

# Solunum Yolu Örneklerinde *Streptococcus pneumoniae*'nin Saptanmasında Optokin Duyarlılığı, Safrada Erime ve *psaA* Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemlerinin Yeri

Barış Can ©  
M. Derya Aydın ©

## *The Role of Optochin Sensitivity, Bile Solubility and psaA Polymerase Chain Reaction Methods in the Diagnosis of Streptococcus pneumoniae in Respiratory Tract Samples*

### Öz

*Streptococcus pneumoniae*; pnömoni, bakteriyemi ve menenjit gibi hayatı tehdit eden ciddi infeksiyonların yanısıra otit, sinüzit gibi sık rastlanan infeksiyonlara da yol açan önemli bir patojendir. *S.pneumoniae*'nin hızlı ve doğru tanısı, infekte hastaların uygun tedavi görmesinde son derece önemlidir. Çalışmamızda rutin tanıda kullandığımız fenotipik testlerin özgüllük ve duyarlılığının, altın standart yöntem olarak kullandığımız *psaA* PCR ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Klinik örneklerden izole edilen 90 adet alfa hemolitik streptokok suşu optokin duyarlılığı ve safrada erime-damlatma testlerine göre; *S.pneumoniae* olduğu bilinen (optokine duyarlı ve safrada erime-damlatma testi pozitif) 30 suş (Grup 1), *S.pneumoniae* olmayan (optokine dirençli ve safrada erime-damlatma testi negatif) 50 suş (Grup 2) ve *S.pneumoniae* şüpheli (optokine dirençli ama safrada erime-damlatma testi pozitif) 10 suş (Grup 3) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Tüm izolatlara *psaA* PCR ve safrada erime-tüp testi uygulanmış; Grup 1 deki suşlar pozitif, Grup 2 ve 3'teki suşlar ise negatif olarak bulunmuştur. Grup 3'teki 10 suşa API 20 Strep testi yapılmış ve viridans grup streptokok olarak tanımlanmıştır. Bu bulgulara göre safrada erime-tüp testinin; damlatma testine göre daha özgül, *psaA* PCR yöntemiyle ise benzer özgüllüğe sahip olduğu görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Optokin duyarlılığı, safrada erime, *psaA* PCR

### ABSTRACT

*Streptococcus pneumoniae*; in addition to serious life-threatening infections such as pneumonia, bacteremia and meningitis, is also an important pathogen which causes common infections such as otitis and sinusitis. The rapid and accurate diagnosis of *S.pneumoniae* is extremely important for the appropriate treatment of infected patients. In our study, we aimed to compare the specificity and sensitivity of the phenotypic tests used in routine diagnosis with the *psaA* PCR we used as the gold standard method. 90 strains isolated from the clinical specimens were grouped according to their optochin sensitivity and bile solubility: 30 *S.pneumoniae* strains (optochin sensitive and bile solubility-drip test positive) (Group 1), 50 non-pneumococcus strains (optochin resistant and bile solubility-drip test negative) (Group 2) and 10 *S.pneumoniae* suspicious strains (optochin resistant but bile solubility-drip test positive) (Group 3) *psaA* PCR and bile solubility-tube test were applied to all isolates; the strains in Group 1 were positive and the strains in Groups 2 and 3 were negative. The 10 strains in Group 3 were determined as viridans group streptococci in API 20 Strep test. According to these findings, bile solubility-tube test was found to be more specific than the drip test and similar to *psaA* PCR method.

**Keywords:** Optochin sensitivity, bile solubility, *psaA* PCR

Alındığı tarih: 27.02.2018  
Kabul tarihi: 22.04.2019  
Yayın tarihi: 30.04.2019

Barış Can  
Marmara Üniversitesi Pendik EAH  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
İstanbul - Türkiye  
✉ drbarisc@hotmail.com  
ORCID: 0000-0002-1966-4240

M. D. Aydın 0000-0002-5812-4861  
Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
İstanbul - Türkiye



## GİRİŞ

*Streptococcus pneumoniae*; pnömoni, bakteriyemi, menenjit ile otitis media ve sinüzit gibi üst solunum yolu infeksiyonlarına neden olur. Pnömokoklar; toplum kaynaklı pnömoni, menenjit, splenektomili hastalarda sepsis, otitis media ve sinüzitin en sık nedenidir. Özellikle çocuklarda olmak üzere konjunktivitinin sık etkenlerinden birisidir. *S.pneumoniae*, tüm yaş gruplarında önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir<sup>(7)</sup>.

*S.pneumoniae*'nin hızlı ve doğru tanısı, infekte hastaların uygun tedavi görmesinde son derece önemlidir. *S.pneumoniae*'nin tanısına yaklaşım açısından laboratuvarlar arasında farklılıklar vardır. Daha ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle optokin duyarlılığı ve safrada erime yöntemleri sık olarak kullanılmaktadır. Genelde pnömokok tanısı klasik yöntemlerle basittir fakat atipik pnömokokların (kapsülsüz, optokine dirençli, safrada erimeyen) ve atipik streptokokların (optokine duyarlı) varlığında, pnömokokları diğer alfa hemolitik suşlardan ayırt etmek zorlaşır<sup>(5,10,19)</sup>.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi, mikroorganizmaların tanısında yüksek duyarlılığa sahip, hızlı bir yöntemdir. Pnömokokların klinik örneklerden tanımlanması amacıyla pnömokok virülans genlerinin tespitine dayalı amplifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir<sup>(4,9)</sup>.

Pnömokok virülans genlerinden biri olan pnömokok yüzey adhezin A (*psaA*) geni hem aşı çalışmalarında hem de tanıda kullanılmaktadır. Morrison ve ark. *S.pneumoniae*'nin 90 serotipinde de *psaA* geninin varlığını PCR yöntemiyle göstermişlerdir. Verhelst ve ark., yaptıkları çalışmada üç genle (*ply*, *lytA*, *psaA*) yapılan PCR çalışmalarını karşılaştırmışlar ve pnömokok suşlarının tanısında *psaA* PCR yönteminin spesifik olduğunu bildirmişlerdir<sup>(11,14,18)</sup>.

Çalışmadaki amacımız, tipik *S.pneumoniae* suşlarında ve pnömokok şüpheli alfa hemolitik streptokok suşlarında optokin duyarlılığı ve safrada erime (damlatma ve tüp) yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılığını *psaA* PCR testini altın standart olarak kullanarak araştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Bilim Dalı'na gönderilen klinik örneklerden (balgam, boğaz salgısı, burun sürüntüsü, kan, kulak akıntısı, trakeal aspirat, beyin omurilik sıvısı ve konjunktiva sürüntüsü) izole edilen 90 alfa hemolitik streptokok suşu incelenmeye alınmıştır. Bu suşlar rutin laboratuvar sonuçlarına göre; *S.pneumoniae* olduğu bilinen (optokine duyarlı ve safrada erime-damlatma testi pozitif) 30 suş (Grup 1); *S.pneumoniae* olmayan (optokine dirençli ve safrada erime-damlatma testi negatif) 50 suş (Grup 2) ve *S.pneumoniae* şüpheli (optokine dirençli ama safrada erime-damlatma testi pozitif) 10 suş (Grup 3) olarak gruplandırılmıştır. Tüm suşlara *psaA* PCR ve safrada erime-tüp testi uygulanmıştır. Sonuç olarak optokin duyarlılığı ve safrada erime (damlatma ve tüp) testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri altın standart yöntem olarak kullandığımız *psaA* PCR sonuçlarına göre değerlendirilmiştir.

### Fenotipik testler:

Hastalardan alınan örnekler % 5 koyun kanlı besiyerine ekilmiş, 37°C'de % 5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 18-24 saatlik inkübasyondan sonra üremeler değerlendirilmiştir. *S.pneumoniae* tanımlanması Gram boyanma, katalaz negatifliği, koloni morfolojisi, alfa hemoliz, safrada erime ve optokin duyarlılığına göre yapılmıştır.

**Safrada erime:** Safra tuzu (sodyum deoksikolat) bakterinin erimesine neden olan, indirekt etkili bir maddedir; otolitik enzim sentezini aktive ederek etkisini gösterir. Safrada erime-damlatma testinde % 5 koyun kanlı besiyerinde üreyen kolonilerin üzerine % 2'lik sodyum deoksikolat damlatılmış ve 35°C'de 30 dakika bekledikten sonra erime olup olmadığı gözlenmiştir. Safrada erime-tüp testinde ise kontrol ve test olmak üzere iki ayrı tüp kullanılmıştır. 0,5 ml % 0,9'luk serum fizyolojik içerisinde 0,5-1 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Test tüpüne 0,5 ml % 10'luk sodyum deoksikolat, kontrol tüpüne 0,5 ml serum fiz-

yolojik eklenmiş ve 35°C'de iki saat inkübe edilmiştir. Test tüpünde berraklaşma görülüp kontrol tüpü bulanık ise safrada erime tüp testi pozitif olarak değerlendirilmiştir<sup>(20)</sup>.

**Optokine duyarlılık:** Safrada erimesi olan ve/veya koloni morfolojisi *S.pneumoniae*'ye benzeyen kolonilerin saf kültüründen % 5 koyun kanlı agara ekim yapıp ortasına 5 µg optokin (ethyl-hydrocupreine hydrochloride) içeren 6 mm çapında disk yerleştirilmiş ve 35°C'de, % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 24 saat inkübe edilerek inhibisyon zonuna göre (>14 mm=duyarlı) değerlendirilmiştir<sup>(5)</sup>.

**Bakteri tanımlanması:** Safrada erime-damlatma testi ile pozitif, safrada erime-tüp testi ile negatif olan suşların tanımlanması için API 20 Strep yarı otomatize sistemi (bioMérieux, Fransa) kullanılmıştır. İnokülasyon, inkübasyon ve test sonuçlarının okunması üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

#### **PsaA PCR:**

Klinik örneklerden elde ettiğimiz suşların genotipik tanımlaması için *psaA* PCR gen amplifikasyon metodu kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonu için 18-24 saatlik inkübasyon sonrası üreyen koloniler eküvyonla alınarak 200 µl steril distile suda süspanse edilmiş ve daha sonra 10 dakika kaynatılmıştır. Kaynatıldıktan sonra 10,000 g'de 2 dakika santrifuj edilmiş ve supernatant kısmı PCR reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Hemen kullanılmayan örnekler -20°C'de saklanmıştır. Uyguladığımız PCR yönteminde, *S.pneumoniae*'nin yüzeyindeki 37 kDa'luk bir protein olan *psaA*'yı kodlayan gen hedef olarak kullanılmıştır. *PsaA* geninin 838 bp'lik parçasını amplifiye etmek için P1(5'-CTT TCT GCA ATC ATT CTT G -3') ve

P2(5'-GCC TTC TTT ACC TTG TTC TGC-3') primerleri kullanılmıştır. Amplifikasyon karışımı toplam hacmi 50 µl (Distile su (35.7 µl), Tampon 10x (5 µl), dNTP mix 10 mM (1 µl), MgCl<sub>2</sub> 25 mM (2 µl), P1 primer (0.5 µl), P2 primer (0.5 µl), Taq DNA polimeraz (0.3 µl), DNA ekstraktı (5 µl) olacak şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon koşulları denatürasyon basamağı 94°C'de 5 dk, uzama basamağı 40 siklus 95°C'de 30 sn, 52°C'de 30 sn, 72°C'de 2 dk ve sonlanma basamağı 72°C'de 8 dk olacak şekilde termal döngü cihazında (Techne/Progene) gerçekleştirilmiştir. *PsaA* PCR yönteminin özgüllüğünün belirlenmesi amacıyla kontrol suş olarak üst solunum yolu florasındaki çeşitli bakteriler (*Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*) ve pozitif kontrol olarak da *S.pneumoniae* ATCC 49619 suşu kullanılmıştır<sup>(11)</sup>.

#### **BULGULAR**

Bu çalışmada tüm izolatlara *psaA* PCR ve safrada erime-tüp testi uygulanmış; Grup 1'deki suşlar pozitif, Grup 2 ve 3'teki suşlar ise negatif olarak bulunmuştur. Grup 3'teki 10 suşa API 20 Strep testi yapılmış ve viridans grup streptokok olarak tanımlanmıştır. Üç gruba uygulanan *psaA* PCR ve fenotipik test sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre optokin duyarlılığı ve safrada erime-tüp testinin duyarlılık ve özgüllükleri % 100 olarak saptanmıştır. Safrada erime-damlatma testinin duyarlılığı % 100, özgüllüğü ise % 83 olarak saptanmıştır (Tablo 2).

**Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen suşların fenotipik ve genotipik test sonuçları.**

| Grup   | Suş Sayısı (n) | Optokine Duyarlılık (%) | Safrada Erime (%) |     | PsaA PCR pozitifliği (%) |
|--------|----------------|-------------------------|-------------------|-----|--------------------------|
|        |                |                         | Damlatma          | Tüp |                          |
| Grup 1 | 30             | 100                     | 100               | 100 | 100                      |
| Grup 2 | 50             | 0                       | 0                 | 0   | 0                        |
| Grup 3 | 10             | 0                       | 100               | 0   | 0                        |

**Tablo 2. Çalışmada kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllük sayı ve oranları.**

| Test                         | Gerçek pozitif (n) | Yalancı pozitif (n) | Yalancı negatif (n) | Gerçek negatif (n) | Duyarlılık (%) | Özgüllük (%) |
|------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|----------------|--------------|
| Optokine duyarlılık          | 30                 | 0                   | 0                   | 60                 | 100            | 100          |
| Safrada erime-damlatma testi | 30                 | 10                  | 0                   | 50                 | 100            | 83           |
| Safrada erime-tüp testi      | 30                 | 0                   | 0                   | 60                 | 100            | 100          |

## TARTIŞMA

*S.pneumoniae*'nin infeksiyon etkeni olarak tanısı bakterinin infeksiyon bölgesinden izolasyonuna dayanır. Pnömokoklara yönelik laboratuvar tanı yöntemleri mikroskopi, kültür, antijen saptama ve nükleik asit tabanlı testler olarak sıralanabilir<sup>(15)</sup>.

Kanlı agarda alfa hemoliz oluşumu, pnömokokları üst solunum yolunun diğer normal flora üyeleri olan viridans streptokoklardan ayırt etmek için yeterlidir ve bunun için safrada erime deneyi ve optokin duyarlılığı gibi testlere ihtiyaç duyulur. Geleneksel yöntemlerle yapılan *S.pneumoniae* tanısında atipik suşların varlığı nedeniyle bazen zorluklar yaşanabilir. Yapılan çalışmalarda optokine dirençli veya safrada erimeyen pnömokokların ve optokine duyarlı viridans streptokokların varlığı bildirilmiştir<sup>(7, 10,12,18)</sup>.

Kajjalainen ve ark.<sup>(5)</sup> mikrobiyoloji laboratuvarlarında genellikle optokin duyarlılığının standart metod olarak kullanıldığını ve atipik koloni morfolojisi olan veya optokine dirençli suşlarda safrada erime deneyinin uygulandığını söylemişlerdir. Optokine duyarlı ve safrada erime testi pozitif bir alfa hemolitik streptokok pnömokok olarak kabul edilebilir. Eğer suşun koloni morfolojisi farklıysa ya da kan veya beyin omurilik sıvısı gibi bir örnekten izole edilmiş ise ileri inceleme için iyi bir neden oluşturur. Örneğin genotipik testlerle bakterinin virülans genleri araştırılabilir. Optokine dirençli, safrada eriyen, kapsüllü bir suş pnömokok olabilir fakat kapsülsüz, optokine dirençli veya safrada erimeyen bir bakteriyeye pnömokok tanısı konmamalıdır.

Morrison ve ark.<sup>(11)</sup> tanımladıkları primer setiyle yaptıkları PCR ile tüm pnömokok serotiplerinde *psaA* geninin varlığını göstermişlerdir. Ayrıca kullandıkları *psaA* PCR yönteminin özgüllüğünü göstermek için viridans grup streptokokları da içeren çeşitli cins

(n=30) ve türde (n=14) bu yöntemi denemişler ve negatif sonuç almışlardır.

Verhelst ve ark.<sup>(18)</sup> optokine dirençli 49 pnömokok benzeri suşta yaptıkları çalışmada beş farklı genotipik yöntemi [AccuProbe, *psaA*, *lytA*, *ply* ve ARDRA (amplified rDNA restriction analysis)] karşılaştırmışlardır. Tüm testlerde kapsüllü ve tipik koloni morfolojisine sahip 11 pnömokok suşu pozitif olarak, 20 alfa hemolitik streptokok suşu da negatif olarak saptanmıştır. Geriye kalan 18 suş bir veya daha fazla sayıda testte pnömokok karakteristiği göstermiştir. En büyük problem AccuProbe yöntemiyle pozitiflik veren yedi suşta ortaya çıkmıştır. Bunların hepsi kapsülsüz ve *psaA* spesifik PCR negatif olarak saptanmış, bazıları *ply* ve *lytA* spesifik PCR pozitif bulunmuş, bazıları da safrada erimmiştir. Sonuç olarak gerçek pnömokokları tanıma edemedeki en iyi genotipik tekniğin Morrison ve ark.'nın<sup>(11)</sup> tanımladıkları *psaA* spesifik PCR olduğu ve optokine dirençli kapsüllü serotiplerde doğru sonuçlar verdiği belirtilmiştir.

Messmer ve ark.<sup>(9)</sup> tiplendirilemeyen (kapsülsüz) pnömokok suşları ve *S.pneumoniae* ile yakın ilişkili atipik streptokokların tanısında dört farklı yöntemi (*lytA* PCR, *psaA* PCR ve iki farklı primer setiyle *ply* PCR) denemiş ve bunları diğer laboratuvar testleriyle (optokine duyarlılık, safrada erime, Quellung reaksiyonu ve AccuProbe) karşılaştırmışlardır. Tiplendirilemeyen pnömokoklar hem PCR yöntemleri hem de diğer laboratuvar testleriyle tanınmışlardır. Ancak sık kullanılan fenotipik laboratuvar testleri atipik streptokokları, tiplendirilemeyen pnömokoklardan ayırt edememişlerdir. Atipik streptokoklarla karıştırılabilen bu suşların tanısında *psaA* ve *lytA* PCR metodlarının güvenilir olduğu bildirilmiştir<sup>(13,16,17,18)</sup>.

El Alia ve ark.<sup>(2)</sup> yaptıkları çalışmada *S.pneumoniae*'nin belirlenmesinde 16S rRNA bazlı Spne-PCR yöntemini diğer dört genotipik yöntemle (*psaA*, *lytA*, *ply*,

spn9802-PCR) karşılaştırmışlar ve denedikleri dört genotipik yöntemden sadece *psaA* PCR'ın *S.pneumoniae* ile *Streptococcus pseudopneumoniae*'yi net bir şekilde ayırt edebildiğini saptamışlardır.

Suşun izole edildiği örneğin ve altta yatan hastalığın bilinmesi özellikle atipik suşların identifikasyonu açısından önemlidir. Yapılan çalışmalarda optokine dirençli pnömokok suşlarının genellikle kan ve beyin omurilik sıvısından, tiplendirilemeyen (kapsülsüz) suşların ise konjunktivit olgularından izole edildiği bildirilmiştir<sup>(1,4)</sup>.

Kellogg ve ark.'nın<sup>(6)</sup> yaptıkları çalışmada da bizim çalışmamıza benzer bir şekilde safrada erime-tüp testinin özgüllüğü damlatma testine göre daha yüksek olarak bulunmuştur.

Sık infeksiyon etkenlerinden biri olan *S.pneumoniae*'nin identifikasyonunun özellikle atipik suşlarda önemli bir sorun olduğu gözlenmektedir. *S.pneumoniae*, başta penisilin olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı direnç kazandığından bakterinin hızlı ve doğru tanısı tedaviyi yönlendirme açısından da önem taşımaktadır.

Safrada erime-tüp testinin kolay, ucuz ve özgüllük oranının yüksek olması nedeniyle PCR deneylerinden önce yapılması önerilmektedir. Sonuçlar değerlendirilirken safrada erimeyen atipik pnömokokların varlığı unutulmamalıdır<sup>(18,19,20)</sup>.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-316 / 03112003

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Funding:** This study was supported by Istanbul University Research Fund. Project No: T-316/03112003

## KAYNAKLAR

- Carvalho MGS, Steigenralt AG, Thompson T, et al. Confirmation of nontypeable *Streptococcus pneumoniae*-like organisms isolated from outbreaks of epidemic conjunctivitis as *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4415-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4415-4417.2003>
- El Aila NA, Emler S, Kaijalainen T, et al. The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with four other species specific PCR assays. *BMC Infect Dis.* 2010;10:104. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-104>
- Harimurti K, Saldi SR, Dewiasty E, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in adults infected with human immunodeficiency virus in Jakarta, Indonesia. *J Infect Public Health.* 2016;9(5):633-8. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.01.004>
- Ing J, Mason EO, Kaplan SL, et al. Characterization of nontypeable and atypical *Streptococcus pneumoniae* pediatric isolates from 1994 to 2010. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1326-30. <https://doi.org/10.1128/JCM.05182-11>
- Kaijalainen T, Rintamaki S, Herva E, et al. Evaluation of gene-technological and conventional methods in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiological Methods.* 2002;51(1):111-8. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00061-1)
- Kellogg JA, Bankert DA, Elder CJ, et al. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3373-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3373-3375.2001>
- Levinson W. ÇE: Şener B, Esen B. *Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji.* 14. Baskı, s.123, LANGE, Güneş Tıp Kitabevleri (2018).
- Martin-Galiano AJ, Balsalobre L, Fenoll A et al. Genetic characterization of optochin-susceptible viridans group streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3187-94. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3187-3194.2003>
- Messmer TO, Sampson JS, Stinson A, et al. Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;49(4):249-54. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.04.013>
- Miernyk KM, DeByle CK, Rudolph KM. Evaluation of two matrices for long-term, ambient storage of bacterial DNA. *Biopreserv Biobank.* 2017;15(6):529-34. Epub 2017 Nov 13. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.0040>
- Morrison KE, Lake D, Crook J, et al. Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):434-7.
- Pikis A, Campos JM, Rodriguez WJ, et al. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mecha-

- nism, significance, and clinical implications. J Infect Dis. 2001;184(5):582-90.  
<https://doi.org/10.1086/322803>
13. Sanz JC, Ríos E, Rodríguez-Avial I, et al. Identification of *Streptococcus pneumoniae* *lytA*, *plyA* and *psaA* genes in pleural fluid by multiplex real-time PCR. Enferm Infect Microbiol Clin. 2018;36(7):428-30.  
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.07.007>
  14. Scott JAG, Marston EL, Hall AJ, et al. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by *psaA* PCR analysis of lung aspirates from adult patients in Kenya. J Clin Microbiol. 2003;41(6):2554-9.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2554-2559.2003>
  15. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi-etkenlere göre enfeksiyonlar, 4.Baskı, s.1794, Nobel Tıp Kitabevleri (2017).
  16. Tsar HY, Hsueh PR, Teng LJ, et al. Bacteremic pneumonia caused by a single clone of *Streptococcus pneumoniae* with different optochin susceptibilities. J Clin Microbiol. 2000;38(1):458-9.
  17. Veerasamy J, Jayarajan J. Atypical pneumococcal isolate from blood. Int J Appl Basic Med Res. 2018;8(1):61-3.  
[https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR\\_459\\_16](https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR_459_16)
  18. Verhelst R, Kaijalainen T, De Baere T, et al. Comparison of five genotypic techniques for identification of optochin-resistant pneumococcus-like isolates. J Clin Microbiol. 2003;41(8):3521-5.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3521-3525.2003>
  19. Whatmore AM, Efstratiou A, Pickerill AP, et al. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of "Atypical" pneumococci and organisms allied to *S.mitis* harboring *S.pneumoniae* virulence factor-encoding genes. Infect Immun. 2000;68(3):1374-82.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1374-1382.2000>
  20. Winn W, Allen S, Janda W, et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Gram-Positive Cocci Part II: Streptococci, Enterococci, and the 'Streptococcus-Like' Bacteria, 6.baskı, s.672-764, Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia (2006).