

# STREPTOCOCCUS MILLERI GRUP (SMG) BAKTERİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI

## IDENTIFICATION OF *STREPTOCOCCUS MILLERI* GROUP (SMG) BACTERIA BY BIOCHEMICAL AND MOLECULAR METHODS

Gülşen GÜNEL<sup>1,2</sup> , Bülent GÜRLER<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: G.G. 0000-0003-1574-0231; B.G. 0000-0002-6433-5198

**Atf/Citation:** Gunel G, Gurler B. Streptococcus milleri grup (SMG) bakterilerinin biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):73-79. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1164336>

### ÖZ

**Amaç:** *Streptococcus milleri* grubu (SMG) bakterilerin, moleküler, biyokimyasal ve yarı otomatize tekniklerle tür ayırımının yapılması ve tedavide sık kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlılık sonuçlarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma, SMG bakteriler ile ilgili bazı önemli noktalara dikkat çekmek ve epidemiyolojik olarak önemini tespit etmek için planlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamıza 100 streptokok cinsi bakteri dahil edilmiştir. Tür tanımlaması için biyokimyasal testler ve API 20 STREP yarı otomatik identifikasyon kiti kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile hedef gen bölgeleri (HLY-MIX-U, HLY-INT-D, HLY-CC-D, 16S-ANG-U, 16S-ANG-D, ILY-4DFw, ILY-wholeC Bw) çoğaltılarak tür tanımlamaları doğrulanmıştır.

**Bulgular:** Tüm örneklerin Voges-Proskauer (VP) deneyi pozitif, hipurat hidrolizi ve pirolidonil arylamidaz (PYR) negatif olarak saptanmıştır. Tüm suşlar Lancefield grup antijeni açısından değerlendirilmiş olup, %42 G, %26 F, %5 ise C grup antijenine sahip olduğu bulunmuştur. Suşların %27'sinin ise Lancefield grup antijenleri ile antijen tipi saptanamamıştır. 100 suşun tamamı vankomisin, seftriakson, sefepim, sefotaksim, levofloksasin, linezolid antibiyotiklerine duyarlı olarak bulunmuştur. Suşlarda, %16 eritromisin, %6 klindamisin, %5 tetrasiklin, %1 kloramfenikol direnci saptanmıştır. Ampisilin ve penisilin direnci E-test yöntemi ile saptanmış ve %1 ampisilin/penisiline dirençli *Streptococcus anginosus* suşu, %2 ampisiline orta duyarlı *S. anginosus* suşu saptanmıştır. API 20 STREP sonuçlarına göre bakterilerin %41 cins bazında tanımlanmış, %45'i *S. anginosus*, %5'i *Streptococcus constellatus*, %1'i *Streptococcus intermedius* olarak sonuçlandırılmıştır. Multiplex polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonuçları ise %56 *S. anginosus*, %24 *S.constellatus*, %8'i *S. intermedius* olarak saptanmıştır. Suşların %12'sinde herhangi bir bant saptanamamıştır.

**Sonuç:** *Streptococcus milleri* grubun biyokimyasal identifikasyon şemasının henüz tam olarak tanımlanmadığı saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarımıza göre SMG'de direnç gelişimi ciddi boyutta değildir. Grubu tanımlamada ticari kitlerin yetersiz olabileceği ve yapılacak çalışmaların mutlaka moleküler bir yöntemle desteklenmesi gerekmektedir. *Streptococcus milleri* grubun biyokimyasal identifikasyon şemasının henüz tam olarak tanımlanmadığı saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarımıza göre SMG'de direnç gelişimi ciddi boyutta değildir. Grubu tanımlamada ticari kitlerin yetersiz olabileceği ve yapılacak çalışmaların mutlaka moleküler bir yöntemle desteklenmesi gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Streptococcus milleri* grup, PZR, lancefield grup antijeni, API, voges-proskauer

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to differentiate the strains of *Streptococcus milleri* group (SMG) bacteria using molecular, biochemical and semi-automated techniques and to investigate the results of susceptibility to commonly used antibiotics in treatment. It was anticipated that the study would draw attention to some important points about SMG bacteria and to determine their epidemiological importance.

**Materials and method:** A total of 100 streptococcal bacteria were included in our study. Biochemical tests and the API 20 STREP semi-automatic identification kit were used for species identification. Species identifications were confirmed by amplification of the target gene regions (HLY-MIX-U, HLY-INT-D, HLY-CC-D, 16S-ANG-U, 16S-ANG-D, ILY-4DFw, ILY-wholeC Bw) by polymerase chain reaction (PCR).

**Results:** Voges-Proskauer tests of all strains were positive, whereas hippurate hydrolysis and pyrrolidinyl arylamidase (PYR) tests were negative. All strains were evaluated in terms of Lancefield group antigen, and it was found that 42% were G, 26% were F, and 5% were C group antigen. It was not possible to determine antigen type with Lancefield group antigens in 27% of the strains. All of the isolates were found to be susceptible to vancomycin, ceftriaxone, cefepime, cefotaxime, levofloxacin, and linezolid. Erythromycin, clindamycin, tetracycline, and chloramphenicol resistance was found in 16%, 6%, 5%, and %1 of the isolates, respectively. Ampicillin and penicillin resistance were determined by the E-test method. One *Streptococcus anginosus* strain was resistant to ampicillin and penicillin, and two *S. anginosus* isolates were found to be intermediately susceptible to ampicillin. According to API 20 STREP results, 41% of the isolates were identified as genus level, 45% were *S. anginosus*, 5% were *Streptococcus constellatus*, and 1% were *Streptococcus intermedius*. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) results were found to be 56% *S. anginosus*, 24% *S. constellatus*, and 8% *S. intermedius*. No band was detected in 12% of the strains. It has been determined that the biochemical identification scheme of the *Streptococcus milleri* group has not yet been fully defined. According to the antibiotic susceptibility results, the development of resistance in SMG is not critical. Commercial kits are unsatisfactory in identifying this group, and the studies should be supported with molecular methods.

**Keywords:** Lancefield group antigen, *Streptococcus milleri* group, voges-proskauer, PCR, API

**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Gülşen GÜNEL E-mail: gulsen\_gunel@hotmail.com

**Başvuru/Submitted:** 19.09.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 26.09.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 17.01.2023 •

**Kabul/Accepted:** 18.01.2023 • **Online Yayın/Published Online:** 09.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

## GİRİŞ

Streptokoklar doğada oldukça yaygın bulunan, vücudun çeşitli bölgelerinde normal florada yer alan; Gram pozitif, zincir ya da diplokok biçiminde, sporsuz ve hareketsiz koklardır (1,2). Streptokoklar, kanlı agarda hemoliz yapma özelliklerine, biyokimyasal özelliklerine ve antijenik yapılarına göre sınıflandırılmaktadırlar (1,3).

Streptokoklar oksijen gereksinimlerine göre aerobik, fakültatif anaerobik ve zorunlu anaerobik olarak iki guruba ayrılırlar. Kanlı agar'da (%5 koyun kanı) hemoliz yapma özelliklerine göre (Brown sınıflandırması) ise alfa hemolitik, beta hemolitik ve hemoliz özelliği göstermeyen olarak üç grupta incelenirler (4-5). Fizyolojik özelliklerine göre ise (Sherman sınıflandırması) pyojenik streptokoklar, laktokoklar, enterokoklar ve viridans streptokoklar olarak dört grupta incelenirler (6). Hücre duvarı polisakkarit yapısına (Lancefield sınıflandırması) göre A, B, C, D grubu ve diğer gruplar (G-V) olmak üzere ayrılırlar (7, 8). Biyokimyasal sınıflandırmada ise şekerleri fermente etmeleri, bazı enzimleri üretmeleri, antibiyotik duyarlılıkları, farklı besiyelerinde oluşturdukları koloni morfolojileri ve hemoliz özelliklerine göre beş grupta kategorize edilmişlerdir. 16S rRNA dizi analizine göre ise piyojenik grup, anginosus grup, mitis grup, salivarius grup, bovis grup ve mutas grup olarak sınıflandırılmışlardır (9).

Son zamanlarda, *Streptococcus* cinsinin üyelerinin, çoklu genom düzeyinde filogenetik ağaçlar ve bu grupların üyeleri tarafından benzersiz bir şekilde paylaşılan çok sayıda oldukça spesifik moleküler belirteçler tarafından desteklenen tanımlanmış 14 tür grubuna yerleştirilmesi önerilmiştir (10).

Streptokoklarda koloni çapı, 0,5 mm'dan daha büyük olanlar; piyojen, 0,5 mm'dan daha küçük olanlar ise; Avrupa'da *Streptococcus milleri* grup (SMG) olarak, Amerika'da ise *Streptococcus anginosus* grup olarak adlandırılmaktadır (1, 2, 11, 12). Grup *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* olarak üç türe; *S. constellatus* da *S. constellatus* subsp. *constellatus*, *S. constellatus* subsp. *pharyngis* olmak üzere iki alt türe ayrılmaktadır (2, 13). SMG bakterilerinin DNA yapıları daha çok non-hemolitik streptokoklara benzemektedir. Orofaringeal, ürogenital, gastrointestinal sistemde komensal olarak bulunmaktadırlar (1, 2, 11, 13). Biyokimyasal özelliklerinden, Voges-Proskauer (VP) pozitif, eskülin hidrolizi pozitif, pirolidonil arilamidaz (PYR) negatif, üreaz negatif ve hipurat hidrolizi negatif, diğer streptokok türlerinden ayırımı yapılabilir (3, 14).

SMG'de VP testinin pozitif olup, diğer beta hemolitik streptokoklarda negatif olması, tür ayırımı sağlayan en önemli özelliktir (13, 14). Tanı amaçlı hazırlanmış çeşitli ticari kitler de bulunmaktadır, fakat sonuçların birbirleri ile farklılık göstermesi nedeni ile sık tercih edilmemektedir (3). SMG bakteriler, beyin absesi, kan, idrar ve cerahat gibi birçok örnekten izole edilebilmektedir. Normal vücut florasında bulunan ve boğaz sürüntülerinden izole edilen beta hemoliz yapmış suşların patojen olup olmadığı hala tartışılmaktadır (11, 13, 15). SMG bakteriler, genel olarak beta-laktam antibiyotiklere duyarlı ve aminoglikozid an-

tibiyotiklere dirençlidir. Steril vücut bölgelerinden izole edilen *S. anginosus* suşlarında mutlaka antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerinin saptanması gerekmektedir. SMG bakterilerinde makrolid, linkozamid ve streptogramin B (MLS) direnci görülebilmekle; vankomisin, linezolid ve daptomisine direnç henüz bildirilmemiştir (3, 11-13).

Çeşitli hasta gruplarında etken olarak kabul edilen ve direnç geliştirebilen SMG üyeleri ile ilgili ülkemizde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen streptokoklarda konvansiyonel, yarı otomatize ve moleküler yöntemlerle SMG bakterilerin oranı araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

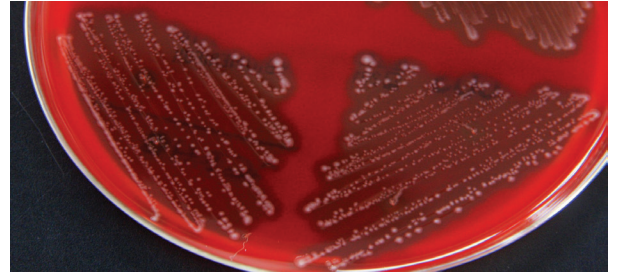
### Hasta Grubu

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji bölümüne gönderilen boğaz sürüntüsü ve çeşitli klinik örneklerden (abse, kan kültürü, doku parçası ve cerahat) izole edilen toplam 100 streptokok cinsi bakteri çalışmaya dahil edilmiştir.

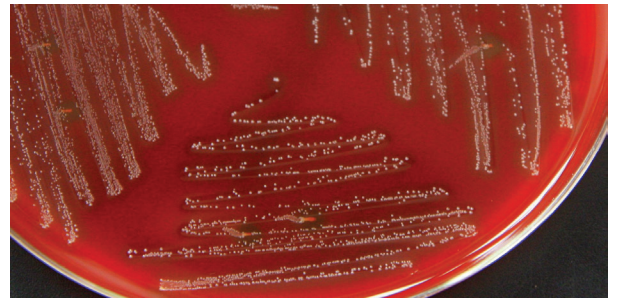
### Koloni Morfolojisi ve Hemoliz Türünün Değerlendirilmesi

Klinik örneklerin %5 koyun kanlı agarda 18-24 saatlik inkübasyonu sonrası oluşturdukları koloni morfolojisine göre, 0,5 mm'den küçük olan streptokoklar (pinpoint, toplu iğne başı koloni morfolojisi) çalışmaya dahil edilmiştir.

Streptokoklar, %5 koyun kanlı agardaki hemolitik aktivitelerine göre alfa, beta, ve hemoliz oluşturmayan (non-hemolitik) olarak sınıflandırılmıştır. Şekil 1'de A grubu beta hemolitik streptokokların, Şekil 2'de SMG'nin koloni morfolojisi gösterilmiştir.



Şekil 1: A grubu beta hemolitik streptokok morfolojisi



Şekil 2: SMG koloni morfolojisi

### Biyokimyasal Testler

Biyokimyasal özelliklerin saptanması için katalaz, Voges Proskauer, Lateks Aglutinasyon Testi, PYR, şeker fermentasyon, arjinin hidrolizi, hipurat hidrolizi, eskülin hidrolizi ve üreaz testleri gerçekleştirilmiştir.

Konvansiyonel biyokimyasal testlerin karşılaştırılmasının yapılması amacı ile API 20 STREP kiti kullanılmıştır.

### Katalaz Testi

Temiz bir lam üzerine bir damla %3 hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılmış ve üzerine beta hemoliz özelliği gösteren bir koloni süspansiyonu ekilmiştir. Hava kabarcıklarının gözlenmesi pozitif sonuç (katalaz enziminin varlığı) olarak kabul edilmiştir (16).

### Voges Proskauer Testi

Taze streptokok kolonileri, steril bir öze ile 2 ml Voges-Proskauer (VP) içeren deney tüplerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında üzerlerine %5'lik α-naftol ve %40'lık potasyum hidroksit (KOH) damlatılmış, oda ısısında 30 dakika bekletilmiştir. Pembe-kırmızı renk oluşumu pozitif olarak kabul edilmiştir (16).

### Lateks Aglutinasyon Testi (Lancefield Grup Aglutinasyon)

Kit kullanım prosedürüne (Streptococcal Grouping Kit, Oxoid, İngiltere) uygun olarak, 2-5 streptokok kolonisi 400 µl ekstraksiyon enzimi içinde süspansiyon haline getirilmiş ve 37°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Her bir grup antijenine karşı antikorla (A, B, C, D, F ve G grubu) kaplı lateks boncukları içeren solüsyonlardan bir damla test kartlarına damlatılmıştır. Üzerlerine süspansiyon halinde olan bakteri örneklerinden konularak karıştırılmış ve çöktelti oluşturanlar grup antijeninde pozitif olarak kabul edilmiştir.

### PYR Testi

Kit prosedürüne göre (Oxoid Biochemical Identification System (O.B.I.S.), Oxoid, İngiltere), steril öze ile üç-beş koloni alınmış, PYR test kartına koyulmuş ve üzerine bir damla solüsyon-1 ilave edilerek üç dakika beklenmiştir. Süre sonunda solüsyon-2 damlatılmış ve yirmi saniye sonunda pembe-mor renk vermesi pozitif kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 standart suşu kullanılmıştır (16).

### Şeker Fermentasyon Deneyleri

100 ml peptonlu su içerisine 25 gr şeker (mannitol, sorbitol, rafinoz, arjinin, sakkaroz, trehaloz veya laktoz) eklenmiş ve pH: 7,2 olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan şekerli çözeltiler 0.45 mm gözenekli filtreden (Stedim Biotech, Almanya) geçirilmiştir. Sarı renk oluşumu bakterinin şekeri kullandığını göstermiş ve pozitif olarak kabul edilmiştir (16).

### Arjinin Hidrolizi Deneyi

100 ml arjinin mediumu (pH: 7.0) için, 0,5 gr maya özeti ve tripton, 0,2 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 gr Glukoz, 0,3 gr D-arjinin monomiklorür eklenmiş ve steril edilmiş, cam tüplere 2,5 ml dağıtılmıştır.

Tüplerin içine her bir suş inoküle edilmiş ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her bir tüpe 1 damla Nessler's ayracı damlatılmıştır. Parlak sarı renk oluşumu pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (16).

### Hipurat Hidrolizi Deneyi

Bakterilerin hipurik asidi hidrolize ederek benzoik asit ve glisine ayrıştırmasını gözlemlemek amacı ile yapılmıştır (17). Bakteri kolonileri, 10gr/ml hipurat bulunan ependorflarda süspansiyon haline getirilmiş, iki saat 37°C'de inkübe edilmiş ve üzerine 400 µl ninhidrin ayırıcı eklenmiştir. 15 dakika oda ısısında inkübasyona devam edilmiş ve süre sonunda mavi/mor renk oluşumu pozitif kabul edilmiştir (16).

### Eskülin Hidrolizi Deneyi

Safra-eskülin agara, saf kolonilerden ekim yapılmıştır. 24 saat 37°C'de inkübasyon sonucunda siyah-kahverengi renk değişimi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kullanılmıştır (16, 18).

### Üre Hidrolizi Deneyi

900 ml distile su içerisine, 15 gr agar eklenmiş ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril hale getirilir. Soğuduktan sonra içerisine, 100 ml distile su içerisinde 29 gr üre çözündürülmüş ve filtreden geçirilmiş karışım eklenmiş, steril şartlarda tüplere dağıtılmıştır (pH: 6,8). 24 saat 37°C'de inkübasyon sonucunda sarı rengin, pembe/kırmızı renk değişimi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (16).

### Yarı Otomatize Sistem ile bakterilerin değerlendirilmesi (API 20 Strep Testi)

Ticari API 20 Strep kiti ile tüm suşlar değerlendirilmiştir. Kit prospektüsüne göre (Biomerieux, Fransa) saf kültür kolonileri, steril eküvyon yardımı ile toplanarak kit ile birlikte verilen %0,85'lik tuzlu su içerisinde süspansiyon edilmiştir. Bakteri süspansiyonu 4 McFarland yoğunluğunda hazırlanmıştır. Daha sonra bu süspansiyondan striplere dağıtılmış, 35-37°C'de 4 ve 24 saat inkübe edilmiş, süre sonunda ayrıları damlatılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

### Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

Antibiyotik duyarlılık deneyleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve bazı antibiyotikler için gradient-test (E-test, bioMerieux, Fransa) yöntemi ile yapılmıştır (19).

### Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

Antibiyotik duyarlılık deneyleri "Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)" (19) kriterleri göz önüne alınarak yapılmıştır, sefepim (FEP) 30µg, vankomisin (VA) 30µg, seftriakson (CRO) 30µg, sefotaksim (CTX) 30µg, eritromisin (E) 30µg, klindamisin (DA) 30µg, levofloksasin (LEV) 30µg, tetrasiklin (TE) 30µg, kloramfenikol (C) 30µg ve linezolid (LZD) 30µg (BD, USA) test edilmiştir. % 5 koyun kanı içeren Mueller Hinton besiyerine 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanmış koloni süspansiyonu steril eküvyon yardımı ile yayılmıştır ve üzerine antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir (19).

### Gradient-Test Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

24 saatlik taze kültürden Mueller Hinton Broth besiyerinde 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Süspansiyon, steril eküvyonla Mueller Hinton Agar üzerine yayılmış ve üzerine gradient-test (E-Test, Biomerieux, Fransa) şe-

**Tablo 1:** SMG için spesifik gen bölgeleri ve çoğaltılan ürün boyutları (20, 21)

Hedef Gen Bölgesi	Kullanılan Primerler	Çoğaltılan Ürün Boyu (bp)
HYL-MIX-U	TGGTGGGAYTAYGARATYGG	428 bp
HLY-INT-D	GCTGTATCAATGGAGTGTCTGTC	752 bp
HLY-CC-D	CTCTCTCTTGAGATTGTTGC	
16S-ANG-U	GCGTAGGTAACCTGCCTATTAGA	105 bp
16S-ANG-D	CGCAGGTCCATCTACTAGC	
ILY-4DFw	CTCACCTCAATCATGATGGTGC	819 bp
ILY-wholeC Bw	CGACTCACTATAGGGAGATCAAGCATGG	

ritleri koyulmuştur. Ekim yapılmış besiyerleri 18-24 saat süreyle 37°C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda CLSI kriterlerine göre yorumlanmıştır. Deneylerde kontrol için *S. pneumoniae* ATCC 49619 standart suşu kullanılmıştır (19).

#### Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Saf halde olan kanlı agar besiyerindeki kolonilerden DNA izolasyonu, kaynatma yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla, yaklaşık 0,5 McFarland bulanıklığında hazırladığımız süspansiyondan 500 µl ependorflara aktarılmış ve 100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır. 13000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiş örneklerin, dip pelletlerine dokunmadan üst kısımdaki süpernatandan 200 µl alınmıştır.

Primer olarak, Tablo 1'de gösterdiği şekilde *S. milleri* grup için spesifik gen bölgelerini içeren HYL-MIX-U, HLY-INT-D, HLY-CC-D, 16S-ANG-U, 16S-ANG-D, ILY-4DFw, ILY-wholeC Bw primerleri (Fermantas, Türkiye) kullanılmıştır (20,21).

Primerlerin son konsantrasyonları 20 µM olarak ayarlanmıştır. PZR karışımı için daha önceden ekstraksiyonu yapılan 2,5 µl DNA kullanılmıştır. Her bir örnek için, 12,5 µl 2X Mastermix (Fermantas, 2X Mastermix, ABD) ve her bir primerden 10 pmol kullanılmıştır (toplam hacim 25µl).

Pozitif kontrol olarak *S. anginosus* NCTC 10713, *S. constellatus* NCDO 2226, *S. intermedius* NCDO 2227 suşlarından ekstrakte edilen DNA ve negatif kontrol olarak da hedef DNA yerine aynı miktarda distile su kullanılmıştır. Amplifikasyon programı, 94°C'de 4 dakika (1 döngü), 94°C'de 45 saniye, 54°C'de 45 saniye, 65°C'de 2,5 dakika (30 döngü) olarak ayarlanmıştır (22). %1'lik agaroz jel de yürütülen örnekler jel translüminatör üzerine alınarak UV ışık altında görüntülenmiştir.

#### BULGULAR

Çalışmada yer alan suşlar farklı klinik örneklerden izole edilmiştir. 81 boğaz sürüntüsü, 10 apse, iki batın içi sıvı, iki doku parçası, iki kan kültürü, 1 balgam, 1 periton sıvısı ve 1 trnak iltihabı örneklerinden suşların izolasyonları yapılmıştır. Hasta yaşları 1 ve 82 arasında değişmektedir (20,29 ± 20,92).

Tüm suşlar Gram boyamada, Gram pozitif, zincir yapmış koklar olarak görülmüştür. Oksidaz ve katalaz özellikleri negatif olarak

saptanmıştır. İzole edilen suşların 90 tanesinin beta hemolitik, dört suşun alfa hemolitik olduğu ve 6 tanesinin hemoliz yapmadığı bulunmuştur.

Tüm suşların VP testleri, hipurat hidrolizleri ve PYR testleri negatif olarak tespit edilmiştir. Üreaz testi iki suşta pozitif olarak saptanmıştır.

Tüm suşlar Lancefield grup antijeni açısından değerlendirilmiş olup, 42 suşun (%42) G grup antijenine, 26 suşun (%26) F grup antijenine, beş (%5) suşun C grup antijenine sahip olduğu tespit edilmiştir. 27 (%27) suşun grup antijeni saptanamamıştır.

Tüm şeker fermentasyonu deneyleri konvansiyonel olarak, her bir şeker için yapılmıştır (100 suşta). 78'i sakkarozu (%78), 69'u (%69) trehalozu, 61'i (%61) laktozu, 10'u (%10) manitolü, yedisi (%7) sorbitolü ve yedisi (%7) rafinozu kullanmıştır.

Suşların arjinini hidroliz edip etmedikleri Nessler ayracı kullanılarak çalışılmış ve tüm suşlar pozitif olarak saptanmıştır.

Eskülin hidrolizi açısından suşlar değerlendirildiğinde, 57 suş eskülin pozitif (%57), 43 suş (%43) eskülin negatif sonuç vermiştir.

API 20 STREP testi ile, 100 suşun 41'i (%41) *Streptococcus* olarak tiplendirilmiş, 45'i (%45) *S. anginosus*, beşi (%5) *S. constellatus*, bir (%1) suş *S. intermedius* olarak tiplendirilmiştir. Tablo 2'de API 20 STREP sonuçları gösterilmiştir.

**Tablo 2:** Yarı Otomatize sistem ile bakterilerin değerlendirilme sonuçları (API 20 Strep)

Cins ya da tür düzeyinde isimlendirme	Bakteri sayısı
<i>Streptococcus milleri</i> grup	41
<i>Streptococcus anginosus</i>	45
<i>Streptococcus constellatus</i>	5
<i>Streptococcus intermedius</i>	1
<i>Enterococcus durans</i>	2
<i>Streptococcus salivarius</i>	1
<i>Granuli adiacens</i>	1
<i>Enterococcus avium</i>	1
<i>Streptococcus agalacita</i>	1
<i>Leuconostoc</i> spp.	1
<i>Streptococcus suis</i> II	1

Antibiyotik duyarlılık deneyleri CLSI'n önerdiği şekilde yapılmış olup tüm suşlar vankomisin, seftriakson, sefepim, sefotaksim, levofloksasin ve linezolid duyarlı bulunmuştur.

Suşların %16'sında eritromisin direnci saptanmış ve bu direnci gösterenlerin 10'unun *S. anginosus*, dördünün ise *S. constellatus* olduğu belirlenmiştir.

Streptokok izolatlarında %6 klindamisin direnci saptanmış ve

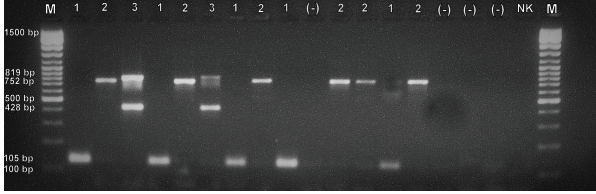
beş *S. anginosus*, üç *S.constellatus* suşunun bu dirence sahip olduğu gözlenmiştir. İzolatlarımızda %5 tetrasiklin direnci gözlenmiş; bu dirence sahip olan suşların üçü *S.constellatus*, ikisi *S.anginosus* olarak belirlenmiştir. %1 oranında saptanan klo-ramfenikol direnci *S.anginosus*'da görülmüştür.

Ampisilin ve penisilin direnci gradient-test yöntemi ile incelenmiş olup, bir *S. anginosus* suşu hem ampisilin hem de penisiline dirençli olarak saptanmıştır. Yine aynı yöntemle ampisiline orta duyarlı iki *S.anginosus* suşu saptanmıştır.

PZR sonuçlarına göre %56 *S. anginosus*, %24 *S. constellatus*, %8 *S. intermedius* olarak saptanmıştır. %12'sinde herhangi bir bant saptanamamıştır (Şekil 3).

### TARTIŞMA

SMG bakterileri heterojen yapıda bulunan bir grup olup üç alt türe ayrılmaktadır: *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*.



Şekil 3: PZR bant profilleri.

M: Marker, 1: *S.anginosus*, 2: *S.constellatus*, 3: *S.intermedius*,  
NK: Negatif kontrol

SMG bakterileri filogenetik özellikleri nedeni ile viridans streptokoklar içinde yer almaktadır fakat klinik olarak oluşturdukları tablolar viridans streptokoklardan farklıdır. SMG, değişken biyokimyasal, hemolitik özelliğe ve farklı Lancefield grup antijenlerine sahiptir. Tanımlamada günümüzde yarı otomatize, otomatize sistemler ya da ticari kitlerden yararlanılsa da grup üyelerinin kesin olarak ayrılabilmesi için moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir (23-24). SMG, klinik olarak perikardit, endokardit, karaciğer ve beyin abseleri gibi birçok hastalıktan tek başına ya da polimikrobiyal olarak izole edilmiş fakat ciddi bir direnç oluşumu görülmemiştir (1, 3, 11, 25, 26).

Çalışmamızda biyokimyasal özellikler olarak VP pozitifliği, hipurat hidrolizi ve PYR negatifliği temel esas olarak alınmış fakat bu kriterler tanımlamada yeterli olmamıştır. Yapılan literatür taramasında Fox ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada VP negatif, Lancefield C grup antijenine sahip *S. anginosus* bakterilerinin de olduğu gösterilmiştir (27). Bu sebeple VP pozitifliğinin her zaman kesin bir ayırtıcılığı olmayabileceği düşünülmüştür.

Amri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da hipurat hidrolizinin yalancı pozitif sonuç verebileceği belirtilmiştir (28). Yaptığımız çalışmada 4 ve 2 McFarland süspansiyon bulanıklıklarında pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Daha sonra API 20 STREP'te bulunan hipurat hidrolizi ile de sonuçlar karşılaştırılmış ve tüm suşlar hipurat hidrolizi açısından negatif bulunmuştur. Böylece

hipuart hidrolizi pozitifliğinin kesin bir ayırtıcılığı olmayabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda arjinin fermentasyonunda da çeşitli sorunlar ile karşılaşmıştır. Arjinin fermentasyonunun kesinlikle pozitif olması gerektiği vurgulandığı bir çalışmanın aksine, çalışmamızda tüm suşlarda arjinin fermentasyonu negatif olarak tespit edilmiştir (1). Niven ve arkadaşlarının önerileri doğrultusunda Nessler' ayracı ile amonyak oluşumunun araştırıldığı yöntemde ise tüm suşların arjinin fermentasyon deneylerinin pozitif olduğu saptanmıştır (29). Elde edilen bu sonuçlar klasik şeker fermentasyonu ile hazırlanan arjininin streptokoklar için yeterli olmadığını göstermiş, bu grupta arjinin hidrolizinde ve bakterinin ürettiği amonyağı göstermekte sadece peptonlu suyun yeterli olmadığı saptanmıştır.

Hong Kong'da yapılan beş yıllık bir çalışmada, 377 infeksiyöz endokardit tanılı hasta grubu ile çalışılmış ve sadece altı olgudan SMG izole edilmiştir. Sonuçlar API 20 STREP, ID 32 STREP, VITEK GPI ve 16S rRNA sekanslama yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Sonuçlara bakıldığında API 20 STREP'te sadece bir suş %94, ID32 STREP'te ise beş suş %99 doğruluk oranıyla *S. anginosus* olarak tanımlanmış ve VITEK GPI ile üç suş tanımlanamamıştır. 16S rRNA sekanslama yöntemi ile suşlar tekrar değerlendirmeye alınmış ve tamamı *S. anginosus* olarak saptanmıştır (30). Bu çalışma, bizim çalışmamızdaki API 20 STREP ile yapılan deney sonuçları (%92) ile paralellik göstermektedir. Bu sonuçlara dayanarak otomatize ticari sistemlerin SMG'yi tanımlamada yeterli olduğu, fakat bu amaçla hazırlanan ticari kitlerin gözden geçirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Çalışmamızda elde edilen %92 oranı sonuçların yorumlanmasında yüksek gibi görünse de %26'lık kısmın saptanamaması ve PZR ile uyumsuz sonuçlar verdiği göz önünde bulundurulmalıdır.

Arjantin'de 64 suş ile yapılan bir çalışmada disk difüzyon ve MİK yöntemiyle 40 *S. anginosus*, 18 *S. constellatus* ve altı *S. intermedius* belirlenmiştir. *S. anginosus* suşlarında %12,5 penisilin, %2,5 eritromisin, *S. constellatus* suşlarında %4,5 penisilin ve eritromisin ve *S. intermedius* suşlarında ise %33,3 penisilin direnci saptanmıştır (31).

Çalışmamızda ise *S.anginosus* suşlarının diğer grup üyelerine oranlara daha dirençli olduğu gözlenmiştir. *S.constellatus'un* ise *S.intermedius'tan* daha yüksek oranda dirençli olduğu saptanmıştır. Ampisilin ve penisilin direnci saptanan suşların boğaz infeksiyonlarından izole edildiğini göz önünde bulundurarak, ampirik tedavi de kullanılan birinci basamak antibiyotiklerin direnç oranı düşük olsa da tekrar revize edilmesi ve kültür sonucu çıkmadan tedaviye başlanmaması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda *S. anginosus* suşlarının diğer grup üyelerine oranlara daha dirençli olduğu gözlenmiştir. *S. constellatus'un* *S. intermedius'tan* daha yüksek oranda dirençli olduğu saptanmıştır. Ampisilin ve penisilin direnci saptanan suşların üst solunum yolu infeksiyonlarından izole edildiğini göz önünde bulundurarak, ampirik tedavide kullanılan birinci basamak antibiyotiklerin direnç oranı düşük olsa da tekrar revize edilmesi ve kültür sonucu çıkmadan tedaviye başlanmaması gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak *Streptococcus milleri* grubun biyokimyasal identifikasyon şemasının henüz tam olarak kesinleşmediği belirlenmiştir. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarımıza dayanarak henüz direnç gelişiminin ciddi boyutta olmadığı saptanmış olup steril vücut bölgelerinden izole edilen suşlarda MİK değerlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Grubu tanımlamada ticari kitlerin yetersiz olabileceği saptanmış ve yapılacak çalışmaların mutlaka moleküler bir yöntemle desteklenmesi gerekmektedir. Günümüzde hızlı taq kitlerinin yaygınlaşması ile rutin laboratuvarlarda oturabilecek, primer setleri ile kullanımı da diğer otomatize sistemler kadar hızlı olabilecektir (4 saat). Bu çalışmanın ülkemizde yapılacak diğer çalışmalar için temel olacağı düşünülmektedir.

**Teşekkür:** İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne desteklerinden ötürü teşekkür ederiz.

The University of Tokushima'dan Dr. Hideaki Nagamune ve Queen Mary, University of London'dan Dr. Robert A. Whiley'e deneylerimizde kullandığımız standart suşları (*S. anginosus* NCTC 10713 *S. intermedius* NCDO 2227 ve *S. constellatus* subsp. *constellatus* NCDO2226) temin edip bizimle bilgi alışverişinde oldukları için teşekkür ederiz.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 27.05.2011, No: 08).

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- G.G., B.G.; Veri Toplama- G.G.; Veri Analizi/Yorumlama- G.G., B.G.; Yazı Taslağı- G.G.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- G.G., B.G.; Son Onay ve Sorumluluk- G.G.;Malzeme ve Teknik Destek- G.G.;Süpervizyon B.G.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir .

**Finansal Destek:** Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 17164).

**Acknowledgments:** Authors would like to thank Istanbul University Scientific Research Projects Unit.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Istanbul Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (Date: 27.05.2011, No: 08).

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- G.G., B.G.; Data Acquisition- G.G.; Data Analysis/Interpretation- G.G., B.G.; Drafting Manuscript- G.G.; Critical Revision of Manuscript- G.G., B.G.; Final Approval and Accountability- G.G.; Material and Technical Support- G.G.; Supervision- B.G.

**Conflict of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

**Financial Disclosure:** This study was supported by the Istanbul University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: 17164).

## KAYNAKLAR

- 1- Forbes BA, Sham DF, Weissfeld AS. Catalase-negative, Gram-positive cocci, Streptococcus, enterococcus and similar organisms. In: Tille PM, editors. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Missouri: Mosby; 2008.p.298-315.
- 2- Procop GW, Church CL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. Isolation and identification of Streptococci and Streptococcus-Like bacteria. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2006.p.701-45.
- 3- Ruoff KL, Bisno AL. Classification of Streptococci. In: Mandell GL, Bannett JE, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005.p.2591-610.
- 4- Patterson MJ. Streptococcus. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7611/>
- 5- Hansen AP, Hucker GJ, Snyder MA. Hemolytic properties of the mastitis streptococcus. American J Public Health 1933;23(12):1262-70.
- 6- Sherman JM. The Streptococci. Microbiol Mol Biol Reviews 1937;1(1):3-97.
- 7- Lancefield R. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J Exp Med 1933;57(4):571-95.
- 8- Carroll KC. Biographical Feature: Rebecca Lancefield, Ph.D. J Clin Microbiol. 2019;57(8):e00728-19. doi:10.1128/JCM.00728-19
- 9- Hardie JM, Whiley RA. Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus. J Appl Microbiol. 1997;83(S1):1S-11S. doi:10.1046/j.1365-2672.83.s1.1.x
- 10- Patel S, Gupta RS. Robust demarcation of fourteen different species groups within the genus Streptococcus based on genome-based phylogenies and molecular signatures. Infect Genet Evol 2018;66:130-51.
- 11- Yao JDC, Moellering RC-JR. Antibacterial Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM press; 2007.p.1077-113.
- 12- Berkiten R. Gram pozitif koklar: Laboratuvar tanı, epidemiyoloji, korunma. İçinde: Bozkaya E, editör. Tıbbi Mikrobiyoloji-2. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2005.sf.1-28.
- 13- Berkiten R. Mini (pinpoint) koloni oluşturan beta-hemolitik streptokoklar: Streptococcus milleri grubu ve çeşitli özellikleri. Ankem Dergisi 2008;22(2):89-94.
- 14- Ardıç N. B grubu Streptokoklar (*Streptococcus agalactiae*). Klimik Dergisi 2003;16(3):101-5.
- 15- Wilson L.G. The early recognition of streptococci as causes of disease. Medical history. 1987;31(4):403-14.
- 16- Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria. Editor(s):Amy L.Leber. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2016; Chapter 3.17. 4th Edition. Volume 1-3. doi:10.1128/9781555818814.ch3.17.1
- 17- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları: İzmir; 2002:495-521.
- 18- York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for identification of aerobic bacteria. In: Lynne JG, editors. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Washington DC: ASM press;

2010. doi/book/10.1128/9781683670438.CMPH
- 19- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement. CLSI document M100-S22, Wayne PA; Clinical and Laboratory Standards Institute;2012.
- 20- Takao A, Nagamune H, Maeda N. Identification of the Anginosus group within the genus *Streptococcus* using polymerase chain reaction. FEMS Microbiol letters 2004;233(1):83-9.
- 21- Goto T, Nagamune H, Miyazaki A, Kawamura Y, Ohnishi O, Hattori K, et al. Rapid identification of *Streptococcus intermedius* by PCR with the *ily* gene as a species marker gene. J Med Microbiol 2002;51(2):178-86.
- 22- Hoshino T, Fujiwara T, Kilian M. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. J Clin Microbiol 2005;43(12):6073-85.
- 23- Jiang S, Li M, Fu T, Shan F, Jiang L, Shao Z. Clinical Characteristics of Infections Caused by *Streptococcus Anginosus* Group. Scientific reports 2020;10(1):9032.
- 24- Pilarczyk-Zurek M, Sitkiewicz I, Koziel J. The Clinical View on *Streptococcus anginosus* group-opportunistic pathogens coming out of hiding. Frontiers in microbiology 2022;13:956677.
- 25- Lehman DC, Mahon CR, Suvarna K. *Streptococcus*, enterococcus and other catalase-negative Gram-positive cocci. In: Mahon CR, Lehman DC ve Manuselis G, editors. Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia; Elsevier. 2007. p.382-95.
- 26- Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Beta Hemolitik Streptokoklar. İçinde: Söyletir G, Över U, editörler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Etkenlere Göre İnfeksiyonlar. Ankara; Nobel Tıp Kitabevleri:2002.sf.1478-97.
- 27- Fox K, Turner J, Fox A. Role of beta-hemolytic group C streptococci in pharyngitis: Incidence and Biochemical Characteristics of *Streptococcus equisimilis* and *Streptococcus anginosus* in patients and healthy controls. J Clin Microbiol 1993;31(4):804-7.
- 28- Al Amri A, Senok AC, Al Ismaeel AY, Al-Mahmeed AE, Botta GA. Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. J Medical Microbiol 2007;56(Pt 10):1350-55.
- 29- Niven CF, Smiley KL, Sherman JM. The hydrolysis of arginine by streptococci. J Bacteriol 1942;43(6):651-60.
- 30- Woo PC, Tse H, Chan KM, Lau SK, Fung AM, Yip KT, et al. *Streptococcus milleri* endocarditis caused by *Streptococcus anginosus*. Diag Microbiol and Infec Disease 2004;48(2):81-8.
- 31- Bantar C, Fernandez Canigia L, Relloso S, Lanza A, Bianchini H, Smayevsky J. Species belonging to the *Streptococcus milleri* group: antimicrobial susceptibility and comparative prevalence in significant clinical specimens. American Soc for Microbiol 1996;34(8):2020-22.