



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**KADIN DOĞUM KLİNİĞİNE HERHANGİ BİR SEBEPLE
BAŞVURAN KADINLARDAN İSTENEN VAJİNAL KÜLTÜR
ÖRNEKLERİNDE B GRUBU STREPTOKOKLARIN PCR VE
KÜLTÜR YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI VE
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

Feyza ALP

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Duygu FINDIK

Konya-2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**KADIN DOĞUM KLİNİĞİNE HERHANGİ BİR SEBEPLE
BAŞVURAN KADINLARDAN İSTENEN VAJİNAL KÜLTÜR
ÖRNEKLERİNDE B GRUBU STREPTOKOKLARIN PCR VE
KÜLTÜR YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI VE
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

Feyza ALP

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Duygu FINDIK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 12102006 proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2013

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimimde emeği geçen danışmanım sayın Prof. Dr. Duygu FINDIK'a, değerli hocalarım sayın Prof. Dr. İnci TUNCER, sayın Doç. Dr. Uğur ARSLAN, sayın Yrd. Doç. Dr. Hatice TÜRK DAğI'na, mesai arkadaşım Dr. Ayşe Rüveyda UğUR ve tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan tüm teknisyen arkadaşlarıma, bu çalışma sürecinde bana anlayış gösteren aileme, eşime ve canım yavrularıma sonsuz teşekkürler.

Feyza ALP
KONYA, 2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER ve KISALTMALAR

1. GİRİŞ	1
1.1. GENEL BİLGİLER.....	2
1.2. TARİHÇE.....	2
1.3. SINIFLANDIRMA	3
1.3.1. Brown Sınıflandırması	3
1.3.2. Lancefield Sınıflandırması	3
1.3.3. Sherman Sınıflandırması	4
1.4. B GRUBU STREPTOKOKLAR	6
1.4.1. MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ.....	6
1.4.1.1. Fenotipik Testlerle Tanımlama	7
1.4.1.2. Antijenik Yapı	8
1.4.2. EPİDEMİYOLOJİ.....	9
1.4.3. VİRÜLANS FAKTÖRLERİ.....	11
1.4.4. PATOGENEZ	14
1.4.5. KLİNİK	17
1.4.5.1. Erken Başlangıçlı Yenidoğan GBS İnfeksiyonu (EBYİ).....	18
1.4.5.2. Geç Başlangıçlı Yenidoğan GBS İnfeksiyonu (GBYİ).....	19
1.4.5.3. İleri Dönem İnfeksiyonlar	19
1.4.5.4. Erişkinlerde GBS İnfeksiyonları	19
1.4.6. TANI	20
1.4.6.1. Konvansiyonel Yöntemler	22
1.4.6.2. Serolojik Tanımlama	22
1.4.6.3. Moleküler Tanımlama	24
1.4.7. KORUNMA	24
1.4.7.1. Kemoproflaksi	25
1.4.7.2. İmmünoproflaksi	27
1.4.8. TEDAVİ.....	27
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
2. 1. Hasta Anamnezi	29
2. 2. Örneklerin Toplanması.....	29
2. 3. Örneklerin Ekilmesi	29
2. 4. Kültürlerin Değerlendirilmesi	30

2. 4. 1. Katalaz Testinin Yapılışı	31
2. 4. 2. CAMP Testinin Yapılışı	31
2. 4. 3. GBS Grup Lateks testi	31
2. 4. 4. GBS Duyarlılık testi	32
2. 4. 5. İndüklenebilir Makrolid Linkozamid Direncinin Araştırılması	33
2. 5. PCR Çalışması	34
2. 5. 1. DNA İzolasyonu	34
2. 5. 2. DNA Miksinin Hazırlanması	35
2. 5. 3. PCR	36
2. 5. 4. Jelde Yürütme	37
2. 5. 4. 1. 0.5X (Tris-borate-EDTA) TBE hazırlama	37
2. 5. 4. 2. Jel hazırlama	37
2. 5. 4. 3. Loading Dye Hazırlama ve Jele Yerleştirilmesi	37
2. 5. 5. Jelde Yürüyen DNA'ların Görüntülenmesi	37
2. 6. Pulsed-Field Gel Elektroforez (PFGE) Çalışması	38
2. 6. 1. PFGE için Kullanılan Solüsyonlar	38
2. 6. 1. 1. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA), PH: 7.6	38
2. 6. 1. 2. ES Buffer, PH: 8	38
2. 6. 1. 3. TBE (1X)	38
2. 6. 2. İzolatların Hazırlanması	39
2. 6. 3. Agaroz Hazırlanması ve İzolatların Agaroz Gömülmesi	39
2. 6. 4. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması	39
2. 6. 5. Hücre Lizisinden Sonra Agaroz Kalıpların Yıkınması	40
2. 6. 6. Agaroz Kalıplarındaki DNA'nın RE ile Kesimi	40
2. 6. 7. Elektroforez Yürütme Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi	40
2. 6. 8. Elektroforez	41
2. 6. 9. Sonucun Gözlenmesi ve Analiz	41
2. 7. İstatiksel Analiz	42
3. BULGULAR	43
4. TARTIŞMA	52
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	61
ÖZET	68

SUMMARY	69
EKLER.....	70
EK. A: Anket Formu	70
EK. B: Etik Kurul Raporu	71
ÖZGEÇMİŞ	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

- AAP:** Amerikan Pediatri Akademisi
ABD: Amerika Birleşik Devletleri
ACOG: Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Koleji
AGN: Akut glomerulo nefrit
ARA: Akut romatizmal ateş
ATTC: American Type Culture Collection
BHI: Brain Heart Infusion
BOS: Beyin omurilik sıvısı
CA: Columbia agar
CAMP: Christie, Atkins, Munch-Petersen
CDC: Center Disease Control and Prevention
CIE: Karşıt immünelektroforez
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CNA: Kolistin-nalidiksik asit içeren kanlı agar
D Test: İndüklenebilir Makrolid Linkozamid Direnci
EB: Elution buffer
EBYİ: Erken Başlangıçlı Yenidoğan GBS İnfeksiyonu
ELISA: Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
EMR: Erken membran rüptürü
GAS: Grup A streptokok
GBS: Grup B streptokok, *Streptococcus agalactiae*
GBSDA: GBS diferansiyel agar
GBYİ: Geç Başlangıçlı Yenidoğan GBS infeksiyonu
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HIV: Human Immunodeficiency Virus
İAP: İntrapartum antibiyotik proflaksisi
IIF: İndirek İmmünofloresan
KKA: Koyun kanlı agar
MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon
MLSB: Makrolid, linkozamid ve streptogramin B
O₂: Oksijen
PCR: Polymerase Chain Reaction

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

RİA: Rahim içi araç

rRNA: Ribozomal RNA

SÜTF: Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi

UPGMA: Unweighted Pair Proup Method with Mathematical Averaging

1. GİRİŞ

İnsanların genitoüriner ve gastrointestinal sisteminin normal flora üyelerinden olan *Streptococcus agalactiae* (Grup B streptokok, GBS) 1887’de Nocard ve Mollereau tarafından ilk kez sığır mastitinin etkeni olarak gösterilmiştir (1887). 1930’dan itibaren ise sepsis ve menenjitin majör etkenlerinden biri olarak saptanmıştır (Suara ve ark 1994). GBS yenidoğanların, infantların, gebe kadınların, 65 yaş üstü erişkinlerin önemli infeksiyon etkenidir (Farley 2001, Edwards ve Baker 2005).

Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) 1970’li yıllarda %20-50 mortalite ile seyreden neonatal infeksiyonlara yol açması ile dikkatler bu mikroorganizmanın üzerinde toplanmıştır. Yenidoğanda oluşabilecek infeksiyonları önlemek için Obstetrik ve Jinekoloji Amerikan Koleji (American College of Obstetricians and Gynecologist, ACOG) ve Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (The Center Disease Control and Prevention, CDC) tarafından stratejiler geliştirilmiştir. GBS yenidoğanda menenjit ve sepsiste esas etyolojik faktördür. Ayrıca erişkinlerde doğum sonu endometrit, maternal üriner sistem infeksiyonları, doğum öcesi, doğum ve doğum sonrası bakteriyemi, korioamnionit ve lohusa infeksiyonlarının da başlıca etkenidir (Ronald ve ark 2004).

Gebelerde bulunma oranı %10-30 düzeyinde olan GBS’nin annenin ürogenital veya gastrointestinal sisteminde kolonize olması, invaziv yenidoğan hastalığı gelişmesinde en önemli risk faktörüdür (Spellerberg ve Brandt 2009). GBS ile kolonize gebelerden doğan bebeklerin yaklaşık yarısında kolonizasyon oluşmakta, kolonize yenidoğanların da % 1-2’sinde ciddi infeksiyonlar saptanmaktadır. Yenidoğanın erken başlangıçlı GBS infeksiyonları en fazla yaşamın ilk haftasında ve özellikle de %90’ı ilk günlerde ortaya çıkmakta ve sıklıkla fulminan seyretmektedir (Topkaya ve ark. 2003).

Bu çalışma ile CDC tarafından gebelerde tarama yapılması önerilen GBS’lerin ilimizde doğurgan çağıdaki kadınlarda vajinal kolonizasyon sıklığını araştırmak, rutin kültürle Polimeraz Zincir Reaksiyonunu (PCR) karşılaştırarak rutin kültürde üremeyen GBS oranını saptamak, üreyen mikroorganizmaları

genotiplendirmek ve yeni doğan infeksiyonlarındaki riski belirleyerek önlem için yapılabileceklerin ortaya konması amaçlanmıştır.

1.1. GENEL BİLGİLER

Streptokoklar *Lactobacillales* takımı, *Streptococcaceae* ailesinde yer alan Gram pozitif, küresel ya da oval yapıda olup 2µm'den küçük genellikle 0,5-1 µm çapında hareketsiz ve sporsuzdurlar. Bazıları kapsüllüdür (Unat 1985). Gram olumlu koklar (Koneman ve ark. 2006) içerisinde katalaz negatif olanlar arasında en geniş gruptur. Fakültatifanaerob olmakla birlikte bazen karbondioksitli ortamda daha iyi ürerler (Spellerberg ve Brandt 2009). Genellikle glikozu heksozdifosfat yolu ile fermente ederek laktik asit oluştururlar. Oksidaz negatif, Gram pozitif olmaları *Neisseria* türlerinden ayrılmalarını sağlar (Koneman ve ark. 2006). Boyalı preparatlarda tek yön boyunca bölündüklerinden zincir ya da ikili gruplar halinde görünürler (Bilgehan 2009). Ribonükleazlarının ve 16S-ribozomal RNA (rRNA) analizlerinin incelenmesine göre streptokoklar filogenetik bakımdan *Lactobacillus* ve bazı *Clostridium* türleri ile yakın ilişkilidir (Koneman ve ark. 2006).

Streptokoklar üremeleri için kan ya da serum ile desteklenmiş zengin içerikli besiyerlerine gereksinim duyarlar. Bazı suşların üremek için B vitaminlerine, bazılarının ise pürin ve pirimidinlere, asparagin ve glutamine gereksinimleri vardır (Gökırmak 1993). Streptokoklar sıvı besiyerinde genellikle dipte çöküntü yaparak ürerler. Katı besiyerlerinde 1-2 mm çapında S tipi küçük koloniler yaparlar (Unat 1985).

1. 2. TARİHÇE

İlk kez 1874'te Billroth tarafından yara infeksiyonunda zincir şeklinde koklar gözlemlenmiş ve streptokok olarak tanımlanmıştır (Söyletir 2008). 1879 yılında Louis Pasteur puerperal sepsis etkeni olarak streptokokları tanımlamıştır (Pasteur 1879). 1881'de Ogston tarafından irinden izole edilmiştir. R. Roch ise 1881'de erizipel lezyonlarında her zaman bulunduğunu belirtmiştir. Fehleisen 1882-1883'de saf kültürünü üretmiştir (Bilgehan 1994). Rosenbach, 1884'te '*Streptococcus*' terimini cins adı olarak kullanmıştır (Söyletir 2008). 1919'da Brown streptokokları hemolitik özelliklerine göre üçe ayırmıştır. Lancefield 1933'de

serogruplandırma prensiplerini açıklamıştır. Sherman 1937'de streptokokların biyokimyasal sınıflandırmasını yapmıştır (Cengiz 2004).

1. 3. SINIFLANDIRMA

Streptokokların sistematik sınıflandırılması ilk defa 1919 yılında Brown tarafından kanlı agarda oluşturdukları hemoliz özelliklerine göre alfa, beta, gama hemolitik olarak yapılmıştır. Lancefield, 1933 yılında streptokokları hücre duvarında bulunan polisakkarit yapıdaki C maddesinden yararlanarak presipitasyon testi ile A-H ve K-V arasında serolojik olarak gruplandırmıştır. Sherman 1937 yılında streptokokları; hemoliz, üreme derecesi ve özellikleri, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri, antijen yapılarına göre, piyojen, laktik, viridans streptokoklar ve enterokoklar olarak 4 gruba ayırmıştır. Jones ise 1978 yılında kapsamlı bir sınıflama yapmıştır (Bilgehan 2009, Söyletir 2002).

1.3.1. Brown Sınıflandırması

Brown tarafından streptokoklar kanlı agarda oluşturduğu hemoliz tipine göre üç gruba ayrılmıştır.

1- beta-hemolitik streptokoklar: Kanlı agar plağında üretildiklerinde oluşan kolonilerin etrafındaki eritrositlerin tamamen hemolizi sonucu beta hemoliz adı verilen saydam bir zon oluşturan streptoklardır. İnsanlar için patojen pek çok streptokok β -hemolitikdir. GBS'ler beta hemolitikdir.

2- Alfa-hemolitik streptokoklar: Kanlı agar plağında üretildiklerinde oluşan kolonilerin etrafındaki eritrositlerin kısmi hemolizi sonucu alfa hemoliz adı verilen yeşilimsi bir zon oluşturan streptoklardır. *S. pneumoniae* alfa hemolitikdir.

3- Gama-hemolitik (nonhemolitik) streptokoklar: Kanlı agar plağında üretildiklerinde oluşan kolonilerin etrafındaki eritrositleri eritmeyen streptokoklardır (Bilgehan 1994).

1.3.2. Lancefield Sınıflandırması

Streptokokların hücre duvarında bulunan C karbonhidratı gruba özel bir antijendir. Yapısal farklılıklar gösteren C antijenine göre Lancefield streptokokları serogruplandırmıştır. AH ve K-V olmak üzere 20 serogrup bulunmuştur. Viridans

streptokokların dışında tüm streptokokların C karbonhidratı vardır. İnsanda genellikle A-D ile F, G grupları hastalık yapmaktadır (Cengiz 2004).

1- A Grubu Streptokoklar (*S.pyogenes*): Hücre duvarındaki gruba spesifik C polisakkariti L, Rhamnose –N– Acetyl-glucosamineden oluşmaktadır (Cengiz 2004). Kanlı agarda beta hemoliz yaparlar. *S.pyogenes* insan boğaz ve derisinde kolonize olarak karmaşık virülans mekanizmaları ile akut faranjite, deri ve sistemik infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu infeksiyonlar sonucunda nonsüpüratif sekel olarak akut romatizmal ateş (ARA) ve akut glomerulonefrite (AGN) yol açmaktadır (Spellerberg ve Brandt 2009, Söyletir 2002).

2- B Grubu Streptokoklar: Hücre duvarındaki gruba spesifik C polisakkariti Rhamnose–glucosamine polimerlerinden oluşmaktadır. Tipe spesifik kapsüler polisakkarit ve protein antijenleri içerir (Koneman ve ark. 2006).

3- C Grubu Streptokoklar: Kanlı agarda A grubu streptokoklara göre daha geniş beta hemoliz yaparlar. Nadir olarak hemolizsiz ve alfa hemolitik olabilirler. Biyokimyasal özelliklerine göre *S.dysagalactiae*, *S.equisimilis*, *S.equi*, *S.zooepidemicus* türlerini içerir.

4- D Grubu Streptokoklar: Enterokokal ve enterokokal olmayan iki ayrı D grubu vardır. Kanlı agarda hemolizsiz veya alfa hemoliz yaparlar. Nadiren bazı D grupları beta hemoliz yapar.

5- G Grubu Streptokoklar: G grubu antijen içerirler. Kanlı agarda beta hemoliz yaparlar (Cengiz 2004).

1.3.3. Sherman Sınıflandırması

Sherman sınıflamasında;

*Lancefield'in serolojik gruplandırması

*Brown'un kanlı agardaki hemolitik aktivite özelliği

*10 °C ve 45°C'de üreyebilme

*%6.5 NaCl varlığında, pH 9.6'da ve %0.1 metilen mavisi içeren ortamda üreyip üreyememe

*Peptondan amonyak oluşturup oluşturamama

*60°C’de 30 dakikada canlı kalabilme gibi özellikler kullanılmıştır. Bu özelliklere göre streptokoklar 4 ana grupta toplanmıştır.

Çizelge 1. 1. 16S rRNA dizi analizine göre insanlardan izole edilen *Streptococcus* türleri.

Grup adı	Türler	Lancefield gruplar	Alternatif grup adı
Piyojenik	<i>S. pyogenes</i>	A	Piyojenik
	<i>S. agalactiae</i>	B	
	<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	C	
	<i>S. dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	C	
	<i>S. porcinus</i>	E, U, U, V	
	<i>S. urinalis</i>	-	
Sanguinis	<i>S. sanguinis</i>	-	Oral
	<i>S. parasanguis</i>	-	
	<i>S. gordonii</i>	-	
	<i>S. sinensis</i>	-	
Mitis	<i>S. mitis</i>	-	Oral
	<i>S. pneumoniae</i>	-	
	<i>S. crista</i>	-	
	<i>S. peroris</i>	-	
	<i>S. infantis</i>	-	
	<i>S. australis</i>	-	
Mutans	<i>S. mutans</i>	-	Oral
	<i>S. sobrinus</i>	-	
	<i>S. cricetus</i>	-	
	<i>S. rattus</i>	-	
Salivarius	<i>S. salivarius</i>	-	Oral
	<i>S. vestibularis</i>	-	
	<i>S. infantarius</i>	-	
	<i>S. constellatus</i>	-	
Anginosus	<i>S. anginosus</i>	-	Oral
	<i>S. intermedius</i>	-	
Bovis	<i>S. bovis</i>	R, S, T	Diğer
	<i>S. suis</i>		

1- Piyojenik Streptokoklar: *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equisimilis*, *S. equi*, *S. porcinus* bu grupta yer alan bazı streptokoklardır.

2- Viridans Streptokoklar: *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans* bu grupta yer alan streptokoklardır.

3- Laktik Streptokoklar

4- Enterokoklar (Söyletir 2002).

Moleküler sınıflama yöntemlerinin uygulanması sonucu Bergey'in 1984 basım Sistematik Bakteriyoloji El Kitabı'ndaki sınıflandırmadan farklı olarak yeni Gram pozitif, katalaz negatif cinsler tanımlanmıştır (Koneman ve ark. 2006).

Streptococcaceae için moleküler yöntemlerden DNA-DNA hibridizasyonu, DNA-ribozomal RNA hibridizasyonu ve ribozomal RNA'nın küçük alt ünitesi (16S) sekanslama yöntemleri kullanılarak yeni sınıflandırmalar oluşturulmuştur. Buna göre *Streptococcaceae* ailesi kendi içinde *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* cinsine ayrılmıştır. Yeni tanımlanan viridans streptokoklar, enterokoklar ve diğer katalaz negatif izolatların bu üç türle yakınlıkları saptanmaya çalışılmıştır (Koneman ve ark. 2006, Söyletir 2002).

Streptococcus cinsi bakterilerin 16S rRNA analizine göre insanlar için patojen olan yedi grup ve bunlar içinde yer alan en az 40 tür tanımlanmıştır. Bu yedi grubu Piyojenik, Sanguinis, Mitis, Mutans, Salivarius, Anginosus ve Bovis oluşturmaktadır (Koneman ve ark. 2006, Söyletir 2002).

1.4. B GRUBU STREPTOKOKLAR

1.4.1. MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Gram pozitif 2µm'den küçük çaplı kok şeklinde fakültatif anaerob, katalaz negatif bakterilerdir. Karbonhidrat fermentasyonu ile laktik asit üretirler. Anaerob ortamda sarı kırmızı pigment oluştururlar. Sıvı besiyerlerinde zincir yaparak ürerler. %5-7 defibrine koyun kanlı agarda kolonileri 3-4mm çapında A grubu streptokoklardan daha büyük, parlak gri- beyaz renkli olup, etraflarında dar bir beta hemoliz zonu bulundurlar. B grubu streptokokların %1- 2'si hemoliz yapmaz, çok azı ise alfa hemolitik özelliktedir. Diğer beta hemolitik streptokoklardan sodyum hippurati hidrolize etmeleri, CAMP faktörü oluşturmaları ile ayrılırlar. %4 NaCl'lü ortamda üremelerine rağmen %6,5 NaCl'lü ortamda üremezler. Basitrasin ve trimetoprim/sulfametoksazole dirençlidirler (Bilgehan 2009, Edwards ve Baker 2005, Söyletir 2002).

1.4. 1. 1. Fenotipik Testlerle Tanımlama

CAMP testi

Beta hemolitik streptokokların fenotipik olarak tanımlanmasında kullanılan bir testtir. 1944'de Christie, Atkins, Munch-Petersen araştırmacıları tarafından tanımlanmıştır. Koyun kanlı agar da *Staphylococcus aureus*'un beta hemolizin'i ile GBS'nin ekstrasellüler CFB proteini'nin eritrositleri sinerjik olarak lizis etme prensibine dayanır. Stafilokoksik beta hemolizin, sfingomyelinaz özelliğinde olup eritrosit membranındaki lipidleri etkiliyerek eritrositleri fiziksel, kimyasal, biyolojik ajanlara duyarlı hale getirir. CAMP faktörü 23500 dalton ağırlığında olan termostabil bir proteindir ve beta hemolizinle duyarlı hale gelen eritrositleri yıkıma uğratar. Test edilecek suş ve *S.aureus* ATTC (American Type Culture Collection) 25923 suşu koyun kanlı agara birbirine 90 derecelik açı ile ve birbirine değmeyecek şekilde çizgi ekim yapılır. Plaklar $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece etüvde inkübe edilir. CAMP olumlu reaksiyon *S. aureus*'un beta hemolizini ile *S. agalactiae*'nin CAMP faktörünün difüzyon bölgesinde üçgen şeklinde artmış bir hemoliz zonu oluşması ile belirlenir (Spellerberg ve Brandt 2009, Edwards ve Baker 2005). Diğer streptokoklarda da nadiren CAMP olumlu suşlar bulunabilir. Bazı grup A streptokoklarda plak anaerobik koşullar altında veya karbondioksitli ortamda inkübe edilirse CAMP testi pozitif olabilir (Bilgehan 2009, Ustaçelebi 1999). GBS'lerdeki CAMP özelliği hem hemolitik hem de non-hemolitik izolatlarında görülür (Koneman ve ark. 2006). GBS izolatlarının %98'inde bu test pozitifdir, fakat CAMP olumsuz mutant türler de vardır. *Corynebacterium* ve *L. monocytogenes* suşları gibi birkaç Gram pozitif basil CAMP faktörü için pozitif olabilir (Özenci 2009).

Hippurat hidrolizi

GBS'ler diğer beta hemolitik streptokokların aksine sodyum hippuratu hidrolize ederler. Bakteri hücreleri içeren bulanık süspansiyon 0,5 ml %1'lik sıvı sodyum hippurat içinde 35°C 'de 2 saat inkübe edilir. GBS'ler sahip oldukları hippuraz enzimi ile sodyum hippuratu glisin ve benzoik asite parçalar. Glisin, ortama ilave edilen ninhidrin ayırıcı ile reaksiyona girerek mor renkli bir bileşik oluşturur. Mor renk sodyum hippuratin hidrolize edildiğini gösterir (Hwang ve Ederer 1975).

GBS'lerden başka D grubu streptokoklarda sodyum hippuratu hidrolize ederler, bunların ayırımı ise eskülin hidrolizi ile yapılır. D grubu streptokoklar %99-100 eskülini hidroliz ederken GBS'ler hidrolize edemez (Edwards ve Baker 2005).

Basitrasin ve trimetoprim-sülfametoksazol direnci

Beta hemolitik streptokoklardan *S.pyogenes* ile GBS'nin ayırt edilmesinde kullanılır. Bakterilerin 0.04 ünite basitrasin ve 1.25 µg trimetoprim-23.75 µg sülfametoksazol disklerine duyarlılıkları incelenir. *S.pyogenes* basitrasin duyarlı, trimetoprim-sülfametoksazol dirençlidir. *S. agalactiae* ise her ikisine de dirençlidir (Bilgehan 2009).

Safıralı eskülinli agar testi

GBS'ler %40 safıralı agarda üreyemezler. Bu test sayesinde D grubu streptokoklardan ayrılırlar. Test edilecek organizma 1-3 koloni % 40 safıralı agara ekilir ve besiyerinin belirgin siyahlanması durumunda test edilen izolatın *S. bovis* veya enterokok olduğunu, GBS olmadığını gösterir (Chuard ve Reller 1998).

Pigment oluşturma

GBS'ler bazı besiyerlerinde pembe, turuncu renk oluştururlar. Kromojenik agar, chromID Strepto B agar (beta hemolitik ve nonhemolitik olan GBS'leri gösterir) veya Granada Agar (sadece hemolitik GBS'leri gösterir) bu besiyerlerindedir (www.cdc.gov 2010).

1. 4. 1. 2. Antijenik Yapı

GBS'lerin hücre duvarı, teikoik asit, lipoprotein ve protein yapıda yüzey antijenlerini içeren primer peptidoglikan tabaka şeklindedir. Lancefield hücre duvarında iki tip karbonhidrat yapıda antijen tanımlamıştır. Bunlar gruba özgü C maddesi ve tipe özgü S maddesidir. GBS'ler için ortak olan C antijeni, Rhamnose-N-acetyl-Glucosamine ve glycerol phosphate'dan oluşur. GBS suşlarının büyük çoğunluğu kapsüllüdür ve karbonhidrat yapısındaki tip spesifik antijenler mikroorganizmanın polisakkarit yapıdaki kapsülüne karşılıktır. Kapsül antijenlerine göre dokuz farklı serotipe ayrılırlar. Bunlar serotip Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII

olup yüksek molek k ağırlıklı polimerlerdir. Bu polisakkaritler glukoz, galaktoz, N-asetilglukozamin, N-asetil n rominik asittir (Koneman ve ark. 2006, Edwards ve Baker 2005).

Hücre duvarı yapısında yer alan protein yapıdaki C antijeni ise ca ve c  olmak üzere iki form içerir. Bunlar suşların spesifikliğini belirler. Bu c antijeni Ib suşlarının tümünde bulunurken tip II suşlarının %60'ında gösterilmiştir. Tip III suşlarında ise nadiren gösterilmiştir. Bu c antijenini içeren suşlar tip Ib/c, Tip II/c şeklinde gösterilir (Main ve Slagle 2000). GBS suşlarının bazılarında R, X, Rib gibi çeşitli protein antijenleri de vardır. GBS'ler, tip spesifik kapsül polisakkarid antijenlerinin ismi ve daha sonra yüzey proteinlerinin ismi yazılarak belirtilir. GBS antijenlerine karşı annede GBS spesifik antikorların yokluğu neonatal GBS hastalığının önemli bir risk faktörüdür (Ferrieri P 1990). GBS tip III suğu neonatal sepsislerin %60'ında, infant menenjitlerinin %80'inde izole edilmiştir (Dillon HC Jr 1987, Lin FY ve ark. 1998).

1.4.2. EPİDEMİYOLOJİ

GBS'ler sıklıkla rektum ve vajen florasında bulunur. 15-45 yaş arasındaki kadınlarda yaygınlığı %5-40 orandadır. Menstrüasyon  ncesi dönemde ve gebelerde bu oran daha da artmaktadır. Kolonizasyon oranının %60'ın üzerine çıktığı durumlarda taşıyıcılık söz konusudur (Ardıç ve Sezer 2003, Söyletir 2008). Farinks kolonizasyonu ise %5 gibi daha düşük oranlardadır (Edwardsve Baker 2005). Kadınlarda genital sistemdeki kolonizasyon sıklığını, coğrafi bölge, ırk, sosyal durum, yaş, parite, gestasyon haftası, partner sayısı, sigara kullanımı, rahim içi araç kullanımı gibi faktörler etkilemektedir (Ardıç ve Sezer 2003, Beitune ve ark. 2005).

Gebelerde vajinal kolonizasyonun esas kaynağının intestinal sistem olduğu düşünülmektedir. Anorektal kolonizasyon beraberinde üretra ve vajen girişinde kolonizasyona yol a tığından gebelikte GBS'ye bağlı bakteriüri daha sıklıkla görülmektedir (Edwards ve Baker 2005, Holms ve Mscini 2000). GBS ile vajinal kolonizasyon genelde asemptomatik olmasına rağmen bazen ağır kolonizasyonlarda vajinit gelişebilmektedir. GBS'lerin seksüel geçişi tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda yüksek oranlarda kolonizasyon olduğunda *N. gonorrhoeae* ile birlikte seksüel geçiş olduğu belirtilmiş. Bazı çalışmalarda ise fazla sayıda cinsel partner olduğunda

yüksek kolonizasyon olduğu gösterilmiştir. Böyle durumlarda erkeklerin boğaz ve genital kültürlerinde GBS bulunmuştur (Koneman ve ark. 2006). Erişkinlerde genital bölge ve gastrointestinal sistemde kolonize olabilen bu mikroorganizma gebe kadınlarda erken doğuma ve perinatal bulaşa neden olabilmektedir. GBS kolonizasyonu aralıklı olabilmektedir. Gebeliğin ortasında GBS ile kolonize olanların 1/3 doğum sırasında kolonize olmadığı, buna karşın başlangıçta kolonize olmayanların %5-15'inin doğum sırasında kolonize olduğu saptanmıştır (Regan ve ark. 1996). Genital sistem kolonizasyonu GBS'nin bebeğe bulaşması açısından önemlidir. Yenidoğanda GBS'nin kolonizasyonu, anneden hematogen ve transplasental yolla veya nadiren hastane infeksiyonu şeklinde olmaktadır. Yenidoğanlar mikroorganizmayı en sık intrapartum olarak kolonize annelerden veya mikroorganizmanın amniyotik sıvıya assendan yolla ulaşması ile alırlar. Membranlar intakt bile olsa perinatal geçiş olabilmektedir (Ardıç ve Sezer 2003, Kadanalı ve ark. 2005). GBS'ler erken membran rüptürüne neden olarak prematüre doğuma zemin hazırlamakta, assendan infeksiyonlar yaparak koryoamniyonite yol açmaktadır (Regan ve ark. 1981). Bebeğin GBS ile kolonizasyon riski, anne kolonize ise artar. Doğumda anneden bebeğe bulaş oranı %75'tir. Maternal genital traktusta yoğun kolonizasyon olması ile yenidoğanda GBS sepsisi gelişimi arasında ilişki olduğu saptanmıştır (Bergaron ve ark. 2000). Yenidoğana infeksiyonun geçmesi mukozalara direkt yayılım, sıyrıklar, skalp monitör yaralanmaları, vaginal sekresyon ve amniyon sıvı aspirasyonu ve umbilikal kordun zedelenmesi sonucunda direkt yolla olabilir. Yenidoğanda kolonizasyon sonrası sıklıkla bakteriyemi gelişir. Hastalığın ciddiyetini gebelik haftası, membran rüptürünün süresi, annede antikör varlığı ve mikroorganizmanın virülansı etkileyebilir (Ardıç ve Sezer 2003).

GBS'ler son trimestir gebelerde vaginal kolonizasyonun yoğunluğuna göre yenidoğanlarda erken ve geç başlangıçlı infeksiyon tablolarına neden olabilmektedir (Brook ve ark. 2001). Yeni doğanlarda ilk 7 gün içinde gelişen hastalıklara erken başlangıçlı hastalık, 7 gün ile 3 ay arasında gelişen hastalıklara geç başlangıçlı hastalık adı verilir. Erken başlangıçlı hastalıklarda en sık saptanan serotipler Ia (%35-40), III (%30) ve V (%15) dir. Serotip V aynı zamanda yetişkin hastalıklarında da en sık saptanan tipdir. İntrapartum antibiyotik profilaksisi uygulamasına başlandıktan sonra, yenidoğan hastalıklarında gerçek anlamda bir azalma görülmüştür (Topkaya ve ark. 2003, Edwards ve Baker 2005).

Erken başlangıçlı hastalık gelişme riskini artıran faktörler

- *Doğum sırasında 38°C ve üzerinde ateş olması
- *Erken doğum (37. gestasyonel haftadan önce)
- *Erken membran rüptürü (18 saatten uzun olduğunda)
- *Annenin gebeliğin herhangi bir döneminde GBS bakteriürisi olması
- *Daha önceki bebekte de erken başlangıçlı GBS infeksiyonu görülmesi
- *Annenin 20 yaşından küçük olması
- *Annenin siyah ırktan olması

Geç başlangıçlı hastalık gelişme riskini artıran faktörler

- *Erken doğum (37. gestasyonel haftadan önce)
- *Annede pozitif GBS kültürü olması olarak sıralanmaktadır. Bunlardan geç başlangıçlı hastalık gelişme riskini artıran faktörler hala tam olarak anlaşılamamıştır (www.cdc.gov 2010).

GBS kolonizasyonu olan annelerin intraamniyotik infeksiyon, preterm membran rüptürü ve preterm doğum riski vardır. Postpartum endometritlerin %20'sinde, sezeryan sonrası bakteriyemilerin %25'inde, gebelik dönemi ve sonrasındaki asemptomatik bakteriürilerin %25-30'unda etken GBS'dir (Suara ve ark. 1994, Brook ve ark. 2001, Main ve Slagle 2000).

Erişkinlerde GBS infeksiyonu insidansı yaş ile doğru orantılıdır. Erişkinlerde en önemli risk faktörleri diabetes mellitus ve daha az oranlarda karaciğer yetmezliği, alkolizm, serebrovasküler bozukluklar, malignensi, Human Immunodeficiency Virus (HIV) infeksiyonu, steroid kullanımı ve splenektomi gibi nedenlerdir (Edwards ve Baker 2005, Holm ve Mascini 2000).

1.4. 3. VİRÜLANS FAKTÖRLERİ

Kapsül

En önemli virülans faktörlerinden biridir. Kapsül glikoz, galaktoz, N-asetil glikoz amin, N-asetil nörominik asit (sialik asit) komponentlerinden oluşur. GBS'ler dokuz kapsül serotip içerir. Bunlar Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII ve VIII dir.

Bunlardan tip Ia, Ib, II, III, V önemli kapsüller serotipleri olup erken başlangıçlı infeksiyonlardan sorumludur (Takahashi ve ark. 1998).Tipe spesifik antikorlar bu immünojenik moleküllere karşı etkili olarak infeksiyona karşı konağı korurlar. Kapsüller polisakkarit, aktive kompleman C3b'nin mikroorganizma üzerine yapışmasını engeller. Bu nedenden dolayı alternatif yol aktive olamaz (Marques ve ark. 1992, Brook ve ark. 2001).

Kapsül immün tanımayı azaltır, opsonofagositik temizlenmeyi önler, nötrofillerin toplanmasını geciktirir (Doran ve Nizet 2004). İnvaziv infeksiyonlardan sıklıkla kapsüllü suşlar izole edilmektedir. Maternal antikapsüller antikor seviyesinin düşüklüğü ile invaziv GBS infeksiyonu arasında anlamlı ilişki gösterilmiştir (Spellerberg 2000).

C5a peptidaz

ScpB proteini olup *scpB* geni tarafından kodlanır. Bir yüzey proteini olan C5a peptidaz, kemotaktik bir kompleman proteini olan C5a'yı C-terminalinden parçalar ve nötrofillerin infeksiyon bölgesine kemotaksisini, ekstraselüler matrikse bağlanmayı, epitelyal aderans ve invazyonu engeller (Doran ve Nizet 2004, Spellenberg 2002, Bohnsack ark. 1991). C5a peptidaz maksimum aktivite için GBS kapsülünün varlığına gereksinim duyar. Grup A ve grup G beta hemolitik streptokoklar tarafından da üretilmektedir (Koneman ve ark. 2006).

Beta- hemolizin/sitolizin

CylE proteini olup *cylE* geni tarafından kodlanır. Hücre membranlarında por oluşturur. Apoptozisi indükler. Hücresel invazyona katkıda bulunur. Nitrik oksit ve sitokin salınımını uyarır. Epitelyal bariyerlere penetrasyon ve fagositoza dirençten sorumludur. Pulmoner infeksiyonlarda etken olan GBS'lerde önemli bir virülans faktörüdür. GBS'nin önemli klinik prezentasyonlarından biride neonatal pnömonidir. Yapılan çalışmalar hemolizinin aslında bir sitolizin olduğunu ve pulmoner epitel üzerine sitopatik etkisi nedeniyle pnömoniye yol açtığını göstermiştir (Patterson ve Hafeez 1976, Gibson ve ark. 1999, Nizet ve ark. 1996).

Lipoteikoikasit

Lipoteikoik asit, GBS'nin insan hücrelerine tutunmasını ve monositlerden sitokinler salınmasını sağlayan bir yüzey komponentidir. Doku kültürlerinde insan embriyosu beyin hücrelerine ve plsentta hücrelerine sitotik etkili olduğu bulunmuştur (Spellerberg 2002, Nealon ve Mattingly 1985).

Penisilin bağlayan hücre yüzey proteini (PBP1a)

PBP1a GBS'lerin fagositik hücrelerde intrasellüler olarak parçalanmasını engellemektedir (Jones ve ark. 2003).

Hyalüronidaz

Hyalüronik asit, konnektif dokunun majör komponentidir. Hyalüronidaz bu yapıdaki glikozit bağları parçalar. Bu etkinin patogenezdaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır (Spellerberg 2000). Fetal dokuda, plsentada, amniyotik sıvıdaki yüksek oranda bulunan hyalüronik asit'i etkileyerek infeksiyonun yayılmasını kolaylaştırır (Pritchard ve ark. 1994).

CAMP faktörü

CAMP proteini *cfb* geni tarafından kodlanır. Membran hasarı oluşturur. Ayrıca IgM ve IgG'nin Fc kısımları ile etkileşime girer (Doran ve Nizet 2004, Spellerberg 2000).

Hücre yüzey proteinleri

R, Rib, BPS, c bunlardan bazılarıdır.

C protein

Alfa ve beta olmak üzere 2 komponentten meydana gelir. C antijeni insan servikal hücrelerine karşı etkilidir ve fagositozdan korur (Bolduc ve ark. 2002, Payne ve ark. 1987).

1.4.4. PATOGENEZ

GBS'ler neonatal ve perinatal periyotta majör hastalık nedenidir. Genital sistem taşıyıcılığı bakterinin bebeğe bulaşması yönünden önemlidir. Gebelerde GBS'nin asemptomatik vajinal kolonizasyon oranı %4.6-40.6 arasında olup, maternal ve neonatal infeksiyonların en önemli nedenidir. B grubu streptokoklar, son trimester gebelerdeki vajinal kolonizasyonun yoğunluğuna göre yenidoğanda da önemli infeksiyonlara neden olabilmektedir. GBS'lerin patojenitesi, yüzey yapısındaki hücrelerden salınan biyolojik aktivitesi yüksek toksinler ve enzimlere dayanır (Jones ve ark. 2006, Koneman ve ark. 2006, Brook ve ark. 2001).

GBS'ler vajina epiteli, plasental membranları, solunum yolu epiteli, kan-beyin bariyeri endoteli gibi çeşitli insan hücrelerine tutunabilmektedir. Vajinal mukozada maksimum aderans, asidik pH'da meydana gelir (Tamura ve ark. 1994). Epitelyal hücrelerle düşük afiniteli etkileşim lipoteikoik asit, yüksek affiniteli etkileşim ise hidrofobik GBS yüzey proteinleri ile ilişkili bulunmuştur. GBS'ler epitelyal hücrelere tutunurken ekstraselüler matriks komponentleri olan fibronektin, fibrinojen ve laminine bağlanırlar. Bu proteinler konak hücrede integrinlerle etkileşime girerek mukozal kolonizasyon gerçekleşir. GBS'ler mukozal kolonizasyonda immobilize fibronektine bağlanırlar. Çünkü çözünebilir fibronektinin fagositler tarafından tanınmada opsonin özelliği taşır (Doran ve Nizet 2004).

Doku kültürlerinde GBS'lerin koriyonik epitel hücrelerini invaze ettiği, ancak amniyotik hücreleri etmediği görülmüştür (Winram ve ark. 1998). GBS'ler plasental membranları geçerken, lokal olarak oksijen radikalleri ve prostaglandinE2 oluşumuna sebep olurlar. Sonuçta plasental membranların rüptürüne neden olarak preterm eylemi tetikler. İnfekte amniyotik veya vajinal sıvının aspirasyonu yenidoğanın akciğerlerinde GBS infeksiyonunun başlamasına neden olur. Buradan organizma dolaşım sistemine geçer ve diğer organ ve dokulara ulaşır. İntraselüler invazyon, direkt sitolitik etki, yenidoğanın verdiği inflamatuvar cevap sonucu yenidoğan GBS hastalığı gelişir (Doran ve Nizet 2004).

GBS ekstrasellüler invazyonu virülans ile korele bulunmuştur. Bakteriyemi gelişmiş infantlardan izole edilen suşların asemptomatik kadınların vajinal

örneklerinden izole edilenlere göre epitelyal hücreleri daha fazla invaze ettiği görülmüştür (Valentin–Weigand ve Chhatwal 1995).

CAMP faktörü tavşanlara vasküler injekte edildiği zaman toksik etki gösteren ekstrasellüler bir proteindir (Skalka ve Smola 1981).Yapılan çalışmalarla CAMP faktörünün, hedef membranı oligomerize ederek por oluşturduğu ve hücre lizisini tetiklediği gösterilmiştir (Lang ve Palmer 2003).

GBS'ler kan dolaşımına ve daha derin dokulara ulaştığında organizmanın temizlenmesi için nötrofil ve makrofajları içeren immünolojik cevap gelişir. Bunun için bakterinin spesifik antikorlar veya serum komplemanı tarafından tanınması gerekir (Doran ve Nizet 2004).

Yenidoğanların özellikle GBS invaziv hastalıklarına karşı yatkın olmaları, fagositik hücre fonksiyonlarında, spesifik anti-GBS Ig miktarında ve klasik veya alternatif kompleman yolundaki yetersizlikten kaynaklanmaktadır (Doran ve Nizet 2004).

Streptokoklar ekstraselüler patojenler olmalarına rağmen fagolizozomda uzun süre yaşadığı gösterilmiştir. H₂O₂ tarafından öldürülmeye katalaz pozitif *S. aureus*'dan 10 kat daha dirençlidir (Wilson ve Weaver 1985). GBS'nin fagosit içinde yaşamasını sağlayan diğer bir faktör de turuncu karotenoid pigment üretimidir. Bu pigment hemolitik streptokoklarda görülen bir özelliktir. Genetik olarak *cyl* operonuyla ilişkilidir. Bu operon GBS beta hemolizini kodlar. Karotenoidin serbest radikalleri temizleme özelliği vardır. H₂O₂ ve O₂'yi nötralize eder (Liu ve ark. 2004).

Gram pozitif bakterilerde *rpoE* geni bulunur. Bu gen RNA polimerazın bir alt ünitesi olan delta peptidi kodlar. Delta peptid GBS'lerin fagositler tarafından öldürülmeye karşı direncinden ve konakta yaşamını sürdürülmesinde gereklidir. Yenidoğan ratlarla yapılan bir çalışmada GBS enfeksiyonlu ratlarda sepsis gelişimi için *rpoE* geninin gerekli olduğu görülmüştür (Jones ve ark. 2003).

Genital sisteminde GBS kolonizasyonu olan annelerden doğan bebeklerin % 50'si GBS ile kolonize olur. Kolonize olan yenidoğanların %98'i asemptomatiktir,

%1-2'sinde ise ilk haftalarda sepsis, pnömoni ve menenjit gibi neonatal infeksiyonlar görülür (Schuchat 2001).

Yetişkin kadınlarda GBS ile vajinal kolonizasyon oranı ve kolonize gebelerin yenidoğanlara bu mikroorganizmayı bulaştırma riski yüksek olmasına rağmen az sayıda yenidoğanda invaziv infeksiyon görülmesi, belirli suşların neden olduğu ya da konağın immün sistemindeki bir defekt sonucu oluşan infeksiyonda klinik belirtilerin ortaya çıktığı düşünülmektedir (Söyletir 2002). Anorektal ve vajinal bölgelerinden GBS izole edilen gebelerden doğan bebeklerde, vertikal geçişin ve bu yolla yenidoğanın enfekte olma riskinin, annedeki GBS kolonizasyonunun yoğunluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ardıç ve Sezer 2003). GBS ile enfekte olan yenidoğanların annelerinin serumlarında GBS'ye karşı antikor titrelerinin düşük olduğunun saptanması hastalık patogenezi açıklamaya katkıda bulunmaktadır (Schuchat 1998). Yenidoğanda ilk kolonizasyon genellikle membran rüptüründen sonra gelişir. Annenin vajeninde ve rektumunda bulunan mikroorganizmalar asendan yolla koryoamniotik membrandan geçerek koriyoamniyonite yol açabilir. Koriyoamniyonit preterm eylemin ve erken membran rüptürünün (EMR) önemli nedenlerinden biridir. EMR, doğum sırasında fazla sayıda vajinal muayene yapılması, özellikle uzun süreli internal fetal monitorizasyon, bakteriyel vajinozis, doğum kanalının GBS ile kolonize olması, üriner sistem infeksiyonu intraamniyotik infeksiyon riskini artırır. Doğumdan sonraki ilk hafta içerisinde gelişen infeksiyonlarda patojen mikroorganizma, bebeğe genellikle doğum eylemi sırasında annenin vajinal ve/veya rektal florasından bulaşır. Nadiren doğumdan önce annede gelişen bakteriyemi sırasında bebek hematogen yolla enfekte olabilir. Ayrıca doğumdan sonra yenidoğan veya infant çevresel bakterilerle enfekte olabilir (Cengiz 2007).

GBS infeksiyonlarına karşı esas koruyucu faktörün kapsül polisakkaritine karşı oluşan antikorlar olduğu bilinmektedir. Yenidoğanda GBS infeksiyonlarına duyarlılıkta spesifik antikorların yetersizliğinin yanında, diğer koruyucu mekanizmalardaki yetersizliklerin de rolü vardır. Kapsül yapısındaki siyalik asit hastalığın patogeneziinde önemlidir. Bu madde özellikle tip Ia ve III kökenlerinde komplemanın alternatif yoldan aktivasyonunu inhibe ederek opsonitofagositoza karşı dirence yol açmaktadır. Yenidoğanların infeksiyona karşı duyarlılığında,

anneden geçen antikor düzeyindeki düşüklük önemlidir. Bunun yanısıra, bakterinin opsonitofagositozu için komplemanın ve opsoninlerin de yeterli olması gerekir (İlhan ve ark. 1997, Suara ve ark. 1994, Bilgehan 2000). Kapsüler polisakkarit aktive faktör kompleman C3b'nin bakteriyel yüzeye bağlanmasını inhibe ederek alternatif kompleman yolunun aktivasyonunu engeller. Ayrıca GBS'lerin ürettiği sitolitik özelliği olan hemolizin ve bir yüzey proteini olan C proteini koruyucu immün yanıtı neden olmaktadır. C proteini β bileşeninin IgA'ya nonspesifik olarak bağlanarak opsonofagositozu engellediği tahmin edilmekle beraber işlevi hala tam olarak anlaşılammıştır. Grup A streptokok (GAS) gibi, GBS'de lökositlerin infeksiyon bölgelerine toplanmasını engelleyen ve hiyalüronidaz, proteaz ve nükleaz aktiviteleri olan bir C5a peptidaz barındırır, buna rağmen bu moleküllerin patogenezdaki rolleri yeterince açıklanamamıştır (Efstratiou 2006).

GBS infeksiyonu erişkinlerde yaşla orantılı olarak artmaktadır. Bunun nedeni azalmış immünite ve altta yatan predispozan hastalıklar olabilir (Suara ve ark. 1994, Edwards ve Baker 2005).

1. 4. 5. KLİNİK

GBS'ler 1938'de insanlardaki patojenler arasında ilk sırada bahsedilirken, 1970'lerde neonatal sepsis, pnömoni, menenjitin majör patojeni olarak tanımlanmıştır (Franciosi 1973).

GBS'ler neonatal ve perinatal periyotta majör hastalık etkenidir. Gebe ve gebe olmayan kadınlarda GBS kolonizasyonu %4-40 arasında olup, bu oranın coğrafi bölgelere göre farklılık gösterdiği anlaşılmıştır (Bayer 1976, Anthony 1978, Regan 1991, Dillon 1982, Boyer 1983). Gebe kadınların vajina ve rektumunda %10-35 oranında kolonizasyon bulunmuştur. Bu oran kadınlarda %60'ın üzerine çıktığında aralıklı olarak taşıyıcılıktan bahsedilmiştir (Hansen ve ark. 2004, Regan ve ark. 1991).

Neonatal GBS hastalığı yaşamın ilk haftasında görülen erken başlangıçlı ve yaşamın ilk haftası ile ilk üç ayı görülen geç başlangıçlı olmak üzere iki şekilde görülmektedir (Schauf ve Hlaing 1976).

1. 4. 5. 1. Erken Başlangıçlı Yenidoğan GBS İnfeksiyonu

Doğumdan sonra ilk 6 gün içinde yenidoğanda gelişen infeksiyon erken başlangıçlı neonatal infeksiyon (EBYİ), 7 gün –3 ay içinde gelişen infeksiyonlar ise geç başlangıçlı neonatal infeksiyon (GBYİ) olarak tanımlanmıştır (Edwards ve Baker 2005). Prematüre bebekler EBYİ'den en fazla etkilenen gruptur. Gebelik haftası 37'nin altında olarak doğan bebeklerdeki semptomatik infeksiyon riski, miadında doğanlara göre 15 kat daha fazladır (Suara ve ark. 1994). Taşıyıcı kadınlarda kapsül antijenine karşı IgG antikoru oluşmaktadır. Bu antikoru bebeğe geçişi, ancak hamileliğin son döneminde yeterli düzeye ulaştığından prematüre doğan bebeklerde infeksiyon riski yüksektir (Berkiten 2002).

EBYİ perinatal veya inutero GBS'nin kazanılmasıyla insidansı 1000 canlı doğumda %0.7-3.7 arasında görülmektedir (Edwards ve Baker 2005). EBYİ'lerin çoğu kolonize annenin bebeğine doğum esnasında bulaşmaktadır. Bir kısmı ise bebek uterus içindeyken asendan yolla veya EMR sırasında bulaşmaktadır. Doğumun ilk beş günü içinde ortaya çıkan EBYİ'lerin yarısından çoğu miyadında doğan bebeklerde görülmekte ve mortalite oranı %5-10 arasında seyretmektedir. Düşük doğum ağırlıklı bebeklerde ve prematürelere ise mortalite oranı çok daha yüksekler çıkmaktadır (Edwards ve Baker 2005). Olguların %90'ı doğumu takiben ilk 24 saatte, %95'i ilk üç günde görülür (Apgar ve ark. 2005).

EBYİ 1990'da 1000 canlı doğumda 2 iken, 2001-2002 yıllarında %0.6, 2004 yılında ise %0.3 olup, prevalansı giderek azalmaktadır (Law ve ark. 2005). EBYİ'lerin %35-40'ında serotip Ia, %30'unda serotip III, %15'inde serotip V etkindir. Tip III GBS erken dönem infeksiyonlarının 1/3'ünü oluştururken, geç dönem infeksiyonlarının %90'ından sorumlu olduğu bildirilmektedir. Her iki peryottada menenjit olgularında en sık etken serotip III olarak gözlemlenmiştir (Ardıç ve Sezer 2003).

Yeni doğanlarda klinik sepsis, menenjit, pnömoni, sellülit, osteomyelit ve septik artrit şeklindedir (www.cdc.gov 2010). EBYİ olgularının %60'ında bakteriyemi, %30'unda pnömoni ve %10'unda menenjit şeklinde seyreder (Mandal ve Mayon White 1984).

1. 4. 5. 2. Geç Başlangıçlı Yenidoğan GBS İnfeksiyonu

Yaşamın 7. günü ile 3. ayı arasında (ortalama 3. 4. haftalar) görülür. GBYİ’de yer alan mekanizmalar erken başlangıçlı formun tersine henüz tam anlaşılammıştır. EBYİ’lerden farklı olarak maternal obstetrik komplikasyonlar daha az görülür. Bu infeksiyonların yarısı kolonize doğum kanalından kaynaklanırken diğer yarısı doğumdan sonra anneden, bebeğin bakımından sorumlu diğer kişilerden veya nozokomiyal bulaştan kaynaklanır (Koneman ve ark. 2006, Edwards ve Baker 2005). Erken dönemde saptanan GBS infeksiyonlarına oranla daha nadirdir. 1000 canlı doğumda 0.5-1.8 oranında görülür (Koneman ve ark. 2006).

GBYİ’ler de görülme sıklıklarına göre menenjit (genellikle bakteriyemi ile birlikte), osteomyelit, septik artritir. GBYİ’ler hangi klinik formda olursa olsun %90’ından serotip III sorumludur (Söyletir 2008). Menenjitli çocuklarda nörolojik sekeller %25-50 gibi yüksek bir oranda görülür (Topkaya 2010). GBYİ’lerde mortalite oranı ise %10-15’tir (Main ve Slagle 2000).

1. 4. 5. 3. İleri Dönem İnfeksiyonlar

Yaşamın 3. ayı ile 18 yaş arasında oluşur. Bunların geç başlangıçlı infeksiyon olarak adlandırılması gerektiği ileri sürülmüştür. Bu infeksiyonlar genellikle çok düşük doğum ağırlıklı ve uzun süre hastanede yatan komplikasyonlu prematürelde görülmektedir. Sağlıklı infantlarda gizli bakteriyemi şeklinde ortaya çıkabilir. GBS’e bağlı ileri erken bebeklik infeksiyonu tanısı alan bebekler, konjenital kalp hastalığı, immün yetmezlik ve HIV infeksiyonu yönünden değerlendirilmelidir (Arslanoğlu ve Kültürsaray 2001, Ardıç ve Sezer 2003).

1. 4. 5. 4. Erişkinlerde GBS İnfeksiyonları

GBS’ler erişkinlerde, bakteriyemi, pnömoni, artrit, menenjit, osteomyelit, endokardit, deri, yumuşak doku, idrar yolu infeksiyonlarına neden olabilir. Erişkin infeksiyonlarında mortalite %30-35 oranlarında oldukça yüksektir. Erişkin infeksiyonlarının %70’i serotip Ib, II, V ile olmaktadır. Erişkin GBS menenjitlerde sıklıkla serotip II etkindir (Söyletir 2008).

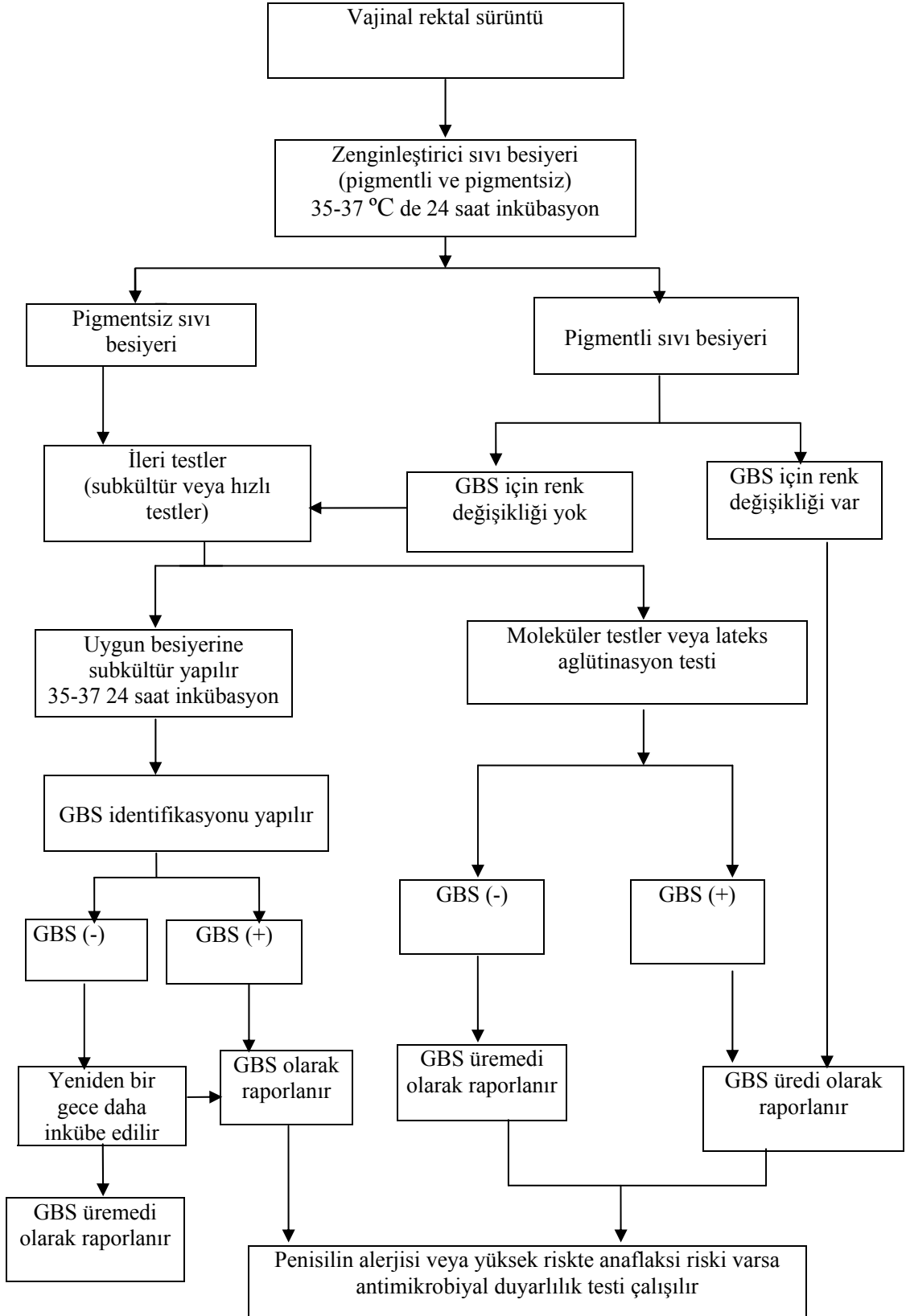
GBS postpartum dönemde önemli bir infeksiyon etkenidir. Postpartum endometritlerin %20'sinden, sezeryan sonrası bakteriyemilerin %25'inden, gebelik dönemi ve sonrası asemptomatik bakteriürilerin %30'undan GBS sorumludur (Suara ve ark. 1994, Brooks ve ark. 2001, Main ve Slagle 2000). Gebelerde oluşan bakteriürilerin en sık rastlanan etkeni *Escherichia coli*'den sonra GBS'ler olup, intestinal sistemden anorektal taşıyıcılık vasıtasıyla vajinal, servikal ve üretral kolonizasyona neden olarak gebelerde üriner sistem infeksiyonlarını oluşturdukları ileri sürülmektedir (Wessels ve Kasper 2004). Doğurganlık yaşındaki kadınlar haricinde yetişkin ve çocukluk çağı infeksiyonları erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir (Efstratiou ve ark. 2006).

1. 4. 6. TANI

GBS'lerin tanısında konvansiyonel yöntemler, serolojik yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. GBS'lerin saptanmasında kültür altın standarttır. GBS'ler, zenginleştirilmiş besiyerlerinde 24 saatlik inkübasyon sonrası büyükçe koloniler oluştururlar. β hemoliz zonu çok dardır nadiren yoktur. CDC 35-37 haftalık gebelerde GBS taramasında antibiyotik içeren seçici sıvı besiyerlerinin kullanılmasını önermektedir. Primer kültürden elde edilen izolatlar geleneksel yöntemlerle koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz testi ve Lancefield gruplama ile tanımlanırlar. Lancefield gruplandırma ile yeterli identifikasyon sağlanamıyorsa, ticari bir tanımlama sistemi kullanılarak tam biyokimyasal tanımlama elde edilebilir (Spellerberg ve Brandt 2011, Verani ve ark. 2010, Schuchat 1998, Topkaya 2010, Efstratiou ve ark. 2006).

CDC'nin önerileri doğrultusunda kültür için örnekler rektovajinal olarak alınır. Vajinal örnekler, vajinanın alt 1/3'ünden, rektal örnekler ise anal sfinkterden 2cm rektuma doğru ilerletilerek ve 360 derece döndürülerek steril pamuklu eküvyon ile alınır (Apgar ve ark. 2005). Rektovajinal alınan kültür sonuçları, yalnızca vajinadan alınan kültürlerle karşılaştırıldığında GBS izolasyon şansının %5-27 arttığı gösterilmiştir (Arslanoğlu ve Kültürsaray 2001).

Çizelge 1. 2. Prenatal GBS kültürü için CDC'nin 2010'da önerdiği laboratuvar algoritması (www.cdc.gov 2010).



GBS yenidoğan sepsisinin en sık nedenidir ve Lancefield B grubu antijeni taşıyan tek türdür. Bu organizmayı tanımlamak için genellikle Lancefield gruplama kullanılır, ayrıca ön identifikasyon için CAMP testi ve hippurat hidrolizi kullanılabilir. *Streptococcus porcinus* ile karışabilir çünkü bu tür “grup E, P, U veya V” antijenlerini taşır aynı zamanda ticari kit sistemlerinde B grubu antijenleri ile çapraz reaksiyonlar vermektedir (Efstratiou ve ark. 2006).

Vajinal ve rektal bölgeden alınan sürüntü örnekleri için seçici besiyerleride kullanılabilir. Taşıma besiyerinde bulunan örnekler, içinde nalidiksik asit, gentamisin, oksolinik asit, kolistin içeren Todd-Hewitt sıvı besiyerine veya uygun ticari besiyerleri olan LIM veya SBM sıvı besiyerine ekilir. Selektif sıvı besiyerinde 18-24 saat inkübe edilir ve bu sürenin sonunda %5 koyun kanlı agar plağına veya GBS kromojenik agara pasaj yapılır. 24 saatlik inkübasyonun sonucunda üreme olmamışsa plak 24 saat daha bekletilir (Schuchat 1998). Seçici besiyeri kullanımı ile izolasyon şansı %50 civarına çıkmıştır. Seçici besiyerleri, üremeye çalışan flora mikroorganizmalarını inhibe ederler (Arslanoğlu ve Kültürsaray 2001).

1. 4. 6. 1. Konvansiyonel Yöntemler

GBS’lerin mikrobiyolojik özellikler bölümünde bu testler detaylı olarak anlatılmıştır. Bunlar;

- Basitrasin ve Trimetoprim-Sülfametoksazol direnci
- CAMP testi
- Pigment oluşturma
- Hippurat hidrolizi
- Safralı eskülinli agar testi

1. 4. 6. 2. Serolojik Tanımlama

Bakteri hücre duvarındaki antijenler belirlenerek GBS’lerin gruplandırılması ve tiplendirilmesi yapılır. Bu antijenler kapiller presipitasyon, karşıt immün elektroforez (CIE), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirek immünofloresan (IIF), stafilokoksik koaglütinasyon ve lateks aglütinasyon testleridir (Main ve Slagle 2000, Bilgehan 2009).

Lateks aglütinasyon testi 10 dakikada sonuç verebilen antijen saptama yöntemlerindedir. Gold standart olan kültürden sonra uygulanırsa %100'e yakın duyarlılık ve özgüllük gösteren mükemmel bir doğrulayıcı testtir. Serotipleme geleneksel olarak GBS'yi sınıflandırmak için kullanılan temel yöntemdir. Tip spesifik kapsüller polisakkarid antijenleri ile GBS Ia, Ib, II-VIII olmak üzere dokuz farklı serotipe ayrılmıştır, ayrıca serolojik olarak faydalı olabilecek C, R ve X olmak üzere üç protein antijeni daha vardır. Yenidoğan menenjitte de dâhil olmak üzere dünya çapında birçok infeksiyondan sorumlu olan serotip III suşları özel bir öneme sahiptir (Beitune ve ark. 2005, Efstratiou ve ark. 2006). Lateks aglütinasyon tekniğinde, grup spesifik antiserumlara bağlanmış lateks (polistren) partikülleri ilgili antijenlere bağlanarak görülebilir lateks partiküllerine döner (Facklam ve ark. 1979, Lue ve ark. 1978). Bazı *S. porcinus* suşları Lancefield grupB'ye ait olup *Streptococcus* grupB lateks ile pozitif reaksiyon verir (Schlegel ve Bouvet 2000).

Çizelge 1. 3. GBS'lerin biyokimyasal özellikleri

Koyun kanlı agarda β -hemoliz	(+), Bazıları nonhemolitik
Basitrasin duyarlılığı	(-)
CAMP Reaksiyonu	(+)
PYR testi	(-)
Arjinin hidrolizi	(+)
Voges Proskauer reaksiyonu	(-)
Hippurat hidrolizi	(+)
Beta galaktozidaz aktivitesi	(-)
Riboz	(+)
Sorbitol	(-)
Trihaloz	(+)

Günümüzde selektif besiyeri içeren sıvı kültür vasatı kullanarak antenatal tarama kültürü yapmak anogenital GBS kolonizasyonunun tespiti için altın standart yöntemdir. Hızlı testler geliştirilmiştir fakat özgüllük ve duyarlılıkları düşük olduğu için kültür yönteminin yerine geçememişlerdir. Bu testler günümüzde ABD'de-

kullanılmakla birlikte, Avrupa'da kullanımı sınırlıdır. Bu testlerden biri ürogenital örneklerde *S. agalactia*'nın grup B antijenlerini doğrudan saptamaya yöneliktir. Aynı şekilde sözkonusu testlerinin BOS'da antijen saptama duyarlılığı da düşüktür (%30). BOS'da Gram boyamanın duyarlılığı bu testlere göre daha yüksektir (Efstratiou ve ark. 2006, Eren Topkaya 2010).

1. 4. 6. 3. Moleküler Tanımlama

Sonuçların kısa sürede elde edilmesi ve doğum sırasında vajinal kolonizasyonun gösterilmesine imkân vermesi moleküler yöntemlerin büyük avantajlarıdır. GBS spesifik PCR temelli testler yüksek duyarlılığa sahiptir, ancak karmaşık prosedürler gerektirdiklerinden klinik tanı için kullanılabilir nitelikte değildirler. Light Cycler teknolojisinin kullanıldığı hızlı bir test yöntemi ile gebelerin rektovajinal sürüntü örneklerinde GBS nükleik asitlerini tespit eden real-time PCR ile GBS *cfb* geni gösterilebilmektedir. Bu yöntemle birkaç saat içinde sonuç alınabilmektedir. Bu testin duyarlılık ve özgüllüğü (sırasıyla %94 ve %95.9) kültür ile yapılan değerlendirmeye yaklaştığı için GBS'lerin saptanmasında kültüre alternatif hızlı bir yöntem olarak gösterilmektedir (Eren Topkaya 2010, Efstratiou ve ark. 2006, Özenci 2009).

1. 4. 7. KORUNMA

Anne ve çocuk sağlığı hizmetlerinde önemli bir yeri olan doğum öncesi bakım hizmeti, temelde koruyucu bir sağlık hizmetidir. Doğum öncesi bakım hizmeti ile infeksiyon yönünden risk altında olan annelerin belirlenmesi, hastalık belirtilerinin erken dönemde tespit edilmesi ve gereken önlemlerin alınması, doğumların sağlıklı koşullarda yapılması komplikasyonlara bağlı anne-bebek hastalık ve ölüm hızlarını azaltır (Taşkın 2003).

GBS infeksiyonlarının önlenmesi için kemoproflaksi ve immünoproflaksi uygulanabilir. Kemoproflaksi gebeye veya yenidoğana uygulanır. Gebelere antibiyotik antenatal dönemde veya doğum sırasında uygulanırken, yenidoğana doğum sırasında uygulanır (Edwards ve Baker 2005). Perinatal GBS geçişini azaltmak için bir diğer yöntemde doğum başladığında vajinal dezenfektanların kullanılmasıdır. Bu amaçla klorheksidin kullanılmıştır. Olgu sayısı az olduğundan bir

sonuç elde edilememiştir. Vajinal dezenfektanlar sistemik antimikrobiyalardan daha az kullanıldıklarından direnç gelişimi de daha az görülür (Schuchat 1999).

1. 4. 7. 1. Kemoproflaksi

GBS taşıyıcı annelerden doğan bebeklerin % 29-70'i GBS'yi vertikal yolla almaktadır. Vertikal geçişi, dolayısıyla yenidoğan infeksiyonlarını önlemek üzere immünoproflaksi ve kemoproflaksi protokolleri oluşturulmuştur (Gökalp ve ark. 1986 ve Balatlı ve ark. 1989). GBS infeksiyonlarına bağlı morbidite ve mortaliteden korunmak için antimikrobiyal proflaksi ile yenidoğan ve anne infeksiyonlarının önlenmesi gerekir (Gil ve ark. 1999). Yapılan çalışmalar intrapartum kemoproflaksinin erken başlangıçlı neonatal GBS infeksiyonu insidansını azalttığı göstermiştir (American Academy of Pediatrics 1997). İntrapartum antibiyotik profilaksisi ABD'nin bazı bölgelerinde gebeliğe bağlı invaziv GBS hastalığı sıklığını %21 azaltmıştır (Schrag ve ark. 2000). Antepartum proflaksi ise rekolonizasyon nedeniyle genelde başarısız olduğu için önerilmemektedir. Bu nedenle genital GBS kolonizasyonu antepartum dönemde tedavi edilmemelidir, sadece bakteriüri varsa tedavi edilmelidir (Shet ve Ferrieri 2004).

CDC 1996 yılında, ACOG ve Amerikan Pediatri Akademisi'nin (AAP) onayı ile erken neonatal GBS infeksiyonundan korunma ilkelerini yayınlamıştır. Buna göre 35-37. haftada tüm gebelere rektovajinal kültür yapılması ve kolonize olan gebelere intrapartum antibiyotik profilaksisi uygulanması veya GBS kültür sonucu bilinmiyor ise ve risk faktörü varsa intrapartum kemoproflaksi yapılması önerilmektedir (Gil ve ark. 1999). CDC, profilakside penisilinG veya ampisilini önermektedir (www.cdc.gov 2010). Beta-laktam antibiyotiklere alerjisi olan hastalara önerilen alternatifler ise klindamisin ve eritromisindir (Karakuş ve ark. 2007).

ACOG, doğum sırasında antibiyotik proflaksisi uygulanması gereken hastaları belirlemek için taramaya dayalı yaklaşım ve riske dayalı yaklaşım olmak üzere iki yaklaşım önermektedir (Glezen ve Alpers 1999).

Taramaya dayalı yaklaşım:

Gebeliğin 35-37. haftalarında rektovajinal sürüntü örnekleri alınır, selektif sıvı besiyerine ekilir. Prenatal kültürde GBS saptananlarda intrapartum profilaksi verilir (Edwards ve Baker 2005).

Riske-dayalı yaklaşım:

- Daha önce GBS infeksiyonu geçirmiş bebek öyküsü,
- Gebeliği sırasında GBS bakteriürisi,
- 37 haftadan erken doğum,
- Membran rüptürü (18 saatten uzun süren),
- Doğum sırasında vücut sıcaklığının 38°C'nin üzerinde olanlara doğum sırasında antibiyotik profilaksisi verilir (Schuchat 2001).

Antibiyotik profilaksisinin GBYİ olgularında, GBS ile ilişkili mortaliteye etkisi yoktur (Schuchat 1999).

Doğumda anneye antibiyotik tedavisi olarak intravenöz penisilinG başlangıçta 5 milyon ünite, sonra doğum oluncaya kadar her 4 saatte bir 2.5 milyon ünite verilir. Alternatif olarak ampisilin başlangıçta 2g iv, sonra doğum oluncaya kadar 4 saatte bir 1g iv verilebilir. Ancak daha dar spektrumlu olduğundan ve invitro aktivitesi daha iyi olduğundan penisilin tercih edilir. Penisilin allerjisi olduğunda klindamisin doğum oluncaya kadar 6 saatte bir 900 mg iv önerilir ancak klindamisine dirençli suşlar olabileceğinden birinci kuşak sefalosporinlerden sefazolin 2g iv verilebilir (Edwards ve Baker 2005). Eğer klindamisin veya eritromisine karşı direnç varsa doğuma kadar 12 saatte bir 1g vankomisin tedavisi önerilmektedir (Shet ve Ferrieri 2004).

Risk grubundaki yenidoğanlara postnatal dönemde penisilin profilaksisi uygulanmakta olan bir yaklaşımdır. Bu yöntem EBYİ riskini azaltmasına rağmen, GBYİ riskini azaltmamaktadır (Schuchat 1999).

1. 4. 7. 2. İmmünoproflaksi

GBS'lerin kapsüler polisakkaritlerine karşı gelişen antikorlar bu mikroorganizma ile meydana gelen infeksiyonlardan korunmada önemlidir. EBYİ geçiren yenidoğanlardaki antikor titresinin sağlıklı yenidoğanlara göre düşük olduğu gösterilmiştir (Schuchat 1999). Sık görülen serotipler için saflaştırılmış polisakkarit aşılar, bazı polisakkaritler yeterince immunojen olmadığından konjuge aşılar geliştirilmiştir (Edwards ve Baker 2005). İkinci trimesterde tetanoz aşısı ile GBS aşısı da uygulandığında erken ve geç başlangıçlı neonatal hastalıktan korunmak için yeterli miktarda antikor anneden bebeğe geçer (Schrag 2002). Konjuge aşılar tetanoz toksoidi yüksek immünojenitesi, güvenilirliği nedeniyle tercih sebebi olmuştur. Ayrıca alfa ve beta C proteinleri, Rib ve Sip proteinleri C5a peptidaz da bu amaçla kullanılabilir (Paoletti ve Madoff 2002). Tip III konjuge GBS aşısı ile aşılanan kadınların %90'unda 4 kat veya daha fazla titre artışı sağlanmıştır (Schuchat 1999). Tetanoz toksoidi ile kombine multivalan GBS aşıları gebeliğin ilk 3 ayını takiben uygulanabilir (Wilke Topçu 2002). İmmünoproflaksi intrapartum proflaksiye göre daha basit uygulanabilir, uzun süre koruyucu ve ucuzdur, antimikrobiyal direnç gelişimi de sözkonusu olmaz (Edwards ve Baker 2005). GBS konjuge aşısının gebe olmayan erişkinler için immunojen olup olmadığı henüz test edilmemiş olmakla beraber altta yatan hastalıkları nedeniyle risk altında bulunan erişkinler de aşılanabilir (Farley 2001). GBS aşısı ile ilgili en önemli sıkıntı ise hastalığa neden olan GBS serotiplerinin farklı coğrafyalara göre ve zaman içinde değişmesidir (Schuchat 1999).

1. 4. 8. TEDAVİ

GBS'ler penisiline duyarlıdır ve tedavide ilk seçenek penisilindir (Feld ve Harrigan 1987). GBS'ler için penisilin minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) GAS'lardan 4-8 kat daha yüksektir (Facklam ve Carey 1985). GBS'lerdeki klindamisin ve eritromisin direnci %15-20 oranında olup bu oran giderek artmaktadır (Farley 2001). Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada, penisilin direncine rastlanmamış olmasına rağmen penisilin toleransına bağlı tedavi başarısızlıkları bildirilmeye başlamıştır (Wu ve ark. 1997). Aminoglikozitler ve ampisilinin in vitro sinerjik etkisi bilindiğinden GBS'ye bağlı neonatal bakteriyemi ve menenjitin ampirik tedavisinde geniş spektrumlu etki için bu ikili kombinasyon kullanılır

(Edwards ve Baker 2005). Yenidoğan GBS infeksiyonlarında antibiyotik tedavisinde infeksiyonun klinik prezentasyonuna göre tedavi protokolleri uygulanır. Bakteriyemi, menenjit Őüphesinde tedavide ampisilin 300 mg/kg ve gentamisin 7.5 mg/kg dozda kan ve beyin omurilik sıvısı (BOS) kültürleri steril olana kadar devam edilir. Yalnız bakteriyemi varlığında tedaviye ampisilin 150-200 mg/kg veya penisilinG 200.000 ünite/kg dozda en az 10 gün devam edilir. Menenjit varlığında tedaviye ampisilin 300 mg/kg veya penisilinG 500.000 ünite/kg ve gentamisin7.5 mg/kg dozda en az 14 gün devam edilir (Shet ve Ferrieri 2004).

İnvaziv GBS infeksiyonları yüksek doz penisilin ile tedavi edilirken müköz membranlarda GBS ile meydana gelen infeksiyonun eradikasyonu oldukça zordur ve tekrarlayan infeksiyonlara neden olmaktadır (Edwards ve Baker 2005). Penisilin tedavisi, bakteriyemi ve pnömonilerde 10 gün, menenjitlerde en az 2-3 hafta, osteomyelit ve endokarditlerde ise 3-4 hafta süreyle verilmelidir (Edwards ve Baker 2005, Holm ve Mascini 2000).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne 26 Kasım 2012-25 Nisan 2013 tarihleri arasında herhangi bir sebeple başvuran 15-45 yaş arası 500 kadın çalışmaya alınmıştır.

2. 1. Hasta Anamnezi

Çalışmaya alınan olguların ad soyad, yaş, telefon numarası, rahim içi araç varlığı, son 10 günde antibiyotik kullanım öyküsü, gebe olup olmadığı, gebe ise gebelik sayısı, gebelik haftası, doğum sayısı sorgulanmıştır.

2. 2. Örneklerin Toplanması

Litotomi pozisyonunda muayene masasına yatırılan kadınlardan spekulum kullanmadan, steril eküvyon ile vajinal ve rektal sürüntü örnekleri alınmıştır. Vajinal örnekler eküvyonla, vajinanın alt 1/3'ünden, rektal örnekler ise anal sfinkterden 2cm rektuma doğru ilerletilerek ve 360 derece rotasyon yapılarak alınmış, Amies taşıma besiyerinde (Cultiplast, İtalya) mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırılmıştır.

2. 3. Örneklerin Ekilmesi

Taşıma besiyerindeki sürüntü örnekleri önce %5 koyun kanlı agar (KKA) plaklarına (Biomerieux, Fransa) seyreltme yöntemi ile ekilerek etüvde $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat aerobik olarak inkübe edilmiştir. Sürüntü örneklerin KKA besiyerine ekiminden sonra, içerisinde 10 µg/ml kolistin ve 15 µg/ml nalidiksit asit ve Todd-Hewitt broth olan 5 ml LIM broth (Becton, Dickinson USA) besiyerinde $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra pipet ile 50 mikrolitre (µl) alınarak chromID Strepto B agar (Biomerieux, Fransa) plaklarına subkültürleri yapılmış ve etüvde $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de en az 48 saat aerobik olarak inkübe edilmiştir.



Şekil 2. 1. Taşıma besiyeri (çalışmamızdan).



Şekil 2. 2. LİM broth besiyeri (çalışmamızdan).

2. 4. Kültürlerin Değerlendirilmesi

KKA'da beta hemolizli GBS kuşku kolonilere gram boyama, katalaz testi, CAMP ve lateks aglütinasyon testleri uygulanmıştır. ChromID Strepto B agardaki koloniler ilk 24. saatte değerlendirilmiş, yeterli üreme olmamışsa tekrar $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de aerob ortamda inkübe edilmiş ve 48. saatte tekrar değerlendirmeye alınmıştır. ChromID Strepto B agarda pembe kırmızı renkte üreyen kolonilere CAMP ve lateks aglütinasyon testleri uygulanarak fenotipik olarak doğrulanmıştır. Fenotipik olarak doğrulanan koloniler pulsed field gel electrophoresis (PFGE) yöntemiyle genotiplendirmek için çalışılınca kadar saklamaya alınarak -20°C 'de bekletilmiştir. Pozitif kontrol olarak *S. agalactia* ATCC 13813 suşu kullanılmıştır.

2. 4. 1. Katalaz Testinin Yapılışı

KKA'da üreyen beta-hemolitik kolonilere katalaz testi yapılmıştır. Bu test, katalaz enzimi bulunduran bakterilerin hidrojen peroksiti katalize ederek, oksijen (O₂) ve suya ayırması esasına dayanır. Temiz bir lam üzerine bir damla katalaz reaktifi hidrojen peroksit (%3 H₂O₂) damlatılıp, üzerine steril öze ile alınan koloni karıştırılmıştır. Gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif, görülmemesi ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Katalaz negatif olan kolonilerin streptokok cinsinden olabileceği düşünülerek ileri identifikasyona geçilmiştir (Bilgehan 2009).

2. 4. 2. CAMP Testinin Yapılışı

KKA'daki şüpheli koloniler ile kromojenik agardaki pembe koloniler ve ATCC 25923 *S.aureus* suşundan KKA'a birbirine değmeden 90 derecelik açı ile çizgi ekim yapılmıştır. Plaklar 35± 2 °C'de bir gece etüvde inkübe edilmiştir. CAMP olumlu reaksiyon *S. aureus*'un beta hemolizini ile GBS'nin CAMP faktörünün difüzyon bölgesinde üçgen şeklinde artmış bir hemoliz zonu oluşturması ile belirlenmiştir (Pratt Rippin ve Pezzlo 1992). Pozitif kontrol olarak *S. agalactia* ATCC 13813 suşu kullanılmıştır.

2. 4. 3. GBS Grup Lateks Testi

Çalışmaya başlamadan önce kullanılan ticari kitin (Biomerieux, Fransa) içindeki lateks süspansiyonu (Latex B) oda sıcaklığına getirilmiş, kullanılmadan önce çalkalanarak homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Ekstraksiyon enzimi 10 ml distile su ile sulandırılmıştır.

1. yöntem

1- 0.4 ml ekstraksiyon enzimi içine alınan katı besiyerinde GBS şüpheli 3-4 koloni ezilerek vortekslenmiştir.

2- 37 °C'de 10 dakika inkübe edilerek grup spesifik antijenler enzimatik olarak açığa çıkarılmıştır.

3- Her lateks damlası, 15µl ekstrakt ile kart üzerinde karıştırılarak 2 dakika süre ile kart nazikçe dairesel olarak çalkalanmıştır.

4- Gözle görülebilir çökelti oluşturduğunda reaksiyon pozitif olarak kabul edilmiştir.

2. yöntem

1- 0.4 ml ekstraksiyon enzimi ve LIM sıvı besiyerinden 100µl bir test tüpüne alınarak vortekslenmiştir.

2- 37 °C’de 10 dakika inkübe edilerek grup spesifik antijenler enzimatik olarak açığa çıkarılmıştır.

3- Her lateks damlası, 15µl ekstrakt ile kart üzerinde karıştırılarak 2 dakika süre ile kart nazikçe dairesel olarak çalkalanmıştır.

4- Gözle görülebilir çökelti oluşturduğunda reaksiyon pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *S. agalactia* ATCC 13813 suşu kullanılmıştır.

2. 4. 4. GBS Duyarlılık Testi

Antibiyotik duyarlılık testi Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda (CLSI 2011) çalışılmıştır. Her bir suş için serum fizyolojik içinde 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyon hazırlanmıştır. Steril eküvyon çubuğu ile bakteri süspansiyonu, %5 koyun kanlı Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine homojen bir şekilde sürülmüştür. Yüzey ekimi yapılmış agar plağı üzerine 10-15 dakika bekletildikten sonra antibiyotik diskleri birbirlerine uzaklıkları merkezden merkeze en az 24 mm olacak şekilde aralıklarla yerleştirilmiştir. Penisilin (10 ünite), Seftriakson (30 µg), Eritromisin (15µg), Klindamisin (2µg), Vankomisin (30µg), Levfloksasin (5µg), Kloromfenikol (30µg), Linezolid (30µg) ve Tetrasiklin (30 µg) diskleri (Becton Dickinson, USA) kullanılmıştır. Diskler yerleştirildikten sonra %5 CO₂’li ortamda 35± 2 °C’de 20-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında zon çapları kumpas ile mm cinsinden tam sayı olarak ölçülerek, inhibisyon zon sınırı çıplak gözle görülebilir üremenin bittiği çizgi olarak kabul edilmiştir. Ölçülen zon çapları not edilerek CLSI’daki değerler ile karşılaştırılmış ve sonuç “duyarlı, orta dirençli, dirençli” şeklinde not edilmiştir. Test edilen antibiyotiklerin CLSI’deki zon çapı sınır değerleri Tablo 2. 1’de gösterilmiştir (CLSI 2011). Pozitif kontrol olarak *S. agalactia* ATCC 13813 suşu kullanılmıştır.

Çizelge 2. 1. GBS için zon çapı sınır değerleri (CLSI, 2011).

Antimikrobik İlaç	Disk İçeriği	Zon Çapı Sınır Değerleri (mm)		
		Duyarlı	Orta Dirençli	Dirençli
Penisilin	10 U	≥24	-	-
Seftriakson	30µ	≥24	-	-
Eritromisin	15µ	≥21	20-16	≤15
Klindamisin	2µ	≥19	18-16	≤15
Tetrasiklin	30 µ	≥21	22-19	≤18
Kloromfenikol	30µ	≥21	20-18	≤17
Levofloksasin	5µ	≥17	16-14	≤13
Linezolid	30µ	≥21	-	-
Vankomisin	30µ	≥17	-	-

2. 4. 5. İndüklenebilir Makrolid Linkozamid Direncinin Araştırılması

GBS'lerin makrolide dirençli izolatlarında klindamisine yapısal veya indüklenebilir direnç olabilir. GBS'lerde, makrolid, linkozamid ve streptogramin B (MLSB) direnci olarak da tanımlanan *erm* geni tarafından kodlanan 23S rRNA'nın metilasyonu şeklinde olan indüklenebilir direnç olabildiği gibi *mef* geni tarafından kodlanan atım pompası mekanizması ile sadece makrolidlere direnç olabilir. İndüklenebilir klindamisin direnci ise disk yaklaşırma testi kullanılarak saptanabilir (CLSI 2011).

İndüklenebilir direnç, %5 koyun kanlı Mueller-Hinton agar besiyerinde 2 µg'lık bir klindamisin diski 15 µg'lık bir eritromisin diskinin kenarından 12 mm uzaklığa yerleştirilerek 35± 2 %5 CO₂'li ortamda 20-24 saat inkübe edilerek araştırılmıştır. İnkübasyondan sonra klindamisin zonunda kütleşme görülmeyen izolatlar klindamisine duyarlı olarak kaydedilmiştir. Klindamisin diskinin eritromisin diskine bakan kenarındaki zonda bir kütleşme olması ("D" zonu olarak tanımlanır) indüklenebilir klindamisin direncini göstermektedir. Bu izolatların indüklenebilir klindamisin direnci olduğu kabul edilmiştir. Bu sonuçlara göre klindamisin diskinin etrafında "D" şekline benzer bir zonun oluşması, indüklenebilir MLSB, normal direnç zonunun oluşması ise yapısal MLSB olarak kabul edilmiştir.

2. 5. PCR Çalışması

Çalışmaya alınan 500 örneğe GBS varlığı LIM sıvı besiyerinden GBS *atr* genine spesifik primerlerle PCR yöntemi aşağıdaki protokole göre araştırılmıştır.

2. 5. 1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu ticari bir kit (Nanohelix, Güney Kore) ile firma önerileri doğrultusunda aşağıda yer alan prosedüre göre yapılmıştır.

*Wash buffer (WB) solüsyonuna 44 ml absöü etanol ilave edilerek hazır hale getirilmiştir.

*Lizozim tüpüne 125 µl distile su ilave edilerek hazır hale getirilmiş ve kullanıncaya kadar -20°C saklanmıştır.

*RNase tüpüne 150 µl distile su ilave edilerek hazır hale getirilmiş ve kullanıncaya kadar -20°C saklanmıştır.

*Proteinaz K tüpüne 500 µl distile su ilave edilerek hazır hale getirilmiş ve kullanıncaya kadar -20°C saklanmıştır.

*Rektal ve vajinal örnekleri içeren LIM sıvı besiyeri tüpleri -20°C'den çıkarılarak oda ısısına gelmesi beklenmiş, daha sonra vortekslenerek 500 µl 1.5 ml'lik ependoflara alınarak 10.000 rpm'de 1dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılmıştır.

*Hücre Resüspanسیون solüsyonundan 300 µl süpernatant atıldıktan sonra geriye kalan çökelti (pellet) üzerine ilave edilmiştir.

*Bu karışım üzerine 2 µl lizozim ilave edilip karıştırılarak vortekslenmiştir.

*Tüpler 37°C'deki ısı bloğunda 30 dk inkübe edilmiştir.

*İnkübasyondan sonra tüpler 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılmıştır.

*Pellet üzerine 300 µl NGD1 buffer, 2 µl RNase A ve 8 µl Proteinase K ilave edilerek vortekslenmiş ve sırasıyla 10 dk 60°C’de, 5 dk -20°C’de inkübe edilmiştir.

*300 µl NPS solüsyonundan ilave edilerek vortekslenmiş, 5 dk -20°C’de inkübe edilmiş ve 12.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir.

*Spin kolon aktivasyonu için 100 µl Max Binder solüsyonu spin kolonlara ilave edildikten sonra 12.000 rpm’de 30 sn santrifüj edilmiştir.

*Pellete değmeden süpernatant kısmı aktive edilmiş 2 ml’lik spin kolonlara aktararak 1 dk 12.000 rpm’de santrifüj edilmiş ve spin kolonların alt tüpleri dışarı boşaltılmıştır.

*Spin kolonlara 500 µl WB buffer (%80 etanol) pipetlenerek 10.000 rpm’de 30 sn santrifüj edilmiş ve kolonların alt tüpleri dışarı boşaltılmıştır.

*Kolonlar boş olarak 2 dk 13.000 rpm’de santrifüj edilmiştir.

*Kolonlar temiz 1.5 ml’lik ependoflara alınarak üzerlerine 40µl elution buffer (EB) solüsyonundan ilave edilmiş ve 1dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

*Tüpler 12.000 rpm’de 2 dk santrifüj edilmiş ve spin kolonlar atılarak alt kısım (DNA) -20°C’de PCR için saklanmıştır.

2. 5. 2. DNA Miksinin Hazırlanması

PCR çalışmasında GBS için *atr* geni primerleri tercih edilmiştir. Primer dizilimi çizelge 2. 2. de gösterilmiştir (De-Paris 2011). LIM broth’dan izole ettiğimiz DNA örnekleri için çizelge 2. 3. de yer alan malzemeler belirtilen oranlarda kullanılmıştır. Hazırlanan mikse toplam hacim 50 µl olacak şekilde 37 µl su ve 3 µl DNA eklenmiş ve PCR işlemi uygulanmıştır.

Çizelge 2. 2. Primer dizileri ve çoğaltılan baz çifti uzunlukları.

Primer	Primer dizisi (5’-3’)	Baz çifti (bç)
<i>atr</i> -F	CAACGATTCTCTCAGCTTTGTTAA	780
<i>atr</i> -R	TAAGAAATCTCTTGTGCTGATTTC	

Çizelge 2. 3. *atr* genini saptamada PCR için kullanılan malzemeler.

Malzeme	1 örnek için
10X Taq Buffer	5 µl
dNTP	1 µl
10 pmol Primer 1	1 µl
10 pmol Primer 2	1 µl
5X Tune Up solüsyonu	2 µl
ddH ₂ O	36.5 µl
Taq Polimeraz	0.5 µl
DNA Örneği	3 µl
TOPLAM	50 µl

2. 5. 3. PCR

PCR yöntemi LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Almanya) ısı döngü cihazında çizelge 2. 4. ki protokole göre çalışılmıştır.

Çizelge 2. 4. GBS'nin PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	1	95C	5 dk
Denatürasyon	30	94°C	1 dk
Bağlanma		55°C	45 sn
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	10 dk

2. 5. 4. Jelde Yürütme

2. 5. 4. 1. (Tris-borate-EDTA) TBE Hazırlama= 0.5X

*1000 ml ultra saf su

*10.8 gr Tris base (Sigma, Amerika)

*5.5 gr Borik asit (Merck, Almanya)

*0.744 gr EDTA (Merck, Almanya) magnetik karıştırıcıda kaynatmadan ısıtılıp karıştırılarak 1000 ml 1X TBE elde edilmiştir. 1000ml 1X TBE, 1000 ml ultra saf su ile tekrar karıştırılarak 2000ml 0.5X TBE elde edilmiştir.

2. 5. 4. 2. Jel Hazırlama

0.5X TBE ile %1'lik jel hazırlanmıştır. Yürütme tankının tamamı için 200 ml 0.5X TBE içine 2 gr agaroz (Biomax) hassas terazide tartılarak karıştırılmış ve mikrodalga fırında kaynatmamaya çalışılarak eritilmiştir. El yakmayacak dereceye kadar soğutulduktan sonra 10 µl SYBR Green ilave edilerek hafifçe karıştırılmış ve hazır hale getirdiğimiz jel kalıbına hava kabarcığı yapmayacak şekilde dökülmüştür. Jel donduktan sonra kalıptan çıkarılarak yürütme tankına yerleştirilmiştir.

2. 5. 4. 3. Loading Dye Hazırlama ve Jele Yerleştirilmesi

-20°C'de saklanan stok 6X Loading Dye 1/5 oranında sulandırılmıştır. 2 µl PCR ürünü DNA ile 4µl 1/5'lik 6X loading Dye ile karıştırılarak pipet yardımıyla jeldeki yürütme kuyucuklarına yerleştirilmiştir. Marker olarak 100 base pairs (bp) DNA (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. 120 Volt elektrik akımı verilerek 2 saat yürütülmüştür.

2. 5. 5. Jelde Yürüyen DNA'ların Görüntülenmesi

DNA bantları UV ışık altında Gel logic imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak görüntülenmiştir. Pozitif DNA örneğinin karşısına denk

gelen ve moleküler stadart ile uyumlu baz çiftine (780 bp) sahip olan örneklerin GBS olduğu kabul edilmiştir.

2. 6. Pulsed-Field Gel Elektroforez (PFGE) Çalışması

PFGE metodu birçok patojen bakterilerin genetik farklılıklarını araştırmak için moleküler epidemiyolojide kullanılan önemli bir genetik tiplendirme yöntemidir. Çalışmamızda GBS suşlarının klonal ilişkisini araştırmak için Delennoy ve ark.(2013)'ı tarafından bildirilen PFGE metodu kullanılmıştır.

2. 6. 1. PFGE için Kullanılan Solüsyonlar

2. 6. 1. 1. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA), PH: 7.6

Tris HCl (Merck, Almanya).....1.576 gr.

EDTA..... 0.1632 gr.

Ultra saf su..... 1000 ml.

Tris HCl ve EDTA ultra saf suda magnetik karıştırıcıda hafif ısıtılarak homojen hale gelinceye kadar karıştırılarak eritilmiştir.

2. 6. 1. 2. ES Buffer, PH: 8

EDTA.....18,61 gr.

Sarcosine (Sigma, Amerika)1 gr.

Ultra saf su.....100 ml.

EDTA ve sarcosine ultra saf suda magnetik karıştırıcıda hafif ısıtılarak homojen hale gelinceye kadar karıştırılmıştır.

2. 6. 1. 3. TBE(1X)

Trimbase.....10.8 gr.

Borik asit.....5.5 gr.

EDTA0.744 gr.

Ultra saf su.....1000 ml.

Trimbase, EDTA ve borik asit ultra saf suda magnetik karıştırıcı ile hafif ısıtılarak homojen hale gelinceye kadar karıştırılmıştır.

2. 6. 2. İzolatların Hazırlanması

*Fenotipik olarak GBS olarak tanımlanan -20'de saklanan suşlar yeniden canlandırmak için koyun kanlı agara (Biomerieux, Fransa) pasajları yapılmıştır. Standart suş olarak *S. agalactiae* ATCC 13813 kullanılmıştır.

*Bir gecelik inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edilerek üreyen koloniden plastik öze yardımıyla Brain Heart Infüzyon (BHI) (Oxoid, Fransa) sıvı besiyerine bir iki koloni ekilerek 12-16 saat etüvde inkübe edilmiştir.

*Bakteri yoğunluğunun 6-8 McFarland olduğu doğrulandıktan sonra sıvı kültürden 1ml alınarak 1.5 ml'lik tüplere aktarılmıştır.

*Sıvı kültür içeren tüpler 12.000 rpm'de 4°C'de 4 dakika santrifüj edilerek santrifüj sonrası süpernatant kısmı dışarı atılmıştır.

*Pelletin üzerine 0.5 ml 1XTE buffer eklendikten sonra 56°C'deki ısı bloğunda bekletilmiştir.

2. 6. 3. Agaroz Hazırlanması ve İzolatların Agaroz Gömülmesi

*10 ml 1X TE içerisine 0,2 gr low melting agar (Sigma, Amerika) ilave edilerek mikrodalga fırında homojen hale gelinceye kadar eritilmiştir.

*Agarozdan 250 µl miktarında 1.5 ml'lik tüplere dağıtılarak 56°C'deki ısıbloğuna yerleştirilmiştir.

*56°C'de ısı bloğunda bulunan bakteri süspansiyonundan 250 µl alınarak, 56°C'de ısı bloğunda bulunan 250 µl miktarında agaroz içeren tüplere eklenerek karışımın homojen hale gelebilmesi için birkaç defa pipetaj işlemi yapılmıştır.

*Bakteri-agaroz karışımından 110µl alınarak bekletilmeden 20x9x1.2 mm³ ölçülerindeki agaroz kalıp bloklarına dağıtılarak agarozun katılaşması için +4 °C' de 10 dakika bekletilmiştir.

2. 6. 4. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması

*Her agaroz kalıp için, steril kapaklı cam tüplere 1960 µl TE solüsyonu dağıtılarak her tüp içerisine 40 µl stok lizozimden (2mg/ml) eklenmiştir.

*İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak bu karışımın içerisine yerleştirilmiş ve 1 gece 37°C'de çalkalamalı su banyosunda bekletilmiştir.

*Bu işlemin sonunda tüplerdeki solüsyon pipetle alındıktan sonra, yerine 1960 µl ES solüsyonu ve 40 µl ProteinazK (2mg/ml) eklenmiş ve 56°C'de en az 48 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilmiştir.

2. 6. 5. Hücre Lizisinden Sonra Agaroz Kalıpların Yıkınması

*Lizis aşamasından sonra yumuşayan agaroz kalıplarının katılaşması için tüpler +4°C'de en az 10 dakika bekletilmiş ve lizis solüsyonu pipetle boşaltılmıştır.

*Daha sonra agaroz kalıpları her yıkama 1saat olmak üzere 25°C'de 2 ml TE solüsyonu ile 6 kez yıkanmıştır.

2. 6. 6. Agaroz Kalıplarındaki DNA' nın RE ile Kesilmesi

*Agaroz kalıbı bir petri kabına alınarak bistürü yardımıyla 1/3 oranında kesilmiştir.

*Parçalardan biri, 1/10 oranında sulandırılmış 100 µl *SmaI* tamponu içine alınarak +4°C'de en az 10 dakika bekletilmiş ve daha sonra bu tampon pipet ile boşaltılmıştır.

*Her agaroz kalıbı için aşağıdaki enzim karışımı hazırlanmıştır.

*10 µl 10X *SmaI* tamponu (Thermo Scientific, ABD)

*2,5 µl *SmaI* enzimi (10 U/µl) (Thermo Scientific, ABD)

*87,5 µl steril ultra saf su (Reagent Grade Type 1)

*Agaroz kalıbına bu enzim karışımı eklenerek çalkalamalı su banyosunda 25 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir.

*İnkübasyon sonunda tüpler +4°C'de en az 10 dakika bekletilmiştir.

2. 6. 7. Elektroforez Yürütme Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi

*2 litre 0,5X TBE solüsyonu hazırlanmış ve içerisinde 100 ml yürütme jeli için ayrılarak kalan tampon ile elektroforez tankı doldurulmuştur.

*Ayrılan 100 ml tampon içerisine 1 gr pulsed-field certified (Sigma, Amerika) agaroz eklenerek % 1' lik agaroz mikrodalga fırında eritilerek hazırlanmıştır.

*Agaroz dökülecek kaset hazır hale getirildikten sonra, *SmaI* enzimi ile kesilmiş olan agaroz kalıpların her biri tarak dişlerinin uç kısmına yerleştirilmiştir.

*Tarağın kenar dişlerine marker kalıplar yerleştirilmiş ve tarak kalıplarla birlikte agaroz dökülecek kaset içine yerleştirilmiştir.

*Agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturmadan kaset içine dökülmüştür.

*Oda ısısında 20 dakika katılaşmaya bırakılmış, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılmış ve dikkatlice tarak çekilmiştir.

2. 6. 8. Elektroforez

Kalıp jellerin yüklendiği yükleme jeli tabla ile alınmış ve içerisinde 1900 ml 0,5X TBE tamponu bulunan PFGE (CHEF DR-II Pulsed Field Gel Electrophoresis System, BioRad Laboratories, Nazareth, Belgium) tankına yerleştirilmiştir.

Elektroforez koşullarının ayarlanması

Başlangıç vuruş süresi	3 sn
Bitiş vuruş süresi.....	55 sn
Vuruş açısı.....	120 °
Akım	6 V/ cm ²
Sıcaklık	14 ° C
Süre	20 saat

2. 6. 9. Sonucun Görüntülenmesi ve Analiz

*Elektroforezden sonra jel 150 µg/ ml etidyum bromür içeren 300 ml 0.5X TBE içine alınarak 20 dakika boyanmıştır.

*Boyama işleminden sonra jeldeki boya artıklarının uzaklaştırılması için 20 dakika 500 ml ultra saf suda bekletilmiştir.

*DNA bantları UV ışık altında Gel logic imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

*DNA bant profilleri Gel Compar II (versiyon 6.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belçika) yazılımında UPGMA (Unweighted pair group method with mathematical averaging) metodu ve Dice benzerlik (Dice similarity coefficient) katsayısı kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramı oluşturularak kümelendirme analizi yapılmıştır. Değerlendirmede tolerans %1 olarak alınmıştır. Bu istatistiksel analizde benzerlik katsayısı $\geq 70\%$ ve üzeri (en az dört bant içermektedir) benzer kabul edilmiştir (Usein ve ark 2012).

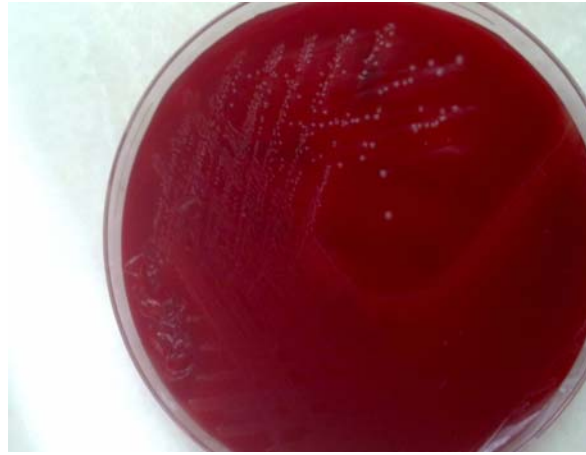
2. 7. İstatiksel Analiz

Çalışmamızda GBS taşıyıcılığının oranını saptamak için kültür ve/veya PCR testi referans test (gold standart) olarak, lateks aglütinasyon testi ise tarama testi olarak kabul edilmiş olup yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri hesaplanmıştır. Verilerin parametrik olup olmadığı Kolmogorov Smirnov Z testiyle analiz edilmiştir. GBS taşıyıcılığı açısından gruplar arasındaki istatistiki analizler ki-kare, Mc Nemar ve Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. İstatistiki anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 25 Kasım 2011 tarihli ve 2011/12 sayılı kararı ile onaylanmış ve Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

3. BULGULAR

Çalışmaya alınan 15-45 yaş arası, 500 kadının 68'inde (%13.6) GBS taşıyıcılığı saptanmıştır. Kültürü yapılan 500 örnekten KKA'da üreyen 44 suş (%8.8), ChromID Strepto B agarda üreyen 61 suş (%12.2) GBS olarak tanımlanmış ve kültürde toplam 65 suş (%13.0) izole edilmiştir. LIM sıvı besiyerinden yapılan lateks aglütinasyon testi ile 500 örneğin 70'inde (%14) ve PCR ile 62'sinde (%12.4) GBS pozitifliği saptanmıştır. Kullanılan yöntemlerin sonuçları çizelge 3. 1, çizelge 3. 2 ve çizelge 3. 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. 1. KKA'da üreyen GBS kolonileri (çalışmamızdan).



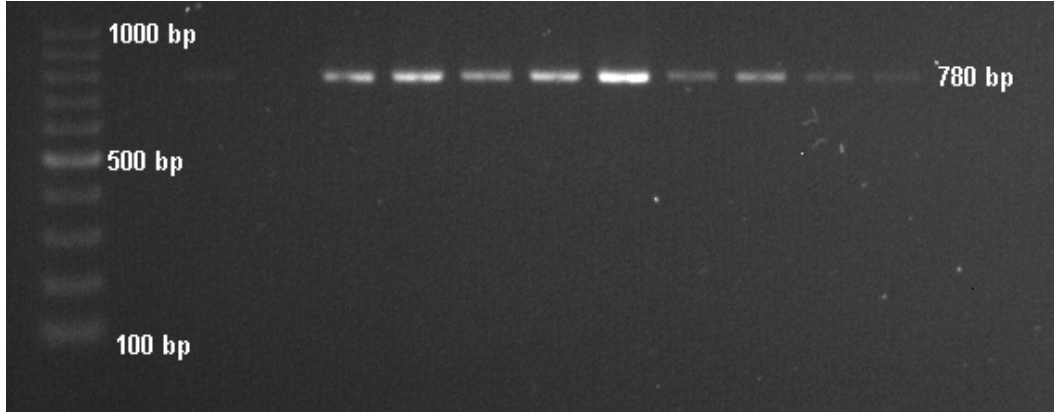
Şekil 3. 2. ChromID Strepto B agar besiyerindeki GBS kolonileri (çalışmamızdan).



Şekil 3. 3. pozitif CAMP testi (çalışmamızdan).



Şekil 3. 4. D- Test (çalışmamızdan).



Şekil 3. 5. GBS *atr* geni PCR sonuçlarının Gel Logic 200 Imaging System görüntüsü (çalışmamızdan).

Çizelge 3. 1. Kültür, Lateks aglütinasyon testi ve PCR ile GBS saptanma oranları.

	Kültür Sayı (yüzde)	Lateks aglütinasyon testi (LIM) Sayı (yüzde)	PCR (LIM) Sayı (yüzde)
GBS pozitif	65(13.0)	70 (14.0)	62 (12.4)
GBS negatif	435(87.0)	430 (86.0)	438 (87.6)
Toplam	500	500	500
Duyarlılık	(95.6)	100	91.2
Özgüllük	100	99.5	98.6
PPD	100	97.1	100
NPD	99.3	100	98.9

*GBS taşıyıcılığı referans test olan kültür ve/veya PCR testi ile 68 (%13.6) kadında saptanmış.

Çizelge 3. 2. Lateks aglütinasyon testinin kültür ve PCR ile karşılaştırılması.

LIM	Kültür		PCR		Toplam
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	
Lateks aglütinasyon pozitif	65	5	62	8	70
Lateks aglütinasyon negatif	0	430	0	430	430
Toplam	65	435	62	438	500

Çizelge 3. 3. Kültür ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

	PCR		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Kültür pozitif	59	6	65
Kültür negatif	3	442	445
Toplam	62	448	500

GBS taşıyıcılığının saptanmasında yöntemler arasındaki farkı hesaplamak için yapılan istatistik analizinde PCR ile lateks aglütinasyon ($p=0.008$) arasında anlamlı fark bulunurken kültür ile lateks aglütinasyon ($p=0.063$) , kültür ile PCR ($p>0.05$) arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Kültürde izole edilen 65 GBS izolatının ikisi pasajlarda üretilmediği için 63'üne Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle CLSI önerileri doğrultusunda antibiyotik duyarlılık testi yapılmıştır. Penisilin, seftriakson, vankomisin ve linezolide direnç saptanmazken 55 (%87.3) suşta tetrasikline direnç saptanmıştır.

İndüklenebilir klindamisin direnci 10 (%15.9) izolatta, yapısal MLSB direnci ise beş izolatta (%7.9) tespit edilmiştir. GBS izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık durumları, sayı ve yüzdeleri çizelge 3. 4 ve çizelge 3. 5'te verilmiştir.

Çizelge 3. 4. GBS izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık sayı ve yüzdeleri (n: 63).

Antibiyotik	Duyarlı Sayı (yüzde)	Orta Dirençli Sayı (yüzde)	Dirençli Sayı (yüzde)
Penisilin	63 (100)	0	0
Seftriakson	63 (100)	0	0
Eritromisin (15µ)	47 (74.6)	1 (1.6)	15 (23.8)
Klindamisin (2µ)	57 (90.5)	0	6 (9.5)
Tetrasiklin (30 µg)	8 (12.7)	0	55 (87.3)
Kloromfenikol (30µ)	55 (87.3)	2 (3.2)	6 (9.5)
Levofloksasin (5µg)	50 (79.4)	3 (4.76)	10 (15.87)
Linezolid (30µ)	63 (100)	0	0
Vankomisin (30µ)	63 (100)	0	0

Çizelge 3. 5. GBS izolatlarının duyarlılık durumları.

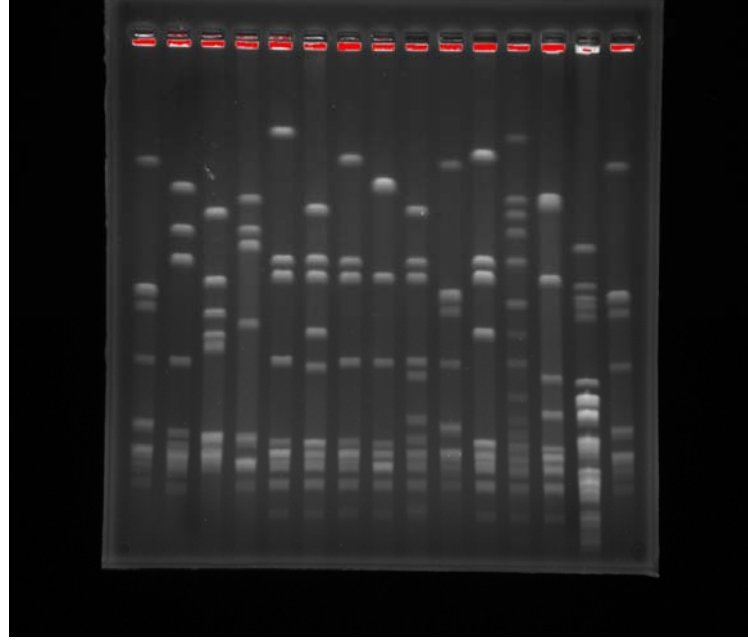
Sıra no	Gebelik durumu	PCR LIM	E	CC	LNZ	P	LVX	CRO	TE	VA	C
1	J	poz	S	S	S	S	I	S	R	S	S
2	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
3	J	poz	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	J	poz	I	S	S	S	R	S	R	S	S
5	G	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
6	G	poz	S	S	S	S	I	S	R	S	S
7	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	I
8	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
9	J	neg	S	S	S	S	S	S	R	S	S
10	J	neg	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	G	poz	R	S	S	S	R	S	R	S	S
12	J	poz	R	R	S	S	S	S	R	S	R
13	G	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
14	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
15	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16	J	neg	S	S	S	S	S	S	R	S	S
17	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
18	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
19	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S

Çizelge 3. 5. (Devamı) GBS izolatlarının duyarlılık durumları.

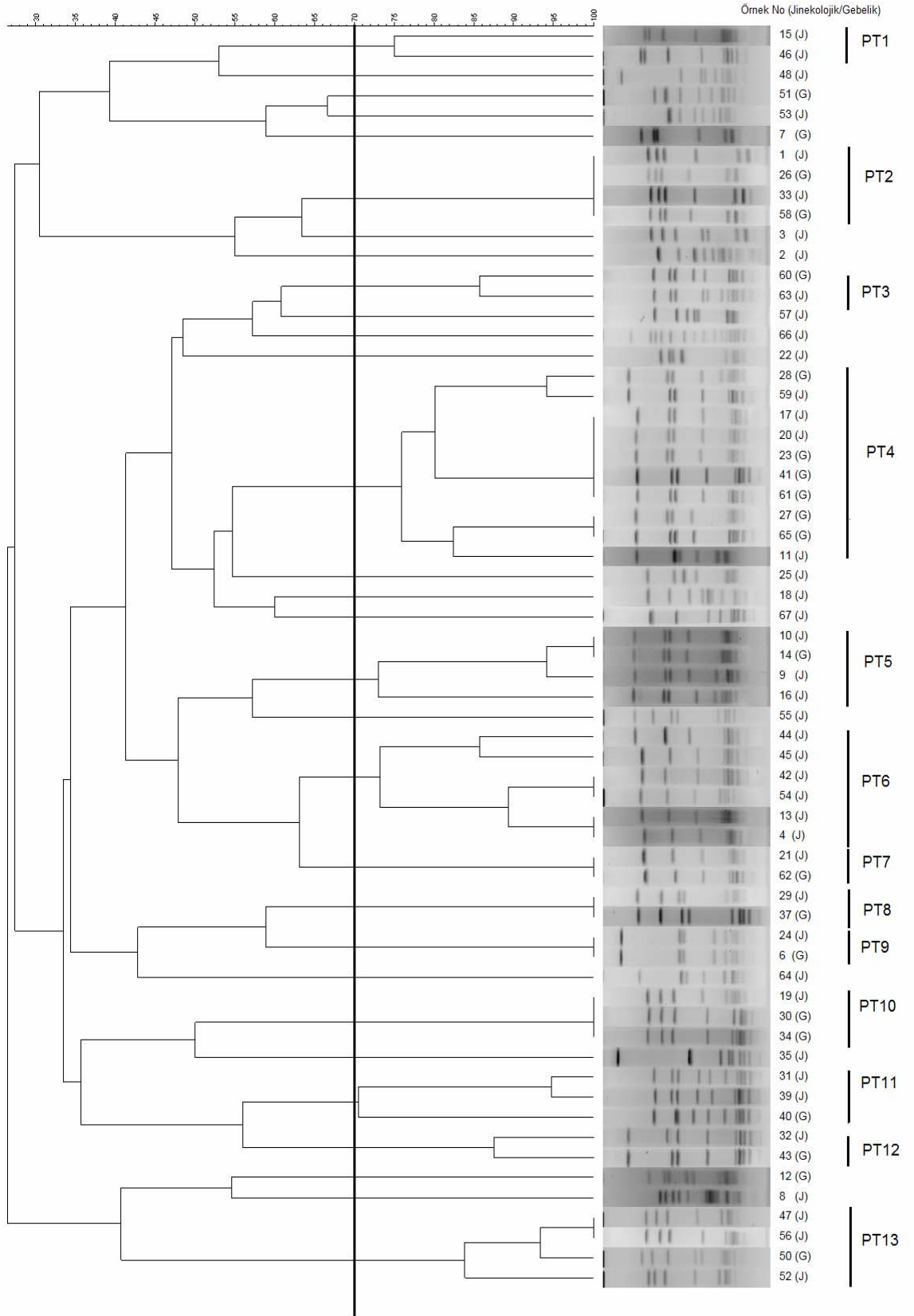
20	J	poz	R	S	S	S	S	S	R	S	S
21	J	poz	R	S	S	S	I	S	S	S	S
22	G	neg	S	S	S	S	S	S	R	S	S
23	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
24	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
25	G	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
26	G	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
27	G	poz	R	S	S	S	R	S	R	S	R
28	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
29	G	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
30	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
31	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
32	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
33	G	neg	S	S	S	S	S	S	R	S	S
34	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
35	J	poz	S	S	S	S	S	S	S	S	S
36	G	poz	R	S	S	S	S	S	R	S	I
37	J	poz	S	S	S	S	R	S	R	S	R
38	G	poz	R	R	S	S	S	S	R	S	S
39	G	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
40	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
41	G	neg	R	S	S	S	R	S	R	S	R
42	J	poz	R	R	S	S	S	S	R	S	S
43	J	poz	S	S	S	S	R	S	R	S	S
44	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
45	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
46	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
47	G	poz	S	S	S	S	R	S	R	S	S
48	G	poz	R	R	S	S	S	S	R	S	S
49	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
50	J	poz	S	S	S	S	S	S	S	S	S
51	J	poz	R	S	S	S	R	S	R	S	S
52	J	poz	R	S	S	S	S	S	R	S	S
53	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
54	J	poz	S	S	S	S	S	S	S	S	S
55	G	poz	S	S	S	S	S	S	S	S	S
56	J	poz	R	S	S	S	R	S	R	S	R
57	G	poz	R	R	S	S	S	S	R	S	S
58	G	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
59	G	poz	S	S	S	S	R	S	R	S	S
60	J	poz	R	R	S	S	S	S	R	S	R
61	J	poz	S	S	S	S	S	S	S	S	S
62	J	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S
63	G	poz	S	S	S	S	S	S	R	S	S

S: duyarlı, I: orta duyarlı, R: dirençli, poz: pozitif, neg: negatif, G:gebe, J: Gebe olmayan, E: eritromisin, CC: klindamisin, LNZ: linezolid, CRO: seftriakson, TE: tetrasiklin, VA: vankomisin, C: kloromfenikol.

Çalışmada üretilen 63 suşun klonal ilişkisini değerlendirmek için PFGE yapılmıştır. PFGE görüntülenen bantların dendogram analizinde benzerlik katsayısı \geq %70 ve üzeri (en az dört bant içermektedir) benzer kabul edilmiş ve buna göre çalışmamızda 13 farklı pulsotip (PT) belirlenmiştir (Şekil 3.7). Dört ve altıncı pulsotiplerde yoğunlaşma görülmüştür. PT4’de on izolat, PT6 izolat ise altı izolat yer almıştır. 63 GBS’nin 46 tanesi 13 farklı pulsotipin herhangi birinin içinde yer alırken, 17 GBS ise %70 benzerlik katsayısının altında kaldığı için sporadik suşlar olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3. 6. *S. agalactiae* suşlarının PFGE görüntüsü (çalışmamızdan).



Şekil. 3. 7. GBS izolatlarının *SmaI* enzimi ile kesilen genomik DNA'sının PFGE görüntüsü (çalışmamızdan). G: Gebe, J: Gebe olmayan.

Çalışmaya alınan 500 kadının 215'inin gebe ve 285'inin gebe olmadığı belirlenmiştir. 21 (4.2) gebe ve 47 (9.4) gebe olmayan kadında GBS pozitifliği saptanmıştır. GBS taşıyıcılığı açısından gebe olmayanlardaki pozitiflik oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.03$). Çalışmaya alınan kadınların yaş gruplarına, demografik özelliklerine ve GBS pozitifliklerine göre dağılımı çizelge 3. 6, çizelge 3. 7 ve çizelge 3. 8 de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 6. Kadınların yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş grubu	Kadın		GBS Pozitif	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
16-20	48	9.6	7	1.4
21-25	103	20.6	10	2
26-30	107	21.4	8	1.6
31-35	110	22	17	3.4
36-40	72	14.4	12	2.4
41-45	60	12	14	2.8
Toplam	500	100	68	13.6

Çizelge 3. 7. Gebe olan kadınların özelliklerine göre dağılımı.

Gebe olan kadınlar (215)	Gebe		GBS pozitif	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
Gebeliğin ilk 12 haftası	26	12.1	2	7.7
Gebeliğin 13-34 haftası	74	34.4	6	8.1
Gebeliğin 35-37. haftası	52	24.2	7	13.5
Gebeliğin 38. haftası ve üzeri	63	29.3	6	9.5
Vajinal duş varlığı	48	22.3	5	10.4
Vajinal duş yokluğu	167	77.7	16	9.6
Antibiyotik kullanan (son on gün)	14	6.5	1	7.1
Antibiyotik kullanmayan	201	93.5	20	10
İlk gebelik	70	32.6	8	11.4
İkinci ve üçüncü gebelik	109	50.7	8	7.3
Dört ve üzeri gebelik	36	16.7	5	13.4
Daha önce doğum yapmamak	78	36	8	10.3
Daha önce bir doğum yapmak	75	35	9	12
Daha önce iki veya üç doğum yapmak	58	27	4	6.9
Daha önce dört ve üzeri doğum yapmak	4	2	0	0
İlk yedi gün hastaneye yatış	9	4.2	0	0
İlk yedi gün - ilk üç ay hastaneye yatış	9	4.2	1	11.1
Erken membran rüptürü (EMR)	7	3.3	2	28.6

Çizelge 3. 8. Gebe olmayan kadınların özelliklerine göre GBS pozitiflikleri.

Gebe olmayan kadınlar (285)	Gebe		GBS pozitif	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
Menstruasyonun ilk 14 günü	100	35	13	13
Menstruasyonun ilk 14 günü sonrası	189	65	34	18
Vajinal duş varlığı	86	30.2	17	19.8
Vajinal duş yokluğu	199	69.8	30	15
Antibiyotik kullanan (son on gün)	37	13	5	13.5
Antibiyotik kullanmayan	248	87	42	17
RİA varlığı	26	9	2	7.7
RİA yokluğu	259	91	45	17.4
Daha önce gebelik geçirmeyenler	59	21	9	15.3
Daha önce bir gebelik geçirenler	40	14	5	12.5
Daha önce iki- üç gebelik geçirenler	129	45	24	18.6
Daha önce üç'den fazla gebelik geçirenler	57	20	9	15.8
Daha önce doğum yapmayanlar	70	25.6	10	14.3
Daha önce bir doğum yapanlar	53	18.6	6	10.7
Daha önce iki-üç doğum yapanlar	136	47.7	28	20.6
Daha önce üç'den fazla doğum yapanlar	26	9.1	3	11.5
İlk yedi gün hastaneye yatış	19	6.7	1	5.3
İlk yedi gün - ilk üç ay hastaneye yatış	10	3.5	0	0
Erken memran rüptürü tarifleyenler (EMR)	6	2.1	3	50

GBS taşıyıcılığı ile demografik özellikler karşılaştırıldığında, yaş, vajinal duş alışkanlığı, antibiyotik kullanma öyküsü, gebelik ve doğum sayısı, menstruasyon dönemi ve Rahim içi araç (RİA) varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($P>0.05$). Daha önceki doğumlarında EMR tarifleyen kadınlar ile GBS pozitifliği arasında ise anlamlı ilişki saptanmıştır ($P=0.022$).

4. TARTIŞMA

GBS infeksiyonları yenidoğanlar için önemli bir sağlık sorunu olmasına rağmen korunabilir ve tedavi edilebilir olması, GBS varlığının gebelerde taranmasını önemli kılmaktadır. Gebelerde GBS taraması koruyucu sağlık hizmetleri adına yapılması gereken uygulamalardandır.

GBS'ler kadın genital sisteminde ve gastrointestinal florada %5–40 oranında bulunmaktadır (Millagan ve ark.1978). Yurtdışında yapılan çeşitli çalışmalarda kadınlarda kolonizasyon oranları %12-28 arasında bulunmuştur (Campbell ve ark. 2000, Nitzan ve ark. 1980, Motlova ve ark. 2004). Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise vaginal GBS kolonizasyonu %2-10.6 arasında bulunmuştur (Bolatlı ve ark. 1989, Gül ve ark. 2005, Çelebi ve ark. 1992).

Gebelerde vajinal ve/veya rektal GBS kolonizasyonu % 40'lara ulaşmaktadır (Regan ve ark. 1991). Zimbabve'de yapılan bir çalışmada gebelerde GBS kolonizasyonu %31.6 bulunmuştur (Moyo ve ark. 2000). Ülkemizde gebelerde yapılan farklı çalışmalarda GBSkolonizasyonu %7, %8, %9.2, %9.74 olarak bulunmuştur (Gökalp ve ark. 1986, Karakuş ve ark. 2007, Eren Topkaya ve ark. 2002, Eren Topkaya ve ark. 2005).

Çalışmamızda GBS kolonizasyon oranı tüm kadınlarda %13.6, gebelerde %9.8 gebe olmayanlarda %16.5 olarak saptanmıştır. Gebelikte GBS'nin artış gösterdiği ifade edilen diğer çalışmaların aksine çalışmamızda GBS kolonizasyonu gebe olmayanlarda gebelere göre daha fazla ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.03). Yurdumuzda yapılmış bazı çalışmalarda saptanan GBS kolonizasyon oranları çizelge 4. 1. de verilmiştir.

Çizelge 4. 1. Yurdumuzda yapılmış bazı çalışmalarda GBS kolonizasyonu.

Kaynak	Örnek	Gebelik haftası	Kolonizasyon oranı (%)
Özerol ve ark. 1994	vajinal	3. trimester	4
Elçi ve ark. 1997	vajinal	Tüm haftalar	10
Deren ve ark. 1999	vajinal, rektal	35-37 hafta	0.95
Polat ve ark. 2003	Vajinal, rektal	3. trimester	16
Kadanalı ve ark. 2005	Vajinal, rektal	Tüm haftalar	16.7
Yenişehirli ve ark. 2006	vajinal	35-37	14.6
Karaduman ve ark. 2006	vajinal	> 8 hafta	0.4
Tok ve Mert 2010	vajinal	3. trimester	4
Şanal ve ark. 2012	vajinal	3. trimester	10

GBS izolasyonunu doğru bir şekilde saptayabilmek için kültürler CDC'inin önerileri doğrultusunda hem vajinal hemde rektal alınmalıdır (www.cdc.gov 2010). Vajinal kültür ile birlikte rektal kültür alınması GBS izolasyonunu artırmaktadır (Platt ve ark. 1995, Quinlan ve ark. 2000, Kovavisarach 2007). Belçika'da 300 gebe kadında yapılan bir çalışmada rektovajinal örneklerin 22'sinde, vajinal örneklerin 11'inde, rektal örneklerin 18'inde GBS izole edilmiş, rektovajinal örneklerin rektal ve vajinal örneklere göre GBS kolonize kadınları saptama oranını artırdığını ifade edilmiştir (El Aila ve ark. 2010). Çalışmamızda vajinal ve rektal örnekleri aynı LIM besiyerinde inkübe edilerek çalışılmıştır. Rektovajinal örneklerin vajinal örneklere göre GBS izolasyonunu artırmadığını belirten çalışmalar da vardır. Amerika Birleşik Devletleri'nde gebe kadınlarda yapılan bir çalışmada GBS izolasyon oranları rektovajinal örnekler için %23.3, vajinal örnekler için %23.8, serviksten alınan örnekleri için %28.9 bulunmuş ve GBS izolasyonunda aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir (Gupta ve Briski 2004).

GBS'leri tanımlamaya yönelik özel besiyerlerinin kullanımı ile gebelerde saptama oranlarının %25-40'lara kadar ulaştığı bildirilmiştir (Bilgehan 1994). Nalidiksik asit ve gentamisin içeren Todd-Hewitt gibi seçici besiyerlerinin kullanımı ile izolasyon şansı %50'ye varan oranlarda artmıştır (Arslanoğlu ve Kültürsaray 2001). Klinik örneklerden yapılan son çalışmalar LIM sıvı besiyerinin GBS

izolasyonunu direkt katı besiyerine göre % 18-35 daha fazla artırdığını göstermektedir. Bu yöntemin bir dezavantajı alınan örneklerde bulunan saprofitik floranın baskın olarak üremesidir. Özellikle *Enterococcus faecalis* varlığında *E.faecalis* baskın olarak ürettiği için yanlış negatiflik olabilmektedir. Ayrıca CDC'nin önerdiği seçici sıvı besiyerinde 16 ile 24 saat ve sonrasında en az 24 saat KKA'a subkültür gerektiğinden GBS izolasyon zamanı çok uzamakta ve gebelerin doğumda İAP alması gecikebilmektedir. (Dunne ve Holland 1998).

Bazı araştırmacılar, zaman kaybını en aza indirmek için direkt seçici plağa ekim yöntemini önermiştir. Kolistin-nalidiksik asit içeren kanlı agar (CNA), neomisin- nalidiksik asit agar, Granada agar, Columbia agar (CA), chromID Strepto B agar, GBS diferansiyel agar (GBSDA) gibi direkt seçici besiyerlerinden hangi besiyerinin kullanılacağı ile ilgili bir fikir birliği sağlanamamıştır (Gupta ve Briski 2004, Overman ve ark. 2002, Wilkinson 1978). Busetti ve ark. (2007) seçici besiyerine direkt ekimle, LIM sıvı besiyerinden subkültür yöntemini karşılaştırdıkları çalışmalarında, GBS pozitif örneklerin ancak %77.1'ini direkt seçici plağa ekim yöntemiyle pozitif bulurken, %22.9'unun GBS pozitifliğini bu yöntemle gözden kaçırmışlardır. Yüksek riskli erken başlangıçlı hastalığı önlemede direkt plağa ekim yöntemi yoğun GBS kolonizasyonlarında yararlı olduğunu, hafif kolonizasyonlarda kültürde üreyen diğer bakteriler tarafından GBS'lerin maskelendiğini ifade etmişlerdir. Bu nedenle tek başına bir yöntemin GBS taşıyıcılarını tespit etmekte yeterli olmayacağını, rektovajinal örneklerin seçici zenginleştirme sıvı besiyeri ve beraberinde doğrudan direkt zenginleştirilmiş plağa ekilmesini önermişlerdir. (Busetti ve ark. 2007). Elsayed ve ark. (2003) direkt seçici besiyeri ile LIM sıvı besiyerinden subkültür yöntemini karşılaştırmışlar istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. El Aila ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada rektovajinal örneklerin LIM sıvı besiyerine ekim sonrası CNA, GBSDA ve CA'a subkültür yöntemiyle sırasıyla %77, %95 ve %100 pozitiflik saptarken, direkt CNA, GBSDA ve CA'a ekim yöntemiyle taşıyıcıların saptanma oranlarını sırasıyla %59, %91 ve %95 bulmuşlardır. GBSDA ve CA'a besiyerlerine direkt ekim ile LIM sıvı besiyerinden subkültür sonrası ekimlerin duyarlılığını eşit olarak belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda LIM sıvı besiyerinden 16-24 saat sonra GBS krom agara subkültür yapılmış ve 500 örneğin 101'inde pembe renkte üreme gözlemlenmiş, ancak bunların

63'ü lateks aglütinasyon testi ile doğrulanmıştır. Bizim çalışmamızda KKA'da beta hemoliz gösteren 57 izolatın ancak 44'ünde GBS pozitifliği bulunmuştur.

Lateks aglütinasyon testi, antikor kaplı lateks partikülleri ile saf bakteri kültür izolatlarının teşhis ve tiplendirilmesinde kullanılmaktadır. Antijen ile antikorun birleşmesi sonucu gözle görülür aglütinasyon oluşur. Rallu ve ark. (2006) yaptıkları çalışmalarında gebelerde GBS taşıyıcılığında LIM sıvı besiyerinden yapılan lateks aglütinasyon testinin, LIM sıvı besiyerinden yapılan subkültüre göre %15 daha sensitif olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda LIM besiyerinden yapılan lateks aglütinasyon testi ile pozitif bulunan 70 örneğin 68'inin GBS olduğu doğrulanmıştır. Lateks aglütinasyon testinin duyarlılığının %100, özgüllüğü %99.5, PPD ve NPD değerleri ise %97.1 ve %100 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre lateks aglütinasyon testinin yalancı pozitifliğe neden olduğu düşünülmüştür.

PCR invitro koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanan spesifik ve hassas bir testtir (Saiki ve ark. 1985, Mullis1990). Yapılan çalışmalarda LIM sıvı besiyerinden PCR yönteminin LIM sıvı besiyerinden subkültür yöntemine göre daha (%12-57) sensitif olduğu söylenmesine rağmen (Goodrich ve Miller 2006), çalışmamızda LIM sıvı besiyerinden yapılan PCR ile 62 örnekte (%12.4) pozitiflik saptanmıştır. PCR'in duyarlılığı %91.2, özgüllüğü %98.6, PPD ve NPD değerleri ise %100 ve %98.9 olarak hesaplanmıştır.

GBS taşıyıcılığının saptanmasında yöntemler arasındaki farkı hesaplamak için yapılan istatistik analizinde PCR ile lateks aglütinasyon ($p=0.008$) arasında anlamlı fark bulunurken kültür ile lateks aglütinasyon ($p=0.063$) , kültür ile PCR ($p>0.05$) arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

GBS'ler alt gastrointestinal ve genitoüriner sistemi kolonize ederler (Spellerberg 2009). Kadınların genital sistemindeki kolonizasyonun sıklığını etkileyen çeşitli faktörler vardır. Cinsel eş sayısı, coğrafi bölge, ırk, kültürel durum, yaş, parite, gebelik süresi, RIA kullanımı bu faktörlendir (Ardıç ve Sezer 2003, Arslanoğlu ve Kültürsaray 2001). Yurt dışındaki yüksek GBS izolasyon oranı da

Amerika ve Avrupa’da yaygın olan çok eşli cinsel yaşam ve siyahi ırktan olguların sayısının fazlalığı ile ilişkilendirilmiştir (Phares ve ark. 2008).

Gebelik boyunca GBS kolonizasyonu değişkenlik gösterdiğinden CDC’nin gebelerde 35-37. gebelik haftasında önerdiği GBS taramasının daha önceki zamanlarda yapılması yenidoğanda erken başlangıçlı GBS hastalığı için bir öngörü oluşturmamaktadır (Regan ve ark. 1996). Gebeliğin 35 hafta ve sonrasında yapılan GBS kültürünün negatif prediktif değeri %95-%98 dir ve taramalar 35 haftadan daha erken yapıldığında İAP alacak gebeler doğru şekilde belirlenememektedir (Verani ve ark. 2010). Çalışmamızda gebelik haftasına göre GBS kolonizasyonu incelendiğinde gebelik haftası ile GBS kolonizasyonu arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Yapılan çalışmalarda gebelik yaşının kolonizasyon ile ilişkisine bakıldığında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bir çalışmada GBS kolonizasyonun yaşla birlikte arttığı gösterilirken başka bir çalışmada 24 yaşından sonra azalma gösterdiği ifade edilmiştir (Regan ve ark. 1991, Arısoy ve ark. 2003). Diğer bir çalışmada ise en fazla 21-30 yaş grubunda %78 GBS kolonizasyonu saptanmıştır (Gültepe ve ark. 2011). Shabayek ve ark. da (2010) 30 yaşından sonra kolonizasyonun arttığını göstermiştir. Çalışmamızda ise en sık 31-35 yaş grubunda %3.4 GBS kolonizasyonu saptanmıştır fakat yaş grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Gebelik sayısı ve doğum sayısının GBS kolonizasyonu ile ilişkisi pek çok çalışmada incelenmiş olmasına rağmen yapılan çalışmalarda anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bazı çalışmalarda gebelik sayısı artışı ile GBS kolonizasyonun arttığı ifade edilirken bazı çalışmalarda ise üç gebelikten sonra GBS kolonizasyonunun azaldığı bildirilmektedir (Elçi ve ark. 1997, Tok ve ark. 2010). Arısoy ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada anne yaşının ve gebelik sayısının GBS kolonizasyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise GBS kolonizasyonu gebelik sayısı 4 ve üzeri olan gebelerde en yüksek oranda (%13.9) bulunmuştur. Gebe olmayan kadınlarda ise 2 ile 3 gebelik geçiren 129 kadından 24’ünde (%18.6) GBS kolonizasyonu en yüksek oranda bulunmuştur. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Kuveyt'te yapılan bir çalışmada iki doğumdan sonra GBS kolonizasyonun arttığı ifade edilmiştir (Hammoud ve ark. 2002). Bizim çalışmamızda gebelerde hiç doğum yapmamış olanlarda %10.3, daha önce bir doğum yapanlarda %12, iki ile üç doğum yapanlarda %6.9 GBS kolonizasyonu bulunmuş, dört ve üzeri doğum yapanlarda ise kolonizasyona rastlanmamıştır. Çalışmamızda gebe olmayan kadınlarda GBS kolonizasyonu, hiç doğum yapmamış olanlarda %14.3, bir doğum yapanlarda %10.7, iki ile üç doğum yapanlarda %20.6, dört ve üzeri doğum yapanlarda %11.5 bulunmuştur. İstatiksel olarak gebelik ve doğum sayısı ile GBS kolonizasyonu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

GBS kolonizasyonu vajinal duş yapan gebelerde %10.4, vajinal duş yapmayan gebelerde ise %9.6 bulunmuştur. Gebe olmayan kadınlarda ise vajinal duş yapanlarda %19.8, vajinal duş yapmayan %15.1 bulunmuştur. Çalışmamızda vajinal duş ile GBS kolonizasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$).

Yapılan çalışmalarda menstruasyon öncesinde ve gebelik sırasında GBS'lerin bulunma sıklığının arttığı ifade edilmiştir (İlhan ve ark. 1997). Bizim çalışmamızda GBS kolonizasyonu gebe olmayan kadınlarda menstruasyonun ilk 14 günü 13 kadında (%13), 14 günden sonra ise 34 kadında (%18) GBS kolonizasyonu tespit edilmiş ancak istatistiksel olarak menstruasyon dönemi ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($P>0.05$).

Farrag ve ark. (1985) RİA kullanımının GBS kolonizasyonuna etkili faktörlerden biri olduğunu belirtmişlerdir. Son trimester gebelerde gebelik öncesi RİA varlığı ile GBS kolonizasyonu ilişkisine bakılan iki ayrı çalışmadan birinde RİA varlığının kolonizasyonu artırdığı (Gül ve ark. 2005) diğerinde ise artırmadığı (Tok ve ark. 2010) ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda RİA kullanan 26 kadının ikisinde (%7.7), RİA kullanmayan 259 kadının 45'inde (%17.4) GBS kolonizasyonu bulunmuştur. RİA varlığı ile GBS kolonizasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$).

McGregor ve ark. (1993) yaptıkları bir çalışmada GBS kolonizasyonunun gebelerde EMR ve erken doğum eylemine neden olabileceğini bildirmişlerdir. Türkiye'de doğum eyleminde olan gebe kadınlarda yapılan bir çalışmada ise GBS

kolonizasyonu ile EMR arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Karadağ ve ark 2013). Bizim çalışmamızda öyküsünde EMR tarifleyen 13 kadının beşinde GBS kolonizasyonu saptanırken EMR tariflemeyen 487 kadının 55'inde GBS kolonizasyonu saptanmıştır. GBS pozitifliği ile EMR öyküsü arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p=0.022).

PFGE, moleküler tiplendirme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilmektedir. PFGE'de bozulmamış DNA gerekli olduğundan DNA'da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu moleküler tiplendirme için uygun değildir. PFGE ile suşların birbirleriyle olan ilişkileri ortaya konulabilmektedir (Swaminathan ve Matar 1993). Fasola ve ark. (1993) geleneksel moleküler yöntem ve PFGE yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında virülan GBS suşlarını göstermede PFGE yönteminin mükemmel bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. GBS serotip ve genotiplerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada izolatların PFGE subtiplerininin majör grup olarak tanımlanan GBS-V serotipinde olduğu gösterilmiştir (Elliott ve ark. 1998). Brezilya'da yapılan bir çalışmada ise 45 GBS izolatının 24'ünün aynı pulsotip olduğu bulunmuş ve ileride serotip çalışılması gerekliliği ifade edilmiştir (Corrêa ark. 2009). Usein ve ark. (2012) yaptıkları PFGE çalışmasında \geq %70 benzerlik analizine göre 118 tip izolatta 21 pulsotip bulmuşlar ve bunların çoğunlukla serotip V, serotip III içerdiğini ve tetrasikline, makrolite direncin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda PFGE metodu ile 63 GBS'nin 46'sının 13 farklı pulsotipin herhangi birinde yer aldığı, 17 GBS'nin ise %70 benzerlik katsayısının altında kaldığı için sporadik suşlar olduğu görülmüştür. Pulsotip 4'de on izolat, pulsotip 6'da ise altı izolat yer almıştır. Bölgemizden izole ettiğimiz GBS'un belli bir klonda yoğunlaşmadığı, farklı klonlar içinde dağılım gösterdiği ve sporadik suşlar içerdiği belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda intrapartum kemoprofilaksinin erken başlangıçlı neonatal GBS infeksiyonu insidansını azalttığı gösterilmiştir (Gil ve ark. 1986). CDC, profilakside penisilin G veya ampisilini önermektedir (www.cdc.gov 2010). Beta-laktam antibiyotiklere alerjisi olan hastalara önerilen alternatifler ise klindamisin ve eritromisindir (Karakuş ve ark. 2007). Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada, penisiline direnç saptanmamış olmasına rağmen penisilin toleransına bağlı tedavi başarısızlıkları bildirilmeye başlamıştır (Wu ve ark. 1997).

Çalışmamızdaki GBS duyarlılık testinde penisiline, seftriaksona, linezolide ve vankomisine direnç saptanmamıştır. Eritromisine direnç %23.8, klindamisine direnç %9.5 bulunmuştur. Tetrasikline ise %87.8 ile en yüksek oranda direnç gözlenmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada SÜTF Hastanesi Kadın Doğum Kliniğine başvuran kadınların rektovajinal örneklerinde %13.6 oranında GBS pozitif suş üremiş, sonuçların rutinde GBS taraması yapan diğer ülkelerle benzer olduğu görülmüştür.

GBS'lerin yeni doğanda oluşturduğu ciddi infeksiyonlar nedeniyle GBS'lere yönelik kültür taramalarının gebelerde CDC'nin önerileri doğrultusunda 35-37'nci gebelik haftalarında yapılması, yeni doğandaki risk faktörlerinin belirlenerek uygun zamanda kemoproflaksinin yapılması bakımından önemlidir. Çalışmamızda GBS pozitifliği ile EMR arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0.022$). CDC'nin önerileri doğrultusunda EMR tarifleyen gebelerin intrapartum antibiyotik profilaksisi (İAP) alması yenidoğan GBS hastalığını önlemesi açısından son derece önemlidir.

Çalışmamızda izole edilen 63 GBS izolatının PFGE ile 13 farklı pulsotipde olduğu, PT4'te 10 ve PT6'da 6 izolatın benzer genotipte olduğu anlaşılmıştır. Bölgemizden izole ettiğimiz GBS'nin belli bir klonda yoğunlaşmadığı, farklı klonlar içinde dağılım gösterdiği ve sporadik suşlar içerdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak GBS'lerin gebelerde 35-37'nci gebelik haftalarında rektovajinal olarak taranması ve en kısa sürede kolonizasyonun saptanması ülkemizde yenidoğanlarda GBS'ye bağlı hastalık ve ölüm oranlarını azaltacağı düşünülmüş olup, profilaksi uygulama programını belirleyen ulusal kılavuzların hazırlanmasının gerekliliği anlaşılmıştır. Çalışmamızda bulduğumuz epidemiyolojik verilerin ileriye yönelik araştırmalar ve tedavi yöntemleri açısından yararlı olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn. Revised guidelines for prevention of early-onset group B streptococcal infection. *Pediatrics*, 1997, 99: 489-96.
2. Anthony BF, Okada DM, and Hobel CJ. Epidemiology of group B streptococcus: longitudinal observations during pregnancy. *J Infect Dis* 1978, 137(5): 524-530.
3. Apgar BS, Greenberg G, Yen G. Prevention of Group B Streptococcal disease in the newborn, *American Family Physician*, 2005, 71(5): 903-10.
4. Ardiç N, Sezer O. B Grubu Streptokoklar (*Streptococcus agalactiae*), *Klinik Derg* 2003, 16 (3): 101-5.
5. Arısoy AS, Kurutepe S, Algün Ü, Çelik H, İspahi Ç, Özbakkaloğlu B. Üçüncü trimester gebelerde grup B streptokok kolonizasyonu. *İnfeksi Derg* 2000, 14(1): 57- 9.
6. Arısoy AS, Altınışık B, Tünger Ö, Kurutepe S, İspahi Ç. Maternal carriage and antimicrobial resistance profile of group B streptococcus. *Infection* 2003, 31: 244-6.
7. Arslanoğlu S, Kültürsay N. Perinatal Grup B Streptokok Enfeksiyonları: 2000 Yılında Dünyada Geline Nokta. *Perinatoloji Dergisi*, 2001, 9(2): 1-8.
8. Balatlı T, Akşit F, Kiraz N. Gebelerde son trimesterde Grup B streptokok kolonizasyonu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1989, 19: 309-14.
9. Bayer AS, Chow AW, Anthony BF and Guze L B. Serious infections in adults due to group B streptococci. Clinical and serotypic characterization, *Am J Med* 1976, 61(4): 498-503.
10. Beitune PE, Duarte G, Maffei CML. Colonization by *Streptococcus agalactiae* during pregnancy: maternal and perinatal prognosis. *Braz J Infect Dis* 2005, 9(3): 276-282.
11. Bergeron MG, Danbing KE, Menard C and others. Rapid Detection of Group B Streptococci in Pregnant Women at Delivery, *New Engl J Med* 2000, 343(3): 175-9.
12. Berkiten R. Grup B streptokoklar (*Streptococcus agalactiae*). In: Ağaçfıdan A, Badur S, Türkoğlu S, derleyenler. *İnfeksiyon Hastalıklarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler*. İstanbul, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2002, 42: 125-131.
13. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. 10. baskı. İzmir, Barış Yayınları, 2000; 293-5.
14. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji*. 8. basım. İzmir. Barış yayınları, 1994.
15. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Beşinci baskı. İzmir, Barış Yayınları, 2009; 495-523.
16. Bohnsack JF, KW Mollison, Buko AM, Ashworth JC and Hill RH. Group B streptococci inactivate C5a by enzymatic cleavage at the carboxy terminus. *Biochem J* 1991, 273: 635-640.
17. Bolatlı T, Akşit F, Kiraz N. Gebelerde son trimesterde grup B streptokok kolonizasyonu. *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Derg* 1989, 19: 309-14.
18. Bolduc GR, Baron MJ, Gravekamp C, Lachenauer CS, Madoff LC. The alpha C protein mediates internalization of group B *Streptococcus* within human cervical epithelial cells, 2002, 4(11): 751-8.
19. Boyer KM, Gadzala CA, Kelly PD, Bund LI and Gottoff SP. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. *J Infect Dis* 1983, 148(5): 802-809.
20. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. The Streptococci. Jawetz, Melnick, Adelberg eds. *Medical Microbiology*. 22'nd edition. New York, Mc Graw Hill, 2001, 203-16.
21. Buseti M, D'Agaro P, Campello C. Group B streptococcus prevalence in pregnant women from North-Eastern Italy: advantages of a screening strategy based on direct plating plus broth enrichment. *J Clin Pathol* 2007 60(10): 1140-3.
22. Campbell JR, Hillier SL, Krohn MA, Ferrieri P, Zaleznik DF et al. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obstet Gynecol* 2000 96: 498-503.
23. Cengiz A B. Yenidoğan Sepsisinde Değerlendirme ve Yönetim, *Güncel Pediatri Dergisi*, 2007; 1: 1.
24. Cengiz A T. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, 2004; 362-373.
25. Centers for Disease Control and Prevention: Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. *MMWR* 1996; 45 (RR-7): 1-24.
26. Centers for Disease Control and Prevention: Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR CDC Surveill Summ*, 2002; 51 (RR11): 1-22.

27. Chuard C ve Reller LB. Bile-esculin test for presumptive identification of enterococci and streptococci effects of bile concentration, inoculation technique and incubation time. *J Clin Microbiol* 1998, 1135-36.
28. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document M100-S16, Wayne, Pennsylvania USA, 2011.
29. Corrêa ABA, Oliveira ICM, Pinto T de CA, Mattos MC, Benchetrit LC. Pulsed-field gel electrophoresis, virulence determinants and antimicrobial susceptibility profiles of type Ia group B streptococci isolated from humans in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2009, July Vol. 104(4): 599-603.
30. Çelebi S, Tuncel E, Babacan M. Yöremiz gebe kadınlar ve yenidoğanlarda B grubu streptokok prevalansı. *Mikrobiyol Bül* 1992, 26: 149-54.
31. Delannoy C MJ, Crumlish M, Fontaine M C, Pollock J, Foster G, Dagleish MP, Turnbull JF and Zadoks RN. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish <http://www.biomedcentral.com>, 2013, 1471-2180/ 13/ 41.
32. Deren Ö, Bildirici İ, Durukan T, Önderoğlu L, Ünal S, Kocagöz S, Yurdakök M, Aygün C. 3. Trimester Gebelerde Grup B Streptokok Kolonizasyonu Prevalansı ve Kemoprofilaksisi. *Perinatoloji Dergisi*, 1999 7(2): 137-137.
33. De-Paris F, Machado AB, Gheno TC, Ascoli BM, Oliveira KR, Barth AL. Group B *Streptococcus* detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. *Braz J Infect Dis*, 2011, 15(4): 323-7.
34. Dillon HC Jr, Gray E, Pass MA, and Gray BM. Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci during pregnancy. *Journal of Infectious Diseases*, 1982; 145(6), 794–799.
35. Dillon HC Jr, Khare S, Gray BM. Group B streptococcal carriage and disease: a 6-year prospective study. *J Pediatr* 1987, Jan 110(1): 31-6.
36. Doran KS, Nizet V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy, *Molecular Microbiology* 2004, 54(1): 23- 31.
37. Dunne WM, Jr and CA Holland-Staley. Comparison of NNA agar culture and selective broth culture for detection of group B streptococcal colonization in women. *J Clin Microbiol* 1998, 36: 2298–2300.
38. Edwards MS, Baker CJ. *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 6th ed. Elsevier Churchill Livingstone 2005, 2423-2434.
39. Efstratiou A, Sriskandan S, Lamagni T, Whatmore A. β -Haemolytic Streptococci, Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Eds, Gillespie, S H, Hawkey, P M, 3-20, second edition, 2006.
40. El Aila NA, Tency I, Claeys G, Saerens B, Cools P, Verstraelen H, Temmerman M, Verhelst R, Vaneechoutte M, Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B streptococcus carriage in pregnantwomen. *BMC Infect Dis*, 2010, 29(10): 285.
41. Elçi S, Gül K, Akpolat NÖ, Göçmen A. Gebe Kadınlarda B Grubu Streptokok Kolonizasyonu *Klimik Derg*, 1997, 10(2): 76-77.
42. Elliott JA, Farmer KD, Facklam RR. Sudden increase in isolation of Group B Streptococci, serotype V, Is not due to emergence of a new Pulsed-Field Gel Electrophoresis Type. *J Clin Microbiol* 1998, July 2115–2116.
43. Elsayed S, Gregson DB, Church DL. Comparison of direct selective versus nonselective agar media plus LIM broth enrichment for determination of group B streptococcus colonization status in pregnant women. *Arch Pathol Lab Med*, 2003, 127718–720.
44. Eren Topkaya A, Çiragil P, Sezer O, Karateke A, Küçükercan M. The Serotype Distribution of Group B Streptococci Isolated from PregnantWomen, *Turk Mikrobiyol Cem Derg* 2005, 35: 81-4.
45. Eren Topkaya A, Küçükercan M, Oğuzoğlu N, Ünal N, Karateke A. Bebeklerde Grup B Streptokok Taşıyıcılığı, *İnfeksiyon Dergisi*, 2002, 16(4): 423-6.
46. Facklam RR, Cooksey RC, Wortham EC. Evaluation of a commercial latex agglutination. *J Clin Microbiol* 1979, 10: 641.
47. Facklam RR, Carey RB. Streptococci and aerococci, EH Lenette, AA Balows, WJ Hausler, Shadomy HJ eds. *Manuel of Clinical Microbiology*, 4th ed, American Society for Microbiology, Washington, 1985, 154.
48. Farley MM. Group B streptococcal disease in non pregnant adults. *Clin Infect Dis* 2001, 33: 556-61.
49. Farrag OA, Gawad AA, Antar S. Group B beta Haemolytic Streptococcal Colonization in Women Using Intrauterine Contraceptive Devices. *Contraception*. 1985, 31: 595.

50. Fasola E, Lıvdahl C, Ferrieri P. Molecular analysis of multiple isolates of the major serotypes of Group B Streptococci. *J Clin Microbiol* 1993, OCT, 2616-2620.
51. Feld SM, Harrigan JT. Vaginal gram stain as an immediate detector of group B streptococci in selected obstetric patients, *Am J Obstet Gynecol* 1987, 156: 446.
52. Ferrieri P. Neonatal susceptibility and immunity to major bacterial pathogens. *Rev Infect Dis* 1990, 12 (Suppl 4): 394-400.
53. Franciosi RA, JD Knostman, RA Zimmerma. Group B streptococcal neonatal and infant infections, *J Pediatr* 1973, 82(4): 707-718.
54. Gibson RL, Nizet V, Rubens CE. Group B streptococcal β -hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatr Res* 1999, 45: 626-34.
55. Gil EG, Rodriguez MC, Bartoleme R, Berjano B, Cabero L, Andreu A. Evaluation of the Granada Agar Plate for detection of vaginal and rectal group B streptococci in pregnant women. *J Clin Microbiol* 1999, 37: 2648-51.
56. Glezen WP, Alpers M. Maternal immunization. *Clin Infect Dis* 1999, 28: 219-24.
57. Goodrich JS, and MB Miller. Comparison of two real-time PCR methods to detect group B Streptococcus in intrapartum setting, Abstr. 106th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC abstr. 2006, C-135, p 124.
58. Gökalp A, Oğuz A, Bakıcı Z, Gültekin A, Toksoy H, Gürel M, Kanara G. Neonatal grup B streptokok kolonizasyonunun annelerdeki ve anorektal sistem taşıyıcılığı ile ilişkisi. *Mikrobiol Bült*, 1986, 20: 248-55.
59. Gökırmak F. Gram pozitif piyojenik koklar. İçinde: Kılıçtırgay K, editor. *Klinik Mikrobiyoloji. Birinci Baskı*, Bursa, Onur Yayıncılık, 1993; 16.
60. Gupta C, Briski LE. Comparison of two culture media and three sampling techniques for sensitive and rapid screening of vaginal colonization by group B streptococcus in pregnant women. *J Clin Microbiol*, 2004; 42(9): 3975-7.
61. Gül HC, Dede M, Avcı DY, Eyigün CP, Pahsa A. Üçüncü trimestr Hamilelerde vaginal grup B streptokok kolonizasyonu. *Klimik Derg*, 2005; 18: 27-29.
62. Gültepe B, Güdücüoğlu H, Özkaçmaz A, Çim N, Berktaş M. Gebelerde Grup B Streptokok Kolonizasyonu ve Antimikrobiyal Duyarlılıkları. *Ortadoğu Medical journal* 2011, 3(2): 71-76.
63. Hammoud MS, Thalib L, Maiyegun SO. The epidemiology of group B streptococcal colonization among obstetrical and newborn populations in Kuwait. *Int J Gynaecol Obstet*, 2002, 76(3): 315-6.
64. Hansen SM, Uldbjerg N, Kilian M, Sørensen UB. Dynamics of Streptococcus agalactiae colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J Clin Microbiol*, 2004; 42(1): 83-9.
65. Holm SE, Mascini EM. Streptococci and Related Genera In: Armstrong D, Cohen J eds. *Infectious Diseases*, 2000.
66. Hwang MN ve Ederer GM. Rapid hippurate hydrolisis method for presumptive identification of group B Streptococci. *J Clin Mikrobiol*. 1975, 114-5.
67. İhan F, Ay S, Akbulut H, Yücel AY, Erkmn D, Yılmaz M. Vajinal akıntı örneklerinde saptanan mikroorganizmalar. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1997, 31: 203-6.
68. Jones AL, Needham RHV, Rubens CE. The delta subunit of RNA polymerase is required for virulence of Streptococcus Agalactiae. *Infect Immun* 2003, 71(7): 4011-17.
69. Jones AL, Needham RH, Clancy A, Knoll KM, Rubens CE. Penicillin-binding proteins in Streptococcus agalactiae: a novel mechanism for evasion of immune clearance. *Mol Microbiol* 2003, 47: 247-256.
70. Jones N, Oliver K, Jones Y, Haines A, Crook D. Carriage of Group B Streptococcus in Pregnant Women from Oxford, UK. *J Clin Pathol* 2006, 59(4): 363-6.
71. Kadanalı A, Altıparlak Ü, Kadanalı S. Maternal carriage and neonatal colonization of group B streptococcus in eastern Turkey: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. *Int J Clin Pract*, 2005, 59: 437-40.
72. Karadağ FY, Hızıl K, Gelisen O. Colonization of group b streptococci in pregnant women at delivery. *J Turk Soc Obstet Gynecol* 2013, Vol: 10, Issue: 1, Pages: 16- 20.
73. Karaduman A, Doğruman Al F, Aksu G, Haberal A. Gebelerde saptanan vajinal enfeksiyon etkenlerinin dağılımı. *İnfeksiyon Dergisi* 2006, 20(3): 171-175.
74. Karakuş M, Karaca Derici Y, Günçiner S. Gebelerde grup B streptokok kolonizasyonu ve antimikrobiyal direnç paterni. *Ege Tıp Dergisi* 2007, 46(3) : 151 -154.

75. Koneman E, Winn W, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Washington CW, Procop GW, Woods GL. The Gram positive cocci Part II: Streptococci, Enterococci, and the "Streptococci-Like Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams and Wilkins. Sixth edition. Quebecor-Dubuque, United States of America 2006, 672-764.
76. Kovavisarath E, Sa-adying W, Kanjanahareutai S. Comparison of combined vaginal-anorectal, vaginal and anorectal cultures in detecting of group B streptococci in pregnant women in labor. *Journal of the Medical Association of Thailand* 2007, 90: 1710-4.
77. Lang S, and Palmer M. Characterization of Streptococcus agalactiae CAMP factor as a pore forming toxin, *J Biol Chem* 2003, 278: 38167-38173.
78. Law MR et al. The prevention of neonatal group B streptococcal disease: a report by a working group of the Medical Screening Society. *J Med Screen* 2005, 12: 60-8.
79. Lin FY, Azimi PH, Weisman LE. Capsular polysaccharide types of group B streptococcal isolates from neonates with early-onset systemic infection. *J Infect Dis* 1998, 177: 790-792.
80. Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson T, Puliti M, Tissi L, and Nizet V. Linked GBS hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment act synergistically to subvert host phagocytic defenses. Abstract ASM General Meeting, New Orleans, LA, 2004 D-257, p. 238.
81. Lue YA, Howit IP, Ellner PD. Rapid Grouping of Beta-Hemolytic Streptococci by Latex Agglutination. *J Clin Microbiol* 1978, 8: 326-8.
82. Main EK, Slagle T. Prevention of early-onset invasive neonatal group B streptococcal disease in a private hospital setting: the superiority of culture based-based protocols. *Am J Obstet Gynecol* 2000, 182: 1344-7.
83. Mandal BK, Mayon White RT. Lecture Notes on the Infectious Diseases. Fourth Edition, Blackwell Scientific Publ, Cations Oxford, 1984, 127-135.
84. Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK et al. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect Immun* 1992, 14: 3986-93.
85. McGregor JA, French JI, Seo K. Premature rupture of membranes and bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993, 169(2 Pt 2): 463- 6.
86. Milligan TW, Baker CJ, Straus DC et al. Association of Elevated Levels of Extracellular Neuraminidase With Clinical Isolates of Type III Group B Streptococci. *Infect Immun* 1978, 21: 738-46.
87. Motlova J, Strakova L, Urbaskova P, Sak P, Sever T. Vaginal & rectal carriage of Streptococcus agalactiae in the Czech Republic: incidence, serotypes distribution and susceptibility to antibiotics. *Indian J Med Res* 2004, 119: 84-87.
88. Moyo SR, Mudzori J, Tswana SA, Maeland JA. Prevalence, capsular type distribution, anthropometric and obstetric factors of group B streptococcus (Streptococcusagalactiae) colonization in pregnancy. *Cent Afr J Med* 2000, 46: 115-120.
89. Mullis KB. The unusual origin of th polymerase chain reaction. *Scientific American*, 1990; April: 56-61.
90. NCCLS Methods for Dilution Antimicrobial Disk Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-8th ed. NCCLS document M7-A6. NCCLS 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA, 2003; 19087-1898.
91. Nealon TJ, Mattingly SJ. Kinetic and Chemical Analyses of the Biologic Significance of Lipoteichoic Acids in Mediating Adherence of Serotype III. Group B Streptococci. *Infect Immun* 1985, 50: 107-115.
92. Nitzan Y, Maayan M, Wajzman C. Streptococcus group B isolates in a regional hospital area. *Med Microbiol Immunol* 1980, 169: 21-30.
93. Nizet V, Gibson R, Chi E, Framson P, Hulse M, Rubens CE. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun* 1996, 64: 3818-26.
94. Nocard E, Mollereau. Surune Mammite Contagieuse des Vaches Laitières. *Annales de l'Institut Pasteur* 1887; 1-15.
95. Overman SB, Eley DD, Jacobs BE, Ribes JA. Evaluation of methods to increase the sensitivity and timeless of detection of Streptococcus agalactiae in pregnant women, *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40(11): 4329-4331.
96. Özenci H. Streptococcus Klinik Mikrobiyoloji (Clinical Microbiology, Murray P R, 9. Baskı, 2007 Çevirisi), Çeviri Editörü; Başustaoglu A, 2009; 412-429.
97. Özerol İH, Baysal B, Şengil AZ. Üçüncü trimesterdeki hamile kadınlarda vaginal B grubu streptokok kolonizasyonu. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1994, 1(1): 14-9.

98. Paoletti LC, Madoff LC. Vaccines to prevent neonatal GBS infection. *Semin Neonatol* 2002, 7: 315-323.
99. Pasteur L. Septicemie puerperale. *Bulletin de L'Academie de Medecine (Paris) 2me serie- tome VIII* 1879, 8256-60.
100. Patterson MJ, Hafeez AEB. Group B Streptococci in human disease, *Bacteriological Reviews* 1976, 40(3): 774-792.
101. Payne NR, Kim YK, Ferrieri P. Effect of differences in antibody and complement requirements on phagocytic uptake and intracellular killing of "c" protein-positive and negative strains of type II group B streptococci 1987, 55(5): 1243-51.
102. Phares CR, Lynfield R, Farley MM and others. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Disease in the United States, 1999-2005, *Journal American Medical Association* 2008, 299(17): 2056-2065.
103. Platt MW, McLaughlin JC, Gilson GJ, Wellhoner MF, Nims LJ. Increased recovery of group B Streptococcus by the inclusion of rectal culturing and enrichment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995, 21: 65-8.
104. Polat E, Özer Y, Çepni İ, Kişioğlu S, Karataş A, Altaş K. Gebe kadınlarda B grubu streptokok kolonizasyonu. *KLİMİK XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (30 Mart- 3 Nisan, İstanbul) 2003*, P-05/10 s. 304.
105. Pratt Rippin K, Pezzlo M. Identification of commonly isolated aerobic gram positive bacteria. In Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, America Society for Microbiology 1992, Washington, 1.20.12.
106. Pritchard DG, Lin B, Willingham TR and Baker JR. Characterization of the Group B Streptococcal Hyaluronate Lyase. *Arch. Biochem. Biophys* 1994, 315: 431-437.
107. Quinlan JD, Hill DA, Maxwell BD, Boone S, Hoover F, Lense JJ. The necessity of both anorectal and vaginal cultures for group B Streptococcus screening during pregnancy. *J Fam Pract* 2000, 49: 447-8.
108. Rallu F, Barriga P, Scrivo C, Martel-Laferrie`re V and Laferrie`re C. Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for screening for group B streptococcus carriage in pregnant women. *J. Clin. Microbiol* 2006, 44: 725-728.
109. Regan JA, Chaos, James LS. Premature Rupture of Membranes, Preterm Livery and Group B Streptococcal Colonization of Mothers. *Am J Obstet Gynecol* 1981, 141: 184-6.
110. Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP et al. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. VIP Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 1996, 174:1354-60.
111. Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. *Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Obstet Gynecol* 1991, 77(4): 604-10.
112. Ronald S, Gibbs MD, Stephanie Schrag PhD and Anne Schuchat MD. Perinatal infections due to Group B Streptococci. *The American College of Obstetricians and Gynecologists*, Published by Lippincott Williams-Wilkins, 2004.
113. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N. Enzymatic amplification of B-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230: 1350-1354.
114. Swaminathan B and Matar GM. Molecular typing methods. In: *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Eds, Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. ASM Press, Washington D.C. 1993; 26-50.
115. Schauf V and Hlaing V. Group B streptococcal colonization in pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* 1976, 47(6): 719-21.
116. Schlegel L and Bouvet A. Streptococcaceae: strptococcus et autres germes apparentes. *Precis de Bacteriologie Clinique*, Edition Eska 2000, 42: 840.
117. Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *The New England, Journal of Medicine* 2000, 342: 15-20.
118. Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease Revised Guidelines from CDC, *MMWR* 2002, August 1-18.
119. Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 497-513.
120. Schuchat A. Group B streptococcus, *Lancet* 1999; 353: 51-6.
121. Schuchat A. Group B streptococcal disease: From trials and tribulations to triumph and trepidation. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 751-756.

122. Shabayek S, Abdalla S, Abouzeid AM. Comparison of scpB gene and cfb gene polymerase chain reaction assays with culture on Islam medium to detect Group B Streptococcus in pregnancy. *Indian J Med Microbiol* 2010, 28(4): 320-5.
123. Shet A, Ferrieri P. Neonatal and maternal group B streptococcal infections, *Indian J Med Res* 2004, 120: 141-150.
124. Skalka B and Smola J. Lethal effect of CAMP factor and UBERIS factor a new finding about diffusible exosubstances of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*, *Zentralbl Bakteriologie A* 1981, 249: 190-4.
125. Söyletir G, Çerikcioğlu N. Streptokokların Genel Özellikleri. Söyletir G, Ülger N. Viridans Streptokoklar. Söyletir G, Över U. Beta Hemolitik Streptokoklar. Büke A Ç, Büke M. Poststreptokoksik Komplikasyonlar. İçinde Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editör. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2 Etkenlere Göre İnfeksiyonlar*. 2002, syf.1467-97.
126. Söyletir G. Streptokokların Genel Özellikleri. İçinde: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editör. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitabevi, Cilt 2 Etkenlere Göre İnfeksiyonlar* 2008; 2019-2057.
127. Spellerberg B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes and Infection* 2000; 2: 1733-42.
128. Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9. baskı (Çeviri ed, Başustaoğlu A). Ankara, Atlas Kitapçılık, 2009; syf. 412-429.
129. Suara RO, Adegbola RA, Baker CJ, Secka O, Mulholland EK, Greenwood BM. Carriage of group B streptococci in pregnant Gambian mothers and their infants. *J Infect Dis* 1994, 170: 1316-9.
130. Şanal L, Sultan N, Güner H. Son Trimestir Gebelerde Grup B Streptokokların Farklı Besiyerleri İle İzolasyonu ve Serotiplendirilmeleri. *Ortadoğu Medical Journal* 2012, 4 (3): 127-132.
131. Takahashi S, Adderson EE, Nagano Y, Nagano N, Briesacher MR, Bohnsack JF. Identification of highly encapsulated genetically related group of invasive type III group B streptococci, *J Infect Dis* 1998, 177: 1116.
132. Tamura GS, Kuypers JM, Smith S, Raff H and Rubens CE. Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infect Immun* 1994, 62: 2450-2458.
133. Taşkın L. *Doğum ve Kadın Sağlığı Hemşireliği, Sitem Ofset Matbaacılık, Ankara, Genişletilmiş VI. Baskı, 2003; s:83-116.*
134. Tok D, Mert G. Gebelerde Son Trimestirde Vajinal Grup B Streptokok Kolonizasyonu. *TAF Prev Med Bull* 2010, 9(2): 123-126.
135. Topkaya AE, Küçükercan M, Oğuzoğlu N, Ünal N, Narin K. Vajinal ve rektal kolonizasyonu olan gebelerden izole edilen B Grubu Streptokokların antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003, 33: 242-5.
136. Topkaya AE. Streptokoklar, *Tıbbi Mikrobiyoloji (Medical Microbiology, Murray P R, 6th Edition, 2009 Çevirisi), Çeviri Editörü; Başustaoğlu A, 2010; 225-242.*
137. Unat EK. *Temel Mikrobiyoloji, 1. Baskı. İstanbul, Bete Basım Yayım Dağıtım Anonim Şirketi, 1985, 448.*
138. Usein CR, Grigore L, Georgescu R, Cristea V, Băltoiu M, Străuț M. Molecular characterization of adult-colonizing *Streptococcus agalactiae* from an area-based surveillance study in Romania. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012, 31: 2301-2310.
139. Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Tümbay E, Mete Ö. *Streptococcus, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Editörler. Mutlu G, İmir T, Cengiz A T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö, Günes Kitabevi, Ankara. 1999, syf 349-364.*
140. Valentin-Weigand P and Chhatwal GS. Correlation of epithelial cell invasiveness of group B streptococci with clinical source of isolation. *Microb Pathog* 1995, 19: 83-91.
141. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010, 19, 59(RR-10): 1-36.
142. Wessels MR, Kasper DL. *Group B streptococcus*. Eds. Gorbach S L, Bartlett J G, Blacklow N R. *Infectious Diseases, Third edition, Philadelphia, Lippincott Williams Wilkins, 2004, 1616-22.*
143. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, cilt 2, Etkenlere göre infeksiyonlar, XXVII-Bakteriyel infeksiyonlar, Streptokokların Genel Özellikleri, Beta hemolitik Streptokoklar, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.*
144. Wilkinson HW. Analysis of Group B Streptococcal types associated with disease in human infants and adults, *J Clin Microbiol* 1978, 7(2): 176-179.

145. Wilson CB, and Weaver WM. Comparative susceptibility of group B streptococci and *Staphylococcus aureus* to killing by oxygen metabolites. *J Infect Dis* 1985, 152: 323–29.
146. Winram SB, Jonas M, Chi E, and Rubens CE. Characterization of group B streptococcal invasion of human chorion and amnion epithelial cells in vitro (in process citation), *Infect Immun* 1998, 66: 4932-4941.
147. Wu JJ, Lin KY, Hsueh PR et al. High incidences of erythromycin-resistant streptococci in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41: 844-6.
148. www.cdc.gov. Provisional Recommendations for the Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease Date of posting of provisional recommendations, 2010; July 29.
149. Yenişehirli G, Bulut Y, Demirtürk F, Çalışkan AC. Gebe kadınlardan izole edilen *Streptococcus agalactiae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları ve serotip dağılımı. *Mikrobiyol Bül* 2006, 40: 155-160.

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Kadın Doğum Kliniğine herhangi bir nedenle başvuran kadınlardan istenen vajinal kültür örneklerinde B grubu Streptokokların PCR ve kültür yöntemleri ile araştırılması ve genotiplendirilmesi

Feyza Alp

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ/ Konya, 2013

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi (SÜTF) Hastanesi Kadın Doğum Kliniğine 2012-2013 yıllarında başvuran 15-45 yaş arası, 215 gebe ve 285 gebe olmayan 500 kadının rektovajinal sürüntü örneği SÜTF Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışılmıştır. Alınan örneklerin LIM sıvı besiyerinde (Becton Dickinson, USA) 16-24 saatlik inkübasyonundan sonra chromID Strepto B agar (Biomerieux, Fransa) plaklarına subkültürleri yapılarak CAMP ve lateks aglütinasyon (SLIDEX, Biomerieux) testleri ile GBS olarak doğrulanmıştır. Ayrıca tüm örnekler direkt LIM sıvı besiyerinden PZR (Nanohelix, Güney Kore) ve lateks aglütinasyon (SLIDEX, Biomerieux) testi yapılmıştır. Kültürden izole edilen GBS'lere CLSI önerileri doğrultusunda antibiyotik duyarlılık testi ve klonal ilişki araştırmak için PFGE çalışılmıştır.

Çalışmaya alınan 500 kadından 21'i (%9.76) gebe, 47'si (% 17.19) gebe olmayan toplam 68 kadında (%13.6) GBS kolonizasyonu saptanmıştır. İstatiksel olarak gebe ve gebe olmayan kadınlar arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p=0.03$). GBS kolonizasyonu ile gebelik yaşı, gebelik sayısı ve haftası, doğum sayısı, RİA varlığı, menstruasyon dönemi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamış, EMR öyküsü ile GBS sıklığı arasında ise anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.022$). Kültürde 500 örneğin 65'inde (%13) GBS pozitifliği saptanmış, kültürün duyarlılığı %95.6, özgüllüğü %100, PPD %100 ve NPD % 99.3 olarak belirlenmiştir. LIM sıvı besiyerinden yapılan lateks aglütinasyon testi ile 500 örneğin 70'inde (%14) ve PCR ile 62'sinde (%12.4) GBS pozitifliği saptanmıştır. Lateks aglütinasyon testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %99.5, PPD ve NPD değerleri ise %97.1 ve %100 olarak, PCR'in duyarlılığı %91.2, özgüllüğü %98.6, PPD ve NPD değerleri ise %100 ve %98.9 olarak hesaplanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testinde penisilin, seftriakson, linezolid ve vankomisine direnç saptanmazken tetrasikline ise %oranında direnç gözlenmiştir. Çalışmada üretilen 63 suşun PFGE analizinde 13 farklı pulsotip belirlenmiştir. PT4'de on izolat, PT6'da ise altı izolat yer almıştır. 63 GBS'nin 46'sı 13 pulsotipin herhangi birinde yer alırken, 17'si ise sporadik suş olarak tanımlanmıştır.

Çalışmadan elde edilen veriler ışığında GBS kolonizasyonunu göstermede LIM sıvı besiyerinden GBS grup lateks aglütinasyon testi konvansiyonel kültür yöntemlerine göre daha kısa zamanda ve yüksek duyarlılıkta sonuç vermekte fakat yalancı pozitifliğe neden olmaktadır. PZR testi hızlı olmasına karşın pahalıdır ve deneyimli eleman gerektirmektedir. Kültür zaman alıcı olmasına rağmen, antibiyotik duyarlılık testi ve genotiplendirme gibi diğer testlerin uygulanması için gereklidir. GBS'lerin gebelerde 35-37'inci gebelik haftalarında rektovajinal olarak taranması ve en kısa sürede kolonizasyonun saptanması ülkemizde yenidoğanlarda GBS'ye bağlı hastalık ve ölüm oranlarını azaltacağı düşünülmüş, profilaksi uygulama programını belirleyen ulusal kılavuzların ivedilikle hazırlanmasının gerekliliği anlaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: B grubu streptokok; kolonizasyon; kültür; PCR; Lateks aglütinasyon; PFGE.

SUMMARY

Genotyping and Investigation of Group B Streptococci by PCR and Culture methods in vaginal culture samples requested from women admitted to Clinic of Gynecology and Obstetrics by any reason

A total of 500 rectovaginal swab samples obtained from 215 pregnant and 285 nonpregnant women, aged between 15-45, applied to the Clinic of Obstetrics and Gynecology, Selcuk University, Faculty of Medicine in 2012-2013 were studied in Microbiology Laboratory. The samples taken from were incubated in the LIM broth (Becton, Dickinson, USA) over night and then they were subcultured on the chromID Strepto B agar medium (Biomerieux France) after incubation. The GBS positivity was confirmed by using CAMP and latex agglutination tests (Slidex, Biomerieux). PCR (NAhohelix, South Korea) and latex agglutination (Slidex, Biomerieux) assays were carried out for all LIM broths. Antimicrobial susceptibility testing for all GBS isolates is carried out by using instructions of CLSI. PFGE is used to characterize clonal relationship among GBS isolates.

In the study, colonization with GBS were detected in 68 women (13.6%, 68/500), of which 21 (9.76%) were pregnant and 47 (17.19%) were nonpregnant. A statistically significant difference was observed between pregnant and non-pregnant women ($p < 0.05$). No significant relationship between GBS colonization rate and age of pregnant women, gravidity, gestational age, parity, IUD, and menstrual period was found. On the otherhand there was a significant relationship between GBS colonization and EMR ($p=0.022$). Sixty five GBS isolates grew on 500 samples (13%) by cultivation technique. Sensitivity of cultivation was found as 95.6%, while sensitivity, PPD and NPD were 100%, 100%, 99.3% respectively. Latex agglutination test positivity of Lim broths for GBS was 70 (14%) and PCR positivity for GBS was 62 (12.4%). Sensitivity of latex agglutination test was 100%, its specificity was 99.5%, PPV and NPV values were 97.1% and 100% respectively. The sensitivity of PCR was 91.2%, and its specificity was 98.6%. PPV and NPV values were 100% and 98.9%, respectively. While all strains were susceptible to penicillin, ceftriaxone, linezolid and vancomycin, 87.3% of strains were resistant to tetracycline. Thirteen different pulso-types (PT) were determined in the PFGE study of 63 strains isolated. There was 10 isolates in PT4 and 6 isolates in PT6. Forty six isolates out of 63 were included in any group of 13 PTs and the other 17 were identified as sporadic strains.

In the light of the data obtained from the study, GBS latex agglutination test of LIM broth media was found faster and more sensitive than cultivation method to demonstrate GBS colonization. However it could cause false positives. The PCR assay, while being fast, seems to be disadvantageous in being costly and requires experienced staff. Although the cultivation method is time consuming, it is necessary for performing antimicrobial susceptibility testing and other assays like genotyping. It is thought that rectovaginal screening of GBS in pregnant women at 35th-37th weeks of gestation and determination of colonization as soon as possible will reduce neonatal GBS infections and mortality rates in Turkey. The need for an immediate preparation of national guidelines for prophylaxis application program is now well understood.

Key Words: Group B streptococcus; colonization; cultur; PCR; PFGE.

EKLER

EK. A: Anket Formu

1. Adı Soyadı
2. Telefon numarası
3. Yaş
4. Siklusun kaçınıcı günü
5. Antibiyotik Kullanım durumu
7. Gravide
8. Parite
10. Gebelik haftası
11. EMR öyküsü
12. Diğer bebeklerde doğumdan sonra ilk 7 gün hastaneye yatış öyküsü
13. Diğer bebeklerde doğumdan sonra ilk 3 ay hastaneye yatış öyküsü
14. Vajinal duş varlığı
15. RİA varlığı

EK. B: Etik Kurul Raporu

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 02

Toplantı Tarihi : 25.10.2011

Karar Sayısı 2011/12 Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Öğretim Üyesi Prof.Dr. Duygu FINDIK'ın proje yürütücülüğünü yaptığı “Kadın Doğum Kliniğine Herhangi Bir Nedenle Başvuran Kadınlardan İstenen Vajinal Kültür Örneklerinde B Grubu Streptokokların PCR ve Kültür Yöntemleri ile Araştırılması ve Genotiplendirilmesi” başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 20.10.2011 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr. Duygu FINDIK'ın proje yürütücülüğünü yaptığı “Kadın Doğum Kliniğine Herhangi Bir Nedenle Başvuran Kadınlardan İstenen Vajinal Kültür Örneklerinde B Grubu Streptokokların PCR ve Kültür Yöntemleri ile Araştırılması ve Genotiplendirilmesi” adlı araştırmanın kabulüne, **(Proje yürütücüsü Prof.Dr. Duygu FINDIK aynı zamanda kurul üyesi olduğundan Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi'nin 4. maddesi gereği konu ile ilgili görüşmelere katılmamıştır.)** BAP desteği alındıktan sonra protokolün dosyaya ilave edilmek üzere Etik Kurul sekreteriyasına teslim edilmesine oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR
25/10/2011

Mahmut KESİK
Sekreteryaya

ÖZGEÇMİŞ

14.11.1972 tarihinde Konya'da doğan Feyza Alp 1979-1984 tarihleri arasında ilköğrenimini Konya Çumra Cumhuriyet İlkokulu'nda, 1984-1991 tarihleri arasında orta öğrenimini Konya Akşehir İmam Hatip Lisesi'nde ve lise öğrenimini Konya İmam Hatip Lisesi'nde tamamlamıştır. 1992-1998 tarihleri arasında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde üniversite öğrenimini tamamlayıp 1998-2009 tarihleri arasında Konya TEİAŞ'da Kurum Hekimi olarak görev yapmıştır. 29.06.2009 tarihinde Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başlamıştır.