

На правах рукописи

Киреева Александра Геннадьевна

**Генетические детерминанты патогенности штаммов стрептококков
групп А, С и G, циркулирующих во Вьетнаме**

1.5.11 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор РАН

Дмитриев Александр Валентинович

Официальные оппоненты:

Хохлова Ольга Евгеньевна доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Соловьева Ирина Владленовна доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией микробиома человека и средств его коррекции Федерального бюджетного учреждения науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2024 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 64.1.006.01, при Федеральном казенном учреждении науки Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д.46

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального казенного учреждения науки Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д.46, <http://www.microbe.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Бугоркова Светлана Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Стрептококки серологических групп А (СГА, *Streptococcus pyogenes*), С и G (СГС и СGG, *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* (SDSE), *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*) являются одними из наиболее распространенных возбудителей широкого спектра генерализованных, системных и местных заболеваний человека. Они вызывают тонзилло-фарингит, скарлатину, рожистое воспаление, импетиго, флегмоны, инвазивные заболевания и др., а также приводят в инвалидизирующим осложнениям, таким как ревмокардит и гломерулонефрит (Broyles L. N., 2009; Avire N.J., 2021).

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 интегрированных экзогенных элементов (мобильных генетических элементов (МГЭ)): профагов, транспозонов, интегративно-конъюгативных элементов (ICE), которые в своем составе могут содержать гены вирулентности и гены устойчивости к антимикробным препаратам (Jespersen M. G., 2020). Увеличение степени вирулентности за счет приобретения штаммами таких МГЭ способствует отбору более вирулентных клонов из изначальной гетерогенной популяции возбудителя и часто является причиной масштабных вспышек стрептококковых инфекций (Sumbly P., 2005; Aziz R. K., 2008; You Y., 2018; Worthing K. A., 2020).

Юго-Восточная Азия является регионом высочайшего биоразнообразия и местом формирования новых вирулентных и устойчивых к антимикробным препаратам штаммов возбудителей многих инфекционных болезней (Oppergaard O., 2020). 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

Вспышки стрептококковых инфекций, как правило, сопряжены с появлением в популяции эволюционно успешных клонов с повышенной вирулентностью, которые приобрели дополнительные гены, участвующие в формировании вирулентного фенотипа (гены токсинов, детерминанты резистентности к антибиотикам). Так, повсеместное распространение клона M1T1 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 (Sumbly P., 2005; Aziz R. K., 2008).

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 (Luk E.Y., 2012; Guy R., 2014; Lamagni T., 2018; Liu Y., 2018; You Y., 2018; Lynskey N. N., 2019; Yu D., 2020). Первое сообщение об увеличении числа заболеваний скарлатиной на 40% было опубликовано вьетнамскими учеными в 2009 году (ProMED-Mail 20 June, 2009). В Гонконге в 2011-2012 гг. число заболеваний скарлатиной выросло в девять раз по сравнению с предшествующими годами (24 случая на 100 тыс. населения, 110 тыс. случаев) (Luk E.Y., 2012). В 2014 году в Великобритании был зафиксирован максимальный уровень заболеваемости скарлатиной со времен 1960-х годов (49 на 100 тыс. населения) (Guy R., 2014).

Большинство случаев заболеваний скарлатиной в Юго-Восточной Азии были ассоциированы со штаммами СГА *emm12* и *emm1* генотипов, содержащими два участка гетерологичной ДНК: профага ФНКU.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 (Tse H., 2012; Luk E.Y., 2012; Ben Zakour N. L., 2015; You Y., 2018).

Сведения о генетической структуре популяции СГА, циркулирующих во Вьетнаме, где впервые был зафиксирован рост случаев заболеваний скарлатиной, в литературе отсутствуют. Несмотря на возрастающее клиническое значение стрептококков СГС/СГГ и возможность межвидового переноса МГЭ между штаммами *S. pyogenes* и *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, данные о популяционной структуре СГС/СГГ и механизмах, участвующих в распространении антибиотикоустойчивости у этих микроорганизмов крайне малочисленны.

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

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 *mLS* 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 СГГ, 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

Анализ генетической структуры популяции стрептококков, циркулирующих среди детей во Вьетнаме, позволил составить представление о генетических особенностях «тропических» штаммов стрептококков. Обнаружение у штаммов СГА, СГС и СГГ новых МГЭ, содержащих гены устойчивости к тетрациклину, макролидам и линкозамидам, может положить основу для исследований, направленных на оценку распространённости 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

Личное участие автора диссертации заключалось в составлении плана исследования, проведении аналитического обзора литературы, участии в экспедициях для сбора микробиологического материала, выполнении микробиологических и молекулярно-генетических исследований, анализе полученных данных, биоинформатической обработке и обобщении 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.

Положения, 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 СГГ, выделенные во Вьетнаме, содержат в своем геноме различные детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам. В геноме штаммов SDSE впервые обнаружены МГЭ (ФNT15, 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 СГГ должен включать сравнительный анализ полных геномов, что позволит более эффективно оценивать их патогенный потенциал, а также выявлять филогенетические связи между эпидемическими клонами в разных регионах.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена системным подходом к сбору материала и анализу полученных данных, применением современных высокочувствительных и высокоспецифичных молекулярно-генетических методов, эпидемиологических и микробиологических подходов, разнообразием представленного материала. 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.)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 4 публикации в рецензируемых изданиях, 1 публикация в других изданиях, 10 публикаций в материалах конференций.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе изучены следующие штаммы:

- 132 штамма стрептококков групп А, С и G, выделенных в 2012-2014 гг. от детей младшего школьного возраста (7-10 лет) во время экспедиций в различные регионы Вьетнама (Таблица 1);

- клинические изоляты СГА генотипов *emm1* (47 штаммов) и *emm12* (38 штаммов) из коллекции ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», выделенные в Санкт-Петербурге и Пекине (Китай) от детей школьного возраста, больных скарлатиной, гнойным синуситом, тонзиллитом, а также носителей

- 34 штамма СГА различных типов из коллекции ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, выделенных в 2008-2011 гг. при инвазивных инфекциях мягких тканей в отделении гнойной хирургии 23 ГКБ им. «Медсантруд» (Москва).

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

Микроорганизмы культивировали на плотной питательной среде Columbia Base Agar (HiMedia, Индия) с добавлением 5% инактивированной лошадиной сыворотки и 3% донорской эритроцитарной массы для определения гемолитической активности, и в жидкой питательной среде Todd-Hewitt Broth (HiMedia, Индия) при температуре 37°C.

Определение серологической группы стрептококков проводили методом коагуляции с использованием наборов диагностикумов фирмы «Аквапаст» (РФ) в соответствии с инструкцией производителя.

Выделение хромосомной ДНК проводили фенол-хлороформным методом или с использованием коммерческого набора «ДНК-экспресс» (Литех, Россия).

Определение вида бактерий проводили с помощью метода дифференциальной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с видоспецифичными праймерами на ген *cpn60*, кодирующий белок теплового шока. Штаммы, вид которых на основании данного метода установить не удалось, были исследованы посредством 16S РНК типирования и амплификации гена *rnpB*, кодирующего РНК-субъединицу эндорибонуклеазы Р, с последующим секвенированием амплификатов.

Метод ПЦР использовали для оценки наличия в геноме исследуемых штаммов генов, кодирующих гены патогенности и антибиотикоустойчивости с использованием известных и разработанных специфических ДНК-праймеров.

Анализ штаммов методом электрофореза в пульсирующем электрическом поле (PFGE) после обработки рестриктазой *SmaI* проводили согласно модифицированному протоколу (Elliot J.A., 1998).

Emm-генотипирование проводили согласно инструкции, предложенной Центром по контролю заболеваний, США (http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emmtype.htm)

Секвенирование методом Сэнгера проводили для исследуемых фрагментов ДНК на автоматическом секвенаторе Beckman CEQ 2000 (Beckman Coulter, США), с использованием набора реактивов GenomeLab DTCS - Quick Start Kit (Beckman Coulter, США).

Оценка чувствительности штаммов к ампициллину, цефотаксиму, цефтазидиму, амикацину, ванкомицину, ципрофлоксацину, норфлоксациму, энрофлоксацину, тетрациклину и эритромицину осуществлялась согласно МУК 4.12.1890-04 с использованием стандартизованных дисков (НИЦФ, РФ).

Полногеномное секвенирование бактериальной ДНК проводили на секвенаторе MiSeq с набором реагентов MiSeq Reagent Kit, v3, 2x300 (Illumina). Сборку генома после высокопроизводительного секвенирования проводили при помощи программы SPAdes, версия 3.6.2, с параметрами по умолчанию (<https://cab.spbu.ru/software/spades/>). Расположение контигов относительно референса было сделано с использованием программы Mauve (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>). Аннотирование полученных в результате полногеномного секвенирования контигов было осуществлено 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 программное обеспечение 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/>).

Поиск генов антибиотикоустойчивости проводили с использованием программы ResFinder 2.0 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), генов вирулентности - с использованием программы PathogenFinder (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/PathogenFinder/>), поиск умеренных бактериофагов – при помощи программы PHAST (PHAgeSearchTool) (<http://phast.wishartlab.com/>).

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

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. был осуществлен осмотр и забор проб с миндалин и задней стенки глотки у 1359 детей младшего школьного возраста. В результате микробиологического анализа и серологической реакции (реакции коагутинации) на группоспецифические антигены по R. Lancefield было выделено 49 штаммов стрептококков серогруппы А, 8 штаммов стрептококков серогруппы С и 75 штаммов стрептококков серогруппы G (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Учет результатов реакции коагутинации отдельно взятого изолята на наличие специфических полисахаридов групп А, С и G

Примечание: реакции №1, №2, №3 соответственно, №4 отрицательный контроль). Образование хлопьев в реакции №1 свидетельствует о принадлежности анализируемого изолята к серологической группе А

При анализе видового состава СГС/СГG были обнаружены: 58 штаммов вида *S. anginosus* (54 штамма серогруппы G и 4 штамма серогруппы С), 9 штаммов вида *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (8 штаммов группы G и 1 штамм группы С), 4 штамма вида *S. parasanguinis* (3 штамма группы G и 1 штамм группы С), 5 штаммов вида *S. constellatus* (4 штамма группы G и 1 штамм группы С), 3 штамма вида *S. sanguinis* (СГG), 2 штамма вида *S. mitis* (СГG) и по 1 штамму – *S. australis*, *S. gordonii* (СГG) (Таблица 1, Рисунок 2,)

Таблица 1 – Штаммы, выделенные во Вьетнаме, и их первичная характеристика

Провинция	Кол-во обследованных детей	Серо-группа	Вид (кол-во штаммов)	Номер штамма
Куанг Чи	200	А	<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
				V 13, V24, V25, V35, V71, V77, V80, V86, V98, V128, V140, V148
		G	<i>S. anginosus</i> (12)	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (2)
				<i>S. parasanguinis</i> (1)
				<i>S. sanguinis</i> (1)
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
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
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

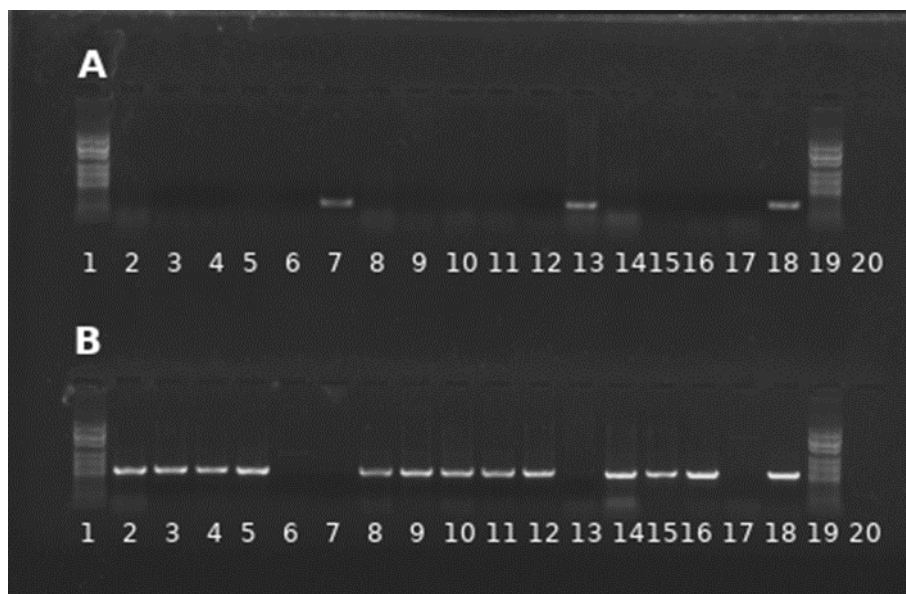


Рисунок 2 – Идентификация штаммов *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* и *S. anginosus* методом ПЦР с видоспецифичными праймерами на ген *srpB0*

Примечание: Треки 1, 19: маркер молекулярного веса (100 bp DNA ladder); Трек 2-18: штаммы СГС и СГГ, выделенные во Вьетнаме; Трек 20: отрицательный контроль

(А) Трек 18: положительный контроль SDSE (размер амплификата 254 п.н.)

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

УСТАНОВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

В результате *emm* – генотипирования среди 49 штаммов *S. pyogenes* было выявлено 15 *emm*-подтипов, относящихся к 11 *emm*-типам, такие как *emm104.0* (9 штаммов), *emm109.1* (6 штаммов), *emm4.0* (4 штамма), *emm12.0* (11 штаммов), *emm12.22* (3 штамма), *emm44.0* (6 штаммов), *emm170.0* (2 штамма), а также *emm170.1*, *emm170.2*, *emm22.0*, *emm75.1*, *emm89.24*, *emm109.0*, *emm8.0*, *emm58* (по 1 штамму каждый) (Таблица 2). В целом, популяция вьетнамских штаммов характеризовалась большим разнообразием *emm*-подтипов, при этом были обнаружены редко встречающиеся подтипы *S. pyogenes*, такие как *emm104.0* и *emm109.1*.

Поскольку многие из существующих в настоящее время вакцин эффективны в отношении только определенных *emm*-типов *S. pyogenes*, полученные данные имеют большое практическое значение (Davies M. R., 2019; Walkinshaw D.R., 2023).

Среди 9 штаммов *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* было выявлено 6 *emm*-типов, такие как *stC5345* (3 штамма), *stG480* (2 штамма), *emm44*, *stG6*, *stG4831*, *stC36.0* (по 1 штамму каждый) (Таблица 2).

Анализ рестрикционного полиморфизма хромосомной ДНК штаммов стрептококков методом пульс-электрофореза выявил 10 паттернов PFGE среди 49 штаммов *S. pyogenes*, (Таблица 2). При этом 31 из 49 штаммов (63%) относились к трем доминирующим паттернам (П1, П2, П8).

Обнаружение штаммов с одинаковым *emm* генотипом и паттерном PFGE в разных провинциях может свидетельствовать о существовании ряда доминирующих в региональном масштабе линий. Так, в нескольких провинциях Вьетнама (Куанг Чи, Хай Фонг, Хоа Бинь, Тхай Нгуен) были выделены штаммы *S. pyogenes*, относящиеся к одной клональной линии *emm12* генотипа.

Анализ паттернов PFGE выявил их определенную корреляцию с конкретными *emm*-подтипами, однако штаммы разных *emm*-подтипов, имеющие идентичный профиль PFGE, также встречались, что может свидетельствовать о случаях замены серотипа, вероятно возникающего вследствие

селективного отбора, направленного на избегание иммунной системы хозяина. Наибольшей гетерогенностью отличались штаммы, относящиеся к *emm44.0* генотипу, которые характеризовались тремя различными паттернами PFGE.

Сравнительный анализ паттернов PFGE штаммов СГС/СГГ выявил высокую генетическую гетерогенность: 7 паттернов для 9 изолятов *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, 16 паттернов для 20 изолятов *S. anginosus* (Таблица 2, Рисунок 3).

Таблица 2 – Суммарные данные по генетической гетерогенности вьетнамских штаммов СГА, СГС и СГГ

Генетический вариант	Паттерн PFGE	№ штамма*	<i>emm</i> -подтип	Детерминанты устойчивости к действию MLSB антибиотиков
<i>S. pyogenes</i> (49 штаммов)				
1	П1	V88	75.1	отсутствуют
2		V22, V23, V57, V67, V87, V103	109.1	отсутствуют
3		V59	109.0	отсутствуют
4		T157	22.0	отсутствуют
5	П2	V01, V32, V43, V129	4.0	отсутствуют
6		V27, V34	170.0	отсутствуют
7		V195	170.2	отсутствуют
8		TN296	170.1	отсутствуют
9	П3	V82, TN281, TN263, NT283, NT46	104.0	отсутствуют
10		V76	8.0	отсутствуют
11	П4	V55, V61, V184, V85	44.0	отсутствуют
12	П5	V96	44.0	отсутствуют
13	П6	V125	44.0	отсутствуют
14	П7	V21, V60, V100, V201	104.0	отсутствуют

15	П8	V31, V154, V193, V194, HF01, HF40 B56, HF124, T131, V171, V174	12.0	ICE <i>emm-12</i> (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
		HF136, HF149, HF166	12.22	
16	П9	B37	89.24	МГЭ не определен (предполагается наличие <i>ICESp1116</i> ; <i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
17	П10	V36	58.0	МГЭ не определен (<i>mefO</i> , <i>msrD</i>)
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (9 штаммов)				
1	Д1	V63	44.0	Tn3872/Tn6002 (<i>ermB</i> , <i>tetM</i>)
2	Д2	V123	<i>stG6</i>	Φ46.1 var (<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>	отсутствуют
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>S. anginosus</i> (20 штаммов)				
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	-	Φ46.1 var (<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

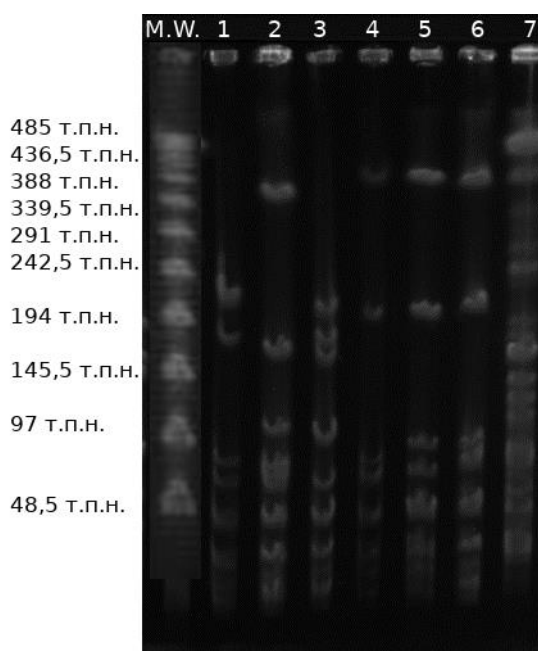


Рисунок 3 – *SmaI* рестрикционные паттерны PFGE хромосомной ДНК штаммов SDSE

Примечание: M.W. – маркер молекулярного веса, конкатомеры бактериофага λ ; Треки 1 – 7: штаммы V63, V123, HF112, HF196, B159, T201, B82 соответственно

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММОВ СГА, СГС И СГГ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Анализ репрезентативной выборки штаммов на чувствительность к антибактериальным препаратам выявил эффективность ампициллина, цефалоспоринов (цефотаксим, цефтазидим) и ванкомицина в отношении всех исследуемых штаммов, что согласуется с данными других авторов (Козлов Р. С., 2006; Barros R. R., 2021; Cattoir V., 2022). К антибиотику широкого спектра действия из группы аминогликозидов, амикацину, были устойчивы все 67 исследованных штаммов. При оценке чувствительности к фторхинолонам было обнаружено, что 12 из 40 (30%) штаммов СГА и 5 из 27 (18,5%) штаммов СГС/СГГ были устойчивы к ципрофлоксацину, 14 из 40 (35%) штаммов СГА и 8 из 27 (29,6%) штаммов СГС/СГГ были устойчивы к норфлоксацину, 15 из 40 (37,5%) штаммов СГА и 6 из 27 (22,2%) штаммов СГС/СГГ были устойчивы к энрофлоксацину.

На чувствительность к тетрациклину и эритромицину были протестированы: 46 штаммов СГА, 65 штаммов СГГ и 8 штаммов СГС (Таблица 3). В результате исследования 13 штаммов из 46 (28,3%) СГА и 28 штаммов из 73 (38,4%) СГС/СГГ оказались устойчивыми к действию эритромицина. Активность препаратов тетрациклинового ряда находилась на достаточно низком уровне: к тетрациклину оказались устойчивы 40 из 46 (86,9%) штаммов СГА. В отношении стрептококков групп G и C также отмечена низкая активность тетрациклина: 38 из 73 (52,0%) штаммов оказались устойчивы к действию тетрациклина.

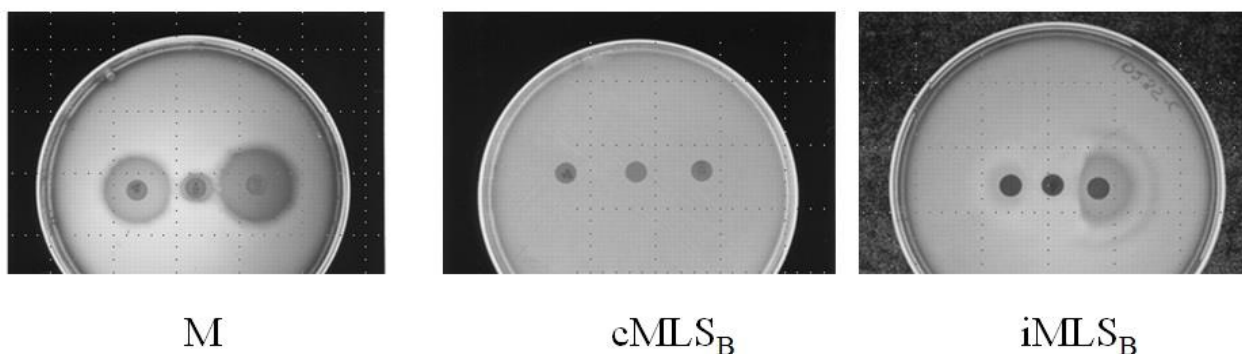
Таблица 3 – Чувствительность стрептококков групп А, С и G, выделенных во Вьетнаме, к антибактериальным препаратам

Антибиотик	СГА, 46 штаммов			СГС, 8 штаммов			СГG, 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

Определение типа лекарственной устойчивости

Из 13 штаммов СГА, устойчивых к эритромицину, 11 штаммов относились к сMLS_B типу, 1 штамм имел iMLS_B тип и 1 штамм имел М тип лекарственной устойчивости (Рисунок 4, Таблица 4). Среди 23 штаммов СГG, устойчивых к эритромицину, было обнаружено 16 штаммов сMLS_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 сMLS_B типу и 2 штамма имели М тип лекарственной устойчивости (Таблица 6).



М

сMLS_B

iMLS_B

Рисунок 4 – 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)

ВЫЯВЛЕНИЕ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГЕНАМИ ВИРУЛЕНТНОСТИ И АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ, У ШТАММОВ СГА

Генетические детерминанты антибиотикоустойчивости у штаммов СГА

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-метилаз семейства *erm* (Kataja J., 2000; Valardo, P.E., 2009; Li H., 2020). 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 специфических праймеров.

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 4). Как известно, у штаммов СГА с *cMLS_B* ген *ermB* может быть ассоциирован с одним из двух элементов *Tn916* семейства, *Tn3872* или *Tn6002* (Brenciani A., 2007; Lu M., 2019). Полногеномное секвенирование одного из штаммов (V31) наиболее распространенного *emm12* генотипа выявило наличие в его геноме полноразмерного транспозона *Tn6002* в составе ICE-*emm12* (Tse H., 2012; Ben Zakour N. L., 2015; You Y., 2018). (Рисунок 5). 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*. 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-НКУ165, отличающийся от ICE-*emm12* отсутствием *ermB*-фрагмента (Tse H., 2012). 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 (Roberts A. P., 2009) (Таблица 4). У 1 штамма коллекции с М типом лекарственной устойчивости был обнаружен ген *mefO*.

Таблица 4 – 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>cMLS_B</i>	11	<i>ermB</i> , <i>tetM</i>	У	ICE <i>emm</i> -12 (<i>Tn6002</i>)
<i>iMLS_B</i>	1	<i>ermB</i> , <i>tetM</i>	Ч	не установлен
М	1	<i>mefO</i> , <i>tetM</i>	Ч	не установлен
Чувствительны к действию <i>MLS_B</i> антибиотиков	1	<i>ermB</i> , <i>tetM</i>	Ч	ICE <i>emm</i> -12 (<i>Tn6002</i>)
	6	<i>tetM</i>	У	ICE-НКУ165
	23	<i>tetM</i>	У	<i>Tn916</i>
	3	-	Ч	-

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

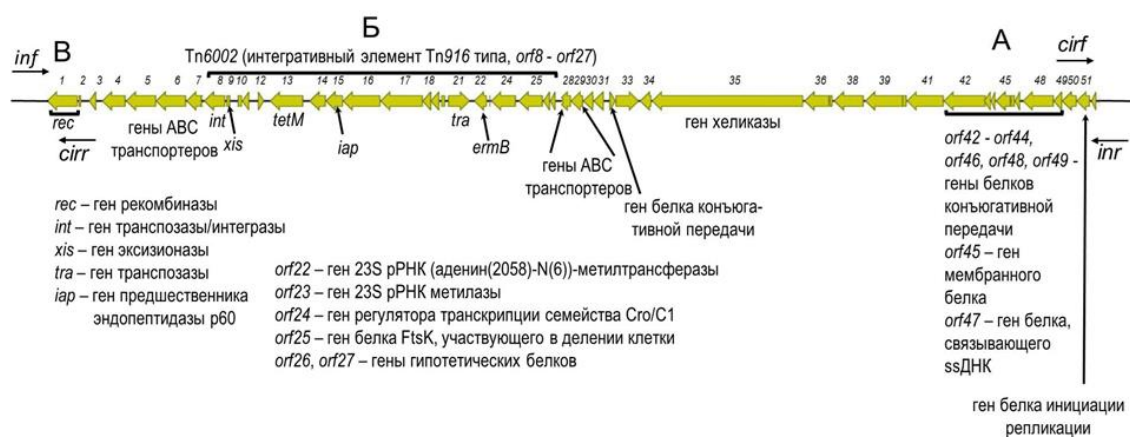


Рисунок 5 – Генетическая организация ICE-*emm12*

Полногеномное секвенирование штамма СГА *emm12* генотипа

Биоинформатический анализ данных NGS секвенирования вьетнамского штамма СГА доминирующего *emm12* генотипа (V31) выявил его филогенетическое родство со штаммами китайской эпидемической клональной линии III (clade III) (HKU306 (99,56% гомологии), HKU383 (98,95% гомологии)) (Рисунок 6).

Streptococcus pyogenes serotype M12 (GCA_014050235.1) genome neighbors

Download table

Items 1 - 100 of 2121 << First < Prev Page 1 of 22 Next > Last >>										
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	99.765	◆
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 6 - Отображение результатов филогенетического анализа генома штамма V31 и рефересных геномов *S. pyogenes*

В геноме штамма V31 было обнаружено присутствие двух участков ДНК (46,4 т.п.н. профага ФНКУ.vir, кодирующего суперантигены стрептококка SpeC, Ssa и ДНКазу Spd1, и 61 т.п.н. интегративно-конъюгативного элемента, кодирующего устойчивость к тетрациклину и макролидам, гомологичного ICE-*emm12*), которые впервые были обнаружены в геноме штамма HKU16, выделенного в Гонконге от больного скарлатиной (Tse H., 2012). У рефересного штамма СГА *emm12* генотипа MGAS9429, гены *speC* и *spd1* расположены на профаге Ф9429.1 (Beres S. B., 2006). У штамма V31, выделенного во Вьетнаме, и штаммов, циркулирующих во время эпидемии скарлатины в Юго-Восточной Азии, гены *speC* и *spd1* локализованы на новом профаге ФНКУ.vir, который дополнительно содержит ген суперантигена Ssa (Рисунок 7).

У штаммов V31, HKU16, MGAS9429, был обнаружен еще один профаг, Ф9429.2, содержащий токсины *speH*, *speI*, который отсутствует у штамма MGAS2096. Все рассматриваемые штаммы (V31, HKU16, MGAS9429, MGAS2096) содержали профаг Ф9429.3, ассоциированный с геном стрептодорназы *sdaD2* (Beres S. B., 2006) (Рисунок 7).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что штамм V31, отнесенный к одной из эпидемических клональных линий, обладает существенным патогенным потенциалом. По-видимому, наличие описанного экзотоксинового профиля, наряду с устойчивостью к антибиотикам, являются крайне значимыми для его быстрого распространения в популяции людей.

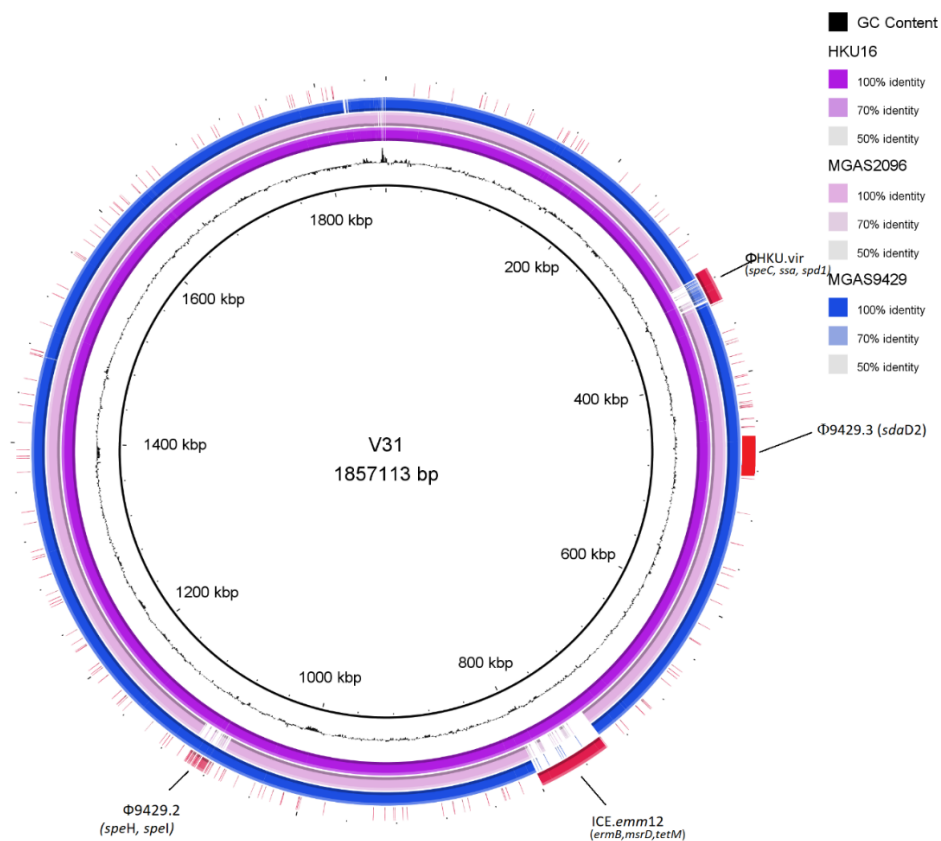


Рисунок 7 – Кольцевая генетическая карта штамма СГА генотипа *emm12* V31 в сравнении с референсными геномами штаммов СГА генотипа *emm12* HKU16, MGAS2096, MGAS9429 на основе алгоритма BLAST

Сравнительный анализ штаммов СГА, выделенных в Юго-Восточной Азии и России, по наличию генов, ассоциированных с МГЭ

Гены, ассоциированные с наличием ICE-*emm12*, были обнаружены у 1 из 35 штаммов, выделенных в 2007 г. в Санкт-Петербурге (*emm12* генотип). 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. Этот штамм принадлежал к редко встречающемуся типу *emm88.2*, и при этом был единственным из 32 штаммов, содержащим ген *ermB*.

Из штаммов СГА, выделенных в 2008-2011 гг. в Пекине, гены, ассоциированные с присутствием ICE-*emm12*, были обнаружены у 11 из 21 штамма *emm12* генотипа и у 11 из 30 штаммов *emm1* генотипа.

С целью изучения распространенности генов бактериофагов в штаммах СГА, выделенных в Юго-Восточной Азии и России, был проведен ПЦР анализ коллекции штаммов на наличие ряда генов, таких как ген стрептококкового токсина *speC*, ген стрептококкового суперантигена *ssa*, ген дезоксирибонуклеазы *spd1*, а также ген *int3*, кодирующий интегразу бактериофага Φ370.1-like. В зависимости от наличия этих маркерных генов сделаны предположения о присутствии в геноме штаммов тех или иных бактериофагов (Таблица 5).

Согласно литературным данным, ген *ssa* у СГА, помимо ΦHKU.vir, может входить в состав других бактериофагов: ΦHKU.ssa, ΦHKU165.4, 315.2, SPpP6, ΦMGAS10750.3, которые в совокупности в данном исследовании обозначены как «Meta-ssa» фаз (Blake A. S., 2019; Shannon B. A., 2019).

Таблица 5 - 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 отсутствуют
штаммы, выделенные во Вьетнаме						
<i>emm12</i> (12)	12/12					
штаммы, выделенные в Пекине						
<i>emm12</i> (21)	13/21			8/21		
<i>emm1</i> (30)	28/30			1/30		1/30
штаммы, выделенные в Санкт-Петербурге						
<i>emm12</i> (18)	1/18		11/18	3/18	1/18	2/18
<i>emm1</i> (17)	1/17	1/17		9/17		6/17
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.

ВЫЯВЛЕНИЕ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГЕНАМИ ВИРУЛЕНТНОСТИ И АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ, У ШТАММОВ СГС И СГГ

Генетические детерминанты антибиотикоустойчивости у штаммов СГС и СГГ

Из 73 штаммов СГС/СГГ, 40 штаммов не содержали детерминант устойчивости к эритромицину и были чувствительны к действию MLSB антибиотиков. Шесть штаммов СГГ содержали ген *mefA*, тем не менее, три из них были чувствительны к эритромицину, а оставшиеся три имели М тип лекарственной устойчивости и устойчивость к тетрациклину за счет наличия гена *tetO* в составе химерного генетического элемента Ф46.1.var (Таблица 6).

Ген *mefE* был обнаружен у 6 штаммов, при этом у двух 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 (Varaldo P.E, 2009).

Секвенирование *mef* амплификатов двух штаммов СГС/СГГ выявило редкую последовательность *mefG*, впервые обнаруженную у штаммов СГГ в Великобритании в 2006 году (Amezaga M. R., 2006). Согласно данным полногеномного секвенирования, устойчивость к тетрациклину одного из этих штаммов была обусловлена наличием гена *tetS*, который впервые был обнаружен у SDSE в ходе данной работы

15 штаммов, конститутивно устойчивых к эритромицину и клиндамицину, содержали ген *ermB*, который входил в состав транспозона Tn6002.1 (Таблица 6). 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*, входит в состав нового конъюгативного транспозона ICE-B82.

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.

Таким образом, гомологи МГЭ, ассоциированных с генами антибиотикоустойчивости, в данной работе были обнаружены у разных видов СГС и СГГ. Так, элемент Tn6002.1 встречался у 2 штаммов SDSE и 11 штаммов *S. anginosus* в различных геномных контекстах, о чем свидетельствует анализ рестрикционного полиморфизма их основного генома (Таблица 2). 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, ему, вероятно, сложнее противостоять (Lerminiaux N. A., 2019).

Таблица 6 – Характеристика 73 штаммов СГС/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	-
	17	<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
	1	<i>mefE, msrD</i>	Ч	MEGA
	1	<i>mefE, msrD, tetM</i>	Ч	MEGA+Tn916-like/ Tn2009
М	3	<i>mefA, msrD, tetO</i>	У	Φ46.1.var (V123)
	2	<i>mefE, msrD, tetM</i>	У	MEGA+Tn916-like/ Tn2009
	2	<i>mefE, msrD</i>	Ч	MEGA
cMLS _B	1	<i>mefG, msrD, tetS</i>	У	новый ΦNT15 (NT15)

	1	<i>mefG, msrD, tetM</i>	Ч	не определен
	15	<i>ermB, tetM</i>	У	Tn6002.1
	1	<i>ermB, tetG</i>	Ч	новый ICE-B82 (B82)
	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 следующем разделе.

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

Новые МГЭ, содержащие гены антибиотикоустойчивости, у трех вьетнамских штаммов SDSE, обнаруженные с помощью полногеномного секвенирования

В геноме SDSE NT15 был выявлен новый МГЭ фагового происхождения размером 54 т.п.н., названный ФНТ15. Данный элемент насчитывает 54 открытые рамки считывания (ORF) и интегрирован в последовательность хромосомного гена *comE*C, являющегося местом встраивания сходных профагов у СГА, SDSE и *S. suis* (Ф1207.3 (52 т.п.н.), Ф10394.4 (58 т.п.н.) (Giovanetti E., 2005). Обнаруженный элемент ФНТ15 также имел сходство с элементом СГА Фм46.1 (55 т.п.н.), интегрированным в ген 23рРНК урацил метилтрансферазы (Brenciani A., 2010). Подобно Фм46.1, ФНТ15 представлял из себя транспозон Tn1207.1, интегрированный в профаг. Однако в отличие от Фм46.1, внутри транспозона Tn1207.1 была обнаружена уникальная последовательность нефагового происхождения, кодирующая сайт-специфическую рекомбиназу (ORF3); ABC-F транспортер (ген *IsaE*), обеспечивающий рибосомную защиту и ответственный за перекрестную резистентность к линкозамидам-стрептограминам А-плевромутилинам (так называемый фенотип LSAP); линкозамид нуклеотидилтрансферазу (ген *InuB*), обеспечивающую устойчивость к линкозамидам (фенотип L), и ген гипотетического белка (ORF6). Следующие пять ORF (ORF7 – ORF11), являются частью транспозона Tn1207.1, который отличается наличием редкого аллеля гена *mef* (*mefG*, степень гомологии с геном *mefA* *S. pyogenes* – 87,9%) и *msrD* (степень гомологии с геном *msrD* *S. pyogenes* – 91,56%) (Рисунок 8).

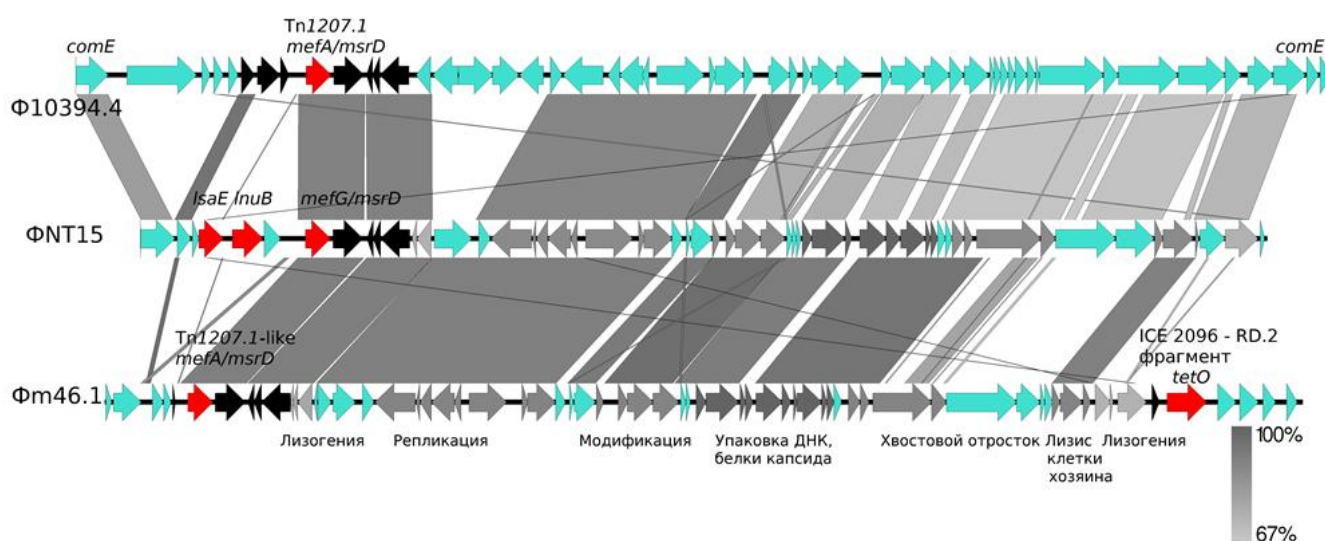


Рисунок 8 – Схема элемента ФНТ15 у штамма SDSE NT15

Низкая степень гомологии фаговых модулей, выявленная при сравнении данного профага (ФНТ15) с подобными элементами, указывает на продолжающиеся процессы перестройки, которые вероятно способствуют уклонению фагов от системы иммунитета CRISPR-Cas (Hampton H. G., 2020; McShan W. M., 2022). Примечательно, что ранее детерминанты устойчивости *lsaE* и *lnuB* в тандеме были описаны у *S. agalactiae* и *S. suis* (Huang K. 2016; Hawkins P. A., 2017). Результаты этой работы — это первый случай их обнаружения у SDSE.

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*, располагалась на профаге длиной 39,6 т.п.н., интегрированном в хромосому в ген *rumA*, и эта структура не передавалась путем конъюгации (Berbel D., 2019). 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) (Chochua S., 2017), а другой в 2007 году в Испании (*lnuC*+; фенотип L) (Berbel D., 2021). В последнем случае ген О-линкозамид-нуклеотидил трансферазы *lnuC*, обеспечивающий устойчивость к линкозамидам, располагался на транспозоне MTn*Sag1* (1724 н.п.) внутри ICES*Spn8140*. Самостоятельно элемент MTn*Sag1* был описан ранее у *S. agalactiae* (Achard A., 2007), а в нашем исследовании был обнаружен у штамма SDSE V123 в составе профага Ф46.1 (Рисунок 9), который является главным элементом, обуславливающим М тип устойчивости к макролидам у *S. pyogenes*, что еще раз указывает на горизонтальный перенос между этими видами.

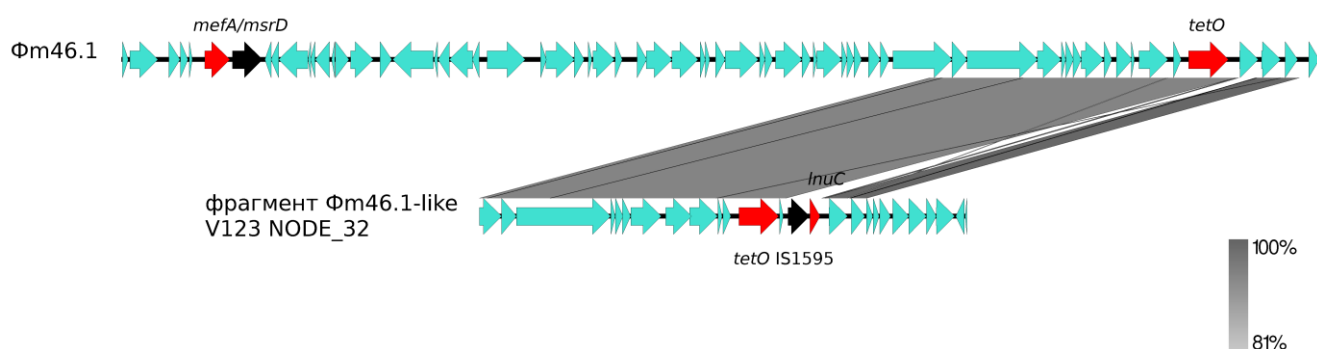


Рисунок 9 – Схема элемента Ф46.1 у штамма SDSE V123

Один из штаммов SDSE (B82) не содержал генов, ассоциированных с присутствием транспозона Tn*6002.1*, несмотря на наличие гена *ermB* и конститутивный тип устойчивости к макролидам, 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*, 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 (Wang T., 2016). 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) (Aruni A. W., 2015). 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 10).

Обнаруженный в штамме B82 элемент является конъюгативным транспозоном, так как содержит гены, кодирующие сайт-специфическую рекомбиназу, релаксазу (*nicK*), точку начала репликации (*oriT*; ACCCCCCGTATCTAACAGGGGGGT (инвертированные повторы выделены), идентичную хорошо изученному ориджину репликации конъюгативного транспозона Tn*916*, а

также ген, кодирующий белок конъюгативного переноса (*traE*). В элементе присутствуют три гена, кодирующие рекомбиназы, расположенные друг за другом. Наличие прямого повтора длиной 3 нуклеотида, фланкирующего транспозон, является доказательством его мобильности.

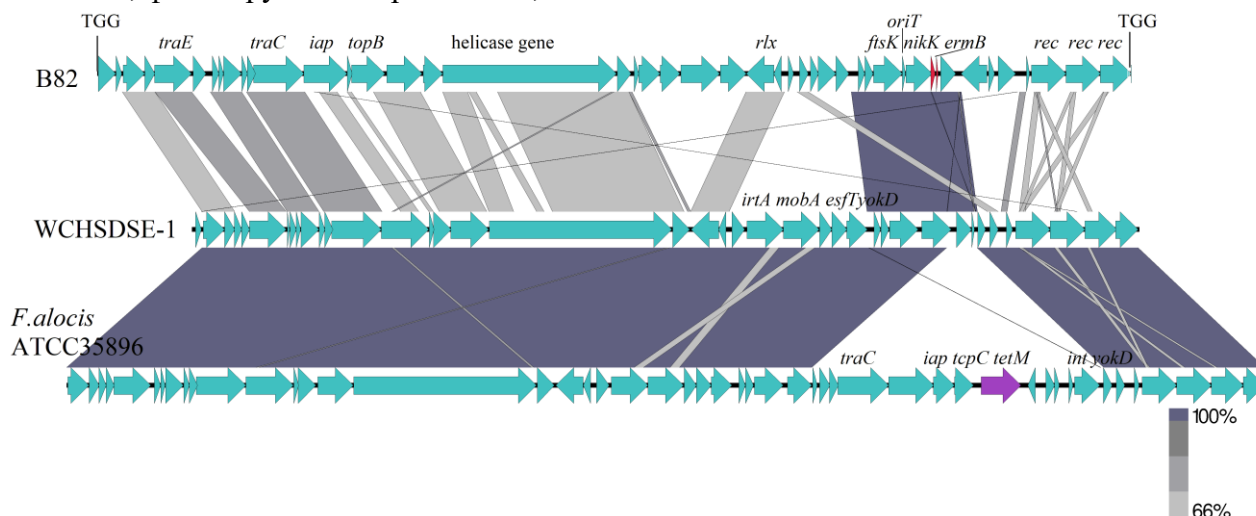


Рисунок 10 – Схема элемента ICE-B82 у штамма SDSE B82

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

Таким образом, гены вирулентности и гены устойчивости к антибиотикам у штаммов стрептококков групп А, С и G зачастую оказываются расположенными на различных МГЭ. В этом случае подходы для дифференцировки штаммов, использующие только вариативность определенных генов, оказываются ограниченными. Для оценки патогенного потенциала и резистоста штаммов, а также для верификации филогенетических связей между эпидемическими штаммами, циркулирующими в различных географических регионах, успешно могут применяться методы NGS секвенирования.

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 и 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 СГГ, характеризуется значительным филогенетическим разнообразием. Распространение устойчивости к макролидам и линкозамидам у СГС и СГГ 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 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Носик***, А. Г. Эпидемиологическая и генетическая характеристика стрептококков, циркулирующих во Вьетнаме / А. Г. **Носик***, Ю. Ю. Ильясов // Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций: подходы, традиции, инновации», Санкт-Петербург, 23-25 апреля 2014 г. – Инфекция и иммунитет. – 2014. – №1. – С. 81.
2. **Носик***, А. Г. Новый транспозон *Streptococcus pyogenes*, содержащий ген устойчивости к тетрациклину, и его распространенность на Северо-Западе России и странах Юго-Восточной Азии / А. Г. **Носик***, Е. М. Полякова, Ф. К. Линь, А. В. Дмитриев // Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций: подходы, традиции, инновации», Санкт-Петербург, 23-25 апреля 2014 г. – Инфекция и иммунитет. – 2014. – №1. – С. 100.
3. Dmitriev, A. V. Molecular analysis of group A, C and G streptococci isolated from Vietnamese children / A. V. Dmitriev, **A. G. Nosik***, P. K. Linh, V. T. Loan, V. H. Giang, Y. Y. Il'yasov // Book of Abstracts XIX Lancefield International symposium on streptococci and streptococcal diseases, Buenos Aires, Argentina. – 2014. – P. 67.
4. Dmitriev, A. V. Invasive streptococcus pyogenes infections of the soft tissues in Moscow, Russia / A. V Dmitriev, E. V Glushkova, **A. G Nosik***, N. F Dmitrieva, D. A Kleumenov, K. V Lipatov, N. I Briko // Book of Abstracts XIX Lancefield International symposium on streptococci and streptococcal diseases, Buenos Aires, Argentina. – 2014. – P. 95.
5. Брико Н. И. Частота заболеваний, вызываемых стрептококками группы А, среди инвазивных инфекций мягких тканей, и характеристика возбудителя / Н. И. Брико, Е. В. Глушкова, **А. Г. Носик***, А. В. Дмитриев, Н. Ф. Дмитриева, Д. А. Клейменов, К. В. Липатов // ЖМЭИ. – 2014. – №5. – P.24-31. (журнал из Перечня ВАК).
6. **Носик***, А. Г. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика стрептококков, выделенных у детей младшего школьного возраста во Вьетнаме / А. Г. **Носик***, Ю. Ю. Ильясов, Ф. К. Линь, А. В. Дмитриев // Журн. Инфектологии. – 2015. – т. 7. – № 3. – С.112-118.
7. **Киреева**, А. Г. Молекулярные детерминанты устойчивости к макролидам у β -гемолитических стрептококков групп А, С и G / А. Г. **Киреева**, А. В. Дмитриев // Всероссийская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и

клинической микологии «XVII Кашкинские чтения», Санкт-Петербург, 09-11 июня 2014 г. – Проблемы медицинской микологии. – 2016. – т. 18. – №2. – Р. 74-75. **(журнал из Перечня ВАК).**

8. Дмитриев, А. В. Поиск новых генетических детерминант *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* / А. В. Дмитриев, А. М. Киселев, **А. Г. Киреева**, Ю. Ю. Ильясов, А. А. Сергушичев, С. В. Казаков, О. В. Калинина // Медицинский академический журнал. – 2016. – 16. – №2. – С.42-50. **(журнал из Перечня ВАК).**
9. Dmitriev, A. V. Novel genetic determinants of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* / A. V Dmitriev, **A. G Kireeva**, A. M Kiselyov, O. V Kalinina // Book of Abstracts XX Lancefield International symposium on streptococci and streptococcal diseases, Fiji. – 2017. – P. 16.
10. **Kireeva, A. G.** An occurrence of ICE-emm12 element containing *tetM* and *ermB* resistance genes among Russian and Vietnamese *Streptococcus pyogenes* strains / **A. G Kireeva**, N. I Briko, E. V Glushkova, O. V Kalinina, A. V Dmitriev // Book of Abstracts XX Lancefield International symposium on streptococci and streptococcal diseases, Fiji. – 2017. – P. 62.
11. **Киреева, А. Г.** Распространенность генетического элемента ICE-emm12, содержащего гены устойчивости *tetM* и *ermB*, среди российских и вьетнамских штаммов стрептококков группы А / **А. Г. Киреева**, О. В. Калинина, А. М. Киселев, Н. И. Брико., Е. В. Глушкова, А. В. Дмитриев // ЖМЭИ. – 2018. – №2. – С.23-30. **(журнал из Перечня ВАК).**
12. **Kireeva, A. G.** Molecular characterization of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from Vietnamese children during the scarlet fever outbreaks in Asian countries / **A.G. Kireeva**, Y.Y. P'yasov, P. K. Linh, V. T. Loan, V. H. Giang, O. V. Kalinina, A. V. Dmitriev // 37th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Slovènjija. – 2019. – P. 690.
13. Dmitriev, A. V. Novel genetic determinants of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strains isolated in Vietnam / A. V. Dmitriev, A. M. Kiselyov, **A. G. Kireeva**, Y. Y. P'yasov, O. V. Kalinina. // 37th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Slovènjija. – 2019. – P. 393.
14. **Kireeva, A. G.** Identification of novel mobile genetic element associated with resistance to macrolide and lincosamide in group G streptococci / **A. G. Kireeva**, O. V Kalinina, A. V. Dmitriev // Book of Abstracts XXI Lancefield International symposium on streptococci and streptococcal diseases, Sweden. – 2022. – P. 110.
15. **Kireeva, A. G.** Identification of novel mobile genetic elements associated with resistance to macrolide and lincosamide in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* / **A. G. Kireeva**, A. V. Dmitriev // The open microbiology journal. – 2023. – V. 17. – №1. – P.1-7.

* фамилия автора Носик А.Г. изменена на Киреева А.Г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СГА, СГВ, СГС, СГГ – Стрептококки группы А, В, С, G

SDSE – *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

МГЭ – Мобильный генетический элемент

ICE – Интегративно-конъюгативный элемент

PFGE – Электрофорез в пульсирующем электрическом поле

MLSB – макролиды, линкозамиды и стрептограмин В (iMLSB/ cMLSB – индуцибельная/ конститутивная устойчивость к клиндамицину)

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

ORF – открытая рамка считывания

ДДМ – диско-диффузионный метод

п. н. – пар нуклеотидов