

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

Киреева Александра Геннадьевна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ПАТОГЕННОСТИ ШТАММОВ
СТРЕПТОКОККОВ ГРУПП А, С И G, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ВО
ВЬЕТНАМЕ**

1.5.11 – микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор РАН
Дмитриев Александр Валентинович

Санкт-Петербург – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Характеристика представителей рода <i>Streptococcus</i>	15
1.1.1 Общие сведения.....	15
1.1.2 Классификация представителей рода <i>Streptococcus</i>	15
1.1.3 Особенности эпидемиологии стрептококковых инфекций	25
1.2 Молекулярно-эпидемиологические подходы для внутривидовой дифференцировки штаммов стрептококков	33
1.3 Генетический полиморфизм стрептококков, опосредованный экзогенными генетическими элементами	37
1.3.1 IS-элементы.....	39
1.3.2 Транспозоны и интегративно-конъюгативные элементы	39
1.3.3 Бактериофаги	44
1.3.4 Плазмиды	48
1.4 Уровень устойчивости стрептококков групп А, С и G к макролидам	48
1.5 Заключение	52
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	53
2.1 Объекты исследования	53
2.2 Микробиологические методы исследования.....	56
2.3 Молекулярно-генетические методы исследования	57
2.4 Методы биоинформатики.....	64
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	67
ГЛАВА 3 СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ И ИХ ПЕРВИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА.....	67
ГЛАВА 4 УСТАНОВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ	73

4.1 <i>emm</i> – генотипирование штаммов <i>S. pyogenes</i> и <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	73
4.2 Анализ рестрикционного полиморфизма геномной ДНК штаммов стрептококков методом пульс-электрофореза	74
ГЛАВА 5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ ГРУПП А, С И G К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ.....	80
5.1 Чувствительность стрептококков, выделенных во Вьетнаме, к антибактериальным препаратам различных классов	80
5.2 Определение типа лекарственной устойчивости	82
5.3 Определение минимальной подавляющей концентрации эритромицина у штаммов <i>S. pyogenes</i>	83
ГЛАВА 6 ВЫЯВЛЕНИЕ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГЕНАМИ ВИРУЛЕНТНОСТИ И АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ, У ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ А	85
6.1 Генетические детерминанты антибиотикоустойчивости у штаммов стрептококков группы А	85
6.2 Полногеномное секвенирование штамма стрептококка группы А <i>emm12</i> генотипа.....	87
6.3 Сравнительный анализ штаммов стрептококков группы А, выделенных в Юго- Восточной Азии и России, по наличию генов, ассоциированных с мобильными генетическими элементами	93
6.3.1 Результаты ПЦР скрининга азиатских и российских штаммов стрептококков группы А на наличие генов, входящих в состав ICE- <i>emm12</i>	93
6.3.2 Результаты ПЦР скрининга азиатских и российских штаммов стрептококков группы А на наличие генов вирулентности, ассоциированных с профагами	97
ГЛАВА 7 ВЫЯВЛЕНИЕ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГЕНАМИ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ, У ИССЛЕДУЕМЫХ ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ С И G.....	99

7.1 Генетические детерминанты антибиотикоустойчивости у штаммов стрептококков группы G	99
7.2 Генетические детерминанты антибиотикоустойчивости у штаммов стрептококков группы С.....	101
7.3 Новые мобильные генетические элементы, содержащие гены антибиотикоустойчивости, у вьетнамских штаммов <i>S. dysgalactiae subsp. equisimilis</i> , обнаруженные с помощью метода NGS.....	102
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	117
ВЫВОДЫ	119
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	120
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	121
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Стрептококки являются одними из самых распространенных возбудителей инфекционных заболеваний человека [17, 45, 54]. Род *Streptococcus* включает в себя более 100 видов стрептококков, которые в зависимости от антигенных свойств полисахарида клеточной стенки, подразделяют на различные серологические группы (А, В, С, G и др.) согласно классификации R. Lancefield [109]. Тяжелые инфекции у человека чаще всего вызывают стрептококки группы А (СГА), которая представлена видом *Streptococcus pyogenes*, стрептококки группы В (СГВ), которую формирует вид *Streptococcus agalactiae*, а также пневмококки (вид *Streptococcus pneumoniae*). Однако в последние годы отмечается рост числа заболеваний, вызванных стрептококками групп С и G (СГС/СГG) (*Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* (SDSE), *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*) [22, 43]. В ряде исследований установлена частота инвазивных заболеваний, вызванных *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*, практически равная количеству инвазивных заболеваний, вызванных *S. pyogenes* [43, 180].

Стрептококки групп А, С и G поражают слизистые оболочки верхних дыхательных путей и кожу. Вызываемые ими заболевания могут быть как неинвазивного (фарингит, скарлатина, рожистое воспаление и пиодермия), так и инвазивного характера (пневмония, некротический фасциит, синдром токсического шока и др.) [17, 45, 82, 174, 196]. После острой стрептококковой инфекции или в отсутствие антибиотикотерапии, возможно развитие таких серьезных осложнений, как ревмокардит и гломерулонефрит [9, 12, 95, 142]. Способность стрептококков колонизировать различные экологические ниши и вызывать широкий спектр заболеваний во многом обусловлена внутривидовой генетической гетерогенностью. При этом около 40% внутривидовых различий приходится на области экзогенных элементов, интегрированных в хромосому (мобильных генетических элементов (МГЭ)): инсерционных последовательностей

(IS-элементов), транспозонов, интегративно-конъюгативных элементов (ICE) и профагов [44, 94].

Зачастую МГЭ содержат гены вирулентности и гены устойчивости к антимикробным препаратам [47, 118]. Приобретение таких МГЭ может привести к осложнению течения заболевания и/или снижению эффективности лечения за счет изменения фенотипических свойств штаммов [141]. Способность МГЭ перемещаться между представителями близкородственных видов расширяет для патогенных микроорганизмов пул дополнительных генов, участвующих в формировании вирулентного фенотипа [118, 171]. Увеличение степени вирулентности способствует отбору более вирулентных клонов из изначальной гетерогенной популяции возбудителя. Появление в популяции эволюционно успешных доминантных клонов с повышенной вирулентностью часто является причиной масштабных вспышек стрептококковых инфекций [18, 176, 195, 200, 206].

Угроза глобального распространения новых высоковирулентных клонов стрептококков обуславливает необходимость эпидемиологического надзора за популяцией патогенных и условно-патогенных стрептококков. Юго-Восточная Азия является регионом высочайшего биоразнообразия и местом формирования новых вирулентных и устойчивых к антимикробным препаратам штаммов возбудителей многих инфекционных болезней. Поэтому оценка клональной структуры штаммов стрептококков в этом регионе, изучение механизмов возникновения и распространения антибиотикоустойчивости и роли горизонтального переноса в этом процессе являются актуальными задачами микробиологии.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день установлено, что эпидемический процесс при стрептококковых инфекциях может иметь не только спорадический, но и вспышечный характер [18, 66, 176, 195, 200]. Масштабные вспышки стрептококковых инфекций, как правило, сопряжены с появлением в популяции эволюционно успешных клонов с повышенной вирулентностью, которые

посредством горизонтального переноса приобрели дополнительные гены, участвующие в формировании вирулентного фенотипа (гены токсинов, детерминанты резистентности к антибиотикам) [18, 176, 206]. Так, вспышки СГА в Канаде объясняются быстрым распространением клональных штаммов СГА серотипа М3, имеющих многочисленные изменения в геноме, включая приобретение профагов, содержащих гены фосфолипазы А2 и SpeA, и дупликацию четырех аминокислот в N-концевой области белка М [31]. Повсеместное распространение клона М1Т1 и его ключевая роль в развитии тяжелых инвазивных заболеваний в развитых странах началась в 1980-х годах после приобретения трех областей гетерологичной ДНК: хромосомной области размером 36 т.п.н., которая содержит гены стрептолизина О (SLO) и NAD-гликогидролазы, и двух бактериофагов, содержащих гены ДНКазы Sda1 и суперантигена SpeA [18, 176]. Способность СГА серотипа М28 вызывать пуэрпиральный сепсис возникла в результате приобретения от СГВ последовательности RD2 размером 36,3 т.п.н., содержащей 7 генов вирулентности, в том числе кодирующих поверхностные белки, позволяющие колонизировать урогенитальный тракт [97].

В настоящее время предметом пристального внимания ученых является беспрецедентный рост числа заболеваний скарлатиной в странах Юго-Восточной Азии, Великобритании и США, наблюдаемый в последнее десятилетие [86, 119, 108, 115, 120, 198, 199, 206, 209]. Первое сообщение о увеличении числа заболеваний скарлатиной на 40% было опубликовано вьетнамскими учеными в 2009 году [148]. В Гонконге число заболеваний скарлатиной выросло в девять раз в 2011-2012 гг. (24 случая на 100 тыс. населения, 110 тыс. случаев) [119, 149, 150, 206]. В 2014 году в Великобритании был зафиксирован максимальный уровень заболеваемости скарлатиной со времен 1960-х годов (49 на 100 тыс. населения) [86].

Многочисленные молекулярно-эпидемиологические исследования штаммов СГА в районах с высокой заболеваемостью скарлатиной опровергли гипотезу о моноклональном характере вспышки. В Пекине, Гонконге, Шанхае и Тайване во время вспышки было зафиксировано увеличение в популяции СГА штаммов

генотипов *emm1* и *emm12*. Так, доля штаммов генотипа *emm1* в Китае изменилась с 3,8% в 2011 г. до 48,6% в 2014 г [50]. При этом большинство случаев заболеваний скарлатиной были вызваны штаммами, относящимися к четырем клональным линиям генотипа *emm12* [51, 185, 204]. Полногеномное секвенирование штаммов этих генотипов (*emm12* и *emm1*) позволило выявить у них наличие двух ранее не описанных участков гетерологичной ДНК: профага ФНКУ.vir размером 46,4 т.п.н., содержащего гены суперантигена стрептококка SpeC и ДНКазы Spd1, и интегративно-конъюгативного элемента ICE-*emm12* размером 64,9 т.п.н., содержащего гены устойчивости к тетрациклину и макролидам [25, 119, 206].

В Великобритании, США и Южной Корее штаммы, ассоциированные со вспышками скарлатины, принадлежали, в свою очередь, к нескольким генотипам (*emm1*, *emm3*, *emm4*, *emm12*, *emm28*) [49, 144]. В отличие от штаммов, ассоциированных со вспышкой скарлатины в Китае и Гонконге, у штаммов *emm1* генотипа, ассоциированных со вспышками скарлатины в США и Великобритании, МГЭ ICE-*emm12* и ФНКУ.vir отсутствовали. Таким образом, было показано, что крупные вспышки скарлатины в Юго-Восточной Азии и Великобритании не являются следствием межконтинентального перемещения одного эпидемического клона СГА. В 84% случаев зарегистрированных инфекций, вызванных штаммами СГА *emm1* генотипа в 2016 г. в Великобритании, штаммы возбудителей относились к новой подлинии M1T1, названной M1UK, которая отличается от архетипичного клона M1T1 наличием 27 однонуклеотидных мутаций (SNP, single nucleotide polymorphism) в ключевых регуляторных и метаболических генах. Этот клон M1UK характеризуется повышенной экспрессией суперантигена SpeA, что предположительно является следствием трех несинонимичных мутаций SNP в регуляторе транскрипции *rofA*, контролирующим транскрипцию гена *speA* [120]. Предварительные данные о геномной эпидемиологии подтверждают наличие клона M1UK в Нидерландах [157], Северной Америке [61] и Австралии [192].

Появление новых субклонов подчеркивает текущую эволюционную динамику линий СГА, которая может происходить независимо у штаммов одного генотипа, циркулирующих в разных географических регионах. Для отслеживания

масштаба распространения и эволюции этих клонов в развитых странах были инициированы геномные эпидемиологические исследования, осуществляемые на базе существующих программ наблюдения за инфекциями, подлежащими регистрации (инвазивные инфекции СГА). Однако роль этих клонов в формировании глобальной популяционной структуры СГА до конца не изучена вследствие ограниченных возможностей эпиднадзора в странах с низким уровнем дохода, для которых такие данные в настоящее время недоступны. Так, несмотря на то что первое сообщение о вспышке скарлатины поступило из Вьетнама, сведения о генетической структуре популяции СГА, циркулирующих в этом регионе, в литературе отсутствуют.

Учитывая возрастающее клиническое значение видов стрептококков, которые ранее считались условно-патогенными, в программы инфекционного контроля целесообразно включать наблюдение за популяцией СГС и СGG. Ранее долгосрочных наблюдений за показателями резистентности у SDSE не проводилось и генетический контекст детерминант резистентности у SDSE в значительной степени неизвестен. Несмотря на то, что механизмы, участвующие в распространении антибиотикоустойчивости у SDSE, широко не изучались, была продемонстрирована возможность межвидового переноса *in vitro* интегративно-конъюгативных элементов (ICEs), содержащих гены устойчивости, между видами *S. pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* и *S. agalactiae* [122, 143].

Все вышеперечисленное определило цели и задачи данного исследования.

Цель исследования

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов стрептококков серологических групп А, С и G, циркулирующих во Вьетнаме, и оценка их эпидемического потенциала.

Задачи исследования

1. Собрать коллекцию штаммов стрептококков групп А, С и G, циркулирующих среди детей младшего школьного возраста во Вьетнаме, и определить их видовую принадлежность

2. Оценить клональную структуру и степень генетической гетерогенности стрептококков, циркулирующих во Вьетнаме, с помощью *emm*-типирования и пульс-электрофореза

3. Определить устойчивость выделенных штаммов стрептококков к антимикробным препаратам

4. Выявить генетические детерминанты, обеспечивающие устойчивость стрептококков групп А, С и G к антимикробным препаратам, и оценить возможность их локализации на МГЭ

5. Провести анализ коллекции штаммов СГА, циркулирующих в Российской Федерации, на наличие маркерных элементов штаммов СГА из Юго-Восточной Азии, ассоциированных со вспышками скарлатины.

Научная новизна исследования

Впервые охарактеризован видовой состав и клональная структура штаммов стрептококков групп А, С и G, циркулирующих во Вьетнаме, получены новые данные, характеризующие эпидемическую значимость данных патогенов.

Установлено, что высокий уровень устойчивости к макролидам среди СГА во Вьетнаме обусловлен появлением нового клона *emm12* генотипа с *sMLS* типом лекарственной устойчивости. Полногеномное секвенирование и аннотирование генома штамма *S. pyogenes* генотипа *emm12*, выделенного во Вьетнаме, установило его филогенетическую связь с эпидемическим клоном, ассоциированным со вспышками скарлатины в Китае и Гонконге.

Выявлены генетические детерминанты, участвующие в распространении устойчивости к макролидам, линкозамидам и стептограмину В среди СГС и СGG, которые свидетельствуют о ключевой роли конъюгативного переноса в этом процессе. У трех штаммов *S. dysgalactiae* subspecies *equisimilis* с помощью полногеномного секвенирования обнаружены новые мобильные генетические элементы, обеспечивающие устойчивость к тетрациклину, эритромицину и линкозамидам.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Анализ генетической структуры популяции стрептококков, циркулирующих среди детей во Вьетнаме, позволил составить представление о генетических особенностях «тропических» штаммов стрептококков. Обнаружение у штаммов стрептококков новых МГЭ, содержащих гены устойчивости к макролидам и линкозамидам, может положить основу для исследований, направленных на оценку распространенности данных детерминант в глобальном масштабе.

Получена информация о динамике генетических изменений, затрагивающих геномы патогенных и условно-патогенных штаммов стрептококков в различные периоды времени, и обнаружены новые генетические маркеры наиболее вирулентных штаммов стрептококков.

Нуклеотидная последовательность генома эритромицин-устойчивого штамма *S. pyogenes* V31 размещена в международной базе данных GenBank (GenBank Acc. № GCA_014050235.1). В GenBank также депонированы последовательности геномов штаммов *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* B82 (GenBank Acc. № GCA_016888305.1), V123 (GenBank Acc. № GCA_016888325.1), NT15 (GenBank Acc. № GCA_016888365.1).

Все выделенные штаммы были подготовлены для длительного хранения в криобанке Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой) и дополнили коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург).

Материалы кандидатской диссертации внедрены в практику поисковых научных исследований ФГБНУ «ИЭМ» в рамках Государственного задания «Молекулярно-генетические и клеточные основы патогенеза, диагностики и лечения социально значимых заболеваний инфекционной и неинфекционной природы» (шифр: 0557-2016-0001). Разработанные протоколы биоинформатической обработки результатов высокопроизводительного секвенирования используются сотрудниками лаборатории инновационных методов микробиологического мониторинга НОЦ «Молекулярные основы

взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» для выявления у штаммов бактерий мобильных элементов значимых с позиции распространения антибиотикорезистентности при выполнении темы «Разработка подходов к мониторингу формирования эпидемических штаммов возбудителей нозокомиальных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью в условиях пандемии COVID-19 и в постэпидемический период».

Методология и методы исследования

Методология исследования состоит в изучение клональной структуры антибиотикорезистентных штаммов стрептококков и полиморфизма мобильных генетических элементов, ассоциированных с генами устойчивости к антибиотикам, при помощи классических методов микробиологии, а также современных молекулярно-генетических подходов. Для обработки полученных данных использованы методы биоинформатического анализа.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора в выполнении диссертационной работы заключалось в самостоятельном планировании экспериментов, непосредственном участии в экспедициях, анализе научной литературы, выполнении микробиологических и молекулярно-генетических исследований, биоинформатическом анализе полученных результатов. Полногеномное секвенирование штаммов стрептококков проводилось совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН «СПб НИИЭМ им Пастера» под руководством в.н.с. д.б.н. О.В. Калининой. Сравнительный анализа штаммов, циркулирующих в Юго-Восточной Азии и Российской Федерации, по профилю фаговых генов проводился совместно с научным сотрудником отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ» к.б.н. Е.М. Поляковой.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Высокий уровень устойчивости СГА, выделенных во Вьетнаме, к MLS_B препаратам обеспечен доминированием резистентного клона генотипа *emm12*.

Идентифицированные во Вьетнаме штаммы СГА генотипа *emm12* являются филогенетически родственными эпидемичному клону СГА генотипа *emm12*, изолированному при вспышках скарлатины в Китае, Гонконге, Тайване и Японии.

2. Условно-патогенные штаммы СГС и СGG, выделенные во Вьетнаме, содержат в своем геноме различные детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам. В геноме штаммов SDSE впервые обнаружены МГЭ (ФНТ15, Ф46.1.var, ICE-B82), содержащие гены устойчивости к макролидам, линкозамидам и тетрациклину, что указывает на то, что в ближайшем будущем эти микроорганизмы приобретут еще большее клиническое значение.

3. Молекулярно-генетический мониторинг за СГА, СГС и СGG должен включать сравнительный анализ полных геномов, что позволит более эффективным образом оценивать их патогенный потенциал, а также выявлять филогенетические связи между эпидемическими клонами в разных регионах.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Все приведенные сведения отражают современное состояние проблемы, включают результаты обследования 1359 детей, данные по анализу коллекции из 251 штаммов посредством высокочувствительных и высокоспецифичных методов молекулярной генетики, таких как: полимеразная цепная реакция (ПЦР), электрофорез в пульсирующем электрическом поле (PFGE), секвенирование нового поколения. Кроме того, использованы современные базы данных для молекулярно-генетического типирования стрептококков (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>), а также базы данных нуклеотидных последовательностей EMBL/GenBank/KEGG.

Результаты исследования представлены на XIX, XX, XXI Ленсфилдовских Международных Симпозиумах (9 – 12 ноября 2014, Буэнос-Айрес, Аргентина; 16 – 20 октября 2017 г., Денарау, Фиджи; 7 – 10 июня 2022, Стокгольм, Швеция), на Российско-Китайской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XIX Кашкинские чтения) (14 – 16 июня 2016 г., СПб, РФ), на научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний:

подходы, традиции, инновации» (23 – 25 апреля 2014 г., СПб, РФ), на II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (12 – 14 ноября 2012 г., СПб, РФ), на 37 конгрессе European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID) (6 – 11 мая 2019 г., Любляна, Словения). Материалы работы докладывались на семинаре лаборатории микробиологии и иммунологии Пекинского детского госпиталя (2017 г.).

Объем и структура диссертационной работы

Материалы диссертационной работы изложены на 140 страницах машинописного текста и иллюстрированы 18 таблицами, 21 рисунком. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 210 источников, из которых 9 – отечественных, 201 – зарубежных.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика представителей рода *Streptococcus*

1.1.1 Общие сведения

Грамположительные кокки рода *Streptococcus* являются факультативно-анаэробными микроорганизмами сферической формы от 0,5 до 2,0 мкм. В мазке из чистой культуры располагаются парами и образуют цепочки разной длины. Неподвижны, спор не образуют. [1].

Стрептококки – хемоорганогетеротрофные микроорганизмы. На обычных питательных средах растут очень скудно или не растут. Их культивируют на сложных питательных средах, с добавлением крови (кровяной агар), сыворотки, углеводов (сахарный бульен). Среда не должна содержать восстанавливающих сахаров, так как они угнетают гемолиз. Факультативные анаэробы, но некоторые штаммы растут только в присутствии 5% CO₂. Стрептококки ферментируют глюкозу с образованием молочной кислоты без газа, молоко не свертывают, протеолитическими свойствами не обладают, каталазаотрицательны. Температурный оптимум роста 37°C, погибают при нагревании до 56 °C в течение 30 мин, при кипячении — моментально; хорошо выдерживают высушивание, сохраняя жизнеспособность в высушенном состоянии длительное время. Чувствительны к действию антисептиков, дезинфектантов и ультрафиолетовому облучению. Многие виды являются комменсалами или патогенами человека и животных. Содержание гуанина и цитозина (G+C) в ДНК: 33-46 % [1].

1.1.2 Классификация представителей рода *Streptococcus*

По характеру гемолиза на плотных питательных средах с добавлением дефибринированной бараньей крови стрептококки были разделены на 3 группы [22]:

1. α -гемолитические стрептококки (*Streptococcus viridans*), вызывающие неполный гемолиз эритроцитов, характеризующийся образованием вокруг колоний зеленоватой зоны гемометаморфоза гемоглобина в метгемоглобин;

2. β -гемолитические стрептококки (*Streptococcus haemolyticus*), вызывающие полный гемолиз эритроцитов, характеризующийся образованием вокруг колоний зоны полного просветления;

3. γ -гемолитические стрептококки (энтерококки и *Streptococcus anhaemolyticus*), не вызывающие гемолиза эритроцитов.

Серологическая классификация стрептококков была разработана в начале 1930-х годов R. Lancefield на основе различий в антигенных свойствах полисахарида клеточной стенки. По этой классификации выделяют 17 серогрупп, обозначаемые буквами A, B, C, D, F, G и т. д. [109]. В 1937 г. J. M. Sherman по характеру гемолиза, антигенному составу, ферментативной активности и толерантности к некоторым химическим соединениям выделил четыре группы стрептококков: пиогенные, зеленыющие, энтерококки (в настоящее время выделенные в род *Enterococcus*) и молочнокислые стрептококки (в настоящее время отнесены к роду *Lactococcus*) [163].

Применение молекулярно-генетических методов анализа способствовало пересмотру существующих классификаций стрептококков, основанных на ограниченном числе признаков. С помощью анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и ДНК-ДНК гибридизации Bentley и Kawamura с соавт. удалось разделить стрептококки на шесть основных групп: pyogenic, anginosus, mitis, salivarius, bovis и mutans [26, 102]. Именно этот подход лег в основу современной систематики Bergey [197]. В ней не упоминается такая таксономическая категория как царство, а стрептококки относятся к отделу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*, который в 2017 году насчитывал 117 видов и 22 подвида, имеющих биномиальную номенклатуру. В 2002 году Facklam R. добавил к имеющимся шести группам еще одну, названную *sanguinis*. Классификация бактерий рода *Streptococcus* с учетом номенклатурных и таксономических изменений,

произошедших с момента выхода в свет в 2002 году рекомендаций Facklam R., представлена в Таблице 1 [106].

Таблица 1 – Виды и подвиды микроорганизмов, входящих в состав рода *Streptococcus* (по Köhler, 2007, с изменениями и дополнениями)

Филогенетическая группа	Виды	Группа антигенов Lancefield	Гемолиз	Хозяин	Автор(ы)/год
Pyogenic group	<i>S. pyogenes</i>	A	β	человек	Rosenbach (1884)
	<i>S. agalactiae</i>	B	β/α	человек, свиньи	Lehmann and Neumann (1896)
	<i>S. dysgalactiae</i>				Diernhofer (1932)
	subsp. <i>dysgalactiae</i>	C, L	α/β	животные	Vandamme et al. (1996)
	subsp. <i>equisimilis</i>	C, A, G, L	β	человек, животные	Vandamme et al. (1996)
	<i>S. equi</i>				Sand and Jensen (1888)
	subsp. <i>equi</i>	C	β	лошади	Farrow and Collins (1984a)
	subsp. <i>zooepidemicus</i>	C	β	коровы, человек	Farrow and Collins (1984a)
	subsp. <i>ruminantium</i>	C	β	овцы, козы	Ferna'ndez et al. (2004)
	<i>S. canis</i>	G	β	собаки, коровы, кошки, человек	Devriese et al. (1986)
	<i>S. iniae</i>	–	β	дельфины, рыбы, человек	Pier and Madin (1976)
	<i>S. porcinus</i>	B, E, P, U, V	β	свиньи, человек	Collins et al. (1984a)

Филогенетическая группа	Виды	Группа антигенов Lancefield	Гемолиз	Хозяин	Автор(ы)/год
	<i>S. pseudoporcinus</i>	–	β	человек	Bekal et al. (2006)
	<i>S. uberis</i>	–, E, C, D, P, U	α/β	коровы	Diernhofer (1932)
	<i>S. parauberis</i>	ND	α	коровы	Williams and Collins (1990)
	<i>S. hyointestinalis</i>	–	β	свиньи	Devriese et al. (1988)
	<i>S. phocae</i>	–, F, C	β	тюлени, лососи	Skaar et al. (1994)
	<i>S. halichoeri</i>	B		тюлени	Lawson et al. (2004)
	<i>S. urinalis</i>	–		человек	Collins et al. (2000)
	<i>S. castoreus</i>	A	β	бобры	Lawson et al. (2005b)
Anginosus group	<i>S. anginosus</i>	–, F, C, A, G	β/α	человек	Whiley and Beighton (1991)
	<i>S. constellatus</i>				
	subsp. <i>constellatus</i>	–, F, C, A, G	β/α	человек	Whiley et al. (1999)
	subsp. <i>pharynges</i>	C	β	человек	Whiley et al. (1999)
	<i>S. intermedius</i>	–	α/β	человек	Whiley and Beighton (1991, 1998)
Mitis group	<i>S. mitis</i>	–, K, O	α	человек	Andrewes and Horder (1906); Kilian et al. (1989)

Филогенетическая группа	Виды	Группа антигенов Lancefield	Гемолиз	Хозяин	Автор(ы)/год
	<i>S. oralis</i>	–	α	человек	Kilian et al. (1989)
	<i>S. crista</i>	ND	α	человек	Handley et al. (1991)
	<i>S. peroris</i>	ND	α	человек	Kawamura et al. (1998)
	<i>S. infantis</i>	ND	α	человек	Kawamura et al. (1998)
	<i>S. australis</i>	–		человек	Willcox et al. (2001)
	<i>S. pneumoniae</i>			человек	Chester (1901)
	<i>S. pseudopneumoniae</i>	ND	α	человек	Arbique et al. (2004)
	<i>S. sinensis</i>	–, F	α	человек	Woo et al. (2002)
	<i>S. orisratti</i>	A	α	крысы	Zhu et al. (2000)
	<i>S. oligofermentans</i>	ND	α	человек	Tong et al. (2003)
	<i>S. massiliensis</i>	G		человек	Glazunova et al. (2006)
Sanguinis group	<i>S. sanguinis</i>	–, H, W	α	человек	Kilian et al. (1989)
	<i>S. parasanguinis</i>	–, F, C, G, B	α	человек	Whiley et al. (1990)
	<i>S. gordonii</i>	–, H	α	человек	Kilian et al. (1989)
Salivarius group	<i>S. salivarius</i>	–, H, K	–/ α/β	человек	Andrewes and Horder (1906)
	<i>S. thermophilus</i> ^q	–	–/ β	молочные продукты	Orla-Jensen (1919)

Филогенетическая группа	Виды	Группа антигенов Lancefield	Гемолиз	Хозяин	Автор(ы)/год
	<i>S. vestibularis</i>	–	α	человек	Whiley and Hardie (1988)
Bovis group	<i>S. bovis</i>	–, D	α /	лошади, крупный рогатый скот	Orla-Jensen (1919)
	<i>S. equinus</i>	–, D	α	лошади, крупный рогатый скот	Andrewes and Horder (1906)
	<i>S. alactolyticus</i>	–, D	–/ α	человек	Farrow et al. (1984)
	<i>S. gallolyticus</i>	–, D	–	человек, коалы, крупный рогатый скот	Osawa et al. (1995)
	<i>S. macedonicus</i> (= <i>S. waiius</i>)			молочные продукты	Tsakalidou et al. (1998) Manachini et al. (2002)
	<i>S. pasteurianus</i>			человек	Poyart et al. (2002)
	<i>S. infantarius</i> (subsp. <i>infantarius</i>) (subsp. <i>coli</i>)	–, D	–/ α	человек, крупный рогатый скот	Bouvet et al. (1997) Schlegel et al. (2003) Schlegel et al. (2003)
	<i>S. lutetiensis</i>	–, D	α	человек	Poyart et al. (2002)

Филогенетическая группа	Виды	Группа антигенов Lancefield	Гемолиз	Хозяин	Автор(ы)/год
Mutans group	<i>S. mutans</i>	–	$\alpha/-/\beta$	человек	Clarke (1924)
	<i>S. rattus</i>	–	$-/\alpha$	крысы, человек	Coykendall (1977)
	<i>S. sobrinus</i>	–	$\alpha/-$	человек, крысы	Coykendall (1983)
	<i>S. cricetus</i>	–	$-/\alpha$	крысы, человек	Coykendall (1977)
	<i>S. downei</i>	–	$-/\alpha$	обезьяны	Whiley et al. (1988)
	<i>S. ferus</i>	–	$-/\alpha$	крысы	Coykendall (1983)
	<i>S. macacae</i>	–	$-/\alpha$	обезьяны	Beighton et al. (1984)
	<i>S. hyovaginalis</i>	–	α	свиньи	Devriese et al. (1997)
	<i>S. devriesei</i>	ND	α	лошади	Collins et al. (2004)
Групповая принадлежность не установлена	<i>S. acidominimus</i>	–, G	α	человек	Ayers and Mudge (1922)
	<i>S. suis</i>	R, S, T	α	свиньи, человек	Kilpper-Balcz et al. (1985) (validation)
	<i>S. ovis</i>	ND	α	овцы	Collins et al. (2001)
	<i>S. entericus</i>	D	α	телята	Vela et al. (2002)
	<i>S. marimammalium</i>	C	β	тюлени	Lawson et al. (2005)
	<i>S. gallinaceus</i>	ND	ND	куры, человек	Collins et al. (2002)
	<i>S. thoralensis</i>	–	α	свиньи	Devriese et al.

Филогенетическая группа	Виды	Группа антигенов Lancefield	Гемолиз	Хозяин	Автор(ы)/год
					(1997)
	<i>S. plurianimalium</i>	ND	α	коровы, телята, канарейки, кошки	Devriese et al. (1999)
	<i>S. didelphis</i>	–	β	опоссумы	Rurangirwa et al. (2000)
	<i>S. minor</i>	ND	α	собаки, кошки	Vancanneyt et al. (2004)
	<i>S. intestinalis</i>	–, G	β	свиньи	Robinson et al. (1988)
	<i>S. alactolyticus</i>	–, G, D	α	свиньи, попугаи, собаки	Vandamme et al. (1999)
	<i>S. difficile</i>	–	–	рыбы	Eldar et al. (1994)
	<i>S. agalactiae</i>	B		человек, коровы	Vandamme et al. (1997); Kawamura et al. (2005)

«-» – нет серологической реакции на групповые антигены по R. Lancefield

В 2002 году Facklam R. опубликовал практическое руководство для клинических микробиологов, которое позволяло легко отнести штаммы стрептококков к одной из семи групп по нескольким фенотипическим признакам (каталазная реакция, чувствительность к бацитрацину, PYR-тест и др.) [68]. Согласно этому руководству, видовая идентификация β -гемолитических стрептококков не представляет особой сложности и может быть осуществлена при помощи серологической реакции по Lancefield и нескольких простых фенотипических тестов. Видовая идентификация не- β -гемолитических стрептококков сложнее и требует больших трудозатрат из-за неинформативности

серологического теста на группоспецифический антиген по Lancefield, так как большинство видов могут синтезировать несколько группоспецифических полисахаридов, и поэтому могут быть отнесены к разным группам по Lancefield, или вообще не содержат антигенов по Lancefield. Исключение составляет определение антигена группы D для идентификации микроорганизмов, входящих в группу *bovis*, и определение антигенов R/S/T для идентификации *S. suis*. Несмотря на то что в настоящее время существует большое количество разнообразных биохимических панелей для идентификации не-β-гемолитических стрептококков, с помощью них не всегда удается точно установить вид микроорганизма. Более точными в этом отношении являются генетические методы анализа, основанные на определении последовательности консервативных генов. Чаще всего используется ген, кодирующий 16S рРНК [106]. Royart C. с соавт. для видовой идентификации стрептококков секвенировал ген *sodA*, кодирующий марганец-зависимую супероксиддисмутазу [147]. Tärr с соавт. предложил для определения видовой принадлежности штамма секвенировать *rnpB* ген, кодирующий РНК-субъединицу эндорибонуклеазы Р [181]. Однако на практике могут возникать ситуации, когда степень гомологии последовательности целевого гена у разных видов превышает 99%, например, гены, кодирующие 16S рРНК у референсных штаммов видов *S. mitis*, *S. oralis* и *S. pneumoniae*. К сожалению, в силу продолжительности анализа методы секвенирования остаются недоступными для большинства клинических лабораторий. Поэтому ряд ученых в целях дифференцировки и идентификации стрептококков предлагает учитывать видовую специфичность последовательностей различных генов для конструирования специфичных праймеров для полимеразной цепной реакции. В качестве такого генетического маркера Garnier с соавт. использовал ген, кодирующий d-аланин-d-аланин лигазы, однако с использованием данного подхода не удастся дифференцировать виды стрептококков, входящих в группу *anginosus* [77]. Дмитриевым А.В. с соавт. в качестве генетического маркера было предложено использовать ген *srpB0*, кодирующий белок теплового шока, для дифференцировки

штаммов видов *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. anginosus* и *S. constellatus* [64, 3].

Ситуация осложняется еще тем, что результаты, полученные с помощью разных методов, могут отличаться. Так, согласно результатам секвенирования участка гена, кодирующего 16S рРНК, *S. macedonicus*, *S. wais* и *S. gallolyticus* являются самостоятельными видами, тогда как результаты ДНК-ДНК гибридизации и секвенирования гена *sodA* указывают на принадлежность этих штаммов к одному виду *S. gallolyticus* [147].

Помимо классификации Bergey существует классификация National Centre of Biotechnology Information (NCBI, США) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=1301&lvl=1&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>). Согласно этой классификации в апреле 2017 года в род *Streptococcus* насчитывал 1609 видов, имеющих персональный идентификационный номер, из которых биномиальная номенклатура присвоена лишь 110 видам. В названии остальных видов присутствуют цифры, буквы, локализация микроорганизмов и их сочетания (*Streptococcus* sp. oral taxon K18).

Большое практическое значение получила классификация стрептококков по Bergey. Вместе с тем, классификация стрептококков NCBI по молекулярно-биологическим характеристикам, свидетельствует, что подавляющее большинство изолятов стрептококков без биномиальной номенклатуры, возможно, могут претендовать на статус самостоятельных видов, а их этиологическую роль в развитии заболеваний человека и животных еще предстоит установить. Отличия в видовом составе рода *Streptococcus* между классификациями, составленными по принципам NCBI и Bergey, служат доказательством их высокого генетического разнообразия и отражают наши ограниченные представления о составе, казалось бы, хорошо изученной группы микроорганизмов.

1.1.3 Особенности эпидемиологии стрептококковых инфекций

Патогенными для человека являются главным образом представители вида *Streptococcus pyogenes* (стрептококки группы А, СГА). В естественных условиях бактерии вида *S. pyogenes* вызывают заболевания только человека, а источником экзогенной инфекции служат больные люди или носители. Для стрептококковых инфекций характерна множественность механизмов, путей и факторов передачи. Основным способом заражения воздушно-капельный, в других случаях прямой контакт, реже – алиментарный (молоко и другие пищевые продукты). *S. pyogenes* поражает слизистые оболочки, миндалины, кожные покровы и более глубокие слои тканей и вызывает разнообразные формы инфекции, которые делятся на инвазивные и неинвазивные [17].

Инвазивные инфекции – это инфекции, при которых микроорганизмы выделяются из обычно стерильных мест и тканей. К наиболее распространенным относят синдром токсического шока (СТШ), некротический фасциит и миозит, бактериемию и септицемию [2, 82, 95, 174]. Они характеризуются крайне тяжелым течением и высоким риском летального исхода, который составляет 44% случаев для СТШ [2, 4, 42]. Начиная с 2012 - 2013 гг. в некоторых странах отмечено увеличение частоты случаев ИСИ, которое связывают с появлением в популяции вариантов возбудителей с повышенной вирулентностью за счет продукции суперантигенов, каковыми являются различные токсины, широко представленные у СГА и у других бета-гемолитических СГС и СГГ [22, 57, 74, 136, 174, 199].

Типичными примерами неинвазивных инфекций являются острый тонзиллит (фарингит), скарлатина, импетиго/пиодермия, рожистое воспаление [130, 196]. По оценке ВОЗ в мире за год регистрируется свыше 600 миллионов случаев заболеваний острым тонзиллитом (фарингитом). При этом частота заболеваний значительно выше в организованных коллективах (среди школьников и военных), при этом наиболее уязвимой группой населения являются дети старше трех лет. Пик заболеваемости приходится на позднюю зиму и раннюю весну [130]. В целом, по литературным данным уровень ежегодной заболеваемости фарингитом,

вызванным *S. pyogenes*, в развитых странах составляет около 15% для детей школьного возраста и 4-10% для взрослого населения, в то время как в развивающихся странах этот показатель в 5-10 раз выше [45, 55, 196]. Скарлатина за период 1946-2010 гг. характеризовалась снижением уровня заболеваемости, частоты летальных исходов, тяжести заболевания, благодаря внедрению в широкую практику эффективных методов лечения и совершенствования противоэпидемических мероприятий [6, 130]. Уровень заболеваемости скарлатиной в Великобритании и Гонконге до 2010 г. был примерно одинаков и составлял 4 на 100 тыс. населения [86, 119]. За последние годы интерес врачей и ученых всего мира к этому заболеванию был возобновлен в связи с резким увеличением частоты заболеваний и вспышек, произошедших в некоторых регионах мира. Первое сообщение об увеличении частоты заболеваний скарлатиной на 40% было сделано во Вьетнаме в 2009 году [148]. Двумя годами позже был сделан доклад о значительном увеличении числа заболеваний в Гонконге в течение 2011 – 2012 гг. (110 тыс. случаев) [149, 150, 206]. Показатель заболеваемости скарлатиной в 2011 г. в Гонконге увеличился по сравнению с предшествующими годами в девять раз и составил 24 на 100 тыс. населения [119, 206]. В 2014 году в Великобритании был зарегистрирован максимальный уровень заболеваемости скарлатиной со времен 1960-х годов (49 на 100 тыс. населения) [86]. В конце 2022 года Всемирная организация здравоохранения сообщила об увеличении числа заболеваний скарлатиной по сравнению с этим показателем за предыдущие 5 лет во Франции, Ирландии, Нидерландах, Швеции и Великобритании [199]. По данным Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Санкт-Петербурга показатель заболеваемости скарлатиной в 2011 году составил 61,54 на 100 тыс. населения Санкт-Петербурга, в том числе 43,17 на 100 тыс. детского населения [6].

На фоне запущенных (нелеченных) стрептококковых инфекций или после перенесения инфекции в острой форме возможно развитие иммунологически опосредованных осложнений стрептококковой инфекции, таких как острая ревматическая лихорадка (ОРЛ) и гломерулонефрит [9]. ОРЛ – это системное

заболевание соединительной ткани с преимущественной локализацией поражений в сердечно-сосудистой системе (ревмокардит (РК), клапанные пороки сердца в 30-40% случаев), развитие суставного (артрит 60-80% случаев), кожного (ревматические узелки, аннулярная эритема в 2% случаев) и неврологического (хорея) синдромов (10% случаев) [12, 142]. Развитие заболевания обусловлено иммунным ответом организма на антигены СГА и перекрестной реактивностью со схожими эпитопами тканей человека (в коже, суставах, сердце и мозге). На 2005 год по всему миру насчитывалось 15,6 миллионов случаев заболевания ревмокардитом, в том числе 471 тыс. новых случаев и 233 тыс. смертей в год [45, 142]. Среди них более 2,4 миллионов случаев заболеваний ревмокардитом зарегистрировано у детей в возрасте от 5 до 14 лет (ежегодно регистрируется около 336 тыс. случаев), что делает ревмокардит наиболее распространенной детской болезнью сердца по всему миру. Одно время ревмокардит был главной причиной детской смертности в некоторых регионах мира [37, 142]. Острее всего ситуация с ОРЛ и РК стоит в развивающихся странах, где существуют проблемы в оказании адекватной своевременной медицинской помощи и инфраструктуре [33, 45, 90, 126]. В Африке к югу от пустыни Сахара уровень заболеваемости составляет 5,7 случаев на 1 тыс. населения, на тихоокеанских островах и среди коренного населения Австралии и Новой Зеландии этот показатель составляет 3,5 случаев на 1 тыс. населения, на юге центральной Азии 2,2 случаев на 1 тыс. населения [45]. Стоит отметить, что сбор коллекций штаммов стрептококков и проведение широкомасштабных эпидемиологических исследований зачастую затруднено в этих странах, в результате чего уровень заболеваемости явно недооценен. Согласно методологии, принятой исследователями, при отсутствии данных из какого-либо региона осуществляется экстраполяция данных из ближайшего региона, сходного по социально-экономическим условиям. Тем не менее, вызывает сомнение, насколько такая экстраполяция является правомерной. Среди населения с высоким социально-экономическим уровнем жизни в промышленно развитых странах (США, Западная Европа) уровень заболеваемости ОРЛ ниже. В США он колеблется от 2-14 на 100 тыс. человек [184]. Острый гломерулонефрит – тяжелое

поражение аппарата почечных клубочков, приводящее к дисфункции почек и к формированию вторичной гипертензии с летальным исходом. Ежегодно регистрируется более 0,5 млн. случаев гломерулонефрита от которых погибает 5 тыс. человек [12, 45].

Бактерионосительство. Несмотря на то что СГА является патогенным для человека микроорганизмом, существует категория людей, у которых СГА обнаруживается в верхних дыхательных путях культуральными или экспресс-методами при отсутствии каких-либо сопутствующих клинических симптомов острого фарингита [163, 165]. Согласно обзору, обобщающему результаты 29 исследований, при уровне заболеваемости детей фарингитом, вызванным СГА, 37%, носительство СГА было обнаружено у 12% детей [165]. Вопрос о вкладе особенностей организма хозяина и возбудителя на развитие бактерионосительства остается на сегодняшний день открытым. У пациентов, не подвергавшихся лечению антибиотиками, эрадикация СГА в 50% случаев наступает в течение нескольких недель предположительно вследствие реакции иммунной системы организма хозяина. Согласно исследованию, проведенному Martin с соавт., существуют две категории детей, одни из которых предрасположены к носительству СГА, а другие никогда не станут носителями [123]. В ряде случаев у носителей наблюдается смена одного штамма СГА другим без появления клинических симптомов, но в 15% случаев дети сообщают о недомогании, указывающем на стрептококковый фарингит. При этом носитель, перенеся смену одного штамма СГА другим, сопровождающуюся развитием заболевания, иногда возобновлял носительство первичного штамма. Никакой корреляции между *emm* генотипом штамма и бактерионосительством выявлено не было [38, 161]. Данные, подтверждающие зависимость исхода инфекции от особенностей организма хозяина, были получены при расследовании клональной вспышки инфекции, вызванной эритромицин резистентным штаммом СГА, где один и тот же клон был выявлен у 50% детей с типичными симптомами, у 11% детей с атипичными симптомами и у 39% детей с бессимптомным носительством [123].

По-видимому, немаловажную роль в развитии бессимптомного носительства играют особенности конкретного штамма микроорганизма. Показано, что беспрепятственно персистировать на слизистой верхних дыхательных путей, уклоняясь от факторов иммунной системы хозяина и действия антибиотиков, штаммам помогает их способность образовывать биопленки. Кроме того, существует предположение, что клинические проявления в некоторой степени определяются способностью штаммов СГА образовывать капсулу. При этом бескапсульные штаммы чаще изолируют от носителей, а мукоидные штаммы часто ассоциированы со вспышками ОРЛ [12]. Несмотря на то что СГА принято считать внеклеточным патогеном, некоторые штаммы этого вида способны проникать внутрь эпителиальных клеток благодаря наличию у них генов *prtF1* и *prtF2* [54, 137, 20]. Гипотеза о том, что интернализация СГА внутрь эпителиальных клеток способствует их стойкой колонизации слизистых оболочек человека, проиллюстрирована результатами исследования, проведенного Neeman с соавт. и подтвержденного рядом других исследований, в которых сравнивается частота распространения гена *prtF1* в штаммах СГА, выделенных от больных и носителей. Среди штаммов, выделенных от 54 детей с диагнозом фарингит, 16 штаммов (30%) были *prtF1*-позитивными в отличие от 9 *prtF1*-позитивных штаммов из 10 (90%), выделенных от носителей [137, 93]. Musumeci при сравнении изолятов СГА, выделенных у больных фарингитом ($n = 32$) и носителей ($n = 30$), не обнаружил различий в присутствии гена *prtF1* (70% и 69% соответственно), однако доля штаммов, содержащих ген *prtF2*, была выше в группе носителей (80% и 53% соответственно, $p < 0,05$) [134]. Дополнительные исследования *prtF1*- и *prtF2*-позитивных штаммов с использованием модели клеток HEp-2 выявили, что штаммы, выделенные от носителей, обладают большей способностью проникать в клетки по сравнению со штаммами, выделенными от больных фарингитом [163, 83]. Однако стоит учитывать, что интернализация СГА внутрь клеток HEp-2 может иметь фагоцитарную природу из-за многочисленных пересевов этой клеточной линии. Facinelli с соавт. была показана взаимосвязь между устойчивостью к эритромицину и инвазивностью. Оказалось, что изоляты,

резистентные к эритромицину, чаще содержат ген *prtF1* (89%), чем изоляты, чувствительные к эритромицину (21%) [67]. Cосуза с соавт. при изучении штаммов СГА, полученных от детей, больных фарингитом (n = 837), как до, так и после лечения антибиотиками, выявил и наличие гена *prtF1* у 33% штаммов. При этом более высокая распространенность гена *prtF1* наблюдалась среди штаммов, резистентных к эритромицину (45%), особенно с индуцибельным типом устойчивости к макролидам (iMLS) (84%) [53].

Бессимптомное носительство СГА, как правило, сопровождается накоплением в крови антител к различным антигенам стрептококков. В крови взаимодействие СГА с антителами происходит посредством Fab-фрагментов, а в носоглотке, связь формируется преимущественно по типу Fc-рецепции и препятствует дальнейшему фагоцитозу, что способствует длительному пребыванию возбудителя в очаге [145]. Таким образом, Fc-рецепция становится фактором выживаемости СГА. Эти факты являются наглядным примером зависимости исхода инфекции от взаимоотношения организмов в системе «паразит-хозяин».

В последнее время перечень клинически значимых видов стрептококков значительно расширился. Несмотря на то, что условно-патогенные стрептококки являются частью нормальной микрофлоры, заселяющей основные ниши организма (дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, кожные покровы, мочеполовую систему), в определенных условиях они могут стать причиной инфекционно-воспалительных заболеваний человека. Так, была доказана этиологическая роль стрептококков групп С и G (СГС и СGG) в развитии широкого круга заболеваний [16, 22]. Поскольку внутри этих групп идентификация микроорганизмов до вида осуществляется редко, на данный момент сложно адекватно оценить роль отдельных видов в развитии заболеваний.

Streptococcus dysgalactiae subsp. *equisimilis* (SDSE), которые могут относиться и к СГС, и к СGG, вызывают различные поверхностные, глубокие, токсин-опосредованные и иммунологически-опосредованные заболевания человека. В некоторых исследованиях установлена частота инвазивных

заболеваний, вызванных SDSE, практически равная количеству инвазивных заболеваний, вызванных *S. pyogenes* [180, 43]. Существуют сообщения о внебольничных и внутрибольничных вспышках инфекций, вызванных SDSE. SDSE в основном вызывают кожные заболевания и поражения мягких тканей, включая пиодермию, целлюлит, раневые инфекции, абсцессы и некротизирующий фасциит. Так же, как и СГА, SDSE может вызвать фарингит у взрослых людей и явиться причиной вспышек фарингита у детей [22]. Этиологическая роль SDSE в развитии фарингита подтверждается сообщениями о выделениях SDSE с поверхности верхних дыхательных путей у людей с острым постстрептококковым гломерулонефритом и ОРЛ. Среди коренного населения Австралии, где СГА из носоглотки выделяется редко, а уровень заболеваемости ОРЛ и РК очень высок, серологические тесты свидетельствуют о перенесенной ранее инфекции, вызванной СГГ [125]. Инфекции человека, вызванные зоонозными изолятами СГС/СГГ, встречаются сравнительно редко и возникают после контакта с животными или связаны с потреблением непастеризованных молочных продуктов. Так, в 1997 году был зарегистрирован случай сепсиса, причиной которого был *S. canis*, а штаммы *S. equi subsp. zooepidemicus* стали причиной нескольких вспышек гломерулонефрита, в большинстве случаев связанных с употреблением контаминированных молочных продуктов [106].

Среди стрептококков пиогенной группы, не относящихся к СГС/СГГ, *S. iniae*, вызывающий заболевания рыб, может передаваться человеку после употребления в пищу зараженной рыбы. В литературе сообщается о двух случаях заболеваний (цистит, сепсис), вызванных *S. urinalis*. *S. porcinus* был выделен из мочеполовых путей женщины репродуктивного возраста. *S. pseudoporcinus*, патогенный потенциал которого пока не определен, колонизирует слизистую дыхательных путей, глаз, обнаруживается в крови и цереброспинальной жидкости [106].

На протяжении последних десятилетий показано возрастающее число ИСИ, вызванных стрептококками группы *anginosus* (*S. anginosus*, *S. constellatus*, *S.*

intermedius) Со стрептококками вида *S. intermedius* связывают развитие абсцессов головного мозга и печени [16, 106].

Клинические проявления инфекций, вызванных стрептококками группы *mitis* (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. cristatus*, *S. peroris*, *S. australis* и *S. infantis*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. parasanguinis*, *S. sinensis*) разнообразны, но, в первую очередь, представляют собой инфекционные эндокардиты [106].

Среди видов, составляющих группу *salivarius*, только штаммы видов *S. salivarius* и *S. vestibularius* были обнаружены у людей. Бактерии, относящиеся к виду *S. salivarius*, чаще всего ассоциированы с широким кругом инфекций, в то время как *S. vestibularius* обнаруживается в составе нормальной микрофлоры полости рта, и его роль в качестве патогена не подтверждена [106].

Стрептококки вида *S. bovis* часто встречаются в образцах крови пациентов с бактериемией, сепсисом и эндокардитом [106, 147].

Согласно некоторым исследованиям, наиболее распространенными видами, выделенными от человека (в первую очередь, из ротовой полости), являются виды *S. mutans* и *S. sobrinus* [128]. Они являются основной причиной кариеса зубов, а также поражают сердечно-сосудистую систему и способны вызывать эндокардиты. Другие виды, входящие в группу *mutans* (*S. cricetus* и *S. rattii*), встречаются гораздо реже.

Анализ 44 случаев заболеваний людей, вызванных *S. suis* (39 случаев менингита и 5 случаев септицемии без менингита), показал, что все инфицированные люди работали с сырым свиным мясом или контактировали со свиньями. Следует отметить то, что сложности в идентификации этого вида, связанные, в том числе, и со схожестью его фенотипических свойств с видами *S. gordonii*, *S. sanguinis* и *S. parasanguinis*, не позволяют судить об истинной частоте его встречаемости при инфекционных процессах у людей. В 1991 году Trottier с соавт. сообщил о первом случае эндокардита у человека, проживающего в Канаде, вызванного *S. suis* [106].

Таким образом, стрептококки серологических групп А, С и G (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*, *Streptococcus anginosus*,

Streptococcus constellatus и другие виды стрептококков) способны вызывать широкий спектр генерализованных, системных и местных заболеваний человека и являются одной из ведущих причин глобальной заболеваемости и смертности.

1.2 Молекулярно-эпидемиологические подходы для внутривидовой дифференцировки штаммов стрептококков

В настоящее время существует большое количество молекулярно-генетических методов оценки генетического разнообразия возбудителей стрептококковых заболеваний на генном и геномном уровнях [8]. Наиболее информативными подходами для дифференцировки штаммов являются:

- *emm*-типирование (определение нуклеотидных последовательностей *emm* генов, кодирующих переменные фрагменты типовых М-белков стрептококка) [48, 175];

- электрофорез рестрикционных фрагментов ДНК в пульсирующем электрическом поле (PFGE) [162];

- избирательная амплификация полиморфных участков ДНК методом RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) [72]

- MLST-типирование (сравнение последовательностей участков нескольких «house-keeping» маркерных генов конкретного вида) [120];

- анализ геномов на наличие мобильных генетических элементов (островов патогенности, плазмид, транспозонов) и ассоциированных с ними генов [118].

Перечисленные подходы применяются с целью изучения закономерностей географического распространения эпидемически актуальных клонов СГА, СГС и СGG, а также для выявления новых клонов и прогнозирования появления эпидемически актуальных штаммов.

Одним из основных способов дифференцировки штаммов *S. pyogenes* является их разделение на *emm* генотипы, в зависимости от нуклеотидной последовательности 5'-конца кодирующего его *emm* гена согласно разработанной в

Центре по контролю за заболеваемостью (Атланта, США) высокоэффективной технологии [175]. Согласно протоколу первые 90 п.н. *emm* гена определяют *emm*-генотип *S. pyogenes*, а последующие 60 п.н. – *emm*-подтип. Сравнение полученной нуклеотидной последовательности с базой данных (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>) позволяет установить генотип штамма стрептококка. Новый *emm*-тип или подтип регистрируется в случае сходства первого из участков (90 п.н.) с последовательностями известных *emm*-типов менее чем на 92% или при наличии одной нуклеотидной замены во втором участке (60 п.н.) соответственно.

В настоящее время идентифицировано более 250 *emm* типов с более чем 1900 *emm* подтипами [48, 175]. Учитывая типоспецифический характер иммунитета к *S. pyogenes*, можно допустить, что вариации в гене *emm* являются результатом адаптивных реакций макроорганизма. Доминирующие циркулирующие типы варьируют в зависимости от географического региона и могут меняться со временем. Различные стрептококковые заболевания или их осложнения нередко бывают ассоциированы с конкретными *emm* типами [33, 161, 173, 208]. Так, штаммы генотипов *emm5*, *emm6* и *emm18* часто связаны с развитием ревматических поражений, штаммы серотипов *emm1*, *emm2*, *emm4*, *emm12*, *emm25*, *emm42*, *emm49*, *emm56*, *emm57* и *emm60* – с развитием гломерулонефрита, штаммы генотипов *emm1*, *emm3*, *emm12*, *emm28*, *emm49*, *emm89* – с тяжелыми инвазивными заболеваниями, а *emm2*, *emm4*, *emm6*, *emm12*, *emm44*, *emm61* – с неинвазивными заболеваниями [54, 105]. В развивающихся странах циркулирующие *emm* типы отличаются от таковых в развитых странах и гораздо более разнообразны. Так, в развитых странах доминирующими являются несколько *emm* типов (*emm* типы 12, 1, 28, 4 и 3) на долю которых приходится около 40% заболеваний. Эти же типы часто выделяются от бессимптомных носителей. При этом более 90% всех штаммов относятся к 25 наиболее распространенным *emm* типам, в то время как на оставшиеся 10% штаммов приходится более 145 *emm* типов. Однако штаммы, относящиеся к 25 наиболее распространенным в Европе и Америке *emm* типам, реже вызывают заболевания людей в Африке и у коренного населения

Тихоокеанского региона и полуострова Индостан [39, 173]. В этих странах на долю 25 наиболее распространенных *emm* типов приходится около 60% всех штаммов, а доминирование какого-либо определенного *emm* типа отсутствует.

emm-типирование также широко используется для молекулярно-эпидемиологического анализа SDSE, и на данный момент в базе данных насчитывается более 50 *emm* типов [78]. *emm* типы SDSE stG2078, stG10, stG6.1 и stG245 ассоциированы с инвазивными заболеваниями, в то время как штаммы SDSE *emm* типа stG4831 часто выделяют у больных фарингитом. В респираторном тракте обнаруживаются штаммы SDSE с *emm* типом stG10.0 и stG245 [11, 78, 80, 116, 205].

Одним из самых достоверных способов генетического типирования штаммов *S. pyogenes* и SDSE является метод мультилокусного секвенирования (multilocus sequence typing, MLST). Данный подход основан на установлении нуклеотидных последовательностей определенных генов «домашнего хозяйства», которые являются необходимыми для протекания реакций основного метаболизма, а значит присутствуют у всех организмов [9, 118]. Анализу подвергаются лишь небольшие фрагменты (около 500 п.н.) ряда генов. Для *S. pyogenes* в качестве таких генов выбраны: *gki*, *gtr*, *marl*, *mutS*, *recP*, *xpt* и *yqiL*, кодирующие ферменты и транспортные белки. Поскольку эти гены имеют исключительную важность для жизнеспособности организма, они характеризуются относительно низкой скоростью накопления мутаций, поэтому новую аллель присваивают в случае отличия хотя бы одного нуклеотида. Таким образом, для каждого штамма определяют свой аллельный профиль. Например, ST-14 *S. pyogenes* содержит аллели 8, 21, 4, 11, 2, 6, 8 определенных генов. В настоящее время для *S. pyogenes* установлено наличие 1200 ST-типов (MLST типов). MLST типирование часто используется в сочетании с *emm* генотипированием для описания штаммов *S. pyogenes*, и широко признано, что типы *emm* в значительной степени коррелируют с MLST-типами. Изучение генетической структуры популяции методом MLST позволило оценить, насколько генетически разнообразен *S. pyogenes* [31, 32]. В глобальном контексте отсутствует доминирование одного клона или клонального комплекса, что подчеркивает

высокую степень пластичности генома *S. pyogenes* и сохранение дивергентных штаммов на уровне популяции. Одним из ограничивающих факторов при использовании выбранных генов MLST для определения структуры популяции *S. pyogenes* является высокая скорость рекомбинации в самих аллелях [57]. Такие результаты с использованием различных информационных подходов и различных размеров популяции отражают сложность эволюционной истории *S. pyogenes*, которая может быть искажена использованием ограниченного числа геномных локусов в качестве маркеров эволюционных взаимоотношений в глобальном контексте. Увеличение объема выборки позволило установить, что не все штаммы *S. pyogenes* содержат семь целевых генов и в некоторых субпопуляциях отсутствуют целевые гены *yqiL* и *xpt* [57]. Несмотря на это, схема MLST зарекомендовала себя как полезный инструмент для определения взаимосвязи штаммов в географически ограниченных популяциях в короткий промежуток времени.

Другим методом, широко используемым в молекулярной биологии для дифференцировки штаммов *S. pyogenes*, является электрофорез в пульсирующем электрическом поле (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) [162]. Этот подход основан на обработке ДНК редкощепящими рестриктазами с последующим разделением фрагментов в пульсирующем электрическом поле и сравнительном анализе паттернов рестрикции [34].

Одной из причин большого числа рестрикционных паттернов является приобретение штаммами мобильных генетических элементов (IS элементов, транспозонов, бактериофагов), что может привести к исчезновению или появлению новых сайтов рестрикции, а также изменению размеров рестрикционных фрагментов.

Схемы молекулярного типирования, основанные на использовании методов *emt*-типирования, PFGE, MLST, также описаны для SDSE и некоторых других СГС/СГГ [11, 79, 32].

В качестве эпидемиологического инструмента может широко использоваться дифференцировка штаммов по ДНК мобильных генетических элементов (МГЭ)

(островов патогенности, плазмид, транспозонов) и ассоциированных с ними генов [118]. Такие МГЭ участвуют во внутривидовом и межвидовом обмене, определяя геномный полиморфизм и изменения в вирулентности штаммов. Их присутствие часто связывают с антибиотикоустойчивостью бактерий. Примеры элементов, контролирующих MLS-резистентность стрептококков к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В, гены которых могут быть использованы в качестве маркерных ДНК, подробно описаны в главе 1.3.

За короткий период времени изучение молекулярной эпидемиологии штаммов стрептококков продвинулось от анализа вариабельности отдельных генов до сравнительной популяционной геномики, что расширило знания о природе, генетической структуре и молекулярных событиях, происходящих со стрептококками [76, 98, 107, 114]. Возможность широкого использования полногеномного секвенирования (WGS – whole genome sequences) внесла весомый вклад в понимание молекулярных основ генетической изменчивости биологических свойств и эволюции стрептококков [136, 107, 190, 114].

Очевидно, что для контроля за инфекционной заболеваемостью недостаточно только идентификации возбудителя и установления его родовой и видовой принадлежности. Перечисленные подходы крайне необходимы для получения исчерпывающих данных о распространенности, генетической гетерогенности, факторах патогенности стрептококков, контроля за возникновением его новых вариантов и желательны для эпидемиологического прогноза.

1.3 Генетический полиморфизм стрептококков, опосредованный экзогенными генетическими элементами

Размер генома *S. pyogenes* колеблется от 1,67 до 1,98 млн.п.н., что, по оценкам, кодирует от 1495 до 1976 генов, большинство из которых функционально неохарактеризованы [98]. Особенностью генома *S. pyogenes* является наличие 5–6

оперонов 16S рРНК, 57–67 тРНК, 0–10 профаговых элементов и 0–1 плазмид. Многочисленные исследования подтверждают наличие «коровой» (консервативной, core-геном) части генома, общей для всех штаммов *S. pyogenes*, которая насчитывает 1300 генов [98, 202]. Для сравнения, core – геном других видов стрептококков значительно меньше: 850, 1083 и 1193 генов для *S. agalactiae* [155], *S. mutans* [128] и *S. pneumoniae* [81], соответственно.

Несмотря на стабильность размера core – генома, эволюция генов внутри него не является статической или нейтральной. Разница в количестве «коровых» генов, демонстрирующих признаки произошедшей рекомбинации, по-видимому, связана с размером выборки и разнообразием входящих в нее штаммов. Раннее исследование 11 геномов показало, что ~ 37% «коровых» генов имеют рекомбиногенную структуру. Совсем недавно анализ разнообразного набора данных показал, что 68% (890 из 1306) «коровых» генов имели признаки рекомбинационных событий. Было идентифицировано, что 49% из ~416 «коровых» генов без признаков рекомбинации подвергаются «положительному» или диверсифицирующему отбору по гену, имеющему отношение несинонимичных мутаций к синонимичным >1 (1 означает нейтральность) [98]. В совокупности эти данные указывают на то, что core – геном *S. pyogenes*, хотя и стабилен по размеру, вероятно, изменяется под эволюционным и/или селективным давлением, подчеркивая продолжающийся процесс адаптивной эволюции у *S. pyogenes*.

Часть генома, включающая экзогенные генетические элементы, называют мобиломом. Мобилом включает в себя такие участки генома, которые, судя по названию, могут передаваться от одной клетки другой или перемещаться с места на место в конкретном геноме. Эти мобильные генетические элементы (МГЭ) могут быть разделены на две группы: межклеточные МГЭ, такие как плазмиды и профаги, которые могут передаваться от клетки к клетке, и внутриклеточные МГЭ или transposable elements (TE), которые не могут самостоятельно мигрировать из одного генома в другой, но передаются в результате интеграции в элементы первой группы (транспозоны (Tn), инсерционные последовательности или IS-элементы, интегроны (In) и интроны). При этом в геномах бактерий обнаруживаются

структуры, которые обладают чертами обеих групп, такие как интегративно-конъюгативные элементы (Integrative Conjugative Elements, ICE), первоначально называвшиеся конъюгативными транспозонами, и неконъюгативные геномные острова [118]. Гены, входящие в состав МГЭ, не требуются для основных процессов, протекающих в бактериальной клетке, но могут повышать приспособляемость или трансмиссивность определенных штаммов.

1.3.1 IS-элементы

Инсерционные последовательности (IS-элементы) представляют собой МГЭ размером около 800-1400 п.н. Они содержат один или два гена, кодирующих белок транспозазу и фланкированы короткими инвертированными повторами (inverted repeat (IR)) (10 – 40 п.н.) [118]. С помощью транспозазы происходит встраивание IS-элементов в различные участки хромосомы с образованием прямых повторов. Существуют базы данных, такие как ISfinder (https://www-is.biotoul.fr/IS_Infos/1_1.php), в которых представлены известные к настоящему моменту IS-элементы бактерий с указанием сайтов их встраивания в геном. Мультикопийность одинаковых IS-элементов в рамках одного генома является основой для событий гомологичной рекомбинации, которые могут оказывать влияние на транскрипцию тех или иных белков, тем самым приводя к изменениям в вирулентности штамма.

1.3.2 Транспозоны и интегративно-конъюгативные элементы

Транспозоны представляют собой последовательности ДНК размером от 12 до 63 т.п.н, фланкированные IS-элементами. С помощью кодируемой ими транспозазы они способны к перемещению между молекулами ДНК внутри одной клетки (хромосома/плазмида), а также перемещению между геномами в результате конъюгации (конъюгативные транспозоны или ICE) [99, 118].

Присутствие в составе транспозонов генов устойчивости к антимикробным препаратам способствует распространению детерминант резистентности между штаммами [47, 114, 189].

Устойчивость стрептококков к макролидам обусловлена несколькими защитными механизмами. Перекрестная резистентность к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В (MLS_B тип лекарственной устойчивости) может быть обеспечена за счет пост-транскрипционной модификации рРНК-метилазами участка связывания этих антибиотиков с рибосомой (гены метилаз семейства *erm*). Устойчивость к клиндамицину (линкозамиду) у таких штаммов может проявляться конститутивно (сMLS_B) или индуцибельно (iMLS_B). У стрептококков устойчивость в основном обеспечивается за счет двух метилаз, кодируемых генами *ermA* (покласс *ermTR*) и *ermB*. В то время как *ermB* ген ассоциирован с сMLS_B типом лекарственной устойчивости и редко встречается у штаммов с iMLS_B типом лекарственной устойчивости, ген *ermTR* обычно экспрессируется индуцибельно, хотя штаммы с сMLS_B типом лекарственной устойчивости также встречаются. Ген *ermB*, впервые обнаруженный у *Enterococcus faecalis* в составе неконъюгативной плазмиды внутри транспозона Tn917, у *S. pyogenes* ассоциирован с разными генетическими элементами, в зависимости от того, экспрессируется он конститутивно или индуцибельно. В первом случае этот ген находится на транспозонах Tn916 семейства, таких как Tn3872 (24 т.п.н.) или Tn6002 (21 т.п.н.). Транспозон Tn3872 образовался в результате встраивания Tn917 в ORF9 Tn916, в результате чего ген *ermB* оказался расположен рядом с геном *tetM*, обеспечивающим устойчивость к тетрациклину. Была показана возможность передачи Tn3872 элемента между штаммами *S. pyogenes*. Транспозон Tn6002 образовался в результате инсерции *ermB* элемента (3 т.п.н.) между ORF20 и ORF19 транспозона Tn916. В отличие от Tn3872 для Tn6002 была доказана способность к межвидовому конъюгативному переносу от *S. pyogenes*. Индуцибельно экспрессируемый ген *ermB* входит в состав элемента, изначально названного Tn1116 (48 т.п.н.), который позднее был переименован в ICESp1116 из-за своей принадлежности к TnGBS семейству интегративно-когъюгативных элементов.

Этот элемент имеет мозаичную структуру TnGallo1 из *S. gallolyticus* с двумя интегрированными фрагментами, разделенными IS1216: *ermB*-содержащим фрагментом, полученным из плазмиды pSM19035, и фрагментом транспозона Tn5397 (семейство Tn916), обнаруженного у *Clostridium difficile*, в котором ген резолвазы *tndX* замещает гены интегразы *int* и экстизионазы *xis*. При этом ICESp1116 образовался в результате инсерции последовательности ДНК, содержащей *ermB* ген, в кодирующую часть гена *tetM* Tn5397, что привело к его инактивации [189] (Рисунок 1).

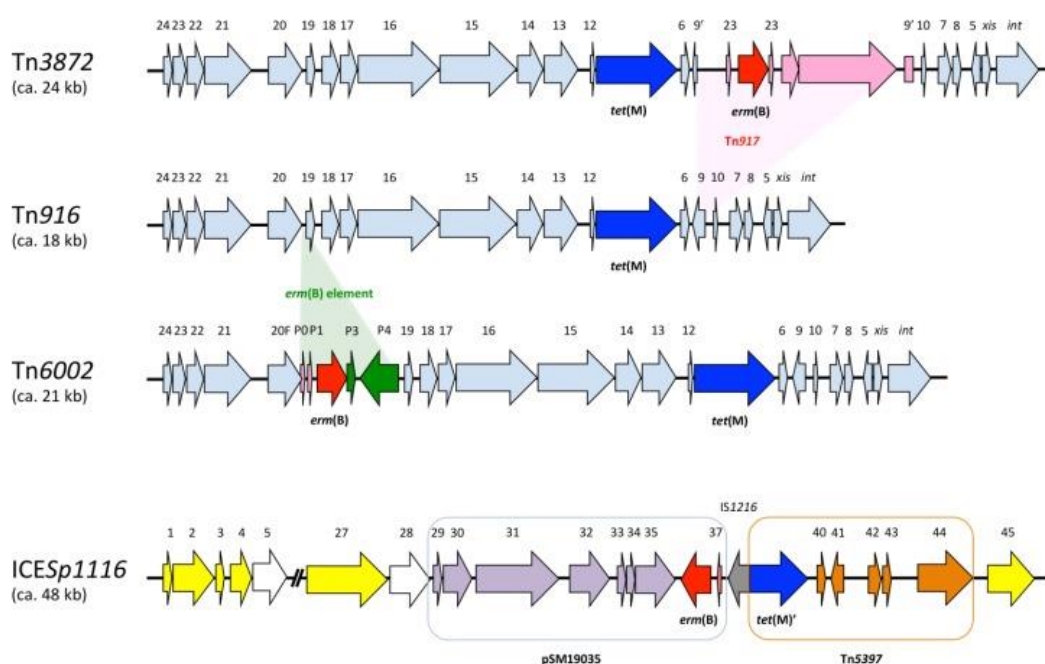


Рисунок 1 – Генетические элементы, содержащие ген *ermB* у стрептококков (Источник: Varaldo, P.E, 2009 [189])

Для штаммов *S. pyogenes* описано несколько *ermTR*-содержащих интегративно-конъюгативных элементов: ICE10750-RD.2 (49 т.п.н.) и ICESp1108 (45 т.п.н.) у штаммов чувствительных к тетрациклину, и ICESp2905 (66 т.п.н.) у штаммов, устойчивых к тетрациклину за счет экспрессии гена *tetO* [189] (Рисунок 2). Все три элемента содержат почти идентичную «core»-часть, которая помимо гена *erm(TR)* содержит два гена, обеспечивающих устойчивость к другим антибиотикам (тетроназину и спектиномицину). Ген *ermTR* может передаваться

посредством конъюгации компетентным штаммам *S. pyogenes* и другим грамположительным бактериям [47, 189].

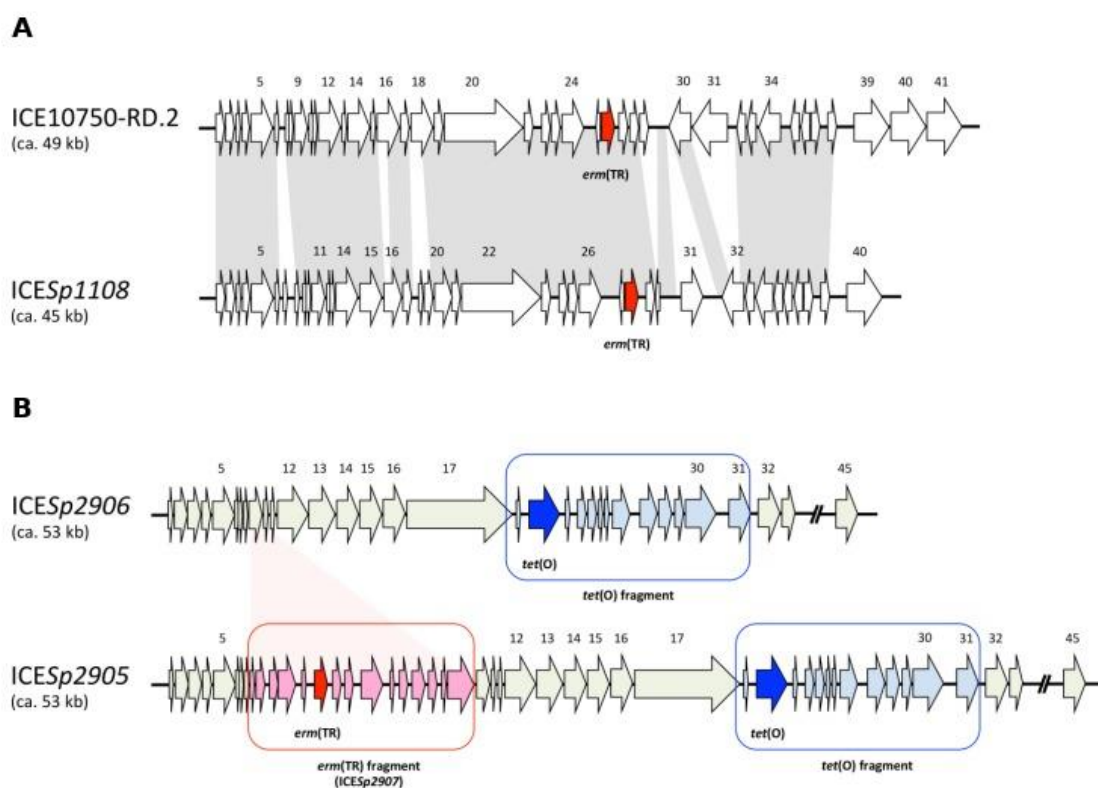


Рисунок 2 – (А) Генетические элементы, содержащие *ermTR* ген у стрептококков, чувствительных к тетрациклину; (В) Генетические элементы, содержащие *ermTR* ген у стрептококков, устойчивых к тетрациклину (Источник: Varaldo, P.E, 2009 [185])

Другой механизм устойчивости стрептококков к макролидам, так называемый М тип лекарственной устойчивости, основан на активном эффлюксе 14-членных макролидов (эритромицина, рокситромицина, кларитромицина) и 15-членного азитромицина, с сохранением при этом чувствительности к 16-членным макролидам (джозамицину), линкозамидам и стрептограминам за счет присутствия *mef* генов. Существует два основных варианта *mef* гена у стрептококков, гомологичных друг другу на 90%, и входящих в состав разных генетических элементов, имеющих различные сайты интеграции в геном. Различается и

последовательность гена, расположенного сразу после *mefA* и *mefE*, которая гомологична стафилококковому гену *msrA* и названная *msrD*. Этот ген кодирует АТР связывающий белок, который обеспечивает устойчивость к действию макролидов независимо от продукта *mef* гена. У *S. pyogenes* ген *mefA* является частью больших составных элементов, имеющих химерную природу, образовавшихся в результате интеграции транспозонов в профаги (Глава 1.3.3. Бактериофаги).

Ген *mefE* ассоциирован с генетическим элементом MEGA (macrolide efflux genetic assembly) у *S. pneumoniae* и стрептококков групп С и G, чувствительных к тетрациклину, но MEGA также может входить в состав большого транспозона Tn3872 у штаммов *S. pyogenes*, устойчивых к действию тетрациклина [47, 189] (Рисунок 3).

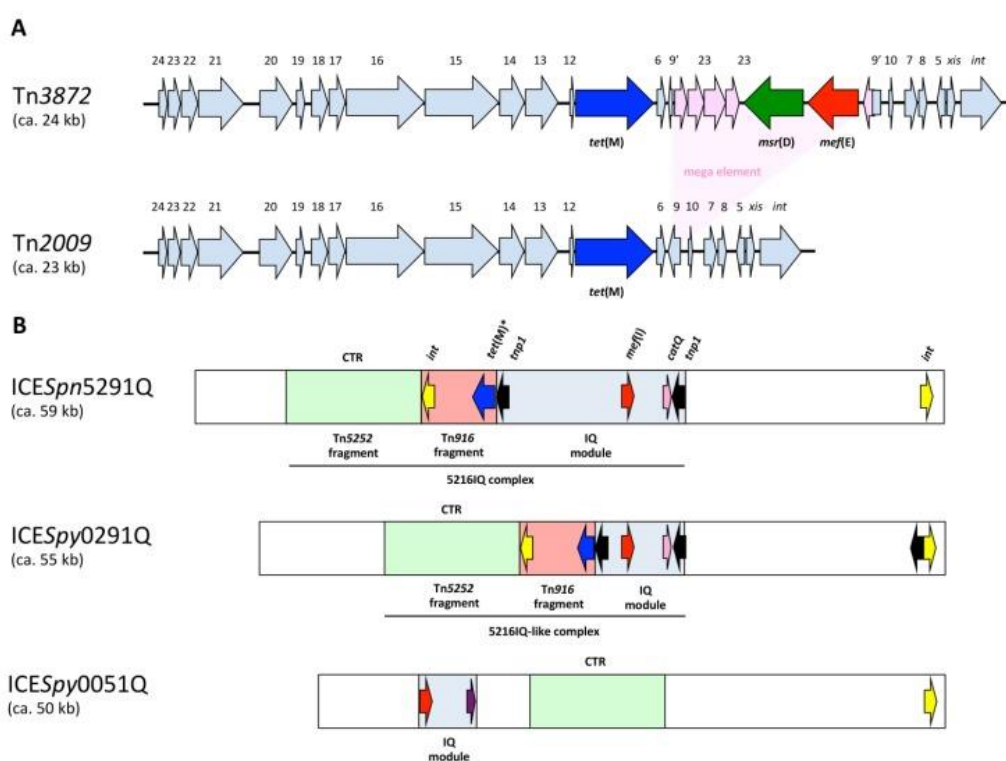


Рисунок 3 – Генетические элементы, содержащие гены *mefE*, *mefI* у стрептококков (Источник: Varaldo, P.E, 2009 [185])

Новые аллели гена *mef*, названные *mefI* и *mefO*, были обнаружены у *S. pyogenes* и *S. pneumoniae* [131, 160]. Степень гомологии *mefI* с *mefA* и *mefE* составляет 91% и 94%, соответственно [139]. У *S. pneumoniae* *mefI* входит в состав интегративно-конъюгативного генетического элемента, содержащего также гены устойчивости к тетрациклину *tetM* и хлорамфениколу *catQ*. Этот элемент, названный 5216IQ (30 т.п.н.), является составным, одна его часть представлена транспозонами Tn5252 и Tn916, а другая представляет собой IQ модуль, включающий гены *mefI* и *catQ*. У *S. pyogenes* *mefI* и *catQ* расположены на 5216IQ-like элементах, отличающихся дефектным IQ модулем и частичным или полным отсутствием Tn916 (ICESpy029IQ (55 т.п.н.), ICESpy005IQ (50 т.п.н.)) [60, 131]. Ген *mefO*, впервые обнаруженный у *S. pyogenes*, на 88% и 89% гомологичен генам *mefA* и *mefE* соответственно [160]. В 2006 году в Великобритании у двух штаммов SDSE был обнаружен еще один вариант гена *mef*, названный *mefG* [13].

Появление в популяции штаммов стрептококков, резистентных к эритромицину, является серьезной проблемой, поскольку данный препарат является препаратом выбора для лечения инфекций, вызванных стрептококками групп А, С и G у людей с аллергией на β -лактамы антибиотики [5, 46, 62, 127]. Еще более актуальной является проблема увеличения устойчивости к клиндамицину (линкозамиду), поскольку в сочетании с пенициллинами этот антибиотик рекомендуется использовать при тяжелых инвазивных инфекциях, представляющих угрозу для жизни, таких как некротический фасциит и синдром токсического шока [19, 127].

1.3.3 Бактериофаги

Бактериофагами называют вирусы бактерий, которые могут обладать литической активностью по отношению к бактериальной клетке, провоцируя ее лизис (вирулентные бактериофаги) или встраиваться в бактериальную хромосому с образованием профага (умеренные, лизогенные бактериофаги).

Гены, ассоциированные с бактериофагами, составляют ~ 50% всех приобретенных генов, благодаря чему бактериофаги являются основными факторами генетической изменчивости у штаммов *S. pyogenes* [118, 126]. Геномы стрептококковых бактериофагов имеют размер около 40 т.п.н. и имеют схожую функциональную организацию. Так, можно выделить модули, представленные генами, продукты которых участвуют в лизисе бактериальной клетки, в лизогении, репликации фаговой ДНК и формировании капсида [30, 87, 126].

На противоположном конце относительно гена интегразы *int* фаговые геномы часто содержат гены вирулентности, кодирующие экзотоксины различных типов (гены *spe*, *smeZ*, *ssa*), дезоксирибонуклеазу (ген *spd1*), ДНКазы (гены *sdn*), фосфолипазу А2 (ген *sla*) и др. Так, 8 из 13 охарактеризованных экзотоксинов *S. pyogenes* переносятся профагами (*speA*, *speC*, *speH*, *speI*, *speK*, *speL*, *speM*, *ssa*). Все стрептококковые экзотоксины, называемые стрептококковыми пирогенными экзотоксинами (*spe*), стрептококковый митогенный экзотоксин Z (*smeZ*) и стрептококковый суперантиген (*ssa*), обладают суперантигенным действием, которое проявляется в активации неспецифической пролиферации Т-лимфоцитов, сопровождающейся выбросом многих цитокинов [36, 166]. Профаги также могут кодировать до шести дезоксирибонуклеаз или ДНКаз, которые способствуют уклонению от иммунитета и деградации бактериальной ДНК [153, 166].

Учитывая расположение перечисленных генов вирулентности на дистальном конце интегрированного фагового генома, отличия их по Г+Ц составу и отсутствия влияния на реализацию жизненного цикла самого бактериофага, существует предположение, что они могли войти в состав бактериофага в результате ошибочной эксцизии фага из генома предыдущего бактериального хозяина [126].

Помимо носительства генов вирулентности (экзотоксинов и дезоксирибонуклеаз), профаги могут оказывать регуляторные изменения, а также сами по себе обеспечивают горячие точки для хромосомной рекомбинации [18, 40].

В ряде случаев у стрептококков были найдены химерные генетические элементы, представляющие собой профаги с интегрированными последовательностями ICE или транспозонов [21, 118, 189]. У чувствительных к

тетрациклину штаммов *S. pyogenes* транспозон *S. pneumoniae* Tn1207.1, содержащий гены устойчивости к макролидам *mefA/msrD*, формирует левый конец химерных генетических элементов Ф1207.3 (52 т.п.н.) и Ф10394.4 (59 т.п.н.), интегрированных в хромосомный ген (*comE*C). По-видимому, Ф1207.3 встречается чаще, чем Ф10394.4 в *mefA*-позитивных штаммах стрептококков и способен к внутри- и межвидовому переносу [189]. У штаммов, устойчивых к тетрациклину, гены *mefA/msrD* и *tetO* обнаружены сцепленными на химерном МГЭ Фm46.1 (55,2 т.п.н.), интегрированном в хромосомный в ген, кодирующий 23S рРНК урацил-метилтрансферазу. Его первые 7,2 т.п.н. гомологичны транспозону Tn1207.1 *S. pneumoniae*, содержащему гены *mefA/msrD*, следующие 41,4 т.п.н. представляет собой фаговый геном, а оставшаяся часть Фm46.1 гомологична ICE 2096-RD.2 штамма MGAS2096, в состав которого входит ген устойчивости к тетрациклину *tetO* (Рисунок 4) [40].

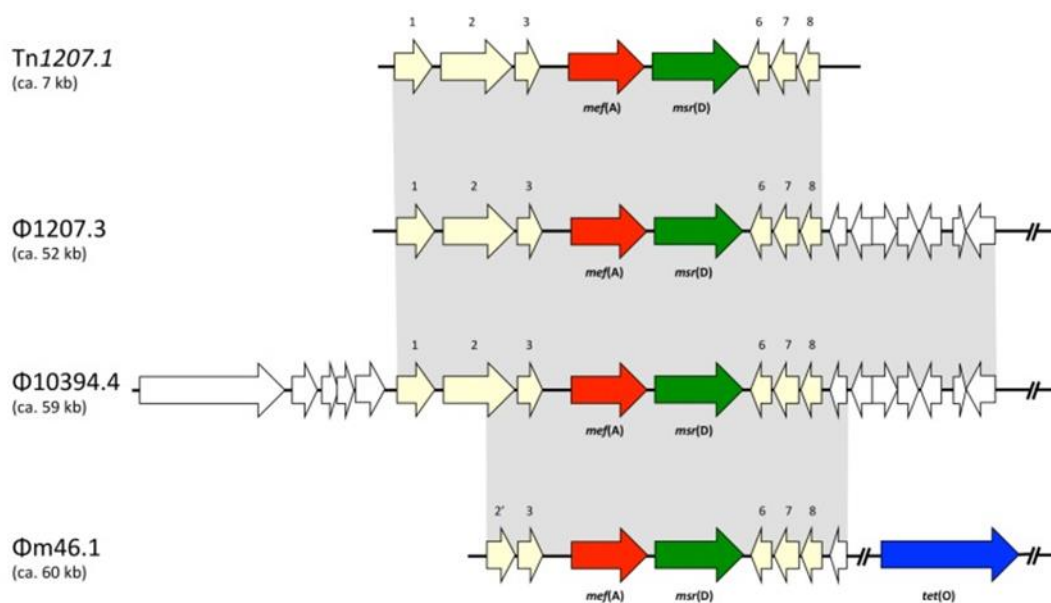


Рисунок 4 – Генетические элементы, содержащие *mefA* ген у стрептококков (Источник: Varaldo, P.E, 2009 [185])

Горизонтальный перенос генов, в том числе генов токсинов, может приводить к формированию эпидемически значимых клонов. Так, было показано,

что вспышку скарлатины в Китае в 2011 г. вызвали штаммы генотипа *emm12*, относящиеся к трем генетическим линиям, которые независимо друг от друга последовательно приобрели два бактериофага: ФНКУ.ssa, содержащий ген *ssa* (в 1980-х годах), и ФНКУ.vir, содержащий гены *speC*, *spd1*, *ssa* (в 1990-х годах). Передача этих элементов от штаммов генотипа *emm12* или другого хозяина штаммам генотипа *emm1*, циркулирующим в данном регионе, привела к изменению частоты их распространения с 3,8% в 2011 году до 48% в 2014 году. Патогенез скарлатины связывают с действием токсинов, а наличие гена *ssa* статистически значимо ассоциировано с этим заболеванием. Поэтому приобретение штаммами подобных элементов, в совокупности с наличием ICE-*emm12* элемента, обеспечивающего устойчивость к нескольким антибиотикам, обеспечило штаммам-реципиентам эволюционное преимущество, оказало влияние на их распространенность и вероятно послужило одной из причин эпидемической вспышки [206, 207].

Расположение генов антибиотикорезистентности на трансмиссивных (мобильных) генетических элементах и их способность к межвидовому переносу увеличивает пул дополнительных генов для патогенных бактерий [171]. Кроме того, в лабораторных условиях удалось воссоздать случаи рекомбинации двух МГЭ от разных видов стрептококков с последующей передачей третьему виду стрептококков (*S. suis*, *S. agalactiae* и *S. pyogenes*) [122]. Таким образом, ключевая роль МГЭ в формировании эпидемических клонов и распространении антибиотикорезистентности среди штаммов стрептококков групп А, С и G становится очевидной. В свою очередь, рост устойчивости стрептококков групп А, С и G к антибиотикам, особенно к макролидам, является глобальной проблемой общественного здравоохранения [141, 199].

1.3.4 Плазмиды

В общедоступных репозиториях нуклеотидных последовательностей, таких как RefSeq (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/plasmids/175/) сообщается о наличии у *S. pyogenes* тринадцати плазмид. Их размер варьирует от 1029 п.н. до 29 т.п.н. при среднем размере 6284 п.н. Количество генов, аннотированных на плазмидах, колеблется от 1 до 35. Семь плазмид, о которых сообщалось всего в нескольких исследованиях, ассоциированы с генами устойчивости к антимикробным препаратам (*ermB*, *ermT* или *ermC*) [63]. В связи с этим распространение устойчивости к антимикробным препаратам через плазмиды, по-видимому, нехарактерно для *S. pyogenes* по сравнению со многими грамотрицательными патогенами.

1.4 Уровень устойчивости стрептококков групп А, С и G к макролидам

В настоящее время пенициллин (феноксиметилпенициллин), аминопенициллины, а также I поколение цефалоспоринов рекомендуются в качестве препаратов первого ряда для лечения стрептококковых заболеваний [5, 46, 47, 104].

Однако на практике в ряде случаев может наблюдаться неэффективность применения этих антибиотиков из-за мутации в пенициллин - связывающем белке (мутация T553K в RVP2x), приводящей к 8-кратному увеличению МИК ампициллина и амоксициллина и 3-кратному увеличению МПК цефотаксима [129, 172, 188, 193, 209]. Как показывает анализ геномных баз данных, эта мутация встречается редко [89], а задокументированная субклиническая толерантность к β -лактамам антибиотикам во многих странах может быть обусловлена рядом других причин, таких как:

- наличие в ротоглотке ко-патогенов, вырабатывающих β -лактамазы [42];

- формирование бактериальных биопленок, способствующих развитию устойчивости бактерий к действию ряда антибактериальных препаратов;
- способность стрептококков к внутриклеточному существованию;
- несоблюдение пациентами предписанной схемы терапии (преждевременное прекращение приема препарата, уменьшение суточной дозы и т.п.).

Пациентам с серьезными аллергическими реакциями на пенициллин рекомендуется назначать курс лечения макролидами и линкозамидами [19].

Появление в популяции штаммов стрептококков, резистентных к эритромицину, усложняет лечение заболеваний органов верхних дыхательных путей, особенно у людей с аллергией на пенициллин [5, 46, 62, 127]. Еще более актуальной является проблема увеличения устойчивости к клиндамицину (линкозамид), поскольку в сочетании с пенициллинами этот антибиотик рекомендуется использовать в борьбе с тяжелыми инвазивными инфекциями [19, 95].

Показатели уровня устойчивости к эритромицину и клиндамицину среди СГА сильно варьируют в зависимости от географического региона и периода времени. Впервые устойчивый к макролидам штамм *S. pyogenes* был обнаружен в США в 1968 году [159]. В конце 1990-ых гг. наряду с увеличением использования макролидов в клинической практике было выявлено постепенное, но значительное повышение устойчивости к ним штаммов СГА в ряде Европейских стран (Франции, Греции, Италии, Португалии и Испании) [35, 84, 164, 170].

Для осуществления мониторинга за распространением антибиотикоустойчивости среди стрептококков, помимо национальных исследований, проводившихся в этих странах, было организовано несколько международных программ, охватывающих разные географические регионы (The Alexander Project, ПРОТЕКТ) (<http://www.alexandernetwork.com>; <http://www.protekt.org>) [70, 151]. Согласно результатам этих исследований, уровень устойчивости СГА к эритромицину в странах Западной Европы сильно варьировал и зависел от интенсивности потребления макролидов в конкретной стране.

Например, в Финляндии резистентность к макролидам была достаточно распространена в 80-ых годах, когда эти антибиотики часто назначали пациентам с инфекциями дыхательных путей. Вслед за значительным уменьшением использования макролидов в 90-ые годы наблюдалось снижение резистентности к эритромицину с 17% в 1992 г. до 9% в 1996 г. В некоторых районах Испании, напротив, частота устойчивости возросла с 1% в 1990 г. до 35% в 1995 г. одновременно с увеличением применения макролидов в клинической практике. Высокий уровень устойчивости к эритромицину был обнаружен в Италии (24,5-40,0%), Португалии (23,8-35,8%), Испании (8,9-27%), Греции (15,4-20,4%) и Франции (12,9%) [35, 80, 85, 127, 191]. Низкий уровень устойчивости СГА к эритромицину был выявлен в Австрии, Бельгии, Нидерландах и Великобритании [69, 70].

Исторически максимальный уровень лекарственной устойчивости среди внебольничных возбудителей респираторных инфекций наблюдается в Индии и странах Тихоокеанского региона. В Японии устойчивость к макролидам была достаточно распространена в 70-ых годах, когда антибиотики этой группы часто назначали пациентам с инфекциями дыхательных путей [123]. Благодаря контролю за использованием в практике этого антибиотика рост резистентности стрептококков к эритромицину удалось сдержать (22% в 1981 г. и только 1% в 1990 г.) [69].

Однако помимо использования макролидов в клинической практике на уровень устойчивости стрептококков к этим антибиотикам может оказать влияние появление и распространение в популяции определенных клонов стрептококков. До 2011 г. уровень устойчивости СГА к эритромицину в Китае, Южной Корее и Гонконге составлял порядка 18%, в Тайване этот показатель был равен 8% [71, 96, 100, 186]. С началом вспышки скарлатины число устойчивых штаммов резко увеличилось до 98,3% в Китае [111] и 39,8% в Японии [95, 187]. Важную роль в отборе и расширении линий *emm12* и *emm1*, ассоциированных со вспышкой скарлатины в этом регионе, сыграло приобретение ими двух МГЭ [112, 113]: ICE-*emm12*, содержащего гены устойчивости к эритромицину и тетрациклину (64,9

т.п.н.), и бактериофага, кодирующего стрептококковые суперантигены (SSA и SpeC) и ДНКазу Spd1 (46,4 т.п.н.) [119, 186], что подчеркивает их влияние на структуру популяции [73, 167, 246].

Согласно различным широкомасштабным исследованиям, проводившимся в (SENTRY, MRL, CROSS, ABC, ПРОТЕКТ), уровень устойчивости к макролидам в Канаде и США до недавнего времени оставался низким (<3%), однако в настоящее время существует тенденция к увеличению этого показателя [69, 91, 92, 158]. В Сан-Франциско 32% штаммов СГА, выделенных при инвазивных инфекциях, были устойчивы к эритромицину по сравнению с 9% штаммов, выделенных из верхних дыхательных путей [199].

Устойчивость к эритромицину среди штаммов СГС и СГГ широко распространена во многих странах мира и достигает 19% в США, 24% - в Гонконге, 56,3% - в Италии, более 50% - в Тайване и Японии, но остается пока относительно невысокой в Индии (8%), Германии (5,7%) и Англии (12%) [41, 43, 101, 156, 180, 178].

Таким образом, существует неоднородность в уровне устойчивости штаммов СГА, СГС и СГГ к макролидам в различных регионах мира. Появление и исчезновение новых доминантных клонов постоянно меняет филогенетический ландшафт и отражается на колебаниях показателей устойчивости. Расположение генов антибиотикочувствительности на МГЭ (транспозонах, профагах, плазмидах), обеспечивающих внутривидовой и межвидовой генетический обмен, обуславливает быстрое распространение антибиотикоустойчивости в естественных популяциях бактерий и генетический полиморфизм стрептококковых штаммов. Это осложняет антибиотикотерапию заболеваний, способствует быстрой адаптации бактерий к новым условиям окружающей среды и повышает их вирулентность.

1.5 Заключение

Благодаря экспрессии генов, кодирующих разнообразные факторы патогенности, стрептококки серологических групп А, С и G (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* и некоторые другие виды стрептококков) способны вызывать широкий спектр генерализованных, системных и местных заболеваний человека, что приводит к значительным экономическим потерям. Достаточно часто ангины, тонзиллиты и фарингиты стрептококковой этиологии осложняются развитием гнойно-септических и иммунопатологических процессов, что может приводить к летальным исходам. При этом основную группу риска составляют дети до 14 лет.

Основным средством лечения стрептококковых заболеваний являются антибиотики. При выборе оптимального антибиотика для лечения клиницисты должны руководствоваться сведениями о региональном уровне устойчивости стрептококков к различным группам антибиотимикробных препаратов. Учитывая высокий риск распространения устойчивости к макролидам и линкозамидам за счет приобретения МГЭ и серьезное влияние клональных вспышек на показатели резистентности, необходимо осуществлять постоянное слежение за популяцией патогенных и условно-патогенных стрептококков.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Для работы была собрана коллекция из 132 штаммов стрептококков групп А, С и G, выделенных с поверхности миндалин и задней стенки глотки среди 1359 детей младшего школьного возраста в различных провинциях Вьетнама за период с 2012 г. по 2014 г.

Для сравнительного анализа штаммов СГА по наличию МГЭ, ассоциированных с антибиотикоустойчивостью и вирулентностью, в работе также использовали:

- клинические изоляты СГА генотипов *emm1* (47 штаммов) и *emm12* (38 штаммов) из коллекции ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», выделенные в Санкт-Петербурге и Пекине (Таблица 2)

- 34 штамма СГА различных генотипов, выделенных от пациентов с инвазивной стрептококковой инфекцией (ИСИ), гнойно-хирургического отделения 23 ГKB им. «Медсантруд» г. Москвы в 2008-2011 гг. (Таблица 3). Штаммы были любезно предоставлены академиком РАН, Н. И. Брико.

Таблица 2 – Штаммы СГА из коллекции ФГБНУ «ИЭМ», использованные в работе

Номер штамма	<i>emm</i> генотип	Диагноз	Год выделения
<i>штаммы, выделенные в Санкт-Петербурге</i>			
12С	<i>emm12</i>	гнойный синусит	2007
94С, 114С, 118С		скарлатина	
97С		острый тонзиллит	
128С		хронический тонзиллит	
120С, 135С, 137С, 139С, 143С, 144С, 152С, 153С, 155С, 164С, 170С		носительство	

171С		контакт по скарлатине	
67С, 88С, 96С, 99С, 154С	<i>emm1</i>	скарлатина	2008
98С		лакунарная ангина	
124С		носительство	
280С, 303С, 331С		носительство	
309С÷314С		контакт по скарлатине	
346С		скарлатина	
<i>штаммы, выделенные в Пекине</i>			
1П ÷ 30П	<i>emm1</i>	скарлатина	2007
31П ÷ 51П	<i>emm12</i>	скарлатина	

Таблица 3 – *emm* генотипы штаммов СГА, выделенных от больных с ИСИ мягких тканей в Москве

Номер штамма	<i>emm</i> подтип	Диагноз (количество больных)
1М	<i>emm117.0</i>	некротизирующая инфекция голени, гнойно-некротическая рана передней брюшной стенки; тяжелый сепсис (1)
2М	<i>emm115.0</i>	некротизирующая инфекция (фасциит) голени (1)
3М-6М	<i>emm88.2</i>	флегмона стопы с некрозом участков ткани (1) флегмона голени с некрозом участков ткани (1) гнойно-некротические раны голени (1) флегмона предплечья с некрозом участков ткани (1)
7М	<i>emm84.0</i>	буллезно-геморрагическая рожа, осложненная флегмоной и некрозом участков ткани голени (1)
8М		флегмона предплечья и кисти с некрозом участков ткани (1)
9М	<i>emm80.0</i>	флегмона предплечья с некрозом участков ткани (1)
10М	<i>emm77.0</i>	флегмона бедра с некрозом участков ткани; летальный исход (1)
11М	<i>emm74.0</i>	буллезно-геморрагическая рожа с некрозом участков ткани стопы; гнойно-некротические раны голени (1)

12M	<i>emm73.0</i>	некротизирующая инфекция мягких тканей нижней конечности (1)
13M,14M 15M 16M	<i>emm66.0</i> , <i>emm66.1</i>	флегмона предплечья с некрозом участков ткани (2) некротическая инфекция мягких тканей бедер, тяжелый сепсис (1) буллезно-геморрагическая рожа, осложненная флегмоной и некрозом участков ткани, СТШ, летальный исход (1)
17M 18M	<i>emm64.0</i>	некротизирующая инфекция (целлюлит, фасциит) верхней конечности, тяжелый сепсис (1) некротизирующая инфекция верхней конечности с переходом на шею; крестцово-ягодичной области с переходом на спину и бедро, СТШ, летальный исход (1)
19M	<i>emm60.1</i>	гнойно-некротические раны левого предплечья (1)
20M	<i>emm53.0</i>	некротизирующая инфекция (1)
21M	<i>emm49.8</i>	некротизирующая инфекция мягких тканей голени и стопы; ампутация конечности на уровне середины бедра (1)
22M	<i>emm44.0</i>	буллезно-геморрагическая рожа с некрозом участков ткани голени (1)
23M	<i>emm41.2</i>	некротизирующая инфекция голени (1)
24M, 25M 26M 27M	<i>emm28.0</i>	флегмона предплечья с некрозом участков ткани (2) флегмона стопы с некрозом участков ткани (1) флегмона шеи с некрозом участков ткани, исход – нетрудоспособна (1)
28M 29M	<i>emm1.0</i> <i>emm1.47</i>	параоссальная флегмона бедра (1) множественные гнойно-некротические раны голени, СТШ, летальный исход (1)
30M	<i>emm27G.6</i>	флегмона предплечья с некрозом участков ткани (1)
31M	<i>st2940</i>	некротизирующая инфекция (фасциит); тяжелый сепсис (1)
32M 33M	<i>st1731</i>	буллезно-геморрагическая рожа с некрозом участков ткани (1) флегмоны стоп с некрозом участков ткани (1)
34M	<i>st221</i>	флегмона стопы с некрозом участков ткани (1)

В качестве референтного штамма для тестирования устойчивости к антибактериальным препаратам был использован штамм *S. pneumoniae* ATCC 49619.

2.2 Микробиологические методы исследования

Культивирование микроорганизмов

Бактерии культивировали в жидкой (Todd-Hewitt Broth, HiMedia, Индия) и плотной питательной среде (Columbia Base Agar, HiMedia, Индия) с добавлением 3% донорской эритроцитарной массы и 5% инактивированной лошадиной сыворотки в течение суток при температуре 37°C. Стерилизацию готовых сред проводили автоклавированием при 1 атм. в течение 15 минут при 121°C. Выделенные в ходе проведения исследования культуры стрептококков сохранены в условиях низкотемпературной криоконсервации (-70°C) (New Brunswick Scientific, США).

Реакция коаггуляции

Серологическую группу стрептококков определяли в реакции коаггуляции с использованием наборов диагностикумов фирмы «Аквапаст» (Россия). Несколько колоний с плотной питательной среды вносили в 100 мкл экстрагирующего раствора №1, добавляли равное количество раствора №2 и инкубировали 30 минут при 37°C в термостате Термит (ДНК Технология, Россия). Затем смесь центрифугировали в центрифуге 5417R (EppendORF, Германия) и надосадочную жидкость использовали в качестве антигена при постановке реакции коаггуляции с наборами диагностикумов на специфические полисахариды групп А, С и G. Положительный и отрицательный контроли использовали для того, чтобы избежать ложных результатов реакции коаггуляции.

Оценка антибиотикочувствительности штаммов

Оценка антибиотикочувствительности штаммов осуществлялась согласно МУК 4.12.1890-04 и заключалась в определении диаметра зон задержки роста

штаммов с использованием стандартизованных дисков (НИЦФ, Санкт-Петербург) на плотной питательной среде на основе Muller-Hinton agar (HiMedia, Индия) с добавлением 3% донорской эритроцитарной массы и 5% инактивированной лошадиной сыворотки.

Чувствительность стрептококков определяли к ампициллину, цефотаксиму, цефтазидиму, эритромицину, тетрациклину, ципрофлоксацину, энрофлоксацину, норфлоксациму, амикацину и ванкомицину.

С помощью метода микроразведений в бульоне, описанного в национальном стандарте Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 20776-1 – 2010, была определена разница в уровне чувствительности к эритромицину штаммов с разным типом лекарственной устойчивости. У штаммов СГА с разным типом лекарственной устойчивости была измерена минимальная подавляющая концентрации (МПК) эритромицина, которая подавляет видимый рост бактерий после 18 часов инкубации *in vitro*. Диапазон измерения МПК эритромицина составил 0,015 - 128 мг/л. Для приготовления растворов бульона с антибактериальным агентом использовалась субстанция эритромицина (Sigma Chemical Co., США). Штаммы были определены в одну из категорий: чувствительный штамм (Ч) (МПК находится в диапазоне от 0,015 до 0,25 мг/л); штамм с промежуточной чувствительностью (П) (МПК находится в диапазоне от 0,5 до 1 мг/л); устойчивый штамм (резистентный) (Р) (МПК находится в диапазоне от 2 до 128 мг/л). В качестве референтного штамма был использован штамм *S. pneumoniae* ATCC 49619.

2.3 Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение хромосомной ДНК

Выделение хромосомной ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора «ДНК-экспресс» (Литех, Россия) согласно прилагаемой инструкции.

Полимеразная цепная реакция

Для проведения ПЦР готовили реакционную смесь, состоявшую из 10 мкл 5-кратного буферного раствора для *Taq*-полимеразы (Fermentas, Литва), смеси дезоксирибонуклеотидтрифосфатов по 0,4 мМ каждого (Fermentas, Литва), 2,5 мМ $MgCl_2$ (Fermentas, Литва), 1-2 ед. *Taq*-полимеразы (Fermentas, Литва), 0,1-0,5 мкг геномной ДНК и 5-10 пМ каждого из специфических праймеров (Бигль, Россия), представленных в Таблице 4, и доводили объем водой до 50 мкл. Температуру отжига праймеров варьировали, в зависимости от используемых праймеров (Таблица 4). Процесс амплификации осуществляли в приборе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) с наслаиванием в пробирки минерального масла (ICN, США) во избежание испарения компонентов реакции, или в приборе C1000 (Bio-Rad, США). Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 1% агарозном геле с использованием TAE буфера в аппарате (Wide Mini Sub Cell GT, Bio-Rad) в течение 40 минут при силе тока 50А. Размер фрагментов ДНК определяли при помощи маркер молекулярного веса GeneRuler™ 100+ п.н. (Thermo Scientific, США).

Таблица 4 – Праймеры, использованные в работе

Ген	Кодируемый белок	Название праймера	Последовательность (5' → 3')	Размер амплификата, п.н.	Ссылка
<i>срп60</i>	Белок теплового шока Срп60	ang1	TGCAGCCGTATCATCACGCAG	589	3
		ang2	GTTGGCAATAGCTTCGGCATCA		
		const1	TTGAAAGTGCTACATCTGAATTT GACAAA	315	
		const2	CTGCATTGATAGCGATTTGTCGA AT		
		dysg1	TGGCTTGATTAAGTCACAAC AGAAACCA	254	
		dysg2	GCTCAAGAGCAGCTACTTTTCG ATCA		

<i>rnpB</i>	РНК- субъединица эндорибонук- леазы Р	<i>rnpBf</i>	YGTGCAATTTTTGGATAAT	374	181
		<i>rnpBr</i>	TTCTATAAGCCATGTTTTGT		
16S rRNA		27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1482	102
16S rRNA		1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		
16S rRNA – seq		519R	GWATTACCGCGGCKGCTG		
<i>emm</i>	М белок	<i>emm1f</i>	TATT(C/G)GCTTAGAAAATTAA	1155	48
		<i>emm1r</i>	GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT		
<i>emm_s</i> <i>eq</i>	М белок	<i>emmse</i> <i>q2</i>	TATTCGCTTAGAAAATTA AAAAA ACAGG		48
ORF28	Гипотетичес- кий белок	<i>tn1r</i>	ATGTTTTTCGCCAGCTTCAG	434	7
		<i>tn1f</i>	TGAATGAGCTTTGATACGACG		
<i>iap</i>	Предшествен- ник эндопептидазы p60	<i>tn2r</i>	CGCCACCTGAATACTCTTTGA	536	
		<i>tn2f</i>	CCGCCACCATTAAGAAAGTC		
<i>int</i>	Интеграза	<i>tn3r</i>	TTTTCTTAAATGCTCGTAAAGCC	173	
		<i>tn3f</i>	AAAGAGAAGCAACAGGAGCG		
<i>xis</i>	Экстизионаза	<i>xisf</i>	AAGCAGACTGAGATTCCTA	193	
		<i>xisr</i>	GCGTCCAATGTATCTATAA		
<i>tetM</i>		<i>tetM2</i>	GAACTCGAACAAGAGGAAAGC	740	140

	Белок, препятствующий связыванию рибосомы с молекулой тетрациклина	tetM3	ATGGAAGCCCAGAAAGGAT	519	140	
<i>tetO</i>		tetOf	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC			
		tetOr	TCCCACTGTTCCATATCGTCA			
<i>tetS</i>			tetSf	GAAAGCTTACTATACAGTAGC	169	14
		tetSr	AGGAGTATCTACAATATTTAC			
<i>tetT</i>			tetTf	AAGGTTTATTATATATAAAAGT G	169	14
		tetTr	AGGTGTATCTATGATATTTAC			
<i>ermTR</i>	23S рРНК (аденин(2058)-N(6))-метилтрансфераза	TR1	ATAGAAATTGGGTCAGGAAAAG G	530	101	
		TR2	AATTGATTTTTAGTAAAAAGAA C			
<i>ermB</i>	23S рРНК (аденин(2058)-N(6))-метилтрансфераза	ERMB 1	GAAAAGGTA CTCAACCAAATA	639	177	
		ERMB 2	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTA C			
<i>msrD</i>	Белок семейства ABC, препятствующий связыванию рибосомы с молекулой эритромицина	MSR 201F	TGCCTATATCCCCAGTTG	689	177	
		MSR 908R	TTAATTTCCGCACCGACTA			
<i>mef(A/E)</i>	Белки кодирующие эффлюкс системы	meff	AGTATCATTAATCACTAGTGC	348	177	
		mefr	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG			
<i>tndX</i>	Резолваза	tndXf	ATGATGGGTTGGACAAAGA	547		

		tndXr	CTTTGCTCGATAGGCTCTA		это исследование	
ORF40	Поверхностный белок	hpf	CCAGTATGAAATCTATTCCAT	258		
		hpr	AGATATTACAGAAAATGCAGAA			
3'- и 5'- концевые фрагменты ICE- <i>emm12</i>		cirf	ACTTAACACCAAGCTAATTGGGA ATA	593		
		cirr	ACTTTAGAGGTAACACTTACCGA			
Участки хромосомной ДНК в направлении 5'- и 3'- от места интеграции ICE- <i>emm12</i>		inf	ATAACGACGGCTGATGGATTACT A	500		
		inr	ACCAAGTGTTATTCTGGTAGACC			
up <i>mef</i>	mega	MEGA-for	GCTAGTCAAGGAGTAAAACG	5509		40
down ORF5		MEGA-rev	CTAATAGACGAAAGGGTGTG			
<i>ermB</i>	Tn917	ERMB1	GAAAAGGTA CTCAACCAAATA	2329		176
<i>tnpA</i>		O22	GTCCCGAGTCCCATGGAAGC		146	
ORF20	Tn6002	J11	GAACTCGAACAAGAGGAAAGC	3649	146	
IR-ORF18/19		J12	GATGTACTTCATGGCGACG			
<i>speC</i>	Токсин <i>speC</i>	<i>speCf</i>	TGCAGGGTAAATTTTTCAACG	200	7	
		<i>speCr</i>	GCAGGGCGTAATTCCTCCATA			
<i>ssa</i>	Суперантиген	<i>ssaf</i>	TGATCAAATATTGCTCCAAGGT G	502		
		<i>ssar</i>	TCCACAGGTCAGCTTTTACAG			
<i>spd1</i>	Дезоксирибонуклеаза	<i>spd1f</i>	CCAAGGAGCTAAAGAGGTCCC	613		
		<i>spd1r</i>	GTCCCGAGTCCCATGGAAGC			
<i>int3</i>	Интеграза Ф370.1-like	<i>int3f</i>	CTTTTAAAGGGGCACCACAA	413		
		<i>int3r</i>	AACAACGGCTTGAAAACAC			

***emm*-генотипирование**

Для *emm*-генотипирования ПЦР проводили согласно инструкции, предложенной Центром по контролю заболеваний, США (http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emmtype.htm), с использованием праймеров для *emm* гена (Таблица 4) [48]. Полученные амплификаты подвергали электрофорезу в агарозном геле. ПЦР-продукты нужного размера (около 1100 п.н.)

вырезали из геля и выделяли с помощью набора AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Ахуген, США), как описано в следующем абзаце. Очищенные продукты использовали в качестве матрицы для секвенирующей ПЦР с использованием праймера emm-seq (Таблица 4).

Выделение фрагментов ДНК из агарозных гелей

После проведения электрофореза в агарозном геле, под ультрафиолетовым светом вырезали участки геля, содержащие интересующий фрагмент ДНК, взвешивали и помещали в пластиковые микроцентрифужные пробирки (1,5 мл). Кусочки геля в пробирке гомогенизировали пипеткой и центрифугировали 30 секунд при 12000 об/мин. Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью коммерческого набора "AxyPrep DNA Gel Extraction Kit" (Ахуген) согласно инструкции производителя. В пробирки добавлялся трехкратный объем буфера DE-A с последующим вортексированием. Полученную смесь выдерживали при температуре 75°C до полного растворения геля (6-8 минут), периодически перемешивая. После полного растворения геля к смеси добавляли 0,5 объема буфера DE-B и перемешивали. Полученную смесь помещали в колонку, которая, в свою очередь, была помещена в пробирку объемом 2 мл, и центрифугировали 30 секунд при 12000 об/мин. Фильтрат удаляли, а в колонку добавляли буфер W1 в количестве 500 мкл и снова центрифугировали 30 секунд при 12000 об/мин. Фильтрат снова удаляли, а в колонку добавляли 700 мкл буфера W2 и центрифугировали. Для удаления примесей проводили отмывку проб буфером W2 2 раза. Фильтрат снова удаляли и колонку центрифугировали 1 минуту при 12000 об/мин для полного удаления остатков буфера. После этого колонку помещали в пробирку объемом 1,5 мл. Для элюирования ДНК из колонок на центр мембраны добавляли предварительно прогретую до 65°C деионизированную воду в количестве 25-30 мкл, и через 1 минуту центрифугировали при 12000 об/мин в течении 1 минуты. Полученные препараты использовали в качестве матрицы для секвенирующей ПЦР.

Электрофорез в пульсирующем электрическом поле (PFGE)

Анализ штаммов методом электрофореза в пульсирующем электрическом поле (PFGE) после обработки рестриктазой *SmaI* проводили согласно модифицированному протоколу [65].

Секвенирование коротких фрагментов ДНК по методу Сэнгера

Секвенирование по методу Сэнгера проводили на секвенаторе Beckman CEQ 2000 (Beckman Coulter) с использованием набора реактивов GenomeLab DTCS - Quick Start Kit (Beckman Coulter, США). Состав реакционной смеси содержал 18 нг ДНК, 3,2 пМ праймера, 8 мкл DTCS Quick Start Master Mix (Beckman Coulter) и бидистиллированную воду (до объёма 20 мкл). Секвенирующую ПЦР проводили в амплификаторе C1000 (Bio-Rad). Начальную денатурацию ДНК осуществляли в течение 3 мин при 96°C, затем следовало 25 циклов, состоящих из трех стадий: денатурации - 96°C - 20 сек, отжига праймеров - 50°C - 20 сек, элонгации - 60°C - 4 мин и окончательной достройки комплементарной цепи - 60°C - 10 мин (1 цикл). Для остановки реакции ПЦР к смеси добавляли stop solution (2 мкл 3 М ацетата натрия (pH=5,2), 2 мкл 100 мМ ЭДТА (pH=8,0) и 1 мкл 20 мг/мл гликогена). ПЦР-продукт отмывали 96% этанолом, охлажденным до -20°C, и центрифугировали при 14000 об/мин при 4°C в течение 15 минут. Осадок дважды промывали 200 мкл 70% этанола, охлажденного до -20°C и затем высушивали в леофильной сушке. Полученный образец ресуспендировали в 40 мкл Sample Loading Solution (Beckman Coulter, США) при комнатной температуре и помещали в секвенатор.

Полногеномное секвенирование

Библиотеку фрагментов ДНК готовили с использованием набора реагентов Illumina Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina) согласно инструкции производителя. Качество полученной библиотеки оценивали с помощью анализатора Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) и ПЦР в режиме реального времени согласно инструкции Sequencing Library qPCR Quantification Guide (Illumina). Ампликоны метили с использованием Nextera XT Index Kit

(Illumina) согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили на секвенаторе MiSeq с набором реагентов MiSeq Reagent Kit, v3, 2x300 (Illumina).

2.4 Методы биоинформатики

Подбор специфичных праймеров для ПЦР был проведен с использованием программы Primer Blast (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) на основе последовательностей ДНК в базах данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Нуклеотидные последовательности, полученные в результате секвенирования по методу Сенгера сравнивали с последовательностями, имеющимися в базах данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) с помощью алгоритма NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Сборку генома после высокопроизводительного секвенирования проводили при помощи программы SPAdes, версия 3.6.2, с параметрами по умолчанию (<https://cab.spbu.ru/software/spades/>). Предварительно, первые 17 нуклеотидов в рядах с праймерами были удалены с помощью программы fastx_trimmer (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) или FastQC (bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/).

Оценку сборки генома различными сборщиками оценивали с помощью программы Quast (cab.spbu.ru/software/quast/) (Рисунок 5).

All statistics are based on contigs of size ≥ 500 bp, unless otherwise noted (e.g., "# contigs (≥ 0 bp)").

Show heatmap

Statistics without reference	spades_V31	spades_HP123	spades_NT15	spades_B82
# contigs	42	70	56	73
# contigs (≥ 0 bp)	58	88	65	92
# contigs (≥ 1000 bp)	38	60	47	61
# contigs (≥ 5000 bp)	26	47	38	43
# contigs (≥ 10000 bp)	21	39	33	39
# contigs (≥ 25000 bp)	18	29	24	30
# contigs (≥ 50000 bp)	14	17	17	13
Largest contig	342 889	126 824	158 120	304 729
Total length	1 852 853	2 106 569	2 113 357	2 181 418
Total length (≥ 0 bp)	1 857 113	2 111 036	2 115 622	2 186 695
Total length (≥ 1000 bp)	1 849 301	2 098 940	2 107 114	2 173 674
Total length (≥ 5000 bp)	1 815 629	2 071 249	2 092 173	2 136 740
Total length (≥ 10000 bp)	1 781 999	2 008 397	2 054 971	2 110 851
Total length (≥ 25000 bp)	1 737 497	1 821 792	1 884 663	1 966 513
Total length (≥ 50000 bp)	1 599 734	1 376 220	1 616 045	1 362 670
N50	101 422	68 761	79 030	66 075
N75	67 881	37 497	54 453	36 314
L50	5	12	9	9
L75	11	22	17	20
GC (%)	38.28	39.49	39.52	39.06
Mismatches				
# N's	0	0	0	10
# N's per 100 kbp	0	0	0	0.46

Рисунок 5 – Основные характеристики финальной сборки контигов штаммов, исследуемых в работе, с помощью программы Quast

Расположение контигов относительно референса проводили с помощью программы Mauve (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>). Аннотация геномов была сделана с использованием алгоритма RAST (<http://rast.nmpdr.org>).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью базы данных National Centre of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), используя алгоритм локального выравнивания BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для локального выравнивания и демонстрации гомологии между последовательностями ДНК в виде колец использовали программу с открытым кодом BRIG (<http://brig.sourceforge.net/>).

Для интерактивной визуализации сравнения нескольких полногеномных последовательностей использовали Artemis Comparison Tool (ACT) (<http://sanger-pathogens.github.io/Artemis/ACT/>).

Последовательности геномов, полученные с помощью секвенирования нового поколения, были проанализированы на наличие генов антибиотикоустойчивости при помощи программы ResFinder 2.0 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) и на наличие в геноме участков ДНК умеренных бактериофагов с помощью программы PHAST(PHAgeSearchTool) (<http://phast.wishartlab.com/>).

Для графического изображения сравнительного анализа аннотированных геномных локусов использовали программу Easyfig (<https://www.scholarmate.com/S/An04Qv>).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3 СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ И ИХ ПЕРВИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Во время 6 научных экспедиций в провинции Куанг Чи, Хай Фонг, Тхай Нгуен, Хоа Бинь, Нячанг, Тай Нинь (Вьетнам) в 2012-2014 гг. осуществлялся осмотр верхних дыхательных путей и забор проб у 1359 детей в возрасте 7-10 лет. Все дети, включенные в исследование, посещали занятия в школе и расценивались как «условно» здоровые. Тем не менее, в ходе осмотра ротовой полости и верхних дыхательных путей было обнаружено, что более 30% детей имели признаки поражений в виде гиперемии, отёчности, рубцовых изменений слизистых оболочек и увеличения миндалин (Рисунок 6).



Рисунок 6 – Поражения органов верхних дыхательных путей у детей, проживающих во Вьетнаме

В результате микробиологического анализа и серологической реакции (реакции коаггутинации) было выделено 49 штаммов стрептококков серогруппы А, 8 штаммов стрептококков серогруппы С и 75 штаммов стрептококков серогруппы G (Рисунок 7).

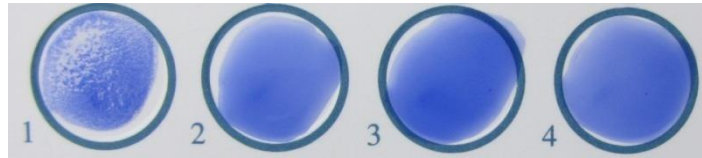


Рисунок 7 – Учет результатов реакции коаггутинации отдельно взятого изолята на наличие специфических полисахаридов групп А, С и G

Примечание: реакции №1, №2, №3 соответственно, №4 отрицательный контроль).
О принадлежности штамма к серогруппе А свидетельствует образование хлопьев в реакции №1

С использованием разработанного ранее метода дифференциальной ПЦР-диагностики с видоспецифичными праймерами на ген *srn60*, кодирующий белок теплового шока, была проанализирована принадлежность выделенных штаммов стрептококков серогрупп С и G к трем видам [3]. В результате исследования было выявлено 50 штаммов вида *Streptococcus anginosus* (49 штаммов серогруппы G и 1 штамм серогруппы С), 9 штаммов вида *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (8 штаммов группы G и 1 штамм группы С) и ни одного штамма вида *S. constellatus* (Рисунок 8).

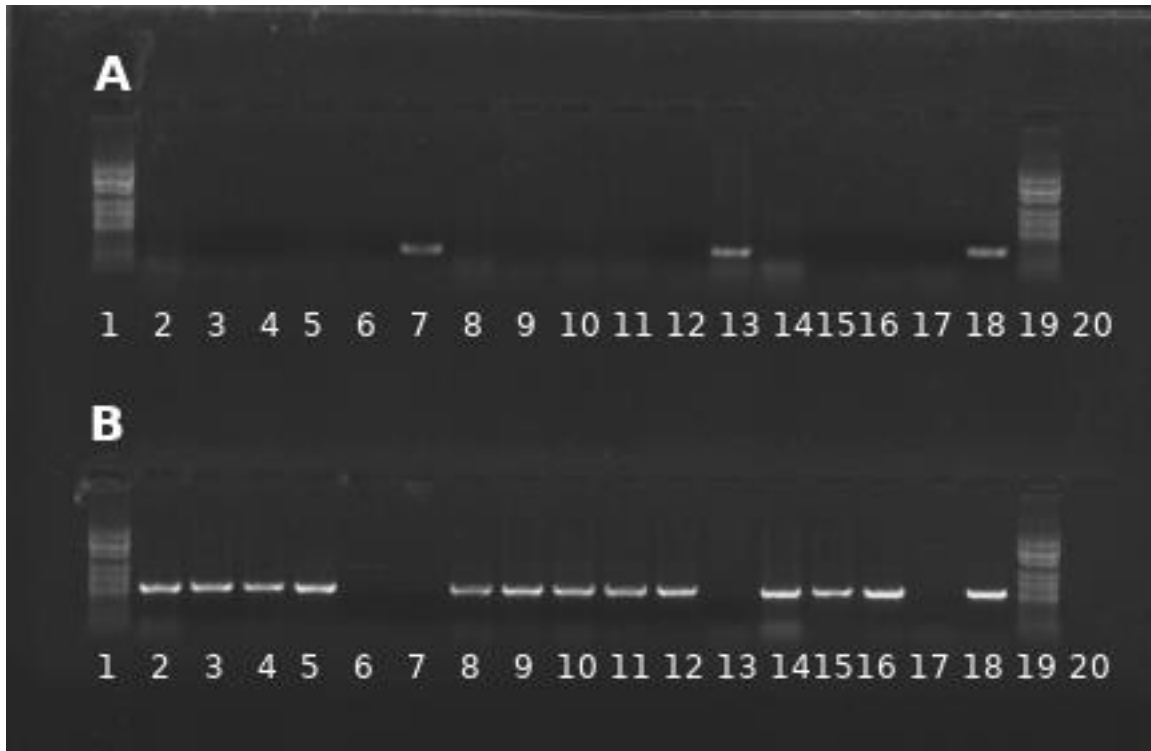


Рисунок 8 – Идентификация штаммов *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* и *S. anginosus* методом ПЦР

Примечание: Треки 1, 19: маркер молекулярного веса (100 bp DNA ladder); Трек 2-18: штаммы V13, V24, V25, V35, HP13, V63, V71, V77, V80, V86, V98, V123, V128, V140, V148, HP3 соответственно; Трек 20: отрицательный контроль

(А) Трек 18: штамм G4 положительный контроль *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (размер амплификата 254 п.н.)

(В) Трек 18: штамм G17 положительный контроль *S. anginosus* (размер амплификата 589 п.н.)

У штаммов, вид которых на основании видоспецифичности гена *srn60* установить не удалось, был амплифицирован и секвенирован ген *rnpB*, кодирующий РНК-субъединицу эндорибонуклеазы Р [181]. В результате сравнительного анализа последовательностей гена *rnpB* 24 штаммов с базой данных BLAST были получены следующие результаты:

- среди 6 штаммов стрептококков группы С 3 штамма имели последовательности *rnpB*, гомологичные таковым *S. anginosus* (степень гомологии 99%), 1 штамм имел последовательность *rnpB*, гомологичную таковой *S.*

parasanguinis (степень гомологии 99%), 1 штамм имел последовательность *rnpB*, гомологичную таковой *S. gordonii* (степень гомологии 99%), 1 штамм имел последовательность *rnpB*, гомологичную на 95% таковой *S. constellatus* и на 94% гомологичную последовательности *rnpB S. anginosus*;

- среди 18 штаммов стрептококков группы G 4 штамма имели последовательности *rnpB*, гомологичные на 99% таковым *S. constellatus*, 3 штамма имели последовательности *rnpB*, гомологичные таковым *S. sanguinis* (степень гомологии 99%), 3 штамма имели последовательности *rnpB*, гомологичные таковым *S. parasanguinis* (степень гомологии 99%), 5 штаммов имели последовательность *rnpB*, гомологичную на 99% таковой *S. anginosus*, 2 штамма имели последовательность *rnpB*, гомологичную на 99% таковой *S. mitis*, 1 штамм имел последовательность *rnpB*, гомологичную на 99% таковой *S. australis*.

Все штаммы, выделенные в период 2012-2014 гг. во Вьетнаме были подготовлены для длительного хранения в криобанке лаборатории Института Тропической медицины Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой) и ФГБНУ «ИЭМ» (г. Санкт-Петербург) и легли в основу коллекции штаммов стрептококков, выделенных в странах с тропическим климатом (Таблица 5)

Таблица 5 – Штаммы, выделенные во Вьетнаме, и их первичная характеристика

Провинция	Кол-во обследованных	Серо-группа	Вид (кол-во штаммов)	Номер штамма
Куанг Чи	200	A	<i>S. pyogenes</i> (34)	V01, V21, V22, V23, V27, V31, V32, V34, V36, V43, V55, V57, V59, V60, V61, V67, V76, V82, V85, V87, V88, V96, V100, V103, V125, V129, V154, V171, V174,

				V184, V193, V194, V195, V201
		G	<i>S. anginosus</i> (12)	V 13, V24, V25, V35, V71, V77, V80, V86, V98, V128, V140, V148
			<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (2)	V63, V123
			<i>S. parasanguinis</i> (1)	V38
			<i>S. sanguinis</i> (1)	V197
Хай Фонг	257	A	<i>S. pyogenes</i> (6)	HF001, HF040, HF124, HF136, HF166, HF149
		G	<i>S. anginosus</i> (17)	HF3, HF13, HF15, HF22, HF60, HF67, HF88, HF113, HF128, HF135, HF141, HF147, HF165, HF169, HF228, HF238, HF251
			<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (2)	HF112, HF196
		C	<i>S. anginosus</i> (1)	HF252
Тхай Нгуен	203	A	<i>S. pyogenes</i> (2)	T131, T157
		G	<i>S. anginosus</i> (4)	T59, T94, T178, T87
			<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (2)	T201, T122
			<i>S. sanguinis</i> (1)	T86
			<i>S. constellatus</i> (2)	T170, T167
C	<i>S. anginosus</i> (1)	T 133		

			<i>S. parasanguinis</i> (1)	T20
			<i>S. constellatus</i> (1)	T26
Хоа Бинь	199	A	<i>S. pyogenes</i> (2)	B37, B56
		G	<i>S. anginosus</i> (7)	B24, B35, B142, B195, B71, B68, B121
			<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (1)	B159
			<i>S. constellatus</i> (2)	B85, B125
			<i>S. australis</i> (1)	B147
		C	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (1)	B82
Нячанг	250	A	<i>S. pyogenes</i> (2)	NT283, NT46
		G	<i>S. anginosus</i> (8)	NT 25, NT88, NT90, NT127, NT142, NT147, NT275, NT189
			<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (1)	NT15
			<i>S. parasanguinis</i> (1)	NT16
		C	<i>S. anginosus</i> (1)	NT118
			<i>S. gordonii</i> (1)	NT256
Тай Нинь	250	A	<i>S. pyogenes</i> (3)	TN 296, TN281, TN263
		G	<i>S. anginosus</i> (6)	TN163, TN244, TN125, TN159, TN164, TN53
			<i>S. parasanguinis</i> (1)	TN307
			<i>S. sanguinis</i> (1)	TN 109
			<i>S. mitis</i> (2)	TN 217, TN74
		C	<i>S. anginosus</i> (1)	TN247

ГЛАВА 4 УСТАНОВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

4.1 *emm* – генотипирование штаммов *S. pyogenes* и *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

С целью выявления доминирующих на территории Вьетнама генотипов штаммов *S. pyogenes* и *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* был использован метод *emm* – генотипирования, который основан на различиях в нуклеотидной последовательности 5'-конца *emm* гена. В результате среди 49 штаммов *S. pyogenes* было выявлено 15 *emm*-подтипов, относящихся к 11 *emm*-типам, а среди 9 штаммов SDSE было выявлено 6 *emm*-типов (Таблица 6).

Таблица 6 – Результаты *emm* типирования штаммов *S. pyogenes* и *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, выделенных во Вьетнаме

<i>S. pyogenes</i> (49 штаммов)		
<i>emm</i> генотип	Кол-во штаммов	Номера штаммов
<i>emm</i> 12.0	11	V31, V154, V171, V174, V193, V194, HF01, HF40, HF124, B56, T131
<i>emm</i> 12.22	3	HF136, HF149, HF166
<i>emm</i> 104.0	9	V21, V60, V100, V201, V82, TN281, TN263, NT283, NT46
<i>emm</i> 109.1	6	V22, V23, V57, V67, V87, V103
<i>emm</i> 109.0	1	V59
<i>emm</i> 44.0	6	V55, V61, V184, V85, V96, V125
<i>emm</i> 4.0	4	V01, V32, V43, V129
<i>emm</i> 170.0	2	V27, V34
<i>emm</i> 170.2	1	V195
<i>emm</i> 170.1	1	TN296
<i>emm</i> 75.1	1	V88
<i>emm</i> 8.0	1	V76
<i>emm</i> 58.0	1	V36

<i>emm22.0</i>	1	T157
<i>emm89.24</i>	1	B37
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (9 штаммов)		
<i>stC5345</i>	3	B159, HF196, T201
<i>stG480</i>	2	HF112, NT15
<i>stG6</i>	1	V123
<i>emm44.0</i>	1	V63
<i>stG4831</i>	1	T122
<i>stC36.0</i>	1	B82

4.2 Анализ рестрикционного полиморфизма геномной ДНК штаммов стрептококков методом пульс-электрофореза

Для установления степени генетического родства штаммов стрептококков, выделенных во Вьетнаме, их хромосомные ДНК были проанализированы методом электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) после обработки редкощепящей рестриктазой *SmaI*.

Среди 49 штаммов СГА было обнаружено 10 паттернов PFGE (Рисунок 9, Таблица 7). При этом 31 из 49 штаммов (63%) относились к трем доминирующим паттернам. Так, чаще всего встречался паттерн №8, который имели 14 штаммов и паттерны №1 и №2, которыми характеризовались 9 и 8 штаммов соответственно.

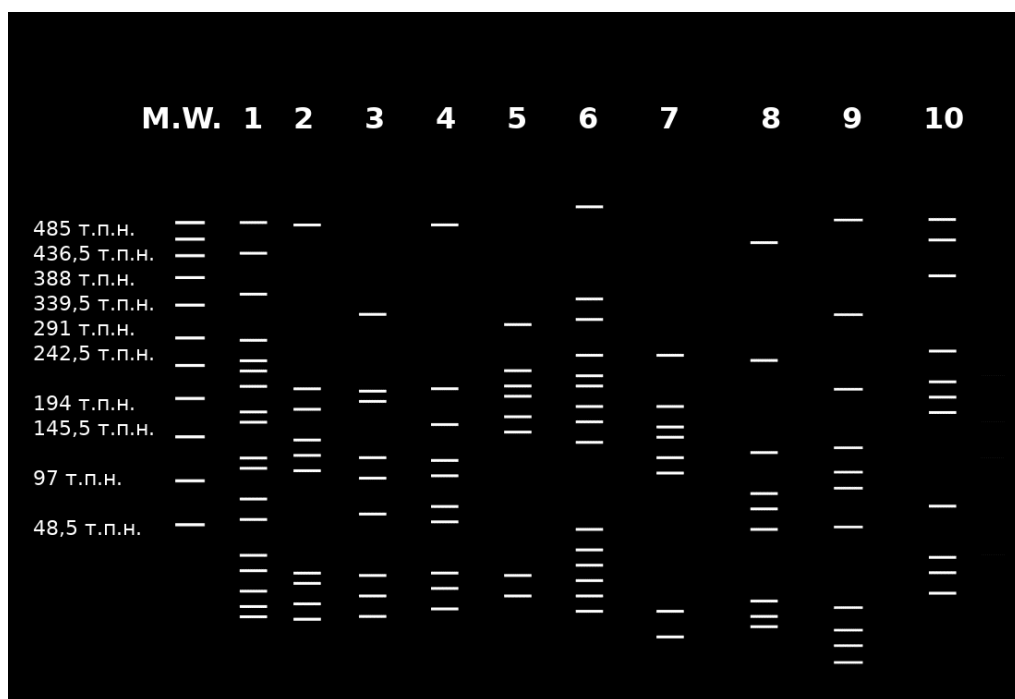


Рисунок 9 – *SmaI* рестрикционные паттерны PFGE хромосомной ДНК штаммов *S. ruogenes* различных *emt*-типов, выделенных во Вьетнаме

Примечание: М. W. – маркер молекулярного веса, конкатомеры бактериофага λ ; Треки 1 – 10: паттерны П1-П10 согласно таблице 7. Фотографии агарозных гелей были обработаны в графическом редакторе Photoshop CS6 (Adobe Systems) для удобства сравнения.

Таблица 7 – *SmaI* паттерны штаммов *S. ruogenes* различных *emt*-подтипов, выделенных во Вьетнаме

Паттерн PFGE	№ штамма	<i>emt</i> - подтип
П1	V88	75.1
	V22, V23, V57, V67, V87, V103	109.1
	V59	109.0
	T157	22.0
П2	V01, V32, V43, V129	4.0
	V27, V34	170.0

	V195	170.2
	TN296	170.1
П3	V82, TN281, TN263, NT283, NT46	104.0
	V76	8.0
П4	V55, V61, V184, V85	44.0
П5	V96	44.0
П6	V125	44.0
П7	V21, V60, V100, V201	104.0
П8	V31, V154, V171, V174, V193, V194, HF01, B56, HF124, HF40, T131	12.0
	HF136, HF149, HF166	12.22
П9	B37	89.24
П10	V36	58.0

Сравнительный анализ паттернов PFGE выявил определенную корреляцию паттернов PFGE с конкретными *emt*-подтипами, однако некоторые паттерны были идентичны и у штаммов разных *emt*-подтипов. Так, паттерн №1 был характерен для 1 штамма подтипа *emt75.1*, 1 штамма подтипа *emt22.0*, 1 штамма подтипа *emt109.0* и для 6 штаммов подтипа *emt109.1*, а паттерн №2 – для 4 штаммов подтипа *emt4.0*, для 2 штаммов подтипа *emt170.0*, для 1 штамма подтипа *emt170.2* и для 1 штамма подтипа *emt170.1*. (Таблица 7). Паттерн №3 был обнаружен у пяти штаммов подтипа *emt104.0* и у одного штамма подтипа *emt8.0* (Таблица 7). Наибольшей гетерогенностью отличались штаммы, относящиеся к *emt44.0* генотипу, которые характеризовались тремя различными паттернами PFGE. Обнаружение обоих вариантов сочетания штаммов одинакового *emt* генотипа с разным PFGE паттерном и штаммов разных *emt* генотипов с одинаковым профилем PFGE может свидетельствовать о случаях замены серотипа, которые вероятно возникают вследствие селективного отбора, направленного на избегание иммунной системы хозяина.

Штаммы с одинаковым *emm* генотипом и паттерном PFGE были выделены в разных провинциях, что может свидетельствовать о существовании ряда доминирующих в региональном масштабе линий. Так, паттерн №8 был характерен для 6 штаммов, выделенных в провинции Куанг Чи (генотип *emm12.0*), 6 штаммов, выделенных в провинции Хай Фонг (генотип *emm12.0*), одного штамма, выделенного в провинции Хоа Бинь и одного штамма из провинции Тхай Нгуен (генотип *emm12.0*) (Таблица 7).

Штаммы *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* также были проанализированы методом PFGE (Рисунок 10). Для 9 штаммов было выявлено 6 паттернов PFGE (Таблица 8). Как и для *S. pyogenes*, одинаковый паттерн могли иметь штаммы SDSE, выделенные в разных провинциях Вьетнама, и имеющие разный *emm* - генотип, при этом принадлежность штаммов к одному *emm*-генотипу не обеспечивала одинаковый паттерн PFGE.

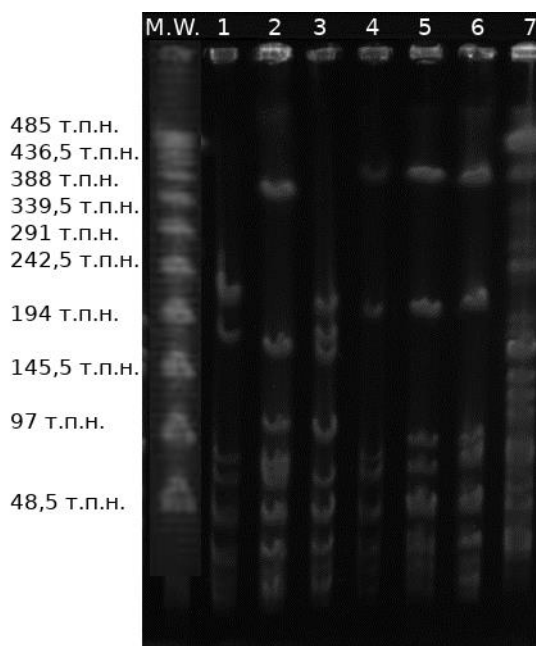


Рисунок 10 – *Sma*I рестрикционные паттерны PFGE хромосомной ДНК штаммов *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, выделенных во Вьетнаме

Примечание: М.В. – маркер молекулярного веса, конкатомеры бактериофага λ ; Треки 1 – 7: паттерны штаммов V63, V123, HF112, HF196, B159, T201, B82 соответственно

Таблица 8 – *Sma*I паттерны штаммов *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* различных *emm*-подтипов, выделенных во Вьетнаме

Паттерны PFGE	№ штамма	<i>emm</i> -подтип
Д1	V63	<i>emm</i> 44.0
Д2	V123	<i>stG</i> 6
Д3	HF112	<i>stG</i> 480
Д4	T122	<i>stG</i> 4831
Д5	HF196, B159, T201	<i>stC</i> 5345
Д6	NT15	<i>stG</i> 480
Д7	B82	<i>st</i> 36.0

Сравнительный анализ паттернов PFGE штаммов *S. anginosus* выявил высокую генетическую гетерогенность: 16 паттернов для 20 изолятов, только три паттерна были обнаружены более чем у одного изолята: B35/NT90/паттерн 2, HF165/T133/TN247/паттерн 3 и HF3/HF169/паттерн 8 (Рисунок 11, Таблица 9). Это подчеркивает поликлональное распределение изолятов *S. anginosus*, но также может свидетельствовать и о существовании некоторых доминирующих линий.

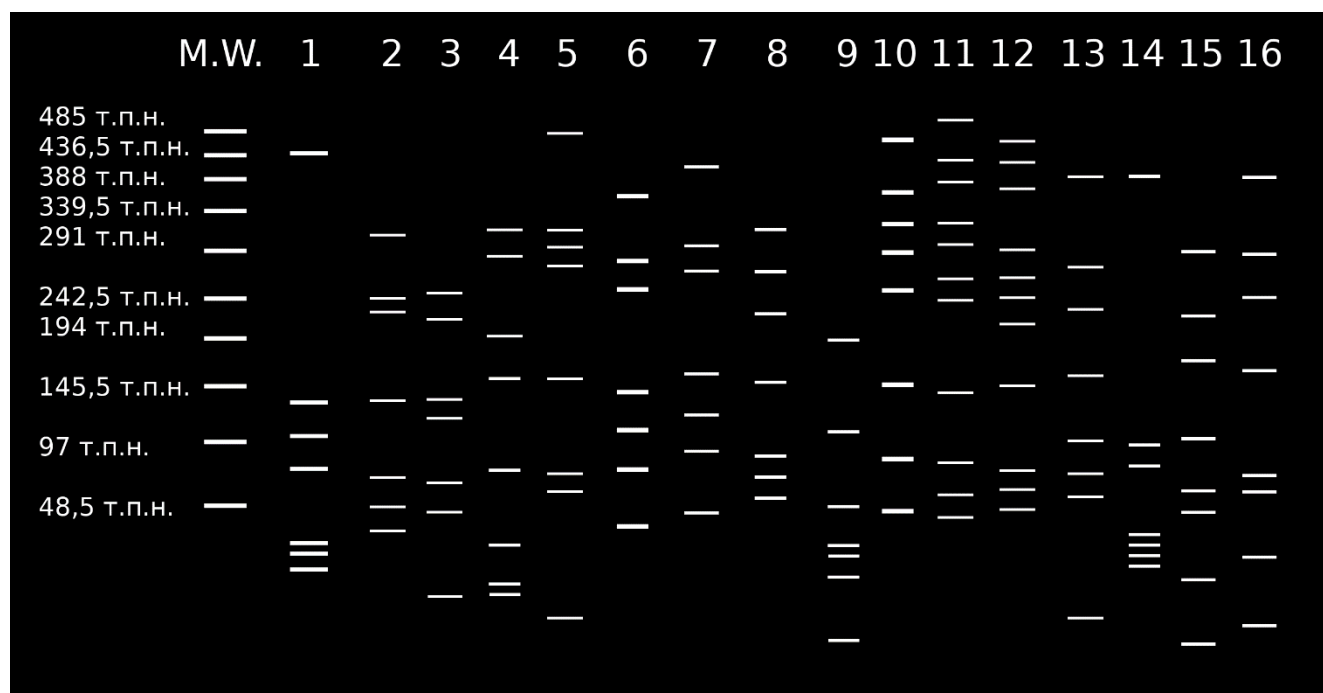


Рисунок 11 – *Sma*I рестрикционные паттерны PFGE хромосомной ДНК штаммов *S. anginosus*, выделенных во Вьетнаме

Примечание: M.W. – маркер молекулярного веса, конкатомеры бактериофага λ; Треки 1 – 16: паттерны 1-16 согласно Таблице 9. Фотографии агарозных гелей были обработаны в графическом редакторе Photoshop CS6 (Adobe Systems) для удобства сравнения.

Таблица 9 – *Sma*I паттерны штаммов *S. anginosus*, выделенных во Вьетнаме

Паттерны PFGE	№ штамма	Детерминанты резистентности и МГЭ, участвующие в их распространении*
A1	V13	<i>mefA</i> , <i>msrD</i> , <i>tetM</i> ; МГЭ не определен
A2	B35, NT90	<i>ermB</i> , <i>tetM</i> ; Tn6002.1
A3	HF165, T133, TN247	<i>ermB</i> , <i>tetM</i> ; Tn6002.1
A4	V71	<i>mefA</i> , <i>msrD</i> , <i>tetM</i> ; МГЭ не определен
A5	HF13	<i>ermB</i> , <i>tetM</i> ; Tn6002.1
A6	V128	<i>mefA</i> , <i>msrD</i> , <i>tetO</i> ; Φ46.1 var
A7	HF228	<i>tetM</i> , cMLS _B , МГЭ не определен
A8	HF3, HF169	<i>ermB</i> , <i>tetM</i> ; Tn6002.1
A9	V140	<i>tetM</i> , cMLS _B , МГЭ не определен
A10	TN244	<i>ermB</i> , <i>tetM</i> ; Tn6002.1
A11	HF15	<i>ermB</i> , <i>tetM</i> ; Tn6002.1
A12	HF238	<i>tetM</i> , iMLS _B , МГЭ не определен
A13	HF113	<i>ermB</i> , <i>tetM</i> ; Tn6002.1
A14	HF147	<i>ermB</i> , <i>tetM</i> ; Tn6002.1
A15	NT127	<i>ermB</i> , <i>tetM</i> ; Tn6002.1
A16	NT118	<i>mefG</i> , <i>msrD</i> , <i>tetM</i> ; МГЭ не определен

Примечание: *согласно результатам, изложенным в разделах 7.1 и 7.2

ГЛАВА 5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ ГРУПП А, С И G К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

5.1 Чувствительность стрептококков, выделенных во Вьетнаме, к антибактериальным препаратам различных классов

С помощью диско-диффузионного метода (ДДМ) были выборочно проанализированы штаммы коллекции (40 штаммов СГА (*S. pyogenes*) и 27 штаммов СГС/СГG (6 штаммов - *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* и 21 штамм - *S. anginosus*)) на чувствительность к представителям основных классов антибиотиков (Таблица 10). Данные штаммы оказались чувствительны к действию антибиотика пенициллинового ряда (ампициллина) и цефалоспоринов (цефотаксим, цефтазидим), что согласуется с данными других авторов [5]. Также эффективным в отношении всех исследуемых штаммов был гликопептид ванкомицин. К антибиотику широкого спектра действия из группы аминогликозидов, амикацину, были устойчивы все исследуемые изоляты. Показатель устойчивости к препаратам из группы фторхинолонов среди СГА составил 30% для ципрофлоксацина, 35% для норфлоксацина и 37,5% для энрофлоксацина. Уровень устойчивости к фторхинолонам среди СГС и СГG составил 18,5%, 29,6% и 22,2%, соответственно.

На чувствительность к тетрациклину и эритромицину были протестированы: 46 штаммов СГА, 65 штаммов СГG и 8 штаммов СГС (Таблица 11). К тетрациклину оказались устойчивы 40 из 46 (86,9%) штаммов СГА и 38 из 73 (52,0%) штаммов СГС и СГG. Устойчивыми к действию эритромицина оказались 13 штаммов из 46 (28,3%) СГА и 28 штаммов из 73 (38,4%) СГС/СГG.

Таблица 10 – Чувствительность стрептококков, выделенных во Вьетнаме, к антибактериальным препаратам

Антибиотик	<i>S. pyogenes</i> (40 штаммов, СГА)			<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (6 штаммов, СГС/СГГ)			<i>S. anginosus</i> (21 штамм, СГС/СГГ)		
	Ч (%)	П (%)	У (%)	Ч (%)	П (%)	У (%)	Ч (%)	П (%)	У (%)
β-лактамы									
Ампициллин	40 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	21 (100)	0 (0)	0 (0)
Цефалоспорины									
Цефтазидим	40 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	21 (100)	0 (0)	0 (0)
Цефотаксим	40 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	21 (100)	0 (0)	0 (0)
Гликопептиды									
Ванкомицин	40 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	21 (100)	0 (0)	0 (0)
Аминогликозиды									
Амикацин	0 (0)	0 (0)	40 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	21 (100)
Фторхинолоны									
Ципрофлоксацин	24/40 (60)	4/40 (10)	12/40 (30)	3/6 (50)	1/6 (16.7)	2/6 (33.3)	18/21 (85.7)	0 (0)	3/21 (14.3)
Норфлоксацин	24/40 (60)	2/40 (5)	14/40 (35)	4/6 (66.6)	1/6 (16.7)	1/6 (16.7)	11/21 (52.4)	3/21 (14.3)	7/21 (33.3)
Энрофлоксацин	21/40 (52,5)	4/40 (10,0)	15/40 (37,5)	3/6 (50)	1/6 (16,7)	2/6 (33,3)	15/21 (71,4)	2/21 (9,5)	4/21 (19,1)

Примечание: Ч – чувствительные штаммы, П – штаммы с промежуточной устойчивостью, У – устойчивые штаммы

Таблица 11 – Чувствительность стрептококков, выделенных во Вьетнаме, к антибактериальным препаратам

Антибиотик	СГА (46 штаммов)			СГС (8 штаммов)			СГГ (65 штаммов)		
	Ч (%)	П (%)	У (%)	Ч (%)	П (%)	У (%)	Ч (%)	П (%)	У (%)
Тетрациклины									
Тетрациклин	6/46 (15,2)	0 (0)	40/46 (86,9)	6/8 (75,0)	0 (0)	2/8 (25,0)	29/65 (44,6)	0 (0)	36/65 (55,4)
Макролиды									
Эритромицин	33/46 (71,7)	0 (0)	13/46 (28,3)	3/8 (37,5)	0 (0)	5/8 (62,5)	42/65 (64,6)	0 (0)	23/65 (35,4)

Примечание: Ч – чувствительные штаммы, П – штаммы с промежуточной устойчивостью, У – устойчивые штаммы

5.2 Определение типа лекарственной устойчивости

Тип лекарственной устойчивости стрептококков серологических групп А, С и G (М тип или MLS_B тип) определяли диско-диффузионным методом, с использованием дисков с эритромицином, клиндамицином и джозамицином. Штаммы, обладающие MLS_B типом, характеризуются устойчивостью к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В. При этом устойчивость к клиндамицину, относящемуся к группе линкозамидов, у таких изолятов может проявляться конститутивно ($sMLS_B$) и индуцибельно ($iMLS_B$), роль индуктора в этом случае выполняет эритромицин, а на чашке образуется характерная D-зона задержки роста.

М тип лекарственной устойчивости проявляется в резистентности штаммов по отношению к 14-членным макролидам (эритромицину, рокситромицину, кларитромицину) и 15-членному азитромицину, с сохранением при этом чувствительности к 16-членным макролидам (джозамицину) (Рисунок 12).

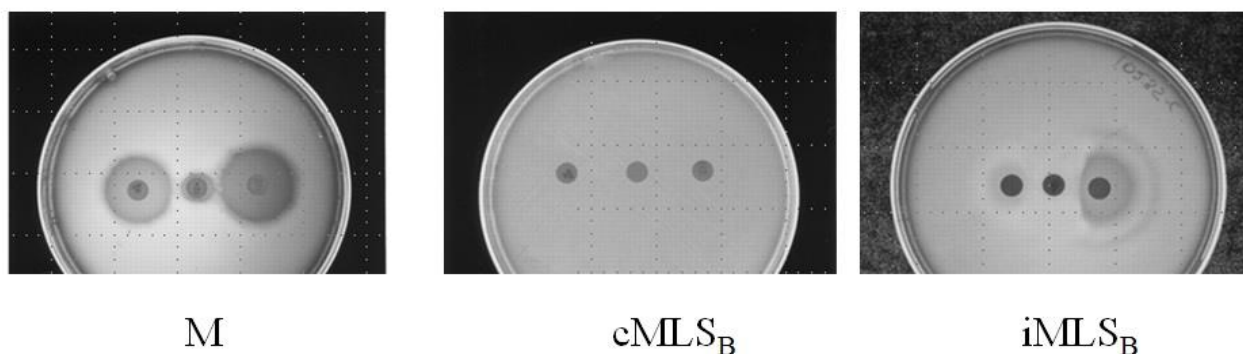


Рисунок 12 – Различные типы устойчивости стрептококков к макролидам и линкозамидам

Примечание: На всех чашках Петри посередине располагается диск с эритромицином (15 мкг), справа диск с клиндамицином (2 мкг), слева диск с джозамицином (30 мкг)

Из 13 штаммов СГА, устойчивых к эритромицину, 11 штаммов относились к cMLS_B типу, 1 штамм имел iMLS_B тип и 1 штамм имел М тип лекарственной устойчивости (Таблица 12). Среди 23 штаммов СGG, устойчивых к эритромицину, было обнаружено 16 штаммов cMLS_B типа, 1 штамм iMLS_B типа и 6 штаммов М типа лекарственной устойчивости. Среди 5 штаммов СГС, устойчивых к эритромицину, 3 штамма относились к cMLS_B типу и 2 штамма имели М тип лекарственной устойчивости.

5.3 Определение минимальной подавляющей концентрации эритромицина у штаммов *S. pyogenes*

С помощью метода микроразведений в бульоне, описанном в национальном стандарте Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 20776-1 – 2010, была определена разница в уровне чувствительности к эритромицину штаммов СГА с разным типом лекарственной устойчивости. С этой целью у штаммов СГА была измерена минимальная подавляющая концентрации (МПК) эритромицина, которая, в условиях *in vitro* полностью подавляла видимый рост бактерий в питательной среде

после инкубации чашки в течении 18 часов. Диапазон измерения МПК эритромицина составил 0,015 - 128 мг/л. У чувствительных к эритромицину штаммов МПК находится в диапазоне от 0,015 до 0,25 мг/л; у штаммов с промежуточной устойчивостью МПК находится в диапазоне от 0,5 до 1 мг/л; у устойчивых штаммов (резистентных) МПК находится в диапазоне от 2 до 128 мг/л. Из данных, представленных в таблице 12, следует, что МПК эритромицина выше у штаммов с MLS_B типом лекарственной устойчивости, чем у штаммов с М типом, разницы в МПК между штаммами с $sMLS_B$ и $iMLS_B$ типом устойчивости не выявлено (Таблица 12).

Таблица 12 – МПК эритромицина штаммов СГА

Тип лекарственной устойчивости	Кол-во штаммов	МПК эритромицина (мг/л)	Чувствительность штаммов к тетрациклину*
		Диапазон	
$sMLS_B$	11	>128 – 64	У
$iMLS_B$	1	>128	Ч
М	1	4	Ч
Чувствительны к действию MLS_B антибиотиков	1	0,015	Ч
	29	0,015-0,125	У
	3	0,015-0,03	Ч

Примечание: * У – устойчив, Ч – чувствителен к действию тетрациклина согласно результатам ДДМ

ГЛАВА 6 ВЫЯВЛЕНИЕ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГЕНАМИ ВИРУЛЕНТНОСТИ И АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ, У ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ А

6.1 Генетические детерминанты антибиотикоустойчивости у штаммов стрептококков группы А

У стрептококков существует несколько механизмов приобретенной устойчивости к макролидам. Эффлюксный механизм устойчивости стрептококков к 14-членным макролидам (эритромицину, рокситромицину, кларитромицину) и 15-членному азитромицину, с сохранением при этом чувствительности к 16-членным макролидам, ассоциирован с присутствием в геноме различных аллелей генов *mef* и *msr*. Другой механизм устойчивости штаммов стрептококков к действию макролидов, линкозамидов и стрептограмину обеспечивается действием ферментов-метиляз семейства *erm*. Учитывая тот факт, что гены устойчивости к эритромицину часто располагаются на МГЭ совместно с генами устойчивости к тетрациклину, штаммы, входящие в состав коллекции, были проанализированы на наличие генов *ermTR*, *ermB*, *mef*, *msrD*, *tetM*, *tetO* с помощью ПЦР с использованием праймеров, приведённых в Таблице 4.

Среди 46 штаммов СГА ген *ermB* был выявлен у 11 штаммов с *cMLS_B* (*emm12.0*, *emm12.22*), у 1 штамма с *iMLS_B* (*emm89.24*) и у 1 штамма, чувствительного к действию макролидов и линкозамидов (*emm12.0*) (Таблица 13). Как известно, у штаммов СГА с *cMLS_B* ген *ermB* может быть ассоциирован с одним из двух элементов *Tn916* семейства, *Tn3872* или *Tn6002* [118] Как приведено в разделе 6.2, полногеномное секвенирование одного из штаммов наиболее распространенного *emm12* генотипа выявило наличие в его геноме полноразмерного транспозона *Tn6002* в составе ICE-*emm12*. Скрининговый ПЦР анализ вьетнамских штаммов на пять генов, входящих в состав ICE-*emm12* (ORF28, *iap*, *int*, *xis*, ORF40), подтвердил наличие ICE-*emm12* у всех штаммов СГА с *cMLS_B*

типом лекарственной устойчивости (11 штаммов) и у 1 штамма, чувствительного к макролидам и тетрациклину, содержащих гены *ermB* и *tetM* (раздел 6.3). Также наличие этих генов было обнаружено у шести штаммов, чувствительных к макролидам и устойчивых к тетрациклину за счет наличия у них гена *tetM*. По-видимому, у этих штаммов в состав генома входит элемент ICE-NKU165, отличающийся от ICE-*emm12* отсутствием *ermB*-фрагмента. Присутствие генов ORF28, *iap*, *int*, *xis* и отсутствие гена ORF40 у 23 чувствительных к макролидам и устойчивых к тетрациклину штаммов, свидетельствует о наличии у них Tn916 транспозона, широко распространенного среди СГА (Таблица 13, 14) [154].

По данным ряда авторов, индуцибельно экспрессируемый ген *ermB* у чувствительных к тетрациклину штаммов СГА входит в состав элемента, ICESp1116. Этот элемент имеет мозаичную структуру TnGallo1 из *S. gallolyticus* с двумя интегрированными фрагментами, разделенными IS1216: *ermB*-содержащим фрагментом, полученным из плазмиды pSM19035, и фрагментом транспозона Tn5397 (семейство Tn916), обнаруженного у *Clostridium difficile*, в котором ген резолвазы *tndX* замещает гены интегразы *int* и экстизионазу *xis* (Рисунок 2). При этом инсерция последовательности ДНК, содержащей *ermB* ген, в кодирующую часть гена *tetM* Tn5397, привела к его инактивации [189]. Однако подтвердить с помощью ПЦР наличие гена *tndX* у вьетнамского штамма с iMLS_B (*emm89.24*) не удалось.

У 1 штамма коллекции с М типом лекарственной устойчивости был обнаружен ген *mefO*. Секвенирование *mef* амплификата выявило последовательность, на 88% гомологичную гену *mefA*, на 89% гомологичную гену *mefE*, и идентичную последовательности редко встречающегося варианта гена *mefO*, который впервые был обнаружен у 2 штаммов СГА, выделенных в Норвегии в 2005 году [160, 13] (Таблица 13). У данного штамма не удалось с помощью стандартных праймеров амплифицировать ген *msrD*, несмотря на то что ранее этот ген всегда встречался совместно с *mef* геном. Это свидетельствует о присутствии у данного штамма другого аллеля этого гена или же об иной организации этого участка ДНК.

Ген *tetM* был выявлен у 43 штаммов СГА, при этом стоит отметить, что только 40 штаммов были устойчивы к действию тетрациклина. «Молчащий» ген *tetM* был обнаружен у 1 штамма с *iMLS_B*, 1 штамма с М типом лекарственной устойчивости и у 1 штамма, чувствительного к действию макролидов и линкозамидов (Таблица 13).

Таблица 13 – Характеристика 46 штаммов СГА по наличию генов устойчивости к эритромицину и тетрациклину и проявлению соответствующих признаков

Тип лекарственной устойчивости	Кол-во штаммов	Гены устойчивости	Чувствительность штаммов к тетрациклину*	МГЭ
<i>sMLS_B</i>	11	<i>ermB, tetM</i>	У	ICE <i>emm-12</i> (Tn6002)
<i>iMLS_B</i>	1	<i>ermB, tetM</i>	Ч	не установлен
М	1	<i>mefO, tetM</i>	Ч	не установлен
Чувствительны к действию антибиотиков	1	<i>ermB, tetM</i>	Ч	ICE <i>emm-12</i> (Tn6002)
	6	<i>tetM</i>	У	ICE-НКУ165
<i>MLS_B</i>	23	<i>tetM</i>	У	Tn916
	3	-	Ч	-

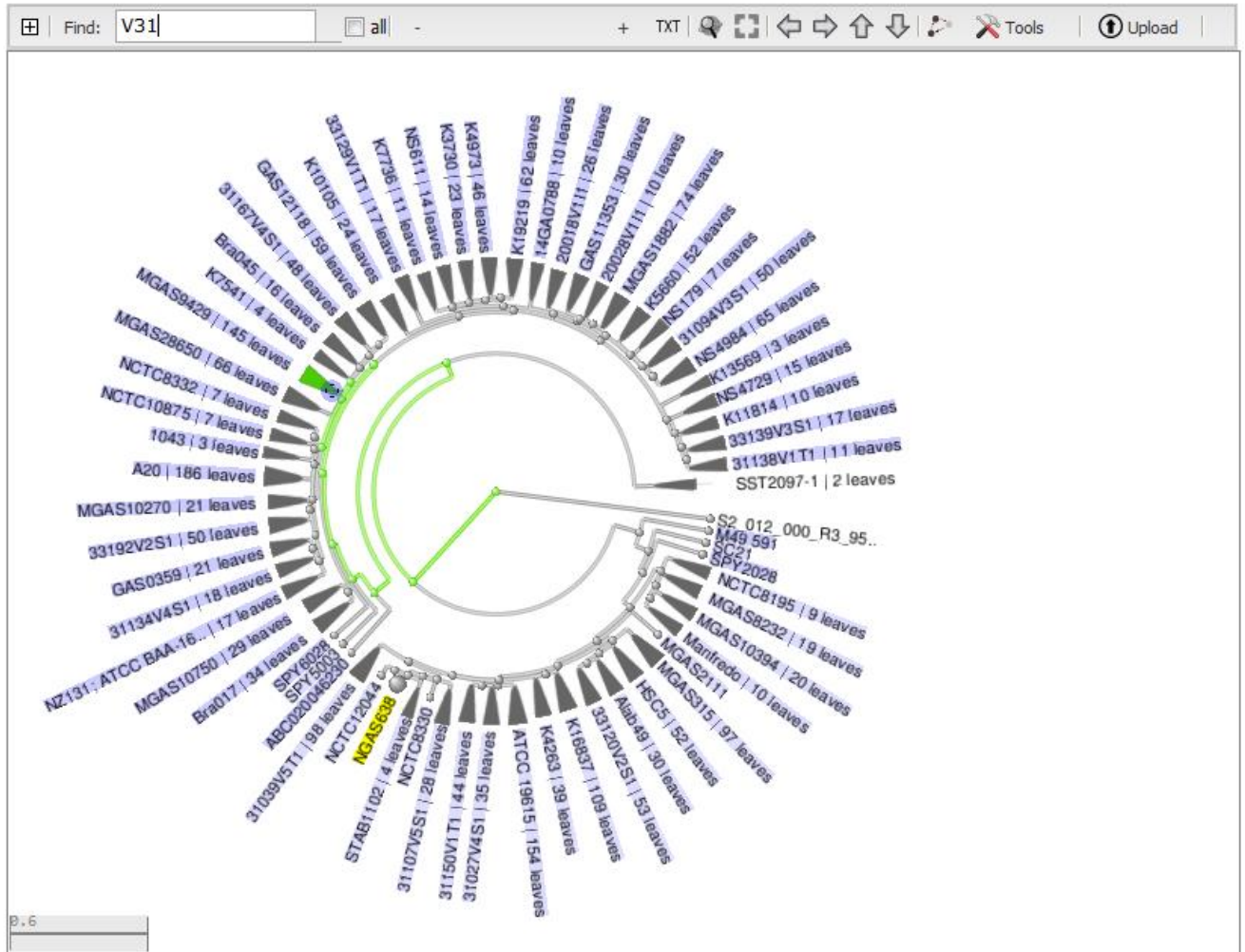
Примечание: * У – устойчив, Ч – чувствителен к действию тетрациклина согласно результатам ДДМ

6.2 Полногеномное секвенирование штамма стрептококка группы А *emm12*

генотипа

Биоинформатический анализ данных NGS секвенирования вьетнамского штамма СГА доминирующего *emm12* генотипа (V31) выявил его филогенетическое

родство со штаммами китайской эпидемичной клональной линии III (clade III) (HKU306 (99,56% гомологии), HKU383 (98,95% гомологии)) (Рисунок 13).



Streptococcus pyogenes serotype M12 (GCA_014050235.1) genome neighbors

[Download table](#)

Name	Strain	BioSample	BioProject	Assembly	Level	Size (Mb)	Scaffolds	Symmetric Identity(%)	Gapped Identity(%)	Alignment
Streptococcus pyogenes	HKU306	SAMEA1034137	PRJEB2657	GCA_900991005.1	●	1.84401	25	99.5643	99.9853	◆
Streptococcus pyogenes BJCYGAS15	BJCYGAS15	SAMN02489371	PRJNA171138	GCA_000290575.1	●	1.84964	45	99.4736	99.9638	◆
Streptococcus pyogenes	HKU383	SAMEA1034012	PRJEB2657	GCA_900991025.1	●	1.82203	21	98.9516	99.9843	◆
Streptococcus pyogenes	HKU360	SAMEA1034066	PRJEB2657	GCA_900991015.1	●	1.88185	32	98.6339	99.9727	◆
Streptococcus pyogenes HKU QMH11M0907901	HKU QMH11M0907901	SAMN02471172	PRJNA68183	GCA_000275625.1	●	1.9081	-	98.2935	99.9627	◆
Streptococcus pyogenes	GAS1441	SAMEA3918937	PRJEB13003	GCA_900984465.1	●	1.83737	28	97.8111	99.785	◆
Streptococcus pyogenes	HKU30	SAMEA1031413	PRJEB2589	GCA_900990975.1	●	1.88764	25	97.4276	99.7294	◆
Streptococcus pyogenes	HKU360	SAMN02980885	PRJNA257934	GCA_000772185.1	●	1.94454	-	97.3751	99.9655	◆

Рисунок 13 – Графическое отображение результатов филогенетического анализа генома штамма V31 и рефересных геномов *S. pyogenes* на дендрограмме

В геноме штамма V31 было обнаружено присутствие двух участков ДНК (61 т.п.н. интегративно-конъюгативного элемента ICE-*emm12*, кодирующего устойчивость к тетрациклину и макролидам и 46,4 т.п.н. профага ФНКУ.vir, кодирующего суперантигены стрептококка SpeC, Ssa и ДНКазу Spd1), которые впервые были обнаружены в геноме штамма НКУ16, выделенного в Гонконге от больного скарлатиной [186] (Рисунок 14). У референсного штамма СГА *emm12* генотипа MGAS9429, гены *speC* и *spd1* расположены на профаге Ф9429.1, отличающегося отсутствием гена суперантигена *ssa* [29].

У штаммов V31, НКУ16, MGAS9429, был обнаружен еще один профаг, Ф9429.2, содержащий токсины *speH*, *speI*, который отсутствует у штамма MGAS2096. Профаг Ф9429.3, содержащий ген стрептодорназы *sdaD2*, присутствует у всех исследуемых штаммов (Рисунок 14).

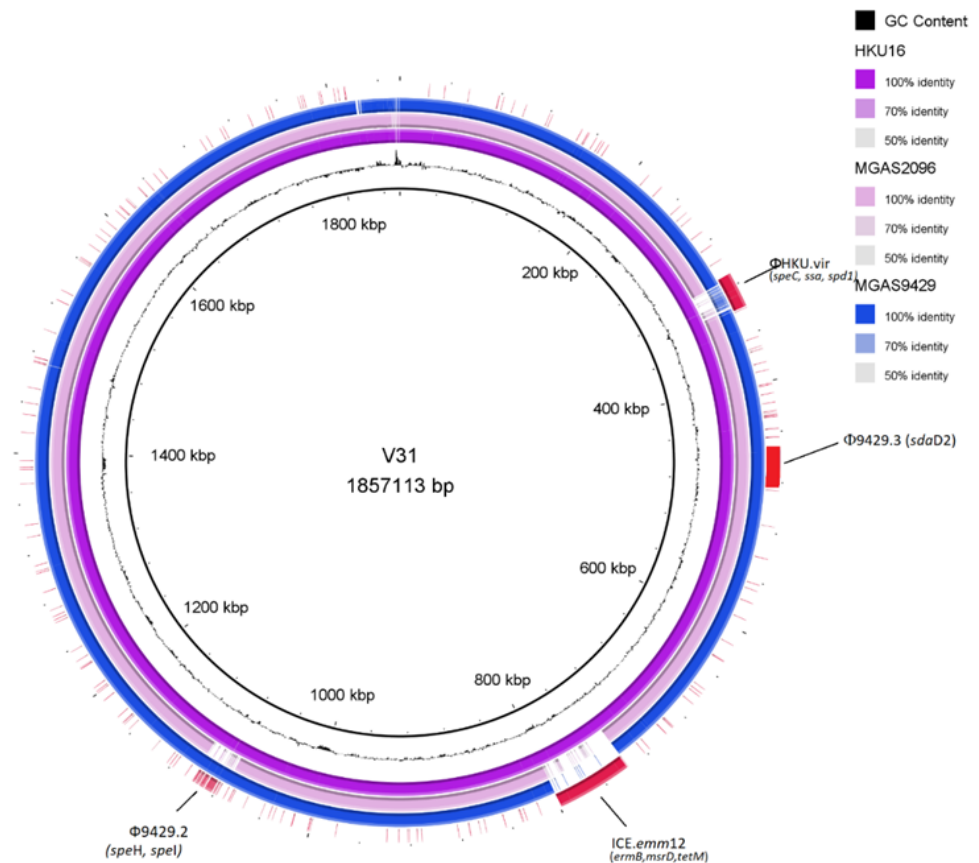


Рисунок 14 – Кольцевая генетическая карта штамма СГА генотипа *emm12* V31 в сравнении с референсными геномами штаммов СГА генотипа *emm12* НКУ16, MGAS2096, MGAS9429 на основе алгоритма BLAST

Примечание: карта была создана с использованием программы BRIG. Внутреннее кольцо отображает Г+Ц состав (черное), внешние кольца отражают BLAST сравнение (используя алгоритм BLASTn и порог E-value 10.0) с последовательностью генома штамма HKU16 (фиолетовое), MGAS2096 (сиреневое) и MGAS9429 (синее). Красные метки снаружи отражают места интеграции МГЭ. Профаг ФНКУ.vir (46,4 т.п.н.) и интегративно-конъюгативный элемент ICE-*emm12* (61 т.п.н.), обнаруженные у штаммов V31 и HKU16, отсутствуют у референсных штаммов данного генотипа MGAS2096, MGAS9429. Профаг Ф9429.2, содержащий гены *speH* *speI*, присутствует в геномах штаммов V31, HKU16, MGAS9429, но отсутствует у штамма MGAS2096. Профаг Ф9429.3, содержащий ген *sdaD2*, присутствует у всех исследуемых штаммов.

В штаммах HKU16 и V31 элемент ICE-*emm12* интегрирован в сайт, соответствующий 1113984 п.н. у референсного штамма СГА М1, в пределы хромосомного гена SPy_1346, кодирующего РНК-метилтрансферазу (Рисунок 15) [26]. В этом же месте генома у штамма MGAS6180 (тип *emm28*) располагается интегративно-конъюгативный элемент 6180-RD.1, а у штамма MGAS2096 (тип *emm12*) – мобильный генетический элемент 2096-RD.2, содержащий ген устойчивости к тетрациклину *tetO*. Следует отметить, что эти три мобильных элемента, ICE-*emm12*, 2096-RD.2 и 6180-RD.1, значительно отличаются друг от друга.

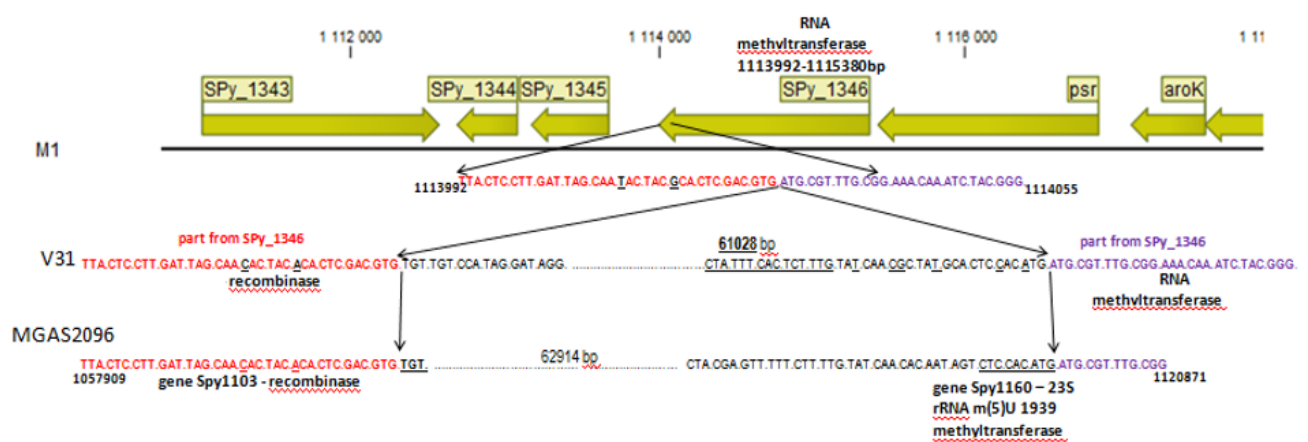


Рисунок 15 – Сайт интеграции ICE-*emm12*

Элемент ICE-*emm12*, идентифицированный в геноме вьетнамского штамма V31, содержит 53 открытые рамки считывания (ORFs) (Рисунок 16). Внутри ICE-*emm12* условно различимы три функциональных модуля: конъюгативный (А), модуль, содержащий детерминанты антибиотикоустойчивости (Б) и модуль, отвечающий за рекомбинацию (В).

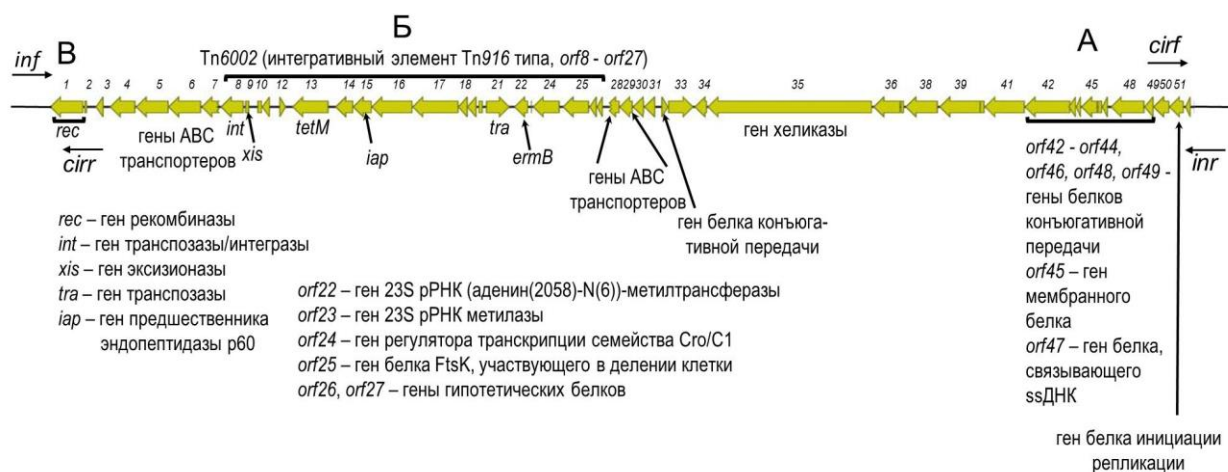


Рисунок 16 – Генетическая организация ICE-*emm12*

Конъюгативный модуль (ORF42-44, ORF46 и ORF48-49), кодирующие белки системы секреции IV С-типа, которая вместе с другими белками, такими как ORF32 и хеликазой, может осуществлять конъюгативный перенос элемента.

Модуль Б, отвечающий за антибиотикоустойчивость (ORF8 - ORF27) включает полноразмерный транспозон Tn6002 (20880 п.н.), содержащий ген устойчивости к тетрациклину *tetM* (ORF13) и ген устойчивости к эритромицину *ermB* (ORF22) [27]. Транспозон Tn6002 интегрирован в участок, содержащий гены ABC транспортеров, обеспечивающих защиту бактерий от действия многих антибиотиков (ORF5 - ORF7, ORF28, ORF29).

Модуль В, отвечающий за рекомбинацию, представлен геном серин-зависимой рекомбиназы (ORF8).

Интересно, что у штамма V31 так же, как и у штамма HKU16 произошла большая инверсия между генами двух транспозаз, затрагивающая 81% генома, в отличие от других штаммов этого генотипа (MGAS9429 и MGAS2096) (Рисунок

17). Аналогичные изменения ранее были обнаружены у инвазивного штамма M3 [135]. Согласно литературным данным, маркерным фрагментом этой перестройки является бенд размером 885 т.п.н. на электрофореграмме PFGE при рестрикции нуклеазой *AscI* [186].

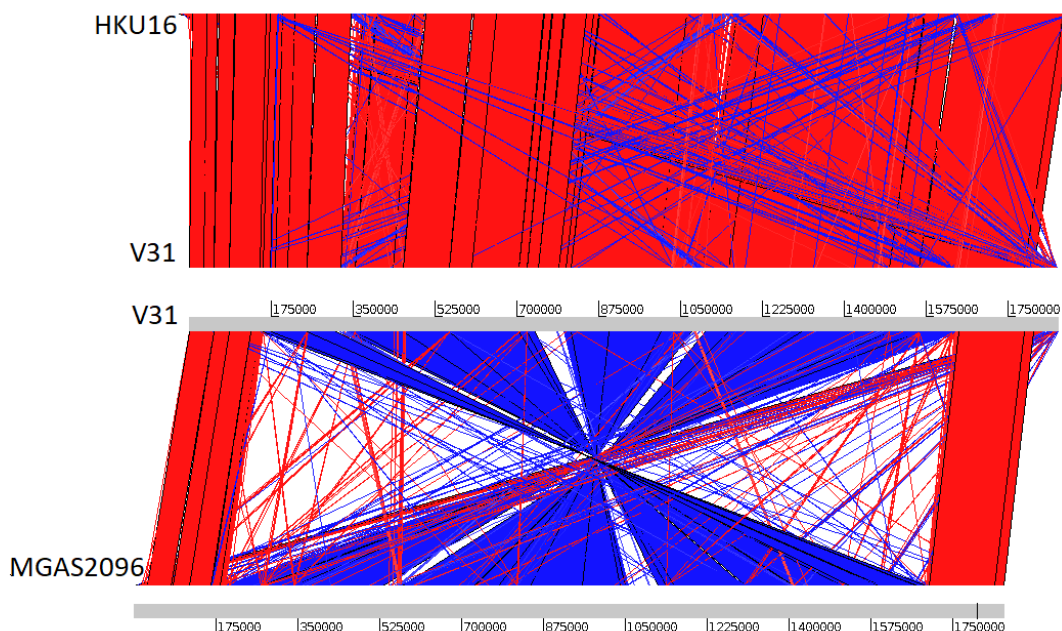


Рисунок 17 – Полногеномный сравнительный анализ штаммов СГА генотипа *emm12* HKU16, V31 и MGAS2096 с использованием алгоритма BLASTn в программе Artemis Comparison Tool

Примечание: Красные линии отражают консервативные участки генома, синим выделены инвертированные участки генома

Таким образом, штамм V31 может быть отнесен к эпидемической клональной линии, быстро распространившейся в популяции людей за счет наличия определенного экзотоксинового профиля, наряду с устойчивостью к антибиотикам.

6.3 Сравнительный анализ штаммов стрептококков группы А, выделенных в Юго-Восточной Азии и России, по наличию генов, ассоциированных с мобильными генетическими элементами

6.3.1 Результаты ПЦР скрининга азиатских и российских штаммов стрептококков группы А на наличие генов, входящих в состав ICE-*emm12*

С целью изучения распространения элемента ICE-*emm12* в популяции СГА был проведен ПЦР скрининг штаммов различных *emm* генотипов, выделенных в Пекине (КНР), Санкт-Петербурге и Москве, на наличие в их геномах несколько генов, входящих в состав ICE-*emm12*: *ermB* (метилтрансферазу ErmB), *tetM* (белок, препятствующий связыванию рибосомы с молекулой тетрациклина), *iap* (предшественник эндопептидазы p60), *xis* (экстизионаза), *int* (интеграза), ORF28 (гипотетический белок), ORF40 (поверхностный белок) (Таблица 4).

В результате исследования коллекции из 51 штамма СГА, выделенных в 2008-2011 гг. в Пекине, все искомые гены, ассоциированные с присутствием ICE-*emm12* были обнаружены у 11 из 21 штамма *emm12* генотипа и у 11 из 30 штаммов *emm1* генотипа.

В результате анализа российской коллекции штаммов, все искомые гены были обнаружены только у 1 штамма *emm12* генотипа из 35, выделенных в 2007 г. в Санкт-Петербурге от детей школьного возраста (Таблица 14). Дополнительный анализ 32 штаммов различных *emm* генотипов, выделенных в Москве в 2008-2011 гг., показал, что все гены, ассоциированные с ICE-*emm12*, присутствуют лишь у 1 штамма редко встречающегося генотипа *emm88.2*, который в свою очередь был единственным из 32 штаммов, содержащим ген *ermB*.

Таблица 14 – результаты ПЦР анализа штаммов на гены, входящих в состав ICE-*emm12*

<i>emm</i> тип (количество штаммов)	Наличие гена <i>ermB</i>	Наличие гена <i>tetM</i>	Наличие генов транспозона (ORF28, <i>iap</i> , <i>int</i> , <i>xis</i>)	Наличие генов элемента ICE- <i>emm12</i> (ORF40)	Элемент
Штаммы, выделенные во Вьетнаме					
<i>emm12.0</i> (9), <i>emm12.22</i> (3)	+	+	+	+	ICE- <i>emm12</i>
<i>emm44.0</i> (2), <i>emm104.0</i> (4)	-	+	+	+	ICE-НКУ165
<i>emm89.24</i> (1)	+	-	-	-	не определен
<i>emm4.0</i> (4), <i>emm8.0</i> (1), <i>emm12.0</i> (1), <i>emm44.0</i> (4), <i>emm104.0</i> (3), <i>emm109.0</i> (1), <i>emm109.1</i> (6), <i>emm170.0</i> (2), <i>emm170.2</i> (1)	-	+	+	-	Tn916
<i>emm22.0</i> (1), <i>emm58.0</i> (1), <i>emm75.1</i> (1), <i>emm170.1</i> (1)	-	-	-	-	-
Штаммы, выделенные в Пекине					
<i>emm1</i> (1П, 4П, 6П, 8П, 11П, 12П, 14П, 16П, 18П, 19П, 22П)	+	+	+	+	ICE- <i>emm12</i>
<i>emm1</i> (2П, 3П, 5П, 7П, 9П, 10П, 13П, 15П, 17П, 20П, 21П, 23П-30П)	-	-	+	-	не определен
<i>emm12</i> (32П, 34П, 35П, 36П, 44П, 46П-51П)	+	+	+	+	ICE- <i>emm12</i>
<i>emm12</i> (31П, 33П, 37П-43П, 45П)	-	-	+	-	не определен
Штаммы, выделенные в Санкт-Петербурге					
<i>emm12.0</i> (1) (94С)	+	+	+	+	ICE- <i>emm12</i>
<i>emm12.0</i> (3) (114С, 120С, 135С)	-	+	+	-	Tn916

<i>emm12.0</i> (14)	-	-	-	-	-
<i>emm1</i> (1) (99C)	-	+	+	-	Tn916
<i>emm1</i> (16)	-	-	-	-	-
Штаммы, выделенные в Москве					
<i>emm88.2</i> (1)	+	+	+	+	ICE- <i>emm12</i>
<i>emm41.2</i> (1), <i>emm49.8</i> (1), <i>emm64.0</i> (1), <i>st221.0</i> (1)	-	+	+	-	Tn916
<i>emm28.0</i> (1), <i>emm44.0</i> (1), <i>emm53.0</i> (1), <i>emm64.0</i> (1), <i>emm66.0</i> (1), <i>st2940.2</i> (1)	-	+	-	-	-
<i>emm1.0</i> (1), <i>emm1.47</i> (1), <i>emm28.0</i> (3), <i>emm60.1</i> (1), <i>emm66.0</i> (2), <i>emm66.1</i> (1), <i>emm73.0</i> (1), <i>emm74.0</i> (1), <i>emm77.0</i> (1), <i>emm80.0</i> (1), <i>emm84.0</i> (2), <i>emm88.2</i> (3) <i>emm115</i> (1), <i>emm117</i> (1) <i>emm27G.6</i> (1) <i>st1731</i> (2)	-	-	-	-	-

С учетом установленной локализации ICE-*emm12* в геноме штамма V31 (ген РНК-метилтрансферазы), были сконструированы две пары праймеров, *inf* - *circ* (размер ампликона 479 п.н.) и *ing* - *circf* (размер ампликона 453 п.н.) (Рисунок 18, Таблица 4). В результате анализа амплификатов было установлено, что во всех штаммах, выделенных во Вьетнаме (типы *emm12.0*, *emm12.22*), и в 1 штамме, выделенном в Москве (тип *emm88.2*), сайт интеграции ICE-*emm12* был такой же, как в штамме V31. В то же время амплификат ожидаемого размера не удалось получить у штамма, выделенного в Санкт-Петербурге, что может свидетельствовать об его интеграции в другой участок хромосомы.

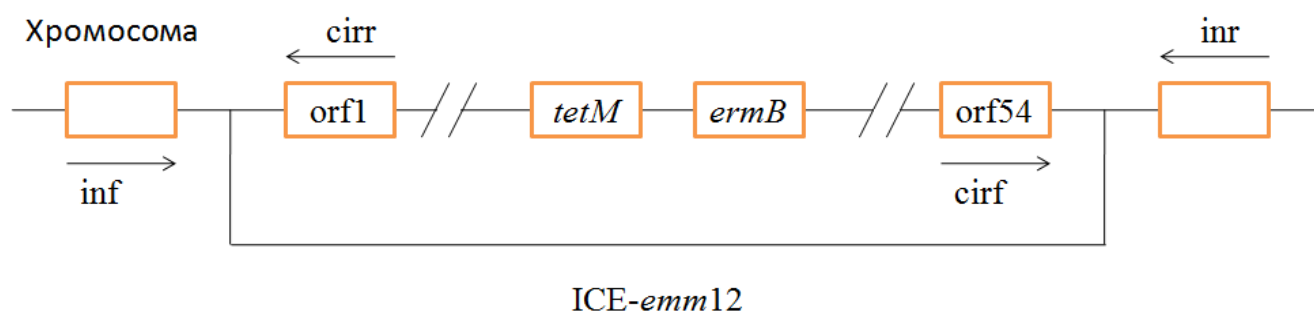


Рисунок 18 – Определение локализации ICE-*emm12* в геноме штаммов СГА

Доказательством мобильности интегративно-конъюгативного элемента может быть его перенос в процессе конъюгации от одной бактерии к другой, однако преобразование элемента в циклические формы в ходе роста бактерий является серьезным доказательством возможности их передачи *in vivo*. Образование циклической формы элементов ICE-*emm12* и ICE-*emm12*-like было подтверждено у содержащих их штаммов с помощью ПЦР с праймерами *cirf-cirr*, специфичными генам, фланкирующим ICE-*emm12* (размер ампликона 593 п.н.). Другим способом исключения мобильного элемента из хромосомы является постановка ПЦР с праймерами, комплементарными областям генома за пределами острова (*inf-inr*) (размер ампликона 500 п.н.) (Рисунок 18). Положительные результаты ПЦР свидетельствовали, что часть бактериальных клеток каждого конкретного штамма содержит интегрированные линейные формы ICE, а у части клеток ICE выщепляется, переходя в циклическую форму, с возможностью дальнейшего горизонтального переноса.

6.3.2 Результаты ПЦР скрининга азиатских и российских штаммов стрептококков группы А на наличие генов вирулентности, ассоциированных с профагами

Штаммы СГА, выделенные в России и Юго-Восточной Азии, были проанализированы на наличие генов, ассоциированных с присутствием в геноме бактериофагов, таких как ген стрептококкового токсина *speC*, ген стрептококкового суперантигена *ssa*, ген дезоксирибонуклеазы *spd1*, а также ген *int3*, кодирующий интегразу бактериофага Ф370.1-like. В зависимости от их наличия этих маркерных генов сделаны предположения о присутствии в геноме штаммов тех или иных бактериофагов (Таблица 15).

Согласно литературным данным, ген *ssa* у СГА, помимо ФНКУ.vir, может входить в состав других бактериофагов: ФНКУ.ssa, ФНКУ165.4, 315.2, SPsP6, ФМГАС10750.3, которые в совокупности в данном исследовании обозначены как «Meta-ssa» фаг.

Таблица 15 – Присутствие генов бактериофагов в геноме исследуемых штаммов СГА

<i>emm</i> - генотип (кол-во штаммов)	ФНКУ.vir – <i>speC/spd1/ssa</i>	«Meta- ssa» фаг – <i>ssa</i>	Ф370.1-like – <i>speC/spd1/int3</i>	«Meta- ssa» фаг +Ф370.1- like	Наличие гена <i>speC</i> в составе неизвестного профага	гены отсутст- вуют
штаммы, выделенные во Вьетнаме						
<i>emm12</i> (12)	12/12					
штаммы, выделенные в Пекине						
<i>emm12</i> (21)	13/21 (П31, П33, П36- П38, П41- П43, П45,			8/21 (П32, П34, П35, П39, П40, П44, П46, П49)		

	П47, П48, П50, П51)					
<i>emm1</i> (30)	28/30			1/30 (П20)		1/30 (П24)
штаммы, выделенные в Санкт-Петербурге						
<i>emm12</i> (18)	1/18 (144С)		11/18 (94С, 114С, 118С, 120С, 137С, 139С, 152С, 153С, 155С,164С, 170С)	3/18 (143С, 97С, 171С)	1/18 (12С)	2/18 (128С, 135С)
<i>emm1</i> (17)	1/17 (99С)	1/17 (96С)		9/17 (154С, 303С, 309С- 314С, 346С)		6/17 (67С, 88С, 98С,124 С, 280С, 331С)
штаммы, выделенные в Москве						
<i>emm73</i> (1)				1/1		
другие (8)						8/8

В результате исследования было выявлено, что штаммы, выделенные в Юго-Восточной Азии, сильно отличаются по профилю фаговых генов от штаммов, выделенных в России. Все азиатские штаммы, за исключением одного (62/63), характеризовались наличием в своем геноме генов *speC*, *ssa*, *spd1* в составе разных бактериофагов. Только 14 штаммов из 35, выделенных в Санкт-Петербурге, и 1 из 9 штаммов, выделенных в Москве, содержали гены *speC*, *ssa*, *spd1*. При этом элемент ФНКУ.vir был обнаружен у 1 штамма *emm1* генотипа и у 1 штамма *emm12* генотипа, выделенных в Санкт-Петербурге. Ген *speC* в составе Ф370.1-like профага был обнаружен у 11 из 18 штаммов *emm12* генотипа.

ГЛАВА 7 ВЫЯВЛЕНИЕ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГЕНАМИ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ, У ИССЛЕДУЕМЫХ ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ ГРУПП С И G

7.1 Генетические детерминанты антибиотикоустойчивости у штаммов

стрептококков группы G

В ходе данной работы был проведен ПЦР анализ штаммов СGG на наличие генов *ermTR*, *ermB*, *mef*, *msrD*, *tetM*, *tetO* методом ПЦР с использованием праймеров, приведённых в Таблице 3. Из 65 штаммов СGG, 38 штаммов не содержали детерминант устойчивости к эритромицину. Шесть штаммов СGG содержали ген *mefA*, тем не менее, три из них были чувствительны к эритромицину, а оставшиеся три имели M тип лекарственной устойчивости и устойчивость к тетрациклину за счет наличия гена *tetO* в составе химерного генетического элемента Ф46.1 (Рисунок 4, Таблица 16).

Ген *mefE* был обнаружен у 4 штаммов, при этом у одного из них отсутствовала фенотипическая устойчивость к эритромицину. Ген *mefE* ассоциирован с генетическим элементом MEGA (macrolide efflux genetic assembly) у *S. pneumoniae* и стрептококков групп С и G, чувствительных к тетрациклину, но MEGA также может входить в состав большого транспозона Tn2009 у штаммов, устойчивых к тетрациклину (Рисунок 5).

Секвенирование *mef* амплификата одного из штаммов СGG выявило редкую последовательность, отличную от *mefA* (степень гомологии 89%) и *mefE* (степень гомологии 90%) и на 99% гомологичную последовательности гена *mefG*, впервые обнаруженного у 2 штаммов стрептококков группы G (*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*), выделенных в 2006 году в Великобритании [13]. Последовательность гена *msrD*, ассоциированного с геном *mefG*, отличалась от последовательностей генов *msrD*, ассоциированных с генами *mefA* и *mefE* (степень гомологии 90% и 92%, соответственно). Согласно данным полногеномного секвенирования (раздел

6.3), устойчивость этого штамма к тетрациклину обеспечена геном *tetS*, который впервые был обнаружен у *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* в ходе данной работы.

13 штаммов, конститутивно устойчивых к эритромицину и клиндамицину, содержали ген *ermB*, который входил в состав транспозона Tn6002.1 (Таблица 16).

В ходе работы были обнаружены 3 штамма, фенотипически устойчивые к макролидам, у которых методом ПЦР не был обнаружен ни один из генов устойчивости к эритромицину, что позволяет сделать заключение о наличии у них механизмов устойчивости, не связанных с присутствием этих генов в геноме. Таким механизмом может быть, например, спонтанная мутация в гене 23S рРНК, приводящая к устойчивости к макролидам. Выявление природы устойчивости к макролидам у этих штаммов требует дальнейших исследований.

Таблица 16 – Характеристика 65 штаммов СГГ по наличию генов устойчивости к эритромицину и тетрациклину и проявлению соответствующих признаков

Тип ЛУ	Кол-во штаммов	Гены устойчивости к тетрациклину и эритромицину	Чувствительность штаммов к тетрациклину*	МГЭ
Чувствительны к действию MLS _B антибиотиков	23	-	Ч	-
	15	<i>tetM</i>	У	Tn916
	1	<i>mefA, msrD, tetM</i>	У	не определен
	1	<i>mefA, msrD</i>	Ч	не определен
	1	<i>mefA, msrD, tetM</i>	Ч	не определен
М	1	<i>mefE, msrD</i>	Ч	MEGA-like
	3	<i>mefA, msrD, tetO</i>	У	Φ46.1.var (V123) MEGA+Tn916-
	1	<i>mefE, msrD, tetM</i>	У	like, Tn2009
	2	<i>mefE, msrD</i>	Ч	MEGA

сMLS _B	1	<i>mefG, tetS</i>	У	новый ФНТ15 (NT15)
	13	<i>ermB, tetM</i>	У	Tn6002.1
	1	<i>tetM</i>	Ч	не определен
	1	<i>tetM</i>	У	не определен
iMLS _B	1	<i>tetM</i>	У	не определен

Примечание: подробное описание новых элементов на основе анализа данных NGS секвенирования изложено в разделе 6.2. *У – устойчив, Ч – чувствителен к действию тетрациклина согласно результатам ДДМ

7.2 Генетические детерминанты антибиотикоустойчивости у штаммов стрептококков группы С

Среди 8 штаммов СГС ген *tetM* был выявлен у 7 штаммов, при этом только пять штаммов СГС проявляли фенотипическую устойчивость к действию тетрациклина.

Три штамма, конститутивно устойчивых по фенотипическим признакам к эритромицину и клиндамицину, содержали ген *ermB*. Полногеномное секвенирование одного из таких штаммов, СГС В82, выявило у него ген *tetG* (гомологичный на 99% СГА), который, однако, не обеспечивал устойчивость штамма к действию тетрациклина. Стоит отметить, что ранее ген *tetG* у *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* обнаружен не был (раздел 6.3).

Секвенирование амплификатов *mef* гена выявило ген *mefE* у двух штаммов СГС и ген *mefG* у одного штамма СГС (Таблица 17).

Ген *ermTR* не был обнаружен ни у одного из исследуемых штаммов.

Таблица 17 – Характеристика 8 штаммов СГС по наличию генов устойчивости к эритромицину и тетрациклину и проявлению соответствующих признаков

Тип ЛУ	Кол-во штаммов	Гены устойчивости к тетрациклину и эритромицину	Чувствительность штаммов к тетрациклину*	МГЭ
Чувствительны к действию MLS _B антибиотиков	2	<i>tetM</i>	У	Tn916
	1	<i>mefE, msrD, tetM</i>	Ч	MEGA
				MEGA+Tn 916,
М	1	<i>mefE, msrD, tetM</i>	У	MEGA+Tn 916-like, Tn2009
	1	<i>mefG, msrD, tetM</i>	Ч	не определен
cMLS _B	2	<i>ermB, tetM</i>	У	Tn6002.1
	1	<i>ermB, tetT</i>	Ч	ICE-B82

Примечание: подробное описание нового элемента на основе анализа данных NGS секвенирования изложено в разделе 7.3 *У – устойчив, Ч – чувствителен к действию тетрациклина согласно результатам ДДМ

7.3 Новые мобильные генетические элементы, содержащие гены антибиотикоустойчивости, у вьетнамских штаммов *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, обнаруженные с помощью метода NGS

Высокопроизводительное секвенирование штамма *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* NT15

При анализе последовательности штамма SDSE NT15 удалось установить, что ген *mefG*, расположенный на контиге №2 (152 т.п.н.) входит в состав нового мобильного элемента фагового происхождения размером 54 т.п.н., названного

ФНТ15. Данный элемент насчитывает 54 открытые рамки считывания (open reading frames (ORF)) и интегрирован в последовательность хромосомного гена *comEC*, являющегося местом встраивания сходных профагов у СГА, SDSE и *S. suis* (Ф1207.3 (52 т.п.н.), Ф10394.4 (58 т.п.н.)).

Обнаруженный элемент ФНТ15 также имел высокую степень гомологии с элементом СГА Фм46.1 (55 т.п.н.), интегрированным в ген 23pPHK урацил метилтрансферазы [40]. Подобно Фм46.1, ФНТ15 представлял из себя транспозон Tn1207.1, интегрированный в профаг. Однако в отличие от Фм46.1, внутри транспозона Tn1207.1(ORF7 – ORF11) была обнаружена уникальная последовательность нефагового происхождения, кодирующая сайт-специфическую рекомбиназу (ORF3); ABC-F транспортер (ген *lsaE*), обеспечивающий рибосомную защиту и ответственный за перекрестную резистентность к линкозамидам-стрептограминам А-плевромутилинам (так называемый фенотип LSAP); линкозамид нуклеотидилтрансферазу (ген *lnuB*), обеспечивающую устойчивость к линкозамидам (фенотип L), и ген гипотетического белка (ORF6). Следующие пять ORF (ORF7 – ORF11), имеют высокую степень гомологии с последовательностью транспозона Tn1207.1, и включают гены *mefG* (степень гомологии с геном *mefA* 87,9%) и *msrD* (степень гомологии с геном *msrD S. pyogenes* 91,56%). Фаговый модуль гомологичен профаговому модулю Фм46.1. ORF12 и ORF13, с которых начинается профаговая часть элемента, по-видимому, являются правым отрезком модуля, контролирующего лизогенный (умеренный) путь развития фага, который в результате инсерции транспозона Tn1207.1 оказался разделен на две части. Модуль, отвечающий за репликацию фаговой ДНК (ORF16 – ORF23), является высоко консервативным и наблюдается у других *mefA*-содержащих элементов Фм46.1, Ф1207.3, Ф10394.4 [40]. Модуль, отвечающий за модификацию ДНК, представлен ORF27 - ORF30. Упаковка ДНК в готовые фаговые частицы и сборка головки фага контролируется ORF34 – ORF41. Модуль, отвечающий за образование хвостового отростка, сформирован четырьмя ORF (ORF43 – ORF46).

Вторая часть модуля, контролирующего лизогенный (умеренный) путь развития фага, представлена ORF53 (Рисунок 19).

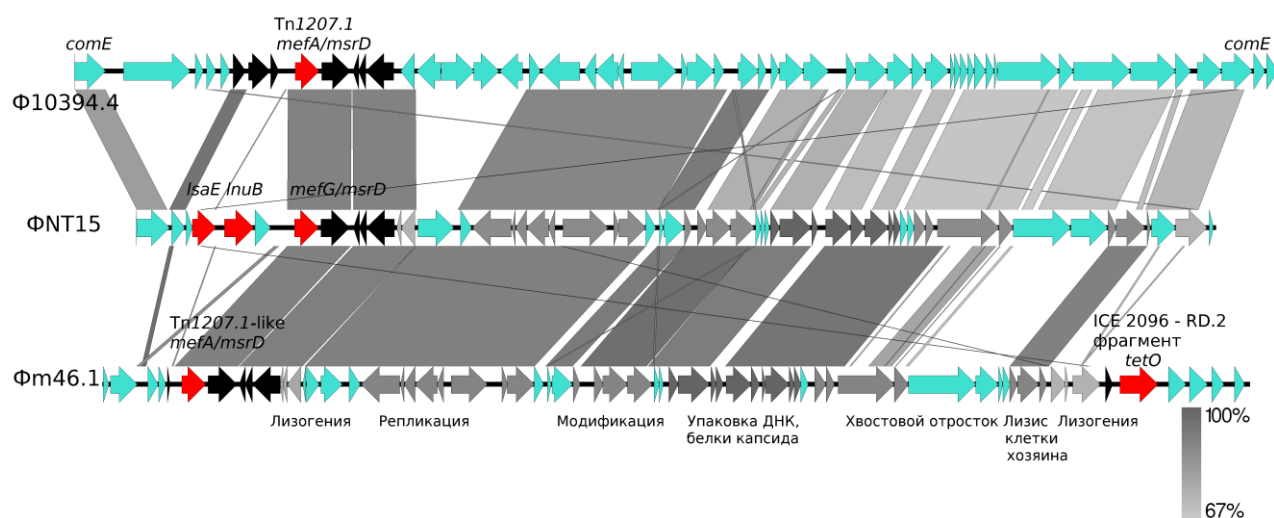


Рисунок 19 – Схема элемента ФНТ15 у штамма SDSE NT15

Элемент Фм46.1 встречается у СГА, устойчивых к тетрациклину за счет наличия в его составе фрагмента ICE2096 – RD.2 с геном *tetO*. ФНТ15 не имеет в составе гена *tetO*, однако у штамма NT15 в другой части генома (контиг №8) был выявлен фрагмент ДНК, на 99% гомологичный полноразмерному транспозону Tn916 *S. agalactiae* и *E. faecalis*, отличительной особенностью которого был ген, обеспечивающий устойчивость микроорганизмов к действию тетрациклина *tetS*, вместо гена *tetM*.

Поиск элементов, гомологичных ФНТ15 у других представителей данного рода, чьи последовательности находятся в GenBank, выявил наличие этого элемента в двух копиях у единственного штамма SDSE AC-2713 (GCA_000317855.1), которой также являлся наиболее филогенетически близким штамму SDSE NT15.

Высокопроизводительное секвенирование штамма *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* V123

При анализе контигов штамма V123 установлено, что гены *mefA*, *msrD*, *tetO* входят в состав бактериофага Фм46.1. Однако отличительной особенностью этого

элемента у штамма V123 стала интеграция в профаг транспозона MTnSag1 размером 1724 н.п., состоящего из транспозазы (IS1595, insLNU) и гена О-линкозамид-нуклеотидил трансферазы *lnuC*, обеспечивающего устойчивость к линкозидам, который ранее был описан у СГВ (GenBank Acc. № AY928180.1) (Рисунок 20) [10].

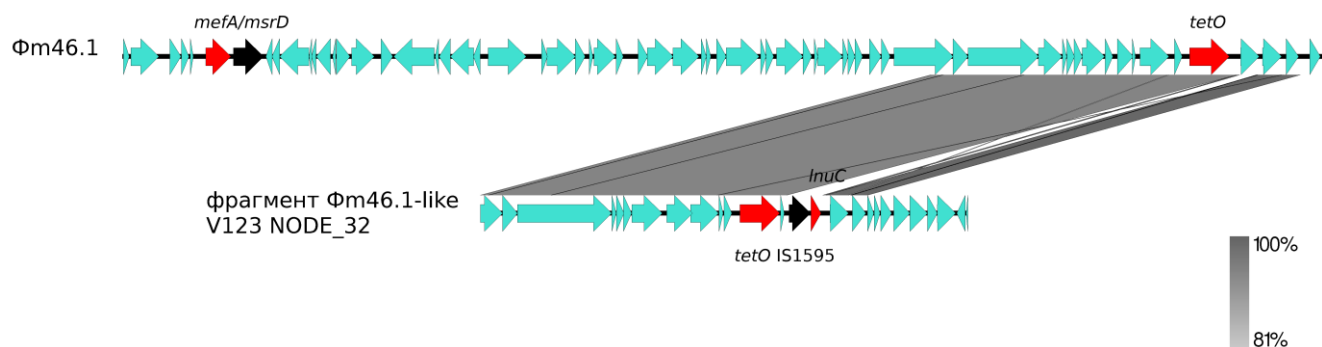


Рисунок 20 – Схема элемента Ф46.1 у штамма SDSE V123

Высокопроизводительное секвенирование штамма *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* B82

Среди 28 устойчивых к макролидам штаммов СГС/СГГ, наличие гена *ermB* и конститутивный тип устойчивости был обнаружен у 16 штаммов (Таблицы 16,17). У 15 из них были обнаружены и другие гены транспозона Tn6002.1, что позволило сделать вывод о наличии у данных штаммов полноразмерного транспозона Tn6002.1, содержащего ген *ermB*. Один штамм (B82) не содержал генов, ассоциированных с присутствием транспозона Tn6002.1, поэтому был выбран для полногеномного секвенирования с целью определения генетических детерминант, ответственных за формирование резистентного фенотипа.

В результате анализа последовательности штамма SDSE B82 удалось установить, что ген *ermB*, расположенный на контиге №3 (131,7 т.п.н.) входит в состав конъюгативного транспозона (ICE) размером 56,6 т.п.н. Данный элемент отсутствовал у других представителей SDSE, представленных в базе NCBI, но имел частичное сходство с транспозоном, обнаруженным ранее у штамма SDSE WCHSDSE-1, обусловившим вспышку фарингита в Китае в 2013 г. среди 30

медработников [194]. Транспозон, похожий на те, что обнаружены у штаммов SDSE B82 и WCHSDSE-1, найден в геноме штамма *Filifactor alocis* ATCC 35896 (грамположительного анаэробного микроорганизма, способного вызывать заболевания периодонта) [15]. Однако на месте *ermB* гена в штаммах SDSE, у *F. alocis* ATCC 35896 располагается последовательность длиной 14.1 т.п.н., содержащая ген устойчивости к тетрациклину *tetM* (Рисунок 21).

Обнаруженный в штамме B82 элемент является конъюгативным транспозоном, так как содержит гены, кодирующие сайт-специфическую рекомбиназу, релаксазу (*nicK*), точку начала репликации (*oriT*; ACCCCCCGTATCTAACAGGGGGGGT (инвертированные повторы выделены), идентичную хорошо изученному ориджину репликации конъюгативного транспозона Tn916, а также ген, кодирующий белок конъюгативного переноса (*traE*). В элементе присутствуют три гена, кодирующие рекомбиназы, расположенные друг за другом.

Сравнительный анализ с последовательностями других геномов SDSE позволил установить границы и место интеграции транспозона. Обнаруженный в штамме B82 транспозон был интегрирован в участок некодирующей ДНК между двумя гипотетическими открытыми рамками считывания (locus tags GGS_0498 и GGS_0499 в штамме RE378; SDSE167_0576 и SDSE167_0577 в штамме 167; SDEG_0522 и SDEG_0523 в штамме GGS_124). Наличие прямого повтора длиной 3 нуклеотида, фланкирующего транспозон, является доказательством его мобильности.

В контиге №42 у штамма B82 впервые у SDSE выявлен ген *tetT* *S. pyogenes* (гомология 99%), который, однако, не обеспечивал устойчивость штамма к действию тетрациклина.

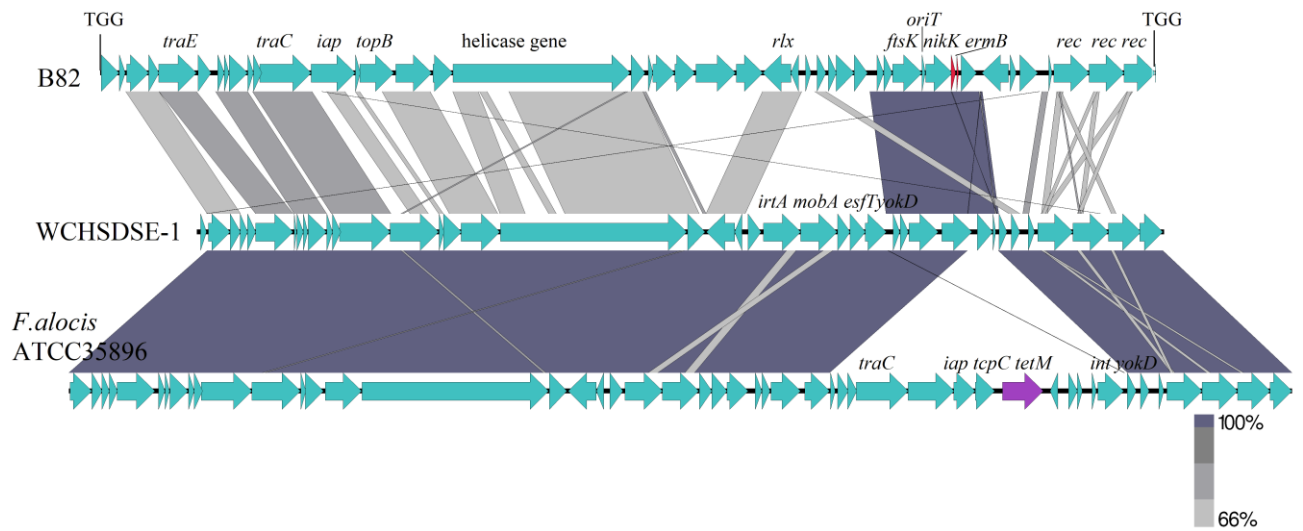


Рисунок 21 – Схема элемента ICE-B82 у штамма SDSE B82

Примечания: *traE* – ген, кодирующий белок конъюгативного переноса, *nikK* – ген релаксазы, *oriT* – точка начала репликации, *ftsK* – ген транслоказы, *rec* – ген рекомбиназы

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выявленный в данном исследовании уровень обсемененности верхних дыхательных путей стрептококками серологических групп А, С и G у детей во Вьетнаме (9,7%) согласуется с ранее опубликованными данными об уровне носительства в разных странах, составляющем 10-12% [165]. При этом, в отличие от многих регионов мира, во Вьетнаме условно-патогенные стрептококки серогрупп С и G высевались в 1,5 раза чаще патогенных стрептококков группы А. Такая тенденция характерна также для коренного населения Австралии и жителей полуострова Индостан [125]. Хотя по-прежнему тонзиллиты и фарингиты гораздо чаще ассоциированы с СГА, высокий уровень колонизации носоглотки СГС/СGG у детей во Вьетнаме позволяет оценить клиническую и эпидемиологическую важность этих возбудителей.

При анализе видового состава СГС/СGG в верхних дыхательных путях вьетнамских детей были обнаружены представители трех филогенетических групп: *anginosus*, *mitis*, *pyogenes*. Самой многочисленной оказалась группа *anginosus* (57 штаммов *S. anginosus*, 5 штаммов *S. constellatus*), представители которой часто в норме колонизируют респираторный, урогенитальный и желудочно-кишечный тракты человека. Стоит отметить, что с помощью предложенного ранее метода дифференцировки стрептококков различных видов на основе особенностей строения гена *srpB0* не удалось установить вид 12 штаммов из этой группы, что свидетельствует об ограниченной эффективности данного подхода.

Наше исследование подтвердило наличие региональных особенностей и большое разнообразие в перечне *emm* типов, циркулирующих в странах с тропическим климатом [164, 168]. Среди популяции вьетнамских штаммов было обнаружено 15 *emm*-подтипов среди 47 штаммов, включая редкие подтипы *emm104.0* и *emm109.1*. При сравнении 11 *emm*-типов, выявленных в данном исследовании, с 8 *emm*-типами, выявленным в ходе исследования в Тайване, общими оказались 4 *emm* типа (*emm12*, *emm4*, *emm22*, *emm89*), к которым принадлежали 40,5% вьетнамских штаммов [196]. Из 46 *emm*-подтипов,

выделенных в 2005-2007 гг. на Фиджи, только штаммы *emm44.0* и *emm58.0* генотипов были обнаружены во Вьетнаме [168]. Общими для Эфиопии и Вьетнама оказались типы *emm12*, *emm22* и *emm75.1*: к ним принадлежали 25,5% вьетнамских штаммов [102, 183]. В нескольких провинциях Вьетнама (Куанг Чи, Хай Фонг, Хоа Бинь, Тхай Нгуен) были выделены штаммы *S. pyogenes*, относящиеся к одной клональной линии *emm12* генотипа. В данной работе были изучены возможные генетические механизмы, обусловившие эпидемический характер распространения этого клона.

Поскольку большинство разрабатываемых вакцин эффективны в отношении *S. pyogenes* определенных *emm*-типов, данные о циркулирующих генотипах имеют большое практическое значение [193, 173]. Отсутствие на данный момент надежной вакцины против *S. pyogenes* делает антибиотики основным средством борьбы со стрептококковыми инфекциями.

Наблюдаемый с течением времени рост значений минимальных подавляющих концентраций различных групп антибиотиков в отношении стрептококков свидетельствует об изменениях, происходящих в популяции и требует проведения постоянного надзора за резистентностью [95, 101, 188]. Настоящее исследование показало, что ванкомицин и цефалоспорины III-IV поколения являются наиболее активными препаратами *in vitro* в отношении протестированных штаммов. Учитывая побочные действия ванкомицина и его широкий спектр действия на представителей нормальной микрофлоры, его применение оправдано лишь при генерализованных формах стрептококковых инфекций. Согласно многоцентровым исследованиям, уровень устойчивости к фторхинолонам среди СГА и СГС/СГГ в Северной Америке, Европе, Индии и России составляет менее 1% [100, 177]. В настоящей работе штаммы СГА отличались выраженной устойчивостью к фторхинолонам (около 35%). По отношению к СГС/СГГ, выделенным во Вьетнаме, фторхинолоны проявили большую активность.

Серьезной проблемой для здравоохранения стало значительное увеличение уровня устойчивости стрептококков к макролидам в некоторых странах, поскольку

антибиотики данного класса широко применяются в клинической практике. У стрептококков гены устойчивости к макролидам и линкозамидам ассоциированы с МГЭ, а распространение антибиотикоустойчивости происходит либо путем клональной экспансии, либо путем горизонтального генетического переноса [141, 189]. Так, эпидемиологический надзор в Испании и Португалии с середины 90-х годов показал, что устойчивая к эритромицину популяция СГА является высоко клональной [132, 141, 170]. Хотя такие клональные вспышки могут оказывать быстрое и серьезное воздействие на показатели резистентности, увеличиваясь с 2 до 20% за год, долгосрочные последствия этих вспышек часто незначительны. С постепенным приобретением специфического иммунитета у населения в целом вспышка обычно затихает [132]. Несмотря на то, что в конце 90-х годов уровень резистентности к эритромицину в Португалии и Испании составлял приблизительно 30%, проблема почти исчезла, и в настоящее время в Португалии уровень устойчивости составляет менее 5% [23, 72]. Во всех отчетах о национальном эпиднадзоре в странах Северной Европы за последние пять лет зафиксированы низкие показатели устойчивости к антибиотикам MLS_B среди СГА, что указывает на то, что появление новых устойчивых клонов является редким событием в этом регионе [56, 138, 178]. Обратная ситуация наблюдается в Юго-Восточной Азии, где резкое увеличение числа случаев заболеваний скарлатиной в 2011 г. было обусловлено распространением СГА *emm12* генотипа с сMLS типом лекарственной устойчивости [204]. Особенностью этих штаммов является приобретение ими двух мобильных генетических элементов: интегративно-конъюгативного элемента ICE-*emm12* (64,9 т.п.н.), содержащего гены устойчивости к эритромицину и тетрациклину, и бактериофага (46,4 т.п.н.), кодирующего стрептококковые суперантигены (SSA и SpeC) и ДНКазу Spd1 [106, 144, 153]. В нашем исследовании мы обнаружили, что устойчивость к эритромицину (28,3%) и клиндамицину (26,0%) у СГА во Вьетнаме почти исключительно связана со штаммами *emm12* генотипа, филогенетически родственными эпидемичному клону, ассоциированному со вспышками скарлатины в Китае, Гонконге, Тайване и Японии [204, 201] (Таблица 14). Полногеномное

секвенирование одного из *ermB*-содержащих штаммов СГА *emm12* генотипа, выделенного во Вьетнаме, выявило наличие у него сходного интегративно-конъюгативного элемента ICE-*emm12* и бактериофага ФНКУ.vir. Анализ оставшихся 13 штаммов СГА генотипа *emm12*, выделенных в различных провинциях Вьетнама, методом электрофореза в пульсирующем электрическом поле и ПЦР на маркерные гены выявил их клональную идентичность, подтверждая определенные эволюционные преимущества этого клона в результате приобретения МГЭ (Таблица 18).

Таблица 18 – Суммарные данные по генетической гетерогенности вьетнамских штаммов СГА, СГС и СГГ, содержащих детерминанты устойчивости к MLS_B препаратам

Генетический вариант	Паттерн PFGE	№ штамма*	<i>emm</i> -подтип	Детерминанты антибиотикоустойчивости
<i>S. pyogenes</i>				
1	П8	V31, V154, V193, V194, HF01, HF40 B56, HF124, T131, V171, V174	12.0	ICE <i>emm</i> -12 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
		HF136, HF149, HF166	12.22	
2	П9	B37	89.24	МГЭ не определен (предполагается наличие ICESp1116; <i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
3	П10	V36	58.0	МГЭ не определен (<i>mefO</i> , <i>msrD</i>)
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>				
1	Д1	V63	44.0	Tn3872/Tn6002 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
2	Д2	V123	<i>stG6</i>	Φ46.1var (<i>mefA</i> , <i>msrD</i> , <i>tetO</i>)
3	Д3	HF112	<i>stG480</i>	Tn3872/Tn6002 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)

4	Д4	T122	<i>stG4831</i>	MEGA (<i>mefE</i> , <i>msrD</i>)
5	Д5	HF196, B159, T201	<i>stC5345</i>	-
6	Д6	NT15	<i>stG480</i>	ΦNT15 (<i>mefG</i> , <i>msrD</i>)
7	Д7	B82	<i>st36.0</i>	ICE-B82 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
<i>S. anginosus</i>				
1	A1	V13	-	МГЭ не определен (<i>mefA</i> , <i>msrD</i> , <i>tetM</i>)
2	A2	B35, NT90	-	Tn6002.1 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
3	A3	HF165, T133, TN247	-	Tn6002.1 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
4	A4	V71	-	МГЭ не определен (<i>mefA</i> , <i>msrD</i> , <i>tetM</i>)
5	A5	HF13	-	Tn6002.1 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
6	A6	V128	-	Φ46.1var (<i>mefA</i> , <i>msrD</i> , <i>tetO</i>)
7	A7	HF228	-	МГЭ не определен, cMLS _B , <i>tetM</i>
8	A8	HF3, HF169	-	Tn6002.1 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
9	A9	V140	-	МГЭ не определен, cMLS _B , <i>tetM</i>
10	A10	TN244	-	Tn6002.1 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
11	A11	HF15	-	Tn6002.1 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
12	A12	HF238	-	МГЭ не определен, iMLS _B , <i>tetM</i>
13	A13	HF113	-	Tn6002.1 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
14	A14	HF147	-	Tn6002.1 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
15	A15	NT127	-	Tn6002.1 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
16	A16	NT118	-	МГЭ не определен (<i>mefG</i> , <i>msrD</i> , <i>tetM</i>)

Примечание: * Буквы в названии штаммов сообщают о регионе выделения

Риск глобального распространения вирулентного клона *emt12* генотипа из Юго-Восточной Азии указывает на необходимость проведения постоянного

молекулярно-эпидемиологического надзора за циркуляцией клонов-возбудителей стрептококковых заболеваний в различных географических регионах. Так, последние исследования клональной структуры СГА в Австралии указывают на появление вирулентного клона *emm12* генотипа в данном регионе [192]. Поэтому следующим этапом работы стал скрининг штаммов *S. pyogenes*, циркулирующих на территории России на присутствие ICE-*emm12*, содержащего гены устойчивости к эритромицину и тетрациклину, и бактериофага, кодирующего стрептококковые суперантигены (SSA и SpeC) и ДНКазу Spd1. В результате исследования элемент ICE-*emm12* был обнаружен лишь у 1 штамма *emm12* генотипа, выделенного в 2007 г. в Санкт-Петербурге, и у 1 штамма *emm88.2* генотипа, выделенного в 2008 г. в Москве. Бактериофаг ФНКУ.vir был обнаружен у 1 штамма *emm1* генотипа и у 1 штамма *emm12* генотипа, выделенных в Санкт-Петербурге. Появление этих элементов у штаммов *emm1* генотипа было ранее зафиксировано в Китае. Это событие сильно повлияло на структуру популяции и способствовало увеличению доли штаммов генотипа *emm1* с 3,8% в 2011 г. до 48,6% в 2014 г [50]. Таким образом, наличие элемента ICE-*emm12* у штамма *emm88.2* генотипа обнаружено нами впервые.

Стрептококки групп С и G, в особенности SDSE, в последние десятилетия стали важным этиологическим агентом инфекционных заболеваний человека. В то время как СГА, СГВ и пневмококки в некоторых странах находятся под национальным надзором, почти ни в одной из них не ведется мониторинг эпидемиологии SDSE на национальном уровне. Общественное здравоохранение Англии сообщает о ежегодных показателях резистентности β -гемолитических стрептококков, но представляет данные по СГС/СГГ без идентификации возбудителей на видовом уровне [152]. Кроме того, данные об антибиотикочувствительности доступны только для 60-70% изолятов, что создает риск необъективности отчетности. Тем не менее, значительный рост резистентности, наблюдаемый в Великобритании за последние десятилетия, обращает на себя внимание: с 13 до 40% и с 7 до 30% у стрептококков группы G к эритромицину и клиндамицину, соответственно. В Азии эти показатели

традиционно еще выше (более 50% в Тайване и Японии) [96, 117, 210]. Тестирование чувствительности вьетнамских штаммов СГС/СГГ к противомикробным препаратам выявило высокий уровень устойчивости к эритромицину (38,4%). По-видимому, эритромицин также, как и тетрациклин, к которому оказались устойчивы 52,0% штаммов СГС/СГГ, выделенных во Вьетнаме, нецелесообразно использовать в качестве препаратов выбора для лечения стрептококковых заболеваний во Вьетнаме.

Основываясь на ограниченном количестве данных относительно механизмов устойчивости к макролидам у СГС/СГГ, Kataja J. с соавт. было сделано предположение, что М тип лекарственной устойчивости является характерным для СГС, а MLS_B тип лекарственной устойчивости превалирует у СГГ [121]. Однако позже несколько штаммов СГГ с М типом лекарственной устойчивости были обнаружены в Северной Америке, Гонконге и Южной Корее. В нашем исследовании около половины вьетнамской популяции эритромицин-устойчивых штаммов СГГ содержали в своем геноме различные аллели гена *mef*, отвечающие за М тип лекарственной устойчивости (6 штаммов – *mefA*, 4 штамма – *mefE*, 1 штамм – *mefG*). Ген *ermB* был обнаружен у 13 штаммов СГГ с MLS_B типом лекарственной устойчивости.

Интересно, что в данной работе обнаружены гомологи МГЭ, ассоциированных с генами антибиотикоустойчивости, у разных видов СГС и СГГ. Так, элемент Tn6002.1 был обнаружен у 2 штаммов SDSE и 11 штаммов *S. anginosus* в различных геномных контекстах, о чем свидетельствует анализ рестрикционного полиморфизма их основного генома (Таблица 17). Генетический элемент MEGA (macrolide efflux genetic assembly) был обнаружен у штаммов видов *S. anginosus*, SDSE, *S. mitis*, *S. constellatus*, *S. parasanguis*, *S. gordonii*. В совокупности это может свидетельствовать о ключевой роли конъюгативного переноса в распространении устойчивости к антимикробным препаратам среди СГС и СГГ. Такой тип распространения устойчивости в меньшей степени подвержен влиянию коллективного иммунитета в популяции хозяина, и, следовательно, ей, вероятно, сложнее противостоять [110].

С помощью полногеномного секвенирования у трех штаммов SDSE были обнаружены новые мобильные генетические элементы, обеспечивающие устойчивость к антимикробным препаратам. В геноме SDSE NT15 был выявлен новый МГЭ фагового происхождения, названный ФНТ15, который помимо редко встречающегося гена устойчивости к эритромицину *mefG* содержал гены *lsaE* и *lnuB*, обеспечивающие устойчивость к линкозамидам – стрептограминам А – плевромутилинам (LSAP фенотип). Примечательно, что ранее детерминанты устойчивости *lsaE* и *lnuB* в тандеме были описаны у *S. agalactiae* и *S. suis*, и это первый случай их обнаружения у SDSE [88, 94]. Низкая степень гомологии, выявленная при сравнении данного профага (ФНТ15) с подобными элементами, указывает на продолжающиеся процессы перестройки фаговых модулей, которые вероятно способствуют их уклонению от системы иммунитета CRISPR-Cas [87, 126].

В 2019 году было опубликовано сообщение о первом изоляте *S. pyogenes* с фенотипом LSAP, который был выделен в Испании от больной целлюлитом в 2009 году. Последовательность, содержащая гены *lsaE-lnuB*, располагались на профаге длиной 39,6 т.п.н., интегрированном в хромосому в ген *rumA*, и эта структура не передавалась путем конъюгации [27]. С тех пор среди клинических изолятов *S. pyogenes* было идентифицировано лишь два штамма с детерминантами устойчивости к линкозамидам, один из которых был выделен в 2015 году в США (*lsaC* +; фенотип LSAP) [52], а другой в 2007 году в Испании (*lnuC* +; фенотип L) [28]. В последнем случае ген *lnuC* располагался на транспозоне MTnSag1 внутри ICESpn8140. Самостоятельно элемент MTnSag1 был описан ранее у *S. agalactiae* [10], а в нашем исследовании был обнаружен у штамма SDSE V123 в составе профага Ф46.1, который является главным элементом, обуславливающим М тип устойчивости к макролидам у *S. pyogenes*, что еще раз указывает на горизонтальный перенос между этими видами.

Таким образом, гены вирулентности и гены устойчивости к антибиотикам зачастую оказываются расположенными на транспозонах, бактериофагах и других мобильных генетических элементах. В этом случае подходы для дифференцировки

штаммов, использующие только вариативность определенных генов, оказываются ограниченными. Для внутривидового типирования, оценки резистоста и патогенного потенциала штаммов успешно могут применяться методы NGS секвенирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование трех разных подходов (*emm*-типирования, PFGE и скрининга штаммов на присутствие различных детерминант антибиотикоустойчивости) выявило высокую степень генетической гетерогенности штаммов стрептококков групп А, С и G и наличие специфических генетических линий, характерных для Вьетнама (Таблица 17). Обнаружение штаммов определенной генетической линии в разных регионах страны дает основание предполагать, что эти клоны являются эпидемическими. Так, среди СГА, устойчивых к макролидам, к наиболее многочисленному генетическому варианту 1 относились 14 из 16 штаммов, которые, несмотря на разные регионы выделения, имели *emm12* генотип и характеризовались идентичным паттерном PFGE, фаговым профилем и фенотипом устойчивости к антибиотикам (Таблица 17). Штаммы этого же генетического варианта были ассоциированы со вспышками скарлатины, начавшимися в 2011 году в Китае, Гонконге и Тайване [185, 186, 204]. По-видимому, среди детей школьного возраста, проживающих во Вьетнаме, продолжается циркуляция этого эпидемического клона СГА, при том, что первое сообщение об увеличении частоты заболеваний скарлатиной на 40% было отмечено в 2009 году именно во Вьетнаме.

С помощью методов молекулярно-генетического типирования установлена высокая степень поликлональности популяции штаммов СГС и СGG при ограниченном числе МГЭ, участвующих в распространении генов устойчивости к антимикробным препаратам. Это позволяет предположить распространение устойчивости к антимикробным препаратам преимущественно путем конъюгативного переноса, а не клональной экспансии устойчивых штаммов у СГС/СGG. Высокий уровень резистентности штаммов СГС и СGG к макролидам и линкозамидам наряду с поликлональной природой резистентных изолятов представляет угрозу. Обнаружение в геноме условно-патогенных стрептококков многочисленных детерминант устойчивости к антибиотическим препаратам и свидетельств процесса их непрекращающейся эволюции указывает на то, что в

ближайшем будущем эти микроорганизмы приобретут еще большее клиническое значение.

Результаты проведенных исследований позволили оценить роль и место методов полногеномного секвенирования в структуре эпидемиологического надзора за возбудителями стрептококковых заболеваний. Секвенирование геномов бактерий дает возможность уточнить особенности их организации, связанные с патогенным потенциалом, оценить мобильную часть генома, в ряде случаев высказать предположение о географических регионах происхождения отдельных генетических линий возбудителя.

ВЫВОДЫ

1. Уровень обсемененности верхних дыхательных путей стрептококками групп А, С и G у детей младшего школьного возраста во Вьетнаме в период 2011-2014 гг. составил 9,7%. Среди стрептококков, выделенных во Вьетнаме, обнаружены представители трех филогенетических групп: *anginosus*, *mitis* и *ruogenes*. Условно-патогенные стрептококки серогрупп С и G встречаются в 1,5 раза чаще патогенных СГА.

2. Популяция штаммов СГА, циркулирующих во Вьетнаме, характеризуется высоким генетическим разнообразием. Среди штаммов СГА обнаружены редко встречающиеся *emm* генотипы (*emm104.0*, *emm109.1*).

3. Высокий уровень устойчивости к макролидам, линкозамидам у СГА во Вьетнаме является результатом широкого распространения резистентного клона генотипа *emm12*.

4. Выделенные во Вьетнаме штаммы СГА *emm12* генотипа филогенетически родственны эпидемичному клону, изолированному при вспышках стрептококковой инфекции в странах азиатского региона (Китае, Тайване, Японии). Распространение данного клона среди популяции СГА, выделенных в Юго-Восточной Азии обусловлено приобретением ICE *emm-12* и бактериофага ФНКУ.vir.

5. Вьетнамская популяция резистентных СГС и СGG, характеризуется значительным филогенетическим разнообразием. Распространение устойчивости к макролидам и линкозамидам у СГС и СGG происходит преимущественно путем конъюгативного переноса МГЭ, а не клонального распространения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные в результате исследования данные указывают на то, что условно-патогенные стрептококки подвержены многочисленным генетическим перестройкам, включая приобретение мобильных генетических элементов, содержащих гены антибиотикорезистентности. Учитывая возникшую угрозу распространения устойчивости к антимикробным препаратам среди патогенных стрептококков, требуются эпидемиологические наблюдения за популяцией β -гемолитических стрептококков, в особенности, за штаммами SDSE.

Перспективным представляется применение экспресс-методов видовой идентификации стрептококков группы С и G с одновременным определением генов устойчивости к макролидам и линкозамидам на основе ПЦР.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

При сравнении мобильных генетических элементов, ассоциированных у СГА, СГС и СGG с устойчивостью к макролидам и линкозамидам, с базой данных NCBI, гомологи этих МГЭ были обнаружены также у видов *Streptococcus agalactiae* и *Filifactor alocis*, что поднимает вопрос об их происхождении. Таким образом, крайне перспективным может оказаться изучение основных природных резервуаров таких МГЭ, а также изучение потенциальных факторов, влияющих на частоту их конъюгативного переноса.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- СГА, СГВ, СГС, СГГ – Стрептококки группы А, В, С, G
- SDSE – *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*
- МГЭ – Мобильный генетический элемент
- ICE – Интегративно-конъюгативный элемент
- IS – Инсерционная последовательность
- TE – внутриклеточные МГЭ (transposable elements)
- MLST – Метод мультилокусного секвенирования
- PFGE – Электрофорез в пульсирующем электрическом поле
- RAPD – Избирательная амплификация полиморфных участков ДНК
- MLS_B – макролиды, линкозамиды и стрептограмин В
- iMLS_B – Индуцибельная устойчивость к клиндамицину (линкозамиду) у штаммов с MLS_B типом устойчивости
- sMLS_B – Конститутивная устойчивость к клиндамицину (линкозамиду) у штаммов с MLS_B типом устойчивости
- SSA – Суперантигены стрептококков
- ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота
- МПК – Минимальная подавляющая концентрация
- ОРЛ – Острая ревматическая лихорадка
- СТШ – Синдром токсического шока
- ИСИ – Инвазивная стрептококковая инфекция
- РК - Ревмокардит
- ПЦР – Полимеразная цепная реакция
- ORF – открытая рамка считывания
- рРНК – Рибосомная рибонуклеиновая кислота
- SNP – Однонуклеотидная мутация
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ДДМ – диско-диффузионный метод
- WGS – полногеномное секвенирование

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов, А.А. Стрептококки и пневмококки / А.А. Баранов, Н.И. Брико, Л.С. Намазова-Баранова, Л.А. Ряпис. - Ростов-на-Дону: Феникс, 2013. - 302 с. - ISBN 978-5-222-21027-7.
2. Брико, Н.И. Инвазивная стрептококковая (группы А) инфекция: взгляд на проблему / Н.И. Брико, Н.А. Малышев, В.И. Покровский // Терапевтический архив. - 2005. - Т. 77, № 11. - С. 10-14.
3. Ильясов, Ю.Ю. Метод дифференциальной ПЦР-идентификации стрептококков групп С и G / Ю.Ю. Ильясов, I. Biswas, А.А. Тотолян, А.В. Дмитриев // Клиническая лабораторная диагностика. - 2011. - № 2. - С. 40-43.
4. Клейменов, Д.А. Стрептококковая (группы А) инфекция в РФ: характеристика эпидемиологических детерминант и оценка современных масштабов проблемы / Д.А. Клейменов, Н.И. Брико, А.В. Аксенова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2011. - Т. 2, № 57. - С. 4-11.
5. Козлов, Р.С. Клиническая микробиология / Р.С. Козлов // Антимикробная химиотерапия. - 2006. - Т. 8, № 1. - С. 33-47.
6. Павлова, Н.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика стрептококковой инфекции (скарлатины, ангины) у детей в современных условиях: автореферат диссертации кандидата биологических наук: 14.01.09 / Павлова Наталья Валерьевна. - Санкт-Петербург, 2011. - 23 с.
7. Полякова, Е.М. Ранее не обнаруженный транспозон штаммов *Streptococcus pyogenes*, устойчивых к действию тетрациклина / Е.М. Полякова, А.В. Дмитриев // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования. - 2011. - Т. 3, № 3. - С. 68-73.
8. Тотолян А.А. Прошлое и настоящее *Streptococcus pyogenes*: некоторые факторы патогенности и их генетическое детерминирование // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2015. - Т. 70. - №1. - С. 63-69.
9. Тотолян А.А. Fc-рецепторные белки *Streptococcus pyogenes* и патогенез постинфекционных осложнений (критический обзор) / А.А. Тотолян, Л.А. Бурова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. -2014. -№ 3. - С. 78–91.
10. Achard, A. Characterization of a small mobilizable transposon, MTnSag1, in *Streptococcus agalactiae* / A. Achard, R. Leclercq // Journal of Bacteriology. - 2007. - Vol. 189, № 11. - P. 4328-4331.
11. Ahmad, Y. Genetic Relationships Deduced from emm and Multilocus Sequence Typing of Invasive *Streptococcus dysgalactiae* subsp *equisimilis* and *S.-canis* Recovered from Isolates Collected in the

- United States / Y. Ahmad, R.E. Gertz, Z.Y. Li et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2009. - Vol. 47, № 7. - P. 2046-2054.
12. Alhamoud, M.A. Comprehensive Review Study on Glomerulonephritis Associated With Post-streptococcal Infection / M.A. Alhamoud, I.Z. Salloom, S.S. Mohiuddin et al. // *Cureus*. - 2021. - Vol. 13, № 12. - P. e20212.
 13. Amezaga, M.R. Molecular epidemiology of macrolide resistance in beta-haemolytic streptococci of Lancefield groups A, B, C and G and evidence for a new *mef* element in group G streptococci that carries allelic variants of *mef* and *msr(D)* / M.R. Amezaga, H. McKenzie // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2006. - Vol. 57, № 3. - P. 443-449.
 14. Aminov, R.I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins / R.I. Aminov, N. Garrigues-Jeanjean, R.I. Mackie // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2001. - Vol. 67, № 1. - P. 22-32.
 15. Aruni, A.W. et al. Filifactor alocis - a new emerging periodontal pathogen / A.W. Aruni, A. Mishra, Y. Dou et al. // *Microbes and Infection*. - 2015. - Vol. 17, № 7. - P. 517-530.
 16. Asam, D. Molecular pathogenicity of *Streptococcus anginosus* / D. Asam, B. Spellerberg // *Molecular Oral Microbiology*. - 2014. - Vol. 29, № 4. - P. 145-155.
 17. Avire, N.J. A review of streptococcus pyogenes: Public health risk factors, prevention and control / N.J. Avire, H. Whiley, K. Ross // *Pathogens*. - 2021. - Vol. 10, № 2. - P. 248.
 18. Aziz, R.K. Rise and persistence of global MIT1 clone of *Streptococcus pyogenes* / R.K. Aziz, M. Kotb // *Emerging Infectious Diseases*. - 2008. - Vol. 14, № 10. - P. 1511-1517.
 19. Babiker, A. Effectiveness of adjunctive clindamycin in β -lactam antibiotic-treated patients with invasive β -haemolytic streptococcal infections in US hospitals: a retrospective multicentre cohort study / A. Babiker, X. Li, Y.L. Lai et al. // *Lancet Infectious Diseases*. - 2021. - Vol. 21, № 5. - P. 697-710.
 20. Baldassarri, L. Detection of genes encoding internalization-associated proteins in *Streptococcus pyogenes* isolates from patients with invasive diseases and asymptomatic carriers / L. Baldassarri, R. Creti, M. Imperi et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2007. - Vol. 45, № 4. - P. 1284-1287.
 21. Banks, D.J. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence / D.J. Banks, S.B. Beres, J.M. Musser // *Trends in Microbiology*. - 2002. - Vol. 10, № 11. - P. 515-521.
 22. Baracco, G.J. Infections Caused by Group C and G *Streptococcus* (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and Others): Epidemiological and Clinical Aspects / G.J. Baracco // *Microbiology Spectrum*. - 2019. - Vol. 7, № 2.

23. Barros, R.R. Antimicrobial resistance among beta-hemolytic *Streptococcus* in Brazil: An overview / R.R. Barros // *Antibiotics*. - 2021. - Vol. 10, № 8. - P. 973.
24. Becker, W.C. The necessity of a standard blood-agar plate for the determination of hemolysis by streptococci / W.C. Becker // *The Journal of Infectious Diseases*. - 1916. - Vol. 19, № 6. - P. 754-759.
25. Ben Zakour, N.L. Transfer of scarlet fever-associated elements into the group A *Streptococcus* MIT1 clone / N.L. Ben Zakour, M.R. Davies, Y. You et al. // *Scientific Reports*. - 2015. - Vol. 5, № 1. - P. 15877.
26. Bentley, R.W. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences / R.W. Bentley, J.A. Leigh, M.D. Collins // *International Journal of Systematic Bacteriology*. - 1991. - Vol. 41, № 4. - P. 487-494.
27. Berbel, D. A novel genomic island harbouring *lsa(E)* and *lnu(B)* genes and a defective prophage in a *Streptococcus pyogenes* isolate resistant to lincosamide, streptogramin A and pleuromutilin antibiotics / D. Berbel, J. Càmara, E. García et al. // *International Journal of Antimicrobial Agents*. - 2019. - Vol. 54, № 5. - P. 647-651.
28. Berbel, D. Deciphering mobile genetic elements disseminating macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* over a 21 year period in Barcelona, Spain / D. Berbel, J. Càmara, A. González-Díaz et al. // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2021. - Vol. 76, № 8. - P. 1991-2003.
29. Beres, S.B. Molecular genetic anatomy of inter- and intraserotype variation in the human bacterial pathogen group A *Streptococcus* / S.B. Beres et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2006. - Vol. 103, № 18. - P. 7059-64.
30. Beres, S.B. Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome / S.B. Beres, J.M. Musser // *PLoS One*. - 2007. - Vol. 2, № 8. - P. e800.
31. Beres, S.B. Genome-wide molecular dissection of serotype M3 group A *Streptococcus* strains causing two epidemics of invasive infections / S.B. Beres, G.L. Sylva, D.E. Sturdevant et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2004. - Vol. 101, № 32. - P. 11833-11838.
32. Bert, F. Analysis of genetic relationships among strains of groups A, C and G streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis / F. Bert, B. Picard, C. Branger et al. // *Journal of Medical Microbiology*. - 1996. - Vol. 45, № 4. - P. 278-284.
33. Bessen, D.E. Contrasting molecular epidemiology of group A streptococci causing tropical and nontropical infections of the skin and throat / D.E. Bessen, J.R. Carapetis, B. Beall et al. // *Journal of Infectious Diseases*. - 2000. - Vol. 182, № 4. - P. 1109-1116.

34. Bessen, D.E. Molecular Epidemiology, Ecology and Evolution of Group A Streptococci / D.E. Bessen, P.R. Smeesters, B.W. Beall // *Microbiology Spectrum*. - 2018. - Vol. 6, № 5.
35. Bingen, E. Emergence of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in French children / E. Bingen, P. Bidet, L. Mihaila-Amrouche et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2004. - Vol. 48, № 9. - P. 3559-3562.
36. Blake, A.S. Toxins and superantigens of group A streptococci / A.S. Blake, K.M. John, P.M. Schlievert // *Microbiology Spectrum*. - 2019. - Vol. 7, № 1.
37. Bland, E.F. Rheumatic fever: the way it was / E.F. Bland // *Circulation*. - 1987. - Vol. 76, № 6. - P. 1190-1195.
38. Blandino, G. *Streptococcus pyogenes* emm types and subtypes of isolates from paediatric asymptomatic carriers and children with pharyngitis / G. Blandino, S. Puglisi, A. Speciale et al. // *New Microbiologica*. - 2011. - Vol. 34, № 1. - P. 101-104.
39. Bowen, A.C. The Global Epidemiology of Impetigo: A Systematic Review of the Population Prevalence of Impetigo and Pyoderma / AC. Bowen, A. Mahé, R.J. Hay et al. // *PLoS One*. - 2015. - Vol. 10, № 8. - P. e0136789.
40. Brenciani, A. Φ m46.1, the main *Streptococcus pyogenes* element carrying *mef(A)* and *tet(O)* genes / A. Brenciani, A. Bacciaglia, C. Vignaroli et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2010. - Vol. 54, № 1. - P. 221-229.
41. Brenciani, A. Genetic determinants and elements associated with antibiotic resistance in viridans group streptococci / A. Brenciani, E. Tiberi, E. Tili et al. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2014. - Vol. 69, № 5. - P. 1197-1204.
42. Brook, I. Failure to eradicate streptococci and beta-lactamase producing bacteria / I. Brook, A.E. Gobar // *Acta Paediatrica*. - 2008. - Vol. 97, № 2. - P. 193-195.
43. Broyles, L.N. Population-Based Study of Invasive Disease Due to beta-Hemolytic Streptococci of Groups Other than A and B / L.N. Broyles, C. Van Beneden, B. Beall et al. // *Clinical Infectious Diseases*. - 2009. - Vol. 48, № 6. - P. 706-712.
44. Brussow, H. Phages and the evolution of bacterial pathogens: From genomic rearrangements to lysogenic conversion / H. Brussow, C. Canchaya, W.D. Hardt // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. - 2004. - Vol. 68, № 3. - P. 560-602.
45. Carapetis, J.R. The global burden of group A streptococcal diseases / J.R. Carapetis, A.C. Steer, E.K. Mulholland et al. // *Lancet Infectious Diseases*. - 2005. - Vol. 5, № 11. - P. 685-694.
46. Casey, J.R. Selecting the optimal antibiotic in the treatment of group A beta-hemolytic streptococci pharyngitis / J.R. Casey // *Clinical Pediatrics*. - 2007. - Vol. 46, № 4. - P. 25S-35S.
47. Cattoir V. Mechanisms of *Streptococcus pyogenes* Antibiotic Resistance. 2022 Sep 19 [updated 2022 Oct 9]. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes: Basic*

- Biology to Clinical Manifestations [Internet]. 2nd ed. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2022 Oct 8. Chapter 30. PMID: 36479762.
48. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Streptococcus pyogenes emm sequence database. Protocol for emm typing. Available from: http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emmtype.htm. Accessed 12 October 2009.
 49. Chalker, V. Genome analysis following a national increase in scarlet fever in England 2014 / V. Chalker, A. Jironkin, J. Coelho et al. // BMC Genomics. - 2017. - Vol. 18, № 1. - P. 224.
 50. Chen, M. Increase of emm1 isolates among group A *Streptococcus* strains causing scarlet fever in Shanghai, China / M. Chen, J. Cai, M.R. Davies et al. // International journal of infectious diseases. - 2020. - Vol. 98. - P. 305-314.
 51. Chen, M. Outbreak of scarlet fever associated with emm12 type group A *Streptococcus* in 2011 in Shanghai, China / M. Chen, W. Yao, X. Wang et al. // The Pediatric Infectious Disease Journal. - 2012. - Vol. 31, № 9. - P. e158-162.
 52. Chochua, S. Population and whole genome sequence based characterization of invasive group A streptococci recovered in the United States during 2015 / S. Chochua, B.J. Metcalf, Z. Li et al. // mBio. - 2017. - Vol. 8, № 5. - P. e01422-17.
 53. Cocuzza, C.E. Prevalence of the internalization-associated gene prtF1 in a bacterial population of *Streptococcus pyogenes* isolated from children with acute pharyngotonsillitis before and after antibiotic therapy / C.E. Cocuzza, A. Lanzafame, F. Sisto et al. // Microbial Drug Resistanc. - 2004. - Vol. 10, № 3. - P. 264-268.
 54. Cunningham, M.W. Pathogenesis of group A streptococcal infections / M.W. Cunningham // Clinical Microbiology Reviews. - 2000. - Vol. 13, № 3. - P. 470-511.
 55. Danchin, M. H. Burden of acute sore throat and group A streptococcal pharyngitis in school-aged children and their families in Australia / M. H. Danchin, S. Rogers, L. Kelpie et al. // Pediatrics. - 2007. - Vol. 120, № 5. - P. 950-957.
 56. DANMAP (2017). Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Food and Humans in Denmark. Lyngby: Technical University of Denmark⁵⁶.
 57. Darenberg, J. Increased incidence of invasive group A streptococcal infections in Sweden, January 2012-February 2013 / J. Darenberg, B. Henriques-Normark, T. Lepp et al. // Euro surveillance. - 2013. - Vol. 18, № 14. - P. 9-13.
 58. Davies, M.R. Emergence of Scarlet Fever *Streptococcus pyogenes* emm12 clones in Hong Kong is associated with toxin acquisition and multidrug resistance / M.R. Davies, M.T. Holden, P. Coupland et al. // Nature Genetics. - 2015. - Vol. 47, № 1. - P. 84-87.

59. Davies, M.R. Atlas of group A streptococcal vaccine candidates compiled using large-scale comparative genomics. / M.R. Davies, L. McIntyre, A. Mutreja et al. // *Nature Genetics*. - 2019. - Vol. 51, № 6. - P. 1035-1043.
60. Del Grosso M, The *mefE*-carrying genetic element (mega) of *Streptococcus pneumoniae*: Insertion sites and association with other genetic elements. / M. Del Grosso, R. Camilli, F. Iannelli et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2006. - Vol. 50, № 10. - P. 3361-3366.
61. Demczuk, W. Identification of *Streptococcus pyogenes* M1UK clone in Canada. / W. Demczuk, I. Martin, F.R. Domingo et al. // *Lancet Infectious Diseases*. - 2019. - Vol. 19, № 12. - P. 1284-1285.
62. Dingle, Y. Molecular characteristics of *Streptococcus pyogenes* isolated from Chinese children with different diseases / Y. Dingle, L. Yunmei, L. Qinghua et al. // *Frontiers in Microbiology*. - 2021. - Vol. 12. - P. 722225.
63. DiPersio, L.P. Identification and characterization of plasmid-borne *erm(T)* macrolide resistance in group B and group A *Streptococcus* / L.P. DiPersio, J.R. DiPersio, J.A. Beach et al. // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. - 2011. - Vol. 71, № 3. - P. 217-223.
64. Dmitriev, A. *cpn60* gene based multiplex-PCR assay for simultaneous identification of streptococcal species / A. Dmitriev, M. Bhide, I. Mikula // *Acta Veterinaria Brno*. - 2006. - Vol. 75, № 2. - P. 235-240.
65. Elliott, J. Sudden increase in isolation of group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulsed-field gel electrophoresis type / J.A. Elliott, K.D. Farmer, R.R. Facklam // *J Clin Microbiol*. - 1998. Vol. 36, №7. - P. 2115-6.
66. Ertugrul, B.M. Food-borne tonsillopharyngitis outbreak in a hospital cafeteria / B.M. Ertugrul, N. Erol, M. Emek et al. // *Infection*. - 2012. - Vol. 40, № 1. - P. 49-55.
67. Facinelli, B. Association between erythromycin resistance and ability to enter human respiratory cells in group A streptococci / B. Facinelli, C. Spinaci, G. Magi et al. // *Lancet*. - 2001. - Vol. 358, № 9275. - P. 30-33.
68. Facklam, R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes / R. Facklam // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2002. - Vol. 15, № 4. - P. 613-630.
69. Felmingham, D. Surveillance of resistance in bacteria causing community-acquired respiratory tract infections / D. Felmingham, C. Feldman, W. Hryniewicz et al. // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2002. - Vol. 8, Suppl. 2. - P. 12-42.
70. Felmingham, D. The Alexander Project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections / D. Felmingham, R.N. Gruneberg // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2000. - Vol. 45, № 2. - P. 191-203.

71. Feng, L.J. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* from Chinese pediatric patients in association with Tn916 transposons family over a 16-year period / L.J. Feng, H.R. Lin, Y.L. Ma et al. // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. - 2010. - Vol. 67, № 4. - P. 369-375.
72. Friaes, A. Changes in emm types and superantigen gene content of *Streptococcus pyogenes* causing invasive infections in Portugal / A. Friaes, J. Melo-Cristino, M. Ramirez et al. // *Scientific reports*. - 2019. - Vol. 9, № 1. - P. 18051.
73. Frost, H.R. Updated emm-typing protocol for *Streptococcus pyogenes* / H.R. Frost, M.R. Davies, S. Velusamy et al. // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2020. - Vol. 26, № 7. - P. 946.e5-946.e8.
74. Gajdács, M. Beta-haemolytic group A, C and G streptococcal infections in southern Hungary: A 10-year population-based retrospective survey (2008–2017) and a review of the literature / M. Gajdács, M. Ábrók, A. Lázár et al. // *Infection and Drug Resistance*. - 2020. - Vol. 13. - P. 4739-4749.
75. Gajic, I. Typing of macrolide resistant group A streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis / I. Gajic, V. Mijac, M. Stanojevic et al. // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. - 2014. - Vol. 18, № 19. - P. 2960-2965.
76. Gardy, J.L. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system / J.L. Gardy, N.J. Loman // *Nature Reviews. Genetics*. - 2018. - Vol. 19, № 1. - P. 9-20.
77. Garnier, F. Identification of clinically relevant viridans group streptococci to the species level by PCR / F. Garnier, G. Gerbaud, P. Courvalin et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1997. - Vol. 35, № 9. - P. 2337-2341.
78. Geyer, A. Genetic organisation of the M protein region in human isolates of group C and G streptococci: two types of multigene regulator-like (mgrC) regions / A. Geyer, K.H. Schmidt // *Molecular and General Genetics*. - 2000. - Vol. 262, № 6. - P. 965-976.
79. Gherardi, G. Genetic diversity and virulence properties of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* from different sources / G. Gherardi, M. Imperi, C. Palmieri et al. // *Journal of Medical Microbiology*. - 2014. - Vol. 63, Pt. 1. - P. 90-98.
80. Gherardi, G. Decline in macrolide resistance rates among *Streptococcus pyogenes* causing pharyngitis in children isolated in Italy / G. Gherardi, D. Petrelli, M.C. Di Luca et al. // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. - 2015. - Vol. 34, № 9. - P. 1797-1802.
81. Gladstone, R.A. International genomic definition of pneumococcal lineages, to contextualise disease, antibiotic resistance and vaccine impact / R.A. Gladstone, S.W. Lo, J.A. Lees et al. // *EBioMedicine*. - 2019. - Vol. 43. - P. 338-346.
82. González-Abad, M.J. Invasive *Streptococcus pyogenes* infections (2011-2018): emm-type and clinical presentation / M.J. González-Abad, M. Alonso Sanz // *Anales de Pediatría (English Edition)*. - 2020. - Vol. 92, № 6. - P. 351-358.

83. Gorton, D. Presence of fibronectin-binding protein gene prtF2 in invasive group A streptococci in tropical Australia is associated with increased internalisation efficiency / D. Gorton, R. Norton, R. Layton et al. // *Microbes and Infection*. - 2005. - Vol. 7, № 3. - P. 421-426.
84. Granizo, J.J. Streptococcus pyogenes resistance to erythromycin in relation to macrolide consumption in Spain (1986-1997) / J.J. Granizo, L. Aguilar, J. Casal et al. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2000. - Vol. 46, № 6. - P. 959-964.
85. Grivea, I.N. Emm Types and clusters and macrolide resistance of pediatric group A streptococcal isolates in Central Greece during 2011-2017 / I.N. Grivea, G.A. Syrogiannopoulos, A.N. Michoula et al. // *PLoS One*. - 2020. - Vol. 15, № 5. - P. e0232777.
86. Guy, R. Increase in scarlet fever notifications in the United Kingdom, 2013/2014 / R. Guy, C. Williams, N. Irvine et al. // *Euro surveillance*. - 2014. - Vol. 19, № 12. - P. 20749.
87. Hampton, H.G. The arms race between bacteria and their phage foes. / H.G. Hampton, B.N.J. Watson, P.C. Fineran // *Nature*. - 2020. - Vol. 577, № 7790. - P. 327-336.
88. Hawkins, P.A. Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A and pleuromutilins in Streptococcus agalactiae isolates from the USA / P.A. Hawkins, C.S. Law, B.J. Metcalf et al. // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2017. - Vol. 72, № 7. - P. 1886-1892.
89. Hayes, A. Restricted Sequence Variation in Streptococcus pyogenes Penicillin Binding Proteins / A. Hayes, J.A. Lacey, J.M. Morris et al. // *mSphere*. - 2020. - Vol. 5, № 2. - P. e00090-20.
90. Hoa, T.T.M. , Damarwan J, Le CS. Prevalence of the rheumatic diseases in urban Vietnam: A WHO-ILAR COPCORD study / T.T.M. Hoa, J. Damarwan, C.S. Le et al. // *Journal of Rheumatology*. - 2003. - Vol. 30, № 10. - P. 2252-2256.
91. Hoban, D.J. Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999 / D.J. Hoban, G.V. Doern, A.C. Fluit et al. // *Clinical Infectious Diseases*. - 2001. - Vol. 32, № 10. - P. S81-S93.
92. Hoban, D.J. Macrolide-resistant Streptococcus pneumoniae in Canada during 1998-1999: Prevalence ofmefA and ermB and susceptibilities to ketolides / D.J. Hoban, A.K. Wierzbowski, K. Nichol et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2001. - Vol. 45, № 7. - P. 2147-2150.
93. Hotomi, M. Distribution of fibronectin-binding protein genes (prtF1 and prtF2) and streptococcal pyrogenic exotoxin genes (spe) among Streptococcus pyogenes in Japan / M. Hotomi, D.S. Billal, A. Togawa et al. // *Journal of Infection and Chemotherapy*. - 2001. - Vol. 15, № 6. - P. 367-373.
94. Huang, K. Characterization of spectinomycin resistance in Streptococcus suis leads to two novel insights into drug resistance formation and dissemination mechanism / K. Huang, Q. Zhang, Y. Song et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2016. - Vol. 60, № 10. - P. 6390-6392.

95. Ikebe, T. Molecular characterization and antimicrobial resistance of group A streptococcus isolates in streptococcal toxic shock syndrome cases in Japan from 2013 to 2018 / T. Ikebe, R. Okuno, Y. Kanda et al. // *International Journal of Medicine Microbiology*. - 2021. - Vol. 311, № 3. - P. 151496.
96. Ip, M. Macrolide resistance and distribution of erm and mef genes among beta-haemolytic streptococci in Hong Kong / M. Ip, D.J. Lyon, T. Leung et al. // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. - 2002. - Vol. 21, № 3. - P. 238-240.
97. Jain, I. A mobile genetic element promotes the association between serotype M28 group A Streptococcus isolates and cases of puerperal sepsis / I. Jain, P. Sarkar, J.L. Danger et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2019. - Vol. 220, № 5. - P. 882-891.
98. Jespersen, M. G. Global genomic epidemiology of Streptococcus pyogenes / M.G. Jespersen, J.A. Lacey, S.Y.C. Tong et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. - 2020. - Vol. 86. - P. 104609.
99. Johnson, C.M. Integrative and conjugative elements (ICEs): what they do and how they work / C.M. Johnson, A.D. Grossman // *Annual Review of Genetics*. - 2015. - Vol. 49. - P. 577-601.
100. Kataja, J. Erythromycin resistance genes in group A streptococci of different geographical origins. Macrolide resistance study group / J. Kataja, P. Huovinen, H. Seppala // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2000. - Vol. 46, № 5. - P. 789-792.
101. Kataja, J. Different erythromycin resistance mechanisms in group C and group G streptococci / J. Kataja, H. Seppala, M. Skurnik et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 1998. - Vol. 42, № 6. - P. 1493-1494.
102. Kawamura, Y. Determination of 16S rRNA sequences of Streptococcus mitis and Streptococcus gordonii and phylogenetic relationships among members of the genus Streptococcus / Y. Kawamura, X.G. Hou, F. Sultana et al. // *International Journal of Systematic Bacteriology*. - 1995. - Vol. 45, № 2. - P. 406-408.
103. Kebede, D. Prevalence and antibiotics susceptibility profiles of Streptococcus pyogenes among pediatric patients with acute pharyngitis at Felege Hiwot Comprehensive Specialized Hospital, Northwest Ethiopia / D. Kebede, A. Admas, D. Mekonnen // *BMC Microbiology*. - 1995. - Vol. 21, № 1. - P. 135.
104. Khademi, F. Group A Streptococcus antibiotic resistance in Iranian children: A meta-analysis / F. Khademi, H. Vaez, A. Sahebkar et al. // *Oman Medical Journal*. - 2021. - Vol. 36, № 1. - P. e222.
105. Kittang, B.R. Invasive group A, C and G streptococcal disease in western Norway: virulence gene profiles, clinical features and outcomes / B.R. Kittang, T. Bruun, N. Langeland et al. // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2011. - Vol. 17, № 3. - P. 358-364.
106. Kohler, W. The present state of species within the genera Streptococcus and Enterococcus / W. Kohler // *International Journal of Medical Microbiology*. - 2007. - Vol. 297, № 3. - P. 133-150.

107. Lacey, J.A. Whole genome sequence analysis and population genomics of group A Streptococci / J.A. Lacey, T.B. James, S.Y.C. Tong et al. // *Methods in Molecular Biology*. - 2020. - Vol. 2136. - P. 81-111.
108. Lamagni, T. Resurgence of Scarlet Fever in England, 2014-16: a population-based surveillance study / T. Lamagni, R. Guy, M. Chand et al. // *Lancet Infectious Diseases*. - 2017. - Vol. 18, № 2. - P. 180-187.
109. Lancefield, R.C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci / R.C. Lancefield // *Journal of Experimental Medicine*. - 1933. - Vol. 57, № 4. - P. 571-595.
110. Lerminiaux, N.A. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments / N.A. Lerminiaux, A.D.S. Cameron // *Canadian Journal of Microbiology*. - 2019. - Vol. 65, № 1. - P. 34-44.
111. Li, H. Epidemiological analysis of Group A Streptococcus infections in a hospital in Beijing, China / H. Li, L. Zhou, Y. Zhao et al. // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. - 2020. - Vol. 39, № 12. - P. 2361-2371.
112. Li, H. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of group a streptococcus recovered from patients in Beijing, China / H. Li, L. Zhou, Y. Zhao et al. // *BMC Infectious Diseases*. - 2020. - Vol. 20, № 1. - P. 507.
113. Liang, Y. Epidemiological and molecular characteristics of clinical isolates of Streptococcus pyogenes collected between 2005 and 2008 from Chinese children / Y. Liang, X. Liu, H. Chang et al. // *Journal of Medical Microbiology*. - 2012. - Vol. 61, Pt. 7. - P. 975-983.
114. Liao, M. Application of Omics and Bioinformatics Tools in Streptococcus Research / M. Liao, T. Tong, Y. Zong et al. // *Current Issues in Molecular Biology*. - 2019. - Vol. 32. - P. 327-376.
115. Liu, Y. Resurgence of scarlet fever in China: a 13-year population-based surveillance study / Y. Liu, T.C. Chan, L.W. Yap et al. // *Lancet Infectious Diseases*. - 2018. - Vol. 18, № 8. - P. 903-912.
116. Lo, H.-H. Distribution of virulence factors and association with emm polymorphism or isolation site among beta-hemolytic group G Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis / H.-H. Lo, W.-S. Cheng // *APMIS*. - 2015. - Vol. 123, № 1. - P. 45-52.
117. Lo, H.-H. Antibiotic susceptibility pattern and erythromycin resistance mechanisms in beta-hemolytic group G Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis isolates from central Taiwan / H.-H. Lo, H.-H. Nien, Y.-Y. Cheng et al. // *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*. - 2015. - Vol. 48, № 6. - P. 613-617.
118. Lu, M. Mobile Genetic Elements in Streptococci / M. Lu, T. Gong, A. Zhang et al. // *Current Issues in Molecular Biology*. - 2019. - Vol. 32. - P. 123-166.
119. Luk, E.Y.Y. Scarlet fever epidemic, Hong Kong, 2011 / E.Y.Y. Luk, J.Y.C. Lo, A.Z.L. Li et al. // *Emerging Infectious Diseases*. - 2012. - Vol. 18, № 10. - P. 1658–1661.

120. Lynskey, N.N. Emergence of dominant toxigenic MIT1 *Streptococcus pyogenes* clone during increased scarlet fever activity in England: a population-based molecular epidemiological study / N.N. Lynskey, E. Jauneikaite, H.K. Li et al. // *Lancet Infectious Diseases*. - 2019. - Vol. 19, № 11. - P. 1209–1218.
121. Maiden, M.C. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms / M.C. Maiden, J.A. Bygraves, E. Feil et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 1998. - Vol. 95, № 6. - P. 3140-3145.
122. Marini, E. Recombination between *Streptococcus suis* ICESsu32457 and *Streptococcus agalactiae* ICESa2603 yields a hybrid ICE transferable to *Streptococcus pyogenes* / E. Marini, C. Palmieri, G. Magi et al. // *Veterinary Microbiology*. - 2015. - Vol. 178, № 1-2. - P. 99-104.
123. Martin, J.M. Group A streptococci among school-aged children: clinical characteristics and the carrier state / J.M. Martin, M. Green, K.A. Barbadora et al. // *Pediatrics*. - 2004. - Vol. 114, № 5. - P. 1212-1219.
124. Masterton, R.G. Surveillance studies: how can they help the management of infection? / R.G. Masterton // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2000. - Vol. 46, Suppl T2. - P. 53-58.
125. McDonald, M. Epidemiology of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in tropical communities, Northern Australia. / M. McDonald, R.J. Towers, R.M. Andrews et al. // *Emerging Infectious Diseases*. - 2007. - Vol. 13, № 5. - P. 1694-1700.
126. McShan WM, Nguyen SV. The Bacteriophages of *Streptococcus pyogenes*. 2022 Jul 20 [updated 2022 Nov 19]. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. 2nd ed. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2022 Oct 8. Chapter 9. PMID: 36479754.
127. Meletis, G. Antimicrobial resistance rates of *Streptococcus pyogenes* in a Greek tertiary care hospital: 6-year data and literature review / G. Meletis, A.L. Soulopoulos Ketikidis, N. Floropoulou et al. // *New Microbiologica*. - 2023. - Vol. 46, № 1. - P. 37-42.
128. Meng, P. Exploring the Genomic Diversity and Cariogenic Differences of *Streptococcus mutans* Strains Through Pan-Genome and Comparative Genome Analysis / P. Meng, C. Lu, Q. Zhang et al. // *Current Microbiology*. - 2017. - Vol. 74, № 10. - P. 1200-1209.
129. Messina, N.L. Risk factors for carriage of antibiotic-resistant bacteria in healthy children in the community: A systematic review / N.L. Messina, D.A. Williamson, R. Robins-Browne et al. // *Pediatric Infectious Disease Journal*. - 2020. - Vol. 39, № 5. - P. 397-405.
130. Miller, K.M. The global burden of sore throat and group A *Streptococcus* pharyngitis: A systematic review and meta-analysis / K.M. Miller, J.R. Carapetis, C.A. Van Beneden et al. // *EClinicalMedicine*. - 2022. - Vol. 48. - P. 101458.

131. Mingoia, M. Composite structure of *Streptococcus pneumoniae* containing the erythromycin efflux resistance gene *mef(I)* and the chloramphenicol resistance gene *catQ del* / M. Mingoia, M. Vecchi, I. Cochetti et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2007. - Vol. 51, № 11. - P. 3983-3987.
132. Montes, M. What causes decreased erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes*? Dynamics of four clones in a southern European region from 2005 to 2012 / M. Montes, E. Tamayo, C. Mojica et al. // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2014. - Vol. 69, № 6. - P. 1474-1482.
133. Muirden, K.D. Community Oriented Program for the Control of Rheumatic Diseases: studies of rheumatic diseases in the developing world / K.D. Muirden // *Current Opinion in Rheumatology*. - 2005. - Vol. 17, № 2. - P. 153-156.
134. Musumeci, R. Internalization-associated proteins among *Streptococcus pyogenes* isolated from asymptomatic carriers and children with pharyngitis / R. Musumeci, C. Lo Bue, I. Milazzo et al. // *Clinical Infectious Diseases*. - 2003. - Vol. 37, № 2. - P. 173-179.
135. Nakagawa, I. Genome sequence of an M3 strain of *Streptococcus pyogenes* reveals a large-scale genomic rearrangement in invasive strains and new insights into phage evolution. / I. Nakagawa, K. Kurokawa, A. Yamashita et al. // *Genome Research*. - 2003. - Vol. 13, № 6A. - P. 1042-1055.
136. Nasser, W. Evolutionary pathway to increased virulence and epidemic group A *Streptococcus* disease derived from 3,615 genome sequences / W. Nasser, S.B. Beres, R.J. Olsen et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2014. - Vol. 111, № 17. - P. E1768-E1776.
137. Neeman, R. Prevalence of internalisation-associated gene, *prtF1*, among persisting group-A streptococcus strains isolated from asymptomatic carriers / R. Neeman, N. Keller, A. Barzilai et al. // *Lancet*. - 1998. - Vol. 352, № 9145. - P. 1974-1977.
138. Norm/Norm-Vet (2018). Usage og Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Available online at: <https://unn.no/fag-og-forskning/norm-norsk-overvakingssystem-for-antibiotikaresistens-hos-mikrober> (accessed March 26, 2020).
139. Northwood, J.B. Characterization of Macrolide Efflux Pump *mef* Subclasses Detected in Clinical Isolates of *Streptococcus pyogenes* Isolated between 1999 and 2005 / J.B. Northwood, M. Del Grosso, L.R. Cossins et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2009. - Vol. 53, № 5. - P. 1921-1925.
140. Olsvik, B. Detection of *tet(M)* and *tet(O)* using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease / B. Olsvik, I. Olsen, F.C. Tenover // *Oral Microbiology and Immunology*. - 1995. - Vol. 10, № 2. - P. 87-92.

141. Oppegaard, O. Emerging Threat of Antimicrobial Resistance in beta-Hemolytic Streptococci / O. Oppegaard, S. Skrede, H. Mylvaganam et al. // *Frontiers in Microbiology*. - 2020. - Vol. 11. - P. 797.
142. Ou, Z. Global burden of rheumatic heart disease: trends from 1990 to 2019 / Z. Ou, D. Yu, Y. Liang et al. // *Arthritis Research & Therapy*. - 2022. - Vol. 24, № 1. - P. 138.
143. Palmieri, C. Unconventional circularizable bacterial genetic structures carrying antibiotic resistance determinants / C. Palmieri, M. Mingoia, P.E. Varaldo // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2013. - Vol. 57, № 5. - P. 2440-2441
144. Park, D.W. Incidence and characteristics of scarlet fever, South Korea, 2008-2015 / D.W. Park, S.H. Kim, J.W. Park et al. // *Emerging Infectious Diseases*. - 2017. - Vol. 23, № 4. - P. 658-661.
145. Nordenfelt, P. IgG-binding bacterial proteins and pathogenesis / P. Nordenfelt, L. Björck // *Future Microbiology*. - 2013. - Vol. 8, № 3. - P. 299-301.
146. Poyart, C. Characterization of the Tn916-like transposon Tn3872 in a strain of *Abiotrophia defectiva* (*Streptococcus defectivus*) causing sequential episodes of endocarditis in a child / C. Poyart, G. Quesne, P. Acar et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2000. - Vol. 44, № 3. - P. 790-793.
147. Poyart, C. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of “*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*” as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. / C. Poyart, G. Quesne, P. Trieu-Cuot // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2002. - Vol. 52, Pt 4. - P. 1247-1255.
148. ProMED-Mail. (2009, June 20). Streptococcus, group A, scarlet fever - Viet Nam. Retrieved December 06, 2015.
149. ProMED-Mail. (2011, June 22). Streptococcus, group A, scarlet fever, fatal - China: (HK) RFI . Retrieved December 6, 2015.
150. ProMED-Mail. (2012, December 11). Streptococcus group A, scarlet fever - China (13): (Shanghai). Retrieved December 6, 2015.
151. PROTEKT Study Database. Feb. 2001 ([http:// www.protekt.org](http://www.protekt.org)).
152. Public Health England (2018). Laboratory surveillance of pyogenic and non-pyogenic streptococcal bacteraemia in England, Wales and Northern Ireland: 2017. Health Protect. Rep. 12:41.
153. Remington, A. The DNases of pathogenic Lancefield streptococci / A. Remington, C.E. Turner // *Microbiology*. - 2018. - Vol. 164, № 3. - P. 242-250.
154. Roberts, A. P. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements / A. P. Roberts, P. Mullany // *Trends in microbiology*. - 2009. - Vol. 17, №6. -(2009): 251-8.

155. Richards, V.P. Population gene introgression and high genome plasticity for the zoonotic pathogen *Streptococcus agalactiae* / V.P. Richards, I.M. Velsko, M.T. Alam et al. // *Molecular Biology and Evolution*. - 2019. - Vol. 36, № 11. - P. 2572-2590.
156. Rubio-Lopez, V. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994-2006) / V. Rubio-Lopez, S. Valdezate, D. Alvarez et al. // *BMC Microbiology*. - 2012. - Vol. 12. - P. 215.
157. Rümke, L.W. Dominance of M1UK clade among Dutch M1 *Streptococcus pyogenes* / L.W. Rümke, B. de Gier, S.M.T. Vestjens et al. // *Lancet Infectious Diseases*. - 2020. - Vol. 20, № 5. - P. 539-540.
158. Sahn, D.F. Need for annual surveillance of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States: 2-year longitudinal analysis / D.F. Sahn, J.A. Karlowsky, L.J. Kelly et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2001. - Vol. 45, № 4. - P. 1037-1042.
159. Sanders, E. Group A beta-hemolytic *Streptococci* resistant to erythromycin and lincomycin / E. Sanders, M.T. Foster, D. Scott // *New England Journal of Medicine*. - 1968. - Vol. 278, № 10. - P. 538-540.
160. Sangvik, M. *mefA*, *mefE* and a new *mef* allele in macrolide-resistant *Streptococcus* spp. isolates from Norway / M. Sangvik, P. Littauer, G.S. Simonsen et al. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2005. - Vol. 56, № 5. - P. 841-846.
161. Sanson, M.A. Unexpected relationships between frequency of antimicrobial resistance, disease phenotype and *emm* type in group A *Streptococcus* / M.A. Sanson, O.R. Macias, B.J. Shah et al. // *Microbial Genomics*. - 2019. - Vol. 5, № 11. - P. e000316.
162. Schwartz, D.C. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis / D.C. Schwartz, C.R. Cantor // *Cell*. - 1984. - Vol. 37, № 1. - P. 67-75.
163. Sela, S. Relationship between asymptomatic carriage of *Streptococcus pyogenes* and the ability of the strains to adhere to and be internalised by cultured epithelial cells / S. Sela, R. Neeman, N. Keller et al. // *Journal of Medical Microbiology*. - 2000. - Vol. 49, № 6. - P. 499-502.
164. Seppala, H. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group a streptococci in Finland / H. Seppala, T. Klaukka, J. VuopioVarkila et al. // *New England Journal of Medicine*. - 1997. - Vol. 337, № 7. - P. 441-446.
165. Shaikh, N. Prevalence of Streptococcal pharyngitis and Streptococcal carriage in children: a meta-analysis / N. Shaikh, E. Leonard, J.M. Martin // *Pediatrics*. - 2010. - Vol. 126, № 3. - P. E557-E564.
166. Shannon, B.A. Toxins and superantigens of group A *Streptococci* / B.A. Shannon, J.K. McCormick, P.M. Schlievert // *Microbiology Spectrum*. - 2019. - Vol. 1.

167. Shen, Y. Identification and characterization of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes* clones harboring tetracycline and macrolide resistance in Shanghai, China / Y. Shen, J. Cai, M.R. Davies et al. // *Frontiers in Microbiology*. - 2018. - Vol. 9. - P. 542.
168. Sherman, J.M. The Streptococci / J.M. Sherman // *Bacteriological Reviews*. - 1937. - Vol. 1. - P. 3-97.
169. Shulman, S.T. Group A streptococcal pharyngitis serotype surveillance in North America, 2000-2002 / S.T. Shulman, R.R. Tanz, W. Kabat et al. // *Clinical Infectious Diseases*. - 2004. - Vol. 39, № 3. - P. 325-332.
170. Silva-Costa, C. Rapid inversion of the prevalences of macrolide resistance phenotypes paralleled by a diversification of T and emm types among *Streptococcus pyogenes* in Portugal / C. Silva-Costa, A. Ramirez, J. Meto-Cristino et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2005. - Vol. 49, № 5. - P. 2109-2111.
171. Smyth, D.J. Conjugative transfer of ICESde3396 between three β -hemolytic streptococcal species / D.J. Smyth, J. Shera, M.J. Bauer et al. // *BMC Research Notes*. - 2014. - Vol. 7. - P. 521.
172. Southon, S.B. Population Genomic Molecular Epidemiological Study of Macrolide-Resistant *Streptococcus pyogenes* in Iceland, 1995 to 2016: Identification of a Large Clonal Population with a pbp2x Mutation Conferring Reduced In Vitro β -Lactam Susceptibility / S.B. Southon, S.B. Beres, P. Kachroo et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2020. - Vol. 58, № 9. - P. e00638-20.
173. Steer, A.C. emm and C-Repeat Region Molecular Typing of Beta-Hemolytic Streptococci in a Tropical Country: Implications for Vaccine Development / A.C. Steer, G. Magor, A.W.J. Jenney et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2009. - Vol. 47, № 8. - P. 2502-2509.
174. Stevens DL, Bryant AE. Severe *Streptococcus pyogenes* Infections. 2022 Sep 7 [Updated 2022 Oct 4]. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. 2nd edition. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2022 Oct 8. Chapter 24. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK587112/>
175. Streptococcus Laboratory Centres for Disease Control and Prevention Blast- emm & emm databases [WWW Document]. URL <https://www2.cdc.gov/vaccines/biotech/strepblast.asp> (2020)
176. Sumbly, P. Evolutionary origin and emergence of a highly successful clone of Serotype M1 Group A *Streptococcus* involved multiple horizontal gene transfer events / P. Sumbly, S.F. Porcella, A.G. Madrigal et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2005. - Vol. 192, № 5. - P. 771-782.
177. Sutcliffe, J. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR / J. Sutcliffe, T. Grebe, A. Tait-Kamradt et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 1996. - Vol. 40, № 11. - P. 2562-2566.

178. Swedres-Swarm (2018). Consumption of antibiotics and occurrence of resistance in Sweden. Solna/Uppsala ISSN1650-6332.
179. Syrogiannopoulos, G.A. Seven-year surveillance of emm types of pediatric Group A streptococcal pharyngitis isolates in Western Greece / G.A. Syrogiannopoulos, I.N. Grivea, A. Al-Lahham et al. // PLoS One. - 2013. - Vol. 8, № 8. - P. e71558.
180. Takahashi, T. Invasive infection caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: characteristics of strains and clinical features / T. Takahashi, K. Ubukata, H. Watanabe // Journal of Infection and Chemotherapy. - 2011. - Vol. 17, № 1. - P. 1-10.
181. Tapp, J. Phylogenetic relationships and genotyping of the genus *Streptococcus* by sequence determination of the RNase P RNA gene, *rnpB* / J. Tapp, M. Thollessen, B. Herrmann // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2003. - Vol. 53, Pt 6. - P. 1861-1871.
182. Tatara, K. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility, and characterization of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes* in Japan / K. Tatara, K. Gotoh, K. Okumiya et al. // Journal of Infection and Chemotherapy. - 2020. - Vol. 26, № 3. - P. 280-284.
183. Tewodros, W. M protein gene (emm type) analysis of group A beta-hemolytic streptococci from Ethiopia reveals unique patterns / W. Tewodros, G. Kronvall // Journal of Clinical Microbiology. - 2005. - Vol. 43, № 9. - P. 4369-4376.
184. Tibazarwa, K.B. Incidence of acute rheumatic fever in the world: a systematic review of population-based studies / K.B. Tibazarwa, J.A. Volmink, B.M. Mayosi // Heart. - 2008. - Vol. 94, № 12. - P. 1534-1540.
185. Tsai, W.C. Emergence of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* emm12 in southern Taiwan from 2000 to 2019 / W.C. Tsai, C.F. Shen, Y.L. Lin et al. // Journal of Microbiology, Immunology, and Infection. - 2021. - Vol. 54, № 6. - P. 1086-1093.
186. Tse, H. Molecular characterization of the 2011 Hong Kong scarlet fever outbreak / H. Tse, J.Y.J. Bao, M.R. Davies et al. // Journal of Infectious Diseases. - 2012. - Vol. 206, № 3. - P. 341-351.
187. Ubukata, K. Changes in epidemiologic characteristics and antimicrobial resistance of *Streptococcus pyogenes* isolated over 10 years from Japanese children with pharyngotonsillitis / K. Ubukata, T. Wajima, M. Morozumi et al. // Journal of Medical Microbiology. - 2020. - Vol. 69, № 3. - P. 443-450.
188. Vannice, K.S. *Streptococcus pyogenes* pbp2x mutation confers reduced susceptibility to β -Lactam antibiotics / K.S. Vannice, J. Ricaldi, S. Nanduri et al. // Clinical Infectious Diseases. - 2020. - Vol. 71, № 1. - P. 201-204.

189. Varaldo, P.E. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci / P.E. Varaldo, M.P. Montanari, E. Giovanetti // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2009. - Vol. 53, № 2. - P. 343-353.
190. Vekemans, J. The path to Group A *Streptococcus* vaccines: World Health Organization research and development technology roadmap and preferred product characteristics / J. Vekemans, F. Gouvea-Reis, J.H. Kim et al. // *Clinical Infectious Diseases*. - 2019. - Vol. 69, № 5. - P. 877-883.
191. Villalón, P. Invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Spain: a microbiological and epidemiological study covering the period 2007–2019 / P. Villalón, J.A. Sáez-Nieto, V. Rubio-López et al. // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. - 2021. - Vol. 40, № 11. - P. 2295-2303.
192. Walker, M.J. Detection of epidemic scarlet fever group A *Streptococcus* in Australia / M.J. Walker, S. Brouwer, B.M. Forde et al. // *Clinical Infectious Diseases*. - 2019. - Vol. 69, № 7. - P. 1232-1234.
193. Walkinshaw, D.R. The *Streptococcus pyogenes* vaccine landscape / D.R. Walkinshaw, M.E.E. Wright, A.E. Mullin et al. // *NPJ Vaccines*. - 2023. - Vol. 8, № 1. - P. 16.
194. Wang, X. Genome sequence and virulence factors of a group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *Equisimilis* strain with a new element carrying *erm(B)* / X. Wang, X. Zhang, Z. Zong // *Scientific reports*. - 2016. - Vol. 6. - P. 20389.
195. Wasserzug, O. A cluster of ecthyma outbreaks caused by a single clone of invasive and highly infective *Streptococcus pyogenes* / O. Wasserzug, L. Valinsky, E. Klement et al. // *Clinical Infectious Diseases*. - 2009. - Vol. 48, № 1. - P. 1213-1219.
196. Wessels MR. *Streptococcus pyogenes* Pharyngitis and Scarlet Fever. 2022 Sep 5 [updated 2022 Oct 4]. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. 2nd ed. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2022 Oct 8. Chapter 22. PMID: 36479768.
197. Whiley R. A., Hardie J. M. 2015 *Streptococcus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1 - 86.
198. Wong S.S.Y. *Streptococcus pyogenes* and re-emergence of scarlet fever as a public health problem / S.S.Y. Wong, K.-Y. Yuen // *Emerging Microbes & Infections*. - 2012. - Vol. 1, № 7. - P. e2.
199. World Health Organization. Increased incidence of scarlet fever and invasive group A *Streptococcus* infection—multi-country [EB/OL]. (2022-12-15) [2023-01-20]. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON429>.
200. Worthing, K.A. Biphasic outbreak of invasive Group A *Streptococcus* disease in eldercare facility, New Zealand / K.A. Worthing, A. Werno, R. Pink et al. // *Emerging Infectious Diseases*. - 2020. - Vol. 26, № 5. - P. 841-848.

201. Wu, P.C. Molecular characterization of Group A streptococcal isolates causing scarlet fever and pharyngitis among young children: A retrospective study from a northern Taiwan medical center / P.C. Wu, W.T. Lo, S.J. Chen et al. // *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*. - 2014. - Vol. 47, № 4. - P. 304-310.
202. Xiao, J. A brief review of software tools for pangenomics / J. Xiao, Z. Zhang, J. Wu et al. // *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. - 2015. - Vol. 13, № 1. - P. 73-76.
203. Yanagihara, K. Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the surveillance committee of Japanese Society of Chemotherapy, the Japanese Association for Infectious Diseases, and the Japanese Society for Clinical Microbiology in 2016: General view of the pathogens' antibacterial susceptibility / K. Yanagihara, T. Matsumoto, I. Tokimatsu et al. // *Journal of Infection and Chemotherapy*. - 2020. - Vol. 26, № 9. - P. 873-881.
204. Yang, P. Characteristics of group A Streptococcus strains circulating during scarlet fever epidemic, Beijing, China, 2011 / P. Yang, X. Peng, D. Zhang et al. // *Emerging Infectious Diseases*. - 2013. - Vol. 19, № 6. - P. 909-915.
205. Yin, J. Molecular characterization of group G Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis recovered from patients and healthy people in China / J. Yin, S.J. Yu, X.R. Liu et al. // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. - 2012. - Vol. 72, № 1. - P. 41-46.
206. You, Y. Scarlet fever epidemic in China caused by Streptococcus pyogenes serotype M12: epidemiologic and molecular analysis / Y. You, M.R. Davies, M. Protani et al. // *EBioMedicine*. - 2018. - Vol. 28. - P. 128-135.
207. You, Y. 8-year M type surveillance of Streptococcus pyogenes in China / Y. You, X. Peng, P. Yang // *Lancet Infectious Diseases*. - 2020. - Vol. 20, № 1. - P. 24-25.
208. Yu, D. Is there emergence of β -lactam antibiotic-resistant Streptococcus pyogenes in China? / D. Yu, Y. Zheng, Y. Yang // *Infection and Drug Resistance*. - 2020. - Vol. 13. - P. 2323-2327.
209. Yu, D. Changes in M types of Streptococcus pyogenes in Chinese children with scarlet fever / D. Yu, Y. Liang, Y. Ma // *Lancet Infectious Diseases*. - 2020. - Vol. 20, № 7. - P. 780.
210. Zheng, P.X. Highly prevalent emmSTG840.0 and emmSTC839.0 types of erythromycin non-susceptible group G Streptococcus isolated from bacteremia in southern Taiwan / P.X. Zheng, Y.C. Chan, C.S. Chiou et al. // *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*. - 2017. - Vol. 50, № 6. - P. 831-838.