testlerinin invaziv GAS enfeksiyonlarının tanısında kullanılmaya başlanmış olmasıdır. Bilindiği gibi invaziv A grubu streptokok enfeksiyonlarının etiyolojik tanısını koymak her zaman mümkün olamamaktadır. Bu tip hastalarda her zaman bakteriyemi gelişmemekte ya da kültürden önce ampirik antibiyotik uygulaması nedeniyle doku kültürlerinden sıklıkla negatif sonuç alınabilmektedir⁽¹⁵⁾. Antikor testleri ise hastalığın akut döneminde tanıda yardımcı olamamaktadır. Son yapılan bir çalışmada doku biyopsisi örneklerinde PCR yöntemiyle pirojenik ekzotoksin B geni (*speB*)'nin saptanması ile nekrotizan fasiit tanısının konabileceği bildirilmiştir. Araştırmacılar bu yöntemin kültürle negatif sonuç alınan invaziv A grubu streptokok enfeksiyonlarının tanısında kullanılabileceğini ileri sürülmektedirler⁽¹⁵⁾.

Serolojik tanı

Akut GAS enfeksiyonunun erken tanısında rolü olmasa da streptokok antikorlarının titresindeki anlamlı ölçüdeki artış, yeni geçirilmiş bir GAS enfeksiyonun saptanmasında altın standarttır⁽²¹⁾.

GAS enfeksiyonu gelişen hastalarda bakterinin bir çok spesifik enzimine karşı antikorlar gelişir. M proteinine karşı antikorlar oluşur ve bağışıklık için önemlidir fakat hastalığın geç döneminde ortaya çıkar ve bunlar tipe spesifik antikorlardır⁽¹⁷⁾. Streptolizin O, DNaz B, hiyaluronidaz, streptokinaz ve NADaz gibi streptokokların ekstrasellüler maddelerine karşı gelişen antikorların durumu ve pratikte kullanımı üzerinde yoğun çalışmalar devam etmektedir. Antistreptolizin O ve anti-DNaz B saptanmasında ticari olarak sağlanabilecek kitler mevcuttur⁽²¹⁾.

Anti-streptolizin O (ASO)

Streptolizin O kuvvetli bir immunojenidir ve buna karşı gelişen antikorların (ASO) ölçümü streptokok farinjitini nedeniyle ortaya çıkan romatizmal ateş ve glomerulonefritin doğrulanmasında pratikte kullanışlıdır. Bu antikorlar bakteriyle temastan 3-4 hafta sonra ortaya çıkar ve kalıcıdır. Ancak streptolizin O'nun C ve G grubu streptokoklar tarafından da oluşturulması nedeniyle, ASO testinin A grubu streptokok enfeksiyonu için spesifik olmadığı unutulmamalıdır⁽¹⁰⁾. Streptolizin O'nun bir özelliği kolayca kolesterolü bağlamasıdır ve bu bağlanma kendisinin hemolitik ve immün sistemi uyarıcı aktivitesini elimine eder. Bu nedenle farinjit gibi diğer streptokok enfeksiyonlarının aksine deri enfeksiyonlarında streptolizin O'ya yanıt genellikle zayıftır, diğer bir deyişle streptokoka bağlı piyodermalı hastalarda ASO titresinin yükseldiği görülmez^(16,17).

Anti-DNaz B

A grubu streptokokların oluşturduğu deoksiribonükleaz (DNaz)'ın A, B, C ve D olmak üzere dört değişik antijenik varyantı vardır. Suşların büyük kısmı B tipi DNaz oluştururlar ve buna karşı gelişen antikorlar, ASO'nun aksine derinin streptokok enfeksiyonunda rutin olarak saptanabilir. Anti-DNaz B antikorları hem deri hem de solunum enfeksiyonlarından sonra ortaya çıkarlar. İdeal olanı iki serum örneğinin (akut ve konvalesan serum) alınıp anti-streptolizin O ve anti-DNaz B açısından test edilmesidir; bu iki serum arasında saptanan 4 kat artış anlamlıdır. Ancak antikor yanıtının erken antibiyotik tedavisi uygulanan hastalarda baskılanmış olabileceği unutulmamalıdır. Anti-DNaz B testinin streptokoka bağlı glomerulonefritteki kullanımı şüphelidir^(16,17).

A grubu streptokokların nikotinamid adenin dinukleotidaz (NADaz), hiyaluronidaz ve streptokinaz gibi virulansında rol oynayan başka enzimleri de vardır. Bu enzimlere karşı da antikorlar (anti-NADaz, anti-hiyaluronidaz, anti-streptokinaz) gelişir ve anti-streptolizin O'ya paralel olarak bu antikorlarının saptanması geçirilmiş streptokok enfeksiyonunun saptanmasında yararlı olmaktadır^(16,17,21).

Sık kullanılan testlerden biri streptozim testidir (Carter Wallace., Wampole Lab, Cranbury, N.J.). Çeşitli streptokok antijenlerine karşı (streptolizin O, NADaz, DNaz, streptokinaz, hiyaluronidaz) gelişen antikorları saptayan tarama testi özelliğinde bir testtir. Tek bir deneyde farklı antikorları saptayabilme üstünlüğü olmasına rağmen saptanan antikoru hangi antijene karşı geliştiği bilinemez. Bu testle ilgili standartizasyon problemleri de olduğundan dikkatli kullanılmalıdır^(9,10).

Klinik immunoloji laboratuvarları tarafından bildirilen antikor titrelerinin değerlendirilmesi çeşitli yaş gruplarına, populasyonun özelliğine göre değişebilir⁽¹⁰⁾.

KAYNAKLAR

1. American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases: Severe invasive group A streptococcal infections. a subject review, *Pediatrics* 1998; 101:136-40.
2. Bisno AL: Classification of streptococci, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5. baskı" kitabında s.2100-1, Churchill Livingstone, Philadelphia, London, Toronto (2000).
3. Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney JM Jr, Kaplan EL, Schwartz RH: Infectious Diseases Society of America: Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis, *Clin Infect Dis* 2002;35(2):113-25.
4. Bisno AL, Stevens DL: Streptococcus pyogenes (Including streptococcal toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis), "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5. baskı" kitabında s.2101-17, Churchill Livingstone, Philadelphia, London, Toronto (2000).
5. Bourbeau PP: Role of the microbiology laboratory in diagnosis and management of pharyngitis, *J Clin Microbiol* 2003;41:3467-72.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Invasive Streptococcus pyogenes after allograft implantation, Colorado, 2003, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52(48):1173-6.
7. Cooper RJ, Hoffman JR, Bartlett JG, Besser RE, Gonzales R, Hickner JM, Sande MA; American Academy of Family Physicians; American College of Physicians-American Society of Internal Medicine; Centers for Disease Control: Principles of appropriate antibiotic use for acute pharyngitis in adults: Background, *Ann Intern Med* 2001;134(6):509-17.
8. Facklam R: What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes, *Clin Microbiol Rev* 2002;15:613-30.
9. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS: Streptococcus, Enterococcus, and similar organisms, "Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology, 11. baskı" kitabında s. 298-315 (2002).
10. Kaplan EL, Gerber MA: Group A, group C, and group G beta-hemolytic streptococcal infections, "Feigin RD, Cherry JD, Demler GJ, Kaplan SL (eds): Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 5. baskı" kitabında s.1142-56, Saunders, New York (2004).
11. Kellogg JA: Suitability of throat culture procedures for detection of group A streptococci and as reference standards for evaluation of streptococcal antigen detection kits, *J Clin Microbiol* 1990;28:165-9.
12. Kellogg JA: Letter to the Editor, Reply to the Letter's Roddey OF: Quantitation of group A beta-hemolytic streptococci in throat culture, *J Clin Microbiol* 1991;29:1279-80.
13. Koneman EW, Allen SD, Janada WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr: The Gram- positive cocci, Part II: Streptococci, Enterococci, and the "Streptococcus-like" bacteria, "Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5. baskı" kitabında s. 577-650 (1997).
14. Kurtz B, Kurtz M, Roe M, Todd J: Importance of inoculum size and sampling effect in rapid antigen detection for diagnosis of Streptococcus pyogenes pharyngitis, *J Clin Microbiol* 2000;38:279-81.
15. Louie L, Simor AE, Louie M, McGeer A, Low DE: Diagnosis of group A streptococcal necrotizing fasciitis by using PCR to amplify the streptococcal pyrogenic exotoxin B gene, *J Clin Microbiol* 1998;36:1769-71.
16. Mascini EM, Holm SE: Streptococci and related genera, "Cohen J, Powderly WG (eds): Infectious Diseases" kitabında s. 2133-52, Mosby Co., Edinburgh, London, New York (2004).
17. Murray PR, Rosenthal KS, Koyabashi GS, Pfaller MA: Streptococcus, "Medical Microbiology, 4. baskı" kitabında s.217-35 (2002).
18. Perry JL: Assessment of swab transport systems for aerobic and anaerobic organism recovery, *J Clin Microbiol* 1997;35:1269-71.
19. Ruoff KL, Whiley RA, Beighton AD: Streptococcus, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover JC (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8. baskı" kitabında s. 405-42, Am Soc Microbiol, Washington (2003).
20. Snow V, Mottur-Pilson C, Cooper RJ, Hoffman JR; American Academy of Family Physicians; American College of Physicians-American Society of Internal Medicine; Centers for Disease Control: Principles of appropriate antibiotic use for acute pharyngitis in adults, *Ann Intern Med* 2001; 134(6):506-8.
21. Stollerman GH: Streptococcus pyogenes (Group A Streptococci), "Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds): Infectious Diseases, 3.baskı" kitabında s. 1591-605, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York (2004).
22. Uhl JR, Adamson SC, Vetter EA, Schleck CD, Harmsen WS, Iverson LK, Santrach PJ, Henry NK: Comparison of LightCycler PCR, rapid antigen immunoassay, and culture for detection of group A streptococci from throat swabs, *J Clin Microbiol* 2003;41:242-9.