

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ В ИНФЕКЦИОННОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ (НА ПРИМЕРЕ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ПАТОГЕННЫМИ СТРЕПТОКОККАМИ)

А.А. Тотолян

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Modern approaches and technologies in infectious epidemiology (as an example, infections caused by pathogenic streptococci)

A.A. Totolian

Science Research Institute of Experimental Medicine NWD RAMS, Saint-Petersburg

Резюме. Данный обзор составлен на основании опыта многолетних исследований отдела молекулярной микробиологии НИИЭМ РАМН по молекулярной идентификации и характеристике патогенных стрептококков, *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus agalactiae*. В нем изложены современные подходы и технологии оценки бактериального звена в эпидемиологии широко распространенных стрептококковых заболеваний. Основное внимание уделено генетическому разнообразию возбудителей на геномном и геномном уровнях, их генотипированию и роли мигрирующих генетических элементов (умеренные фаги, транспозоны, встраивающиеся последовательности, острова патогенности, плазмиды) в дифференцировке стрептококков и в анализе распространенности признаков болезнетворности. Прослежена взаимосвязь между генотипом возбудителя и вызываемой им патологией. Выдвинуты предложения по учету форм стрептококковых инфекций и регламентированию диагностических средств и подходов.

Ключевые слова: стрептококки, генотипирование, профаг, мобильный элемент, полимеразная цепная реакция, остров патогенности, эпидемиология.

Введение

Эффективность эпидемиологии и её составляющих — мониторинга инфекций и их возбудителей, учета всего спектра заболеваний, иммунитета популяций и коллективов, определения поражаемых контингентов, специфической профилактики заболеваний и организации эпидемиологического надзора — более других медицинских дисциплин зависит от технологического уровня, чувствительности и специфичности, информативности и доступности методов идентификации и изучения возбудителей, оценки их вирулентности, средств и способов преобразования патогенов в условиях спорадических и эпидемических процессов. К движущим силам этих процессов относятся восприимчивость популяций, гено- и фенотипическое

Abstract. The present review is based on the long term researches done at the Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine and devoted to molecular identification and characterization of pathogenic streptococci, mainly *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*. In it the basic approaches and technologies the evaluation of microbiological aspects of wide-spread streptococcal infection epidemiology were described and considered. The special attention was given to the genetic heterogeneity of causative strains at the gene and genomic levels and to their genotyping. Also, the essential role of mobile genetic elements (temperate phages, plasmids, transposons, pathogenic islands and insertion sequences) in differentiation of streptococci and analysis of their pathogenic properties were determined. Interrelation between genotypes of species and their pathogenic potentiality was traced. Some proposals were developed to improve an official registration of streptococcal diseases and their complications as well as diagnostic abilities for them.

Key words: streptococci, genotyping, prophage, mobile element, polymerase chain reaction, pathogenic island, epidemiology.

разнообразие возбудителей, а также особенности и пути распространения инфекции [1, 2].

Можно с большой вероятностью утверждать, что наиболее уязвимым звеном среди перечисленных разделов эпидемиологической науки в нашей стране все еще остаются идентификация и детальная молекулярная характеристика возбудителей, что определяется недостаточным развитием практической лабораторной базы инфекционной патологии. В свою очередь, именно этим обстоятельством определяются слабые стороны мониторинга инфекций и возбудителей, выявления доминирующих или вновь выявленных вариантов циркулирующих в окружающей среде патогенов, неполноценный учет вызываемых форм заболеваний и, наконец, промахи в специфической профилактике (выбор и подготовка вакцинных штаммов, сроки и качество разработки средств

и мер профилактики). Отставание в этих областях ставит отечественную медицину в зависимость от зарубежных фармацевтических рынков, что стоит значительных средств, которые более целесообразно направлять на развитие собственной базы молекулярной эпидемиологии.

В настоящем изложении основное внимание отводится новым технологиям и подходам в вопросах идентификации возбудителей с учётом современных достижений молекулярной микробиологии, геномики и протеомики бактерий. Прогресс в изучении полногеномных последовательностей большого числа патогенов, особенностей генов и организации генома, факторов патогенности, систем регуляции транскрипции генов и экспрессии белков открыл новые возможности для фундаментальной микробиологии и для создания информативных и прецизионных технологий и методов в интересах детальной характеристики возбудителей инфекций.

В настоящем обзоре проблема рассматривается на примере патогенных стрептококков, их распространённых видов, определяющих полнотропность вызываемых процессов, чреватых высокой инвалидизацией и значительными социально-экономическими потерями. Многие положения изложены с учетом итогов исследований отдела молекулярной микробиологии НИИ экспериментальной медицины РАМН, выполненных под руководством автора статьи, профессора А.Н. Суворова и д.б.н. А.В. Дмитриева [3, 4]. Краткий обзор этих исследований приводится ниже. Отметим, что в конце XX в. построены первые генетические карты стрептококков групп А и В с локализацией на них 35–38 и 10–12 генов патогенности соответственно [3а, 4а]. Эта работа внесла существенный вклад в генетику патогенности стрептококков.

Стрептококковые заболевания, вызываемые *S. pyogenes* (стрептококк группы А, СГА) относят к распространённой инфекционной патологии. В отдельных регионах ущерб, наносимый ими, может превосходить потери от кишечных инфекций и гепатитов вместе взятых [5]. В мире ежегодная заболеваемость, вызываемая *S. pyogenes*, исчисляется 616 млн случаев тонзилло-фарингитов и 111 млн – кожных инфекций, т.е. заболевает около 9% и 1,6% населения планеты соответственно [6, 7]. При этом погибает до 517 000 человек, преимущественно от инвазивных форм (некротический фасцит или миозит, синдром токсического шока) и осложнённый типа ревматической лихорадки, гломерулонефрита. Инвазивными инфекциями ежегодно заболевает до 663 000 человек, а летальность при этом достигает 30–35%. Каждый год в мире регистрируют до 15,6 млн случаев ревматической лихорадки и до 0,5 млн случаев гломерулонефрита, а погибает до 233 000 и 5000 человек соответственно.

Следует отметить, что в 20–25% случаев так называемая сердечная или почечная смертность сочетается со стрептококковой инфекцией. Поэтому данный возбудитель рассматривается в качестве одной из ведущих причин глобальной заболеваемости и смертности. В этих цифрах не отражена инвалидизация от стрептококковых инфекций. Если к ним добавить случаи, вызываемые стрептококками групп В (СГВ, *S. agalactiae*), С и G, то цифры станут более весомыми [3]. *S. agalactiae* хотя и причислен к условно-патогенным микробам, сегодня вышел в лидеры летальной инвазивной инфекции плодов (преждевременные роды, поздние выкидыши, выраженное недоразвитие) и новорожденных (сепсис, менингит, пневмония), а также занял существенное место в этиологии болезней наружных родовых путей у беременных (носительство до 30%), бесплодия, простатита (18%) [8, 9] и патологии пожилых при сниженной функции иммунологической защиты.

Для идентификации и детальной характеристики патогенных стрептококков и создания средств специфической профилактики вызываемых заболеваний целесообразно исходить почти исключительно из современных знаний об их геноме, белках и адаптивных потенциях на колебания параметров внешней среды. Это замечание особенно важно для задач эпидемиологического свойства, поскольку их решение нуждается в длительных, систематических или периодических наблюдениях в интересах детальной характеристики штаммов-возбудителей. Естественно, что эта работа должна быть основана на тщательной организации и опережающем планировании. В большинстве стран Америки и Европы, в Австралии и в некоторых странах Азии и Африки подобные исследования выполняются службами центров по контролю за заболеваемостью и её предупреждению, и на передний план выходят апробированные наукой методы, подходы и технологии генотипирования. К числу наиболее информативных из них относятся следующие:

– emm-генотипирование штаммов-изолятов СГА по данным секвенирования нуклеотидных последовательностей emm-генов, кодирующих переменные фрагменты типовых М-белков стрептококка [10];

– MLST-типирование штаммов патогенов по результатам сравнительного секвенирования аллельных участков ряда «house-keeping» маркерных генов конкретного вида [11];

– дифференцировка генетически модифицированных вариантов патогенов по ДНК умеренных фагов (профагов) и трансдуцируемых (или конвертируемых) ими генов [12, 13];

– дифференцировка штаммов патогенов по ДНК мигрирующих генетических элементов (плазмид, транспозонов, IS-элементов, островов патогенности) и ассоциированных с ними генов [14];

– геномный полиморфизм штаммов, например, по данным электрофореза рестриционных фрагментов ДНК в пульсирующем электрическом поле (PFGE) [15];

– различные варианты полимеразной цепной реакции (PCR) на маркерные гены и их аллели [16].

Приведенный перечень подходов не является исчерпывающим, но указанные в нем технологии стандартизованы и применяются с целью определения региональных, годовых и сезонных колебаний в распределении циркулирующих генотипов патогенных микробов, а также для выявления генетически новых клонов и прогнозирования появления эпидемически актуальных штаммов.

Как правило, организация бактериального генома каждого отдельного вида, а точнее взаиморасположение хромосомных генов, весьма консервативна, хотя внутренняя структура функционально однозначных генов (аллелей) может различаться за счет мутаций, делеций, вставок и варибельных участков [17, 18]. Данная упорядоченность, как правило, нарушается в первую очередь вставками мигрирующих ДНК-элементов, имеющих различную локализацию и размеры. Именно они вносят наибольший вклад в полиморфизм штаммов того или иного вида и модифицируют проявления вирулентности [13].

Считается, что величина генома бактерий находится в обратной зависимости от их образа жизни. В процессе эволюции рост паразитизма сопровождался редуцированием размера генома, что может происходить за счет потери «house-keeping» генов.

В микробной клетке постоянно имеет место динамика событий, меняющих её адаптивные возможности и выживаемость в агрессивной среде организма хозяина. Для этого бактерии используют двойной механизм сенсорных способностей: (i) регуляцию транскрипции генома на колебания температуры, парциального давления O_2 , CO_2 и концентрации ионов металлов в среде [19]; (ii) коммуникативные связи между особями популяции бактерий – «quorum sensing», обеспечивающие модуляцию экспрессии белковых факторов (в том числе патогенных) в зависимости от плотности бактериального фокуса в очаге инфекции [6].

Если механизм «quorum sensing» еще слабо изучен, то за последние 10–15 лет накоплен большой материал по регуляции транскрипции генов и экспрессии их продуктов, изменяющих вирулентность патогена [20]. Системы регуляции известны в двух формах: двухкомпонентные (TCSs) и глобальные (RRs) системы, запускающие позитивный или негативный сигнал на гены, кодирующие белки-регуляторы. Первые распознают сигнал посредством трансмембранных киназ и состоят из гена сенсорной гистидинкиназы и гена ДНК-связывающего белка-регулятора ответа. Сенсорная способность вторых изучена слабее.

S. ruogenes и *S. agalactiae* имеют 13 и 21 TCS соответственно, а также десятки глобальных регуляторов, образующих регуляторную сеть с очень разветвленными возможностями адаптации. Звенья сети должны быть взаимосвязаны с другими, возможно, по принципу обратной связи и могут регулироваться функциями генов в направлении как активации, так и репрессии. Совокупности генов, регулируемые в двух направлениях, образуют регулоны, в которых различают «*core*»- и «*sub*»-части. Регуляция первой носит непосредственный характер. Опосредованная же регуляция типична для «*sub*»-регулонов и является штаммоспецифичной [20]. Она проявляется как на геномном, так и на протеомном уровнях [20].

Регуляторная сеть, по сути, формирует различные проявления вирулентности штаммов. Например, *ggg*-белок СГА непосредственно управляет функцией гена *speV* (экзотоксин В или цистеиновая протеаза) и ко-транскрибируемого с ним гена *sru2040*, между тем как *ggg*-«*sub*»-регулоны по позитивно и негативно регулируемым генам у разных штаммов варьируют в пределах до сотен генов [20]. Естественные и индуцированные мутации в *ggg*-гене, сопровождающиеся заменой хотя бы одной аминокислоты в регуляторном *ggg*-белке, приводят к масштабным изменениям в пептидных профилях мутантных штаммов [20]. При этом подавление синтеза токсина *speV* может сопровождаться двунаправленным изменением экспрессии других факторов патогенности, баланс которых отражается на вирулентности мутантов. Сходные изменения в белковом профиле, снижение антифагоцитарных и вирулентных свойств штаммов СГА имеют место при мутациях и в другом глобальном регуляторе *S. ruogenes* – гене *mutR* [21].

У *S. agalactiae* описана генетическая система *sak188/sak189* в качестве TCS, регулирующей функцию гена *bas*; белок *bas* характерен, как правило, для штаммов СГВ, выделяемых от людей, и относится к факторам патогенности по способности связывать IgA. Нарушения в этой регуляторной системе подавляют синтез *bas*-белка [22, 23].

Этот вопрос здесь изложен весьма сжато, лишь в качестве иллюстрации, т.к. не имеет прямого отношения к теме статьи. Однако эти знания важны для микробиологов и эпидемиологов, поскольку необходимы для понимания внутренних пружин реализации инфекционных процессов в популяциях. Возвращаясь к теме, остановимся на технологиях и подходах, важных для молекулярной эпидемиологии.

Генотипирование *S. ruogenes* по варибельной части гена *emt*, кодирующего типоспецифический М-белок

Еще в прошлом веке основным в типировании СГА оставался трудоёмкий и часто недоступный

серологический анализ штаммов по сумме белков М-семейства. Было описано до 100 М-серотипов по антигенности супервариабельных участков М-белка. К концу века количество серотипов достигло предела, после которого этот подход стал еще более трудоёмким. Накопилась значительная информация о структуре и функциях белков М-семейства (Mpr, Epm, Epp), гены которых в разных сочетаниях входят в состав так называемого Mga-регулона СГА [6]. Среди них постоянно присутствующим и наиболее вариабельным оказался emm-белок, ген которого и был предложен для совершенствования типирования СГА. В итоге в центре по контролю за заболеваемостью (Атланта, США) при поддержке группы экспертов ВОЗ была разработана качественно новая и высокоэффективная технология генотипирования в PCR по нуклеотидной последовательности вариабельных участков emm-генов [10]. Результаты характеризовались высокой точностью по причине технологичности подхода. В соответствии с принятыми условиями первые 90 пар нуклеотидов (п.н.) emm-гена, кодирующие 30 аминокислот, определяют emm-генотип СГА, а последующие 60 п.н. (20 аминокислот) — emm-подтип. Для идентификации типа и подтипа существуют базы данных, позволяющие сопоставлять получаемые данные с известными (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strept/protocol/emm-type.htm>). Сходство первого из участков с последовательностями известных emm-типов менее чем на 92%, а также наличие одной нуклеотидной замены во втором являются основанием для регистрации нового emm-типа или подтипа соответственно. Разделение СГА на emm-типы позволило следить за распределением и динамикой разных типов и форм заболеваний в различных регионах мира. Так, в 2006–2009 гг. для африканского континента были актуальны типы emm12 и emm75; а для Азии — emm1 и emm12. Инвазивные формы в Северной и Латинской Америке вызывали типы emm1 и emm12, а в США — еще и emm3. Кожные инфекции в странах Азии вызывали штаммы emm1 и emm2, в странах Африки — emm28, emm74, emm80, emm100; а в Латинской Америке — emm53 и emm83. В Санкт-Петербурге доминировали типы emm1, emm3, emm4 и emm12. Важно отметить, что в 1970–1980-е гг. в большинстве стран мира из циркуляции полностью исчез тип emm1 и вновь вернулся в 1990-е гг. в ассоциации с тяжелыми инвазивными инфекциями и скарлатиной.

Потенциальная изменчивость вариабельной части emm-гена и кодируемого им фрагмента emm-белка высока и выражается астрономическим числом. На сегодня известно около 200 emm-генотипов СГА [7], а появление новых высоко вероятно. Принимая во внимание типоспецифический характер иммунитета к *S. pyogenes*, можно допустить, что вариации в emm-гене и «антигенный дрейф» в EmM-белке являются функцией давления защит-

ных реакций макроорганизма [24]. Очевидно, что в основе emm-генотипирования лежит полиморфизм emm-гена, а не генома в целом. Следует добавить, что штамм того или иного emm-генотипа, в зависимости от принадлежности к OF-положительным (липопротеиназа) или OF-негативным штаммам, имеет разную структуру Mga-регулона, содержащего гены ведущих факторов патогенности в разных сочетаниях. Речь идет об антикомплементарных и антифагоцитарных белках СГА, способных связывать разные белки крови и противодействовать реакциям врожденного иммунитета. Определяя emm-генотипы штамма, можно предсказать его патогенетическую направленность, согласуясь со структурой конкретного Mga-регулона.

Генотипирование *S. pyogenes* по результатам MLST-типирования

Аббревиатура MLST или просто ST означает мультилокусное сиквенсное типирование, построенное на сравнении разных штаммов по данным PCR и сиквенс-анализа внутренних ДНК-последовательностей (каждый размером в 450–500 п.н.) 7 «house-keeping» генов (генов «домашнего хозяйства»), кодирующих разные ферменты. По сути, речь идет о выявлении различий в аллельных фрагментах одних и тех же генов для построения суммарного аллельного профиля изучаемых штаммов.

ST-профили разных микроорганизмов включены в базы данных, по которым определяют ST-генотипы штаммов конкретного вида [11]. Каждый из них включает аллельные варианты 7 генов, составляющих идентификационный маркер ST-типа. Так, например, ST-14 *S. pyogenes* содержит аллели 8, 21, 4, 11, 2, 6, 8 определенных генов. Различия в одной нуклеотидной паре достаточны для присвоения штамму нового ST-идентификационного номера. На сегодня для *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* установлено наличие 593, 585 и 8253 ST-типов соответственно (<http://www.mlst.net/misc/further.asp/>), между тем как серотипирование выявляет лишь у 135, 11 и 90 типов.

С позиций полноценного эпидемиологического анализа, технология MLST обладает наибольшей дискриминационной потенциальной и необходима в целях выявления наиболее актуальных для конкретных форм патологии типов, что особенно существенно в случае политропных патогенов, к которым принадлежит грам-положительная кокковая флора. Так, например, наиболее инвазивными в перинатологии являются: для *S. pyogenes* ST-15 и 28, а для *S. agalactiae* ST-1, 9, 17, 19 и 23 [3].

Для ST-типирования возбудителей разных видов подобраны специфические наборы генов, прямых и обратных праймеров, а также и отдельные детали выполнения анализа. Примером могут служить сочетания генов разных видов стрептококков. Так, для

S. ruogenes используются гены глюкозокиназы (*gki*), транспортного белка для глутамин (*gtr*), глутаматрацемазы (*murl*), белка репарации неправильно спаренных нуклеотидов (*mutS*), транскетолазы (*recP*), ксантин-фосфорибозил-трансферазы (*xpt*) и ацетил-КоА-ацетилтрансферазы (*yiqL*); для *S. agalactiae* – гены алкогольдегидрогеназы (*adhP*), фенилаланил-ТНК-синтазы (*pheS*), белка транспорта глутамин (*atr*), глутаминсинтазы (*glnA*), сериндегидратазы (*sdhA*), глюкозокиназы (*glcK*) и транскетолазы (*tkt*); а для *S. pneumoniae* – гены шикимат-дегидрогеназы (*aroE*), глюкозо-6-дегидрогеназы (*gdh*), глюкозокиназы (*gki*), транскетолазы (*recP*), пептидазы I (*spi*), ксантин-фосфорибозил-трансферазы (*xpt*) и D-аланин-D-аланилигаза (*ddl*) [4].

ST-типирование применимо ко всем микроорганизмам, а также имеет не только эпидемиологический, но и филогенетический смысл. Он определяется по данным дендрограмм, которые выявляют эволюционные связи между видами и штаммами. Так, из дендрограмм, построенных по результатам анализа СГВ, стало очевидно, что серотиповая принадлежность *S. agalactiae* не отражает их геномную организацию, так как одни и те же серотипы СГВ могут принадлежать к разным ST-генотипам, а именно: серотип Ia – к ST-7 и ST-23, серотип III – к ST-17 и ST-23, а серотип V – к ST-1 и ST-110 и т.п. Эти примеры указывают на условность серотипирования как критерия и на то, что в генотипе в большей степени отражается естество микроорганизма.

Роль умеренных фагов (профагов) в характеристике штаммов-возбудителей инфекций

Способность умеренных бактериофагов как мигрирующих элементов встраиваться в геном бактерии, лизогенизируя её в форме полноразмерного и дефектного профага, является одним из выраженных проявлений внутри- и межвидового генетического обмена. Она была обнаружена еще в 1950-е гг. и реализовалась при взаимодействии генов фаговых интеграз *int*- и *att*-сайтов бактериальной хромосомы. За счёт механизмов трансдукции или/и фаговой конверсии донор передает реципиенту гены, ассоциированные с профаговой ДНК и кодирующие факторы патогенности микроба. Чаще всего фаги имеют излюбленные места вставок и излюбленные передаваемые признаки, хотя могут наблюдаться разные сочетания «профаг – признак». Эволюция накопила много признаков, которые ныне рассматриваются как кодируемые профагами. К ним относят токсины, митогены, суперантигены и отдельные ферменты. Естественно, что чем множественнее лизогения, т.е. чем больше профагов приходится на геном бактерии, тем шире спектр передаваемых признаков патоген-

ности, диапазон клинических симптомов и синдромов. По сути, любая вставка профага в геном штамма модулирует его геномную гетерогенность и вирулентность, а именно признаки, являющиеся маркерами возбудителя. Для анализа существенно не только обнаружение ДНК профага, но и ассоциированных с ним генов патогенности.

Для примера рассмотрим коллекции штаммов *S. ruogenes* (СГА), выделенных в 2006–2008 гг. в разных регионах (Санкт-Петербург, Москва, Пекин) при сезонной спорадической заболеваемости (скарлатина, тонзилло-фарингит) и здоровом носительстве [25]. Эпидемиологически первые два региона должны быть родственнее друг с другом, чем с третьим. В коллекциях штаммов изучали присутствие генов профаговых интеграз и ассоциированных с ними факторов патогенности. При этом в расчет принимали доминирующее, а не случайное распределение признаков (более чем у 50% штаммов). Последнее положение наиболее важно, поскольку оценка эпидемиологической обстановки строится в первую очередь на доминирующих штаммах и признаках. Наличие или отсутствие профаговых генов в геноме бактерий определяли в полимеразной цепной реакции (PCR) на праймеры к искомым генам. Было показано, что распределение профаг-ассоциированных генов может быть связано как с регионом выделения штаммов, так и с фагами, циркулирующими в конкретном регионе (табл. 1).

Таблица 1

Встречаемость (%) профаговых генов среди *S. ruogenes* разных генотипов, выделенных в разных регионах [25]

Генотип штаммов	Гены	Коллекции штаммов из регионов		
		Санкт-Петербург	Москва	Пекин
emm1	<i>speA</i>	100,0	100,0	87,0
	<i>speI</i>	–	–	–
	<i>speH</i>	–	–	–
	<i>speCJ</i>	100,0	100,0	74,0
	<i>speC</i>	58,8	71,0	96,8
	<i>ssa</i>	–	–	96,8
	<i>sdaM</i>	–	–	100,0
	<i>int1</i>	–	–	–
	<i>int3</i>	52,9	–	–
	<i>int4</i>	100,0	100,0	90,3
	<i>int5</i>	–	–	–
	<i>int6</i>	–	71,4	–
	<i>int7</i>	100,0	100,0	93,6
emm12	<i>speA</i>	–	–	–
	<i>speI</i>	94,0	100,0	–
	<i>speH</i>	94,0	100,0	100,0
	<i>speCJ</i>	–	75,0	–
	<i>speC</i>	89,0	100,0	100,0
	<i>ssa</i>	–	–	100,0
	<i>sdaM</i>	–	–	–
	<i>int1</i>	–	50,0	–
	<i>int3</i>	77,8	100,0	–
	<i>int4</i>	–	87,5	81,0
	<i>int5</i>	94,4	100,0	–
	<i>int6</i>	–	87,5	–
	<i>int7</i>	–	–	–

Штаммы СГА из разных регионов различались по *int*-генам и нередко по генам патогенности. Потенциальная токсигенность штаммов практически была близкой во всех регионах, однако регионы различались по типу токсинов, преимущественно между разными генотипами. При сравнении двух *emm*-генотипов стало очевидно, что для штаммов *emm1* характерны гены токсинов А (скарлатинозный токсин Дика) и СJ, между тем как для штаммов *emm12* – гены токсинов I и H. Токсин С был актуален для обоих *emm*-типов [25], что согласуется с представлениями о его возрастающей роли в генезе современной скарлатины. Последнее особенно существенно для штаммов типа 12, которые лишь в одном регионе в единичных случаях содержали ген *speA* (не показано), а ген *speC* – фактически в большинстве штаммов всех регионов. Рост нефритогенных штаммов типа 12 чреват повышением риска поражения почек на фоне скарлатины, вызванной токсинами С, I, H. Рост встречаемости этих токсинов у патогенов указывает на формирующийся в популяциях иммунитет к токсину А.

Интересно, что только в штаммах из Пекина обнаружены гены суперантигена и митогена, чаще встречающиеся среди возбудителей инвазивных инфекций. Если данное распределение генов определяется профагами с указанными *int*-генами, то представляется, что профаг с геном *int7* определяет присутствие генов токсина А и, возможно, СJ; фаг с *int5* – генов токсинов I и H; а фаг с *int4* – предположительно генов *ssa* и *sdaM*. Возможны и другие сочетания. Так, известно, что фаг с геном *int3* может отвечать за С-токсигенность.

Различия между *emm1*- и *emm12*-типами в пределах одного региона оказались большими при группировке штаммов по профаг-ассоциированным профилям генов, т.е. по объединению в одну группу штаммов с одинаковыми наборами (профилями) генов. Типичный пример приведен в таблице 2 [25].

Не исключено, что одни и те же фаги (по *int*-гену) могут нести гены разных факторов патогенности в зависимости от условий их формирования в конкретном регионе. Так, в Петербурге штаммы *emm*-типов 1 и 12 совпадали только по генам *int3* и *speC*; по-видимому, токсин С кодировался фагом с интегразой 3. Токсины А и СJ могли кодироваться фагом с *int7* (у *emm1*), между тем как у *emm12* токсины I и H кодировались

фагом с геном *int5*. Штаммы *emm1* и 12 из Москвы совпадали по профагам с генами *int4* и *int6*. При этом в штаммах *emm1* токсин С мог кодироваться фагом с *int6* (либо неизвестным фагом), а токсины А и СJ – фагом с геном *int7*. Что касается штаммов *emm12*, то их *tox*-паттерн мало чем отличался от такового у штаммов из Петербурга, хотя теоретически мог определяться не 2, а 5 профагами, и функция большинства из них не могла быть предсказана. В коллекции из Пекина трудно объяснить наличие гена *speC* у штаммов типа *emm1* и генов *speC* и *speH* у штаммов *emm12*. Остается допустить наличие неизвестных особенностей у фагов в штаммах данного региона либо присутствие в них неизвестных фагов.

Суммируя изложенное, можно допустить, что для целей молекулярной эпидемиологии большей достоверностью должны обладать сведения по профилям генов, а не по распространенности самих профагов, поскольку один и тот же профаг может содержать гены, кодирующие разные признаки, иметь различную локализацию в геноме микроорганизма или переходить в дефектное состояние.

Большой эпидемиологический интерес представляют штаммы *emm49* из штата Калифорния (США), выделенные при инвазивных инфекциях. Все они обладали генами токсина А (и фагом с интегразой 7), токсинов I и H (и фагом с интегразой 5), а также геном фаговой гиалуронидазы – *hu1*, которая, возможно, определяла патогенетическую направленность штаммов. Данное сочетание фагов и признаков практически не встречалось в описанных выше коллекциях [27].

Известно, что профаг встраивается в геном бактерии в области *att*-сайта хромосомы с участием фаговой интегразы. Положение фага в геноме определяют в PCR, где один праймер соответствует гену *int*, а второй – гену *att*. Гены патогенности находятся на противоположном от *int*-гена конце профага.

Интегразы референс-фагов (*int3*, *int5*) были выбраны как прототипы для изучения локализации профагов в штаммах из Пекина и Петербурга. Из числа обследованных штаммов ген *int3* обнаруживался у 31 СГА, и в 8 из них содержался ген *speC*; видимо, в геноме остальных присутствовал дефектный профаг, утративший ген патогенности [25]. В 18 штаммах содержался ген *int5*, и в 17 из них он ассоциировался с генами *speI* и *speH* (табл. 3, рис. 1).

Таблица 2

Профаг-ассоциированные профили генов патогенности (на примере СГА, выделенных в регионе Пекина)

Генотип	№ профаг-ассоциированного профиля																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<i>emm1</i>	+	+	+						+	+	+	+	+	+					
<i>emm12</i>			+	+	+	+	+	+							+	+	+	+	+

Таблица 3

Ассоциация профага с интегразой 5 с генами, кодирующими токсины SpeI и SpeH [25]

Число штаммов	Область PCR						
	cpsFQ – int5	speH – mutX	speI – speH	cpsFQ – mutX	int5	speI	speH
17	+	+	+	–	+	+	+
1	–	–	–	+	–	–	–



Рис. 1. Ассоциация профага с интегразой 5 с генами, кодирующими токсины SpeI и SpeH [25]: область //_____// – собственная ДНК профага; по сторонам от нее ген int5 и гены токсинов I и H

Аналогичный поиск, ограниченный тремя профаг-ассоциированными генами, был проведен в коллекции *S. agalactiae*; ограничение объяснялось тем, что лизогения среди СГВ, в отличие от СГА, встречается редко. Тем не менее, и этот поиск дал результат, позволив четко разграничить штаммы, характерные для менингита новорожденных, от штаммов без такой потенции [26].

Таким образом, распределение генов int и генов профагового профиля подчас сопровождается потерей некоторых генов, различной локализацией профагов или их дефектностью. Поэтому как маркерными для эпидемиологических целей надежнее пользоваться генами патогенности, а не int-генами. Отметим, что тестированные int-гены не исчерпывают все возможные профаги и сочетания «профаг – признак».

Мультиплексное PCR генотипирование

Этот вид генотипирования также основан на PCR. В нем одновременно используют набор праймеров на разные гены, например, на гены csp, кодирующие капсульные антигены *S. agalactiae*, различающиеся по структуре и специфичности полисахаридной капсулы [3]. Детерминирующий её локус включает 16 – 18 генов; они образуют регулон, в котором многие гены высоко консервативны. Средний фрагмент регулона между генами cspG и cspK наиболее гетерогенен. Он кодирует гликозилтрансферазы, ответственные за сборку капсулы и её антигенные различия. Праймеры построены с расчетом на получение амплификатов различной протяженности (в диапазоне 282 – 1826 п.н.), соответствующих конкретному серотипу *S. agalactiae*. Технология мультиплексного генотипирования наиболее точна по сравнению с обычным серотипированием. Сочетание мультиплексного и MLST-типирования имеет высокий уровень дискриминации для целей молекулярной эпидемиологии [28].

Мультиплексный подход посредством PCR на маркерные гены используют также для определения групповой, видовой принадлежности штаммов или их особенностей. Приведем несколько примеров.

1. Еще во второй половине XX в. СГВ-инфекцию у людей относили к зоонозам. В более поздних работах мультиплексный анализ выявил связь между генотипом возбудителя и источником его выделения (животное, человек) по встречаемости генов факторов патогенности: α-белка (bca), β-белка (bac) и С5а-пептидазы (scpV) (табл. 4). Штаммы от животных в большинстве случаев были лишены всех трех генов или содержали только ген bca, между тем как штаммы от человека, как правило, несли ген scpV и во многих случаях – ген bac. Сочетание bca и scpV генов встречалось в штаммах из обоих источников. Возможно, штаммы именно этого генотипа типичны для обоих хозяев: человека и животного. Не исключено, что СГВ-инфекция у человека могла первоначально возникнуть как зооноз; однако впоследствии сформировались ветви СГА, адаптировавшиеся к новым экологическим нишам и вызывающие патологию преимущественно у одного из хозяев.

Таблица 4

Multiplex-PCR анализ *S. agalactiae* разного происхождения

Генотип штамма	Штаммы от человека	Штаммы от коров
bca+ bac+ scpV+	70%	Не обнаружен
bca- bac- scpV+		
bca+ bac- scpV+	30%	23%
bca+ bac- scpV-	Не обнаружен	77%
bca- bac – scpV-		

Более детальные исследования обнаружили корреляцию между сочетаниями указанных генов, происхождением штаммов и присутствием в геноме одного из 16 аллельных вариантов гена sak192 (ген гипотетического белка). Оказалось, что сочетание гена bac и аллели 1.1 гена sak192 более чем в 96% случаев присуще СГВ, выделенным от человека, и только в 4% встречалось в СГВ от животных. Для них существенными были аллели 3.1, 1.3 и 5.2.

Таким образом, ген *bas*, а тем более аллель 1.1 гена *sak192* являются ценными маркерами для установления происхождения штаммов СГВ [29]. Доказано, что штаммы с геном *bas* представляют собой относительно самостоятельную и однородную ветвь СГВ, поскольку анализ их *Sma*I-рестрикционных паттернов в PFGE не выявил различий между *bas*-позитивными СГВ, в отличие от полиморфизма *bas*-негативных штаммов (рис. 2) [30].

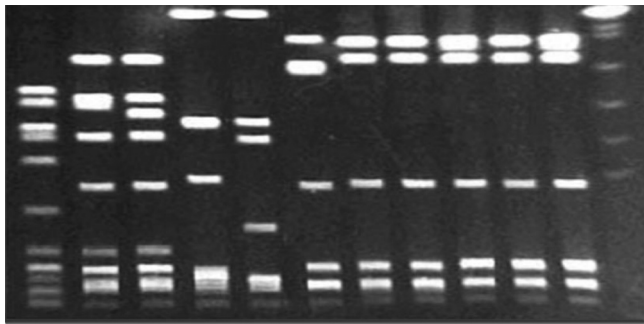


Рис. 2. Клинические изоляты СГВ с геном *bas* имеют однородные паттерны рестрикции [33, 34]. Треки 1–5 – штаммы без гена *bas*; 6–11 – штаммы с геном *bas*

2. Мультиплексная PCR полезна также для определения вида большинства патогенных стрептококков по структуре конкретных генов. Например, для установления видовой принадлежности клонов-возбудителей мастита коров (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*) использовали различия в структуре маркерного гена *srpB0* (белок теплового шока) и по размерам получаемых амплификатов испытуемый штамм относили к одному из указанных видов (рис. 3) [31].

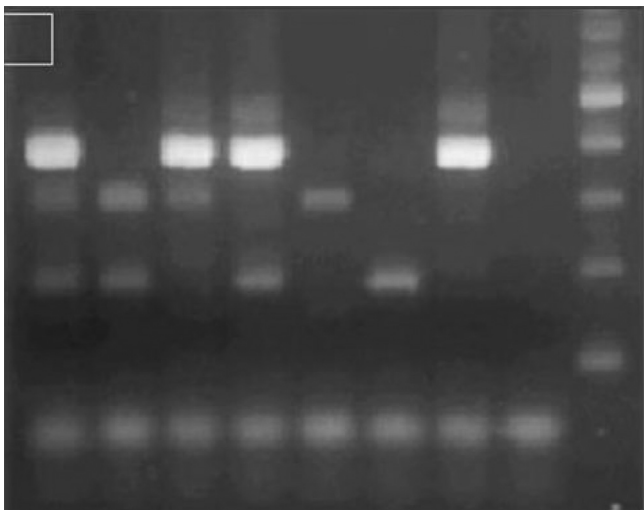


Рис. 3. Multiplex-PCR идентификация патогенных стрептококков по видовым отличиям маркерного гена *srpB0* [20]. Фрагмент в 400 п.н. – *S. uberis*; фрагмент в 310 п.н. – *S. agalactiae*; фрагмент в 192 п.н. – *S. dysgalactiae*

3. Мультиплексную PCR-диагностику групповой (А и С или В и G) и/или видовой принадлежности стрептококков можно проводить с учетом различий первой пары от второй по гену *S5a*-пептидазы (*scr*) на фрагмент размером в 51 п.н. (рис. 4), а также по гену G-белка, экспрессируемому только штаммами групп С и G.

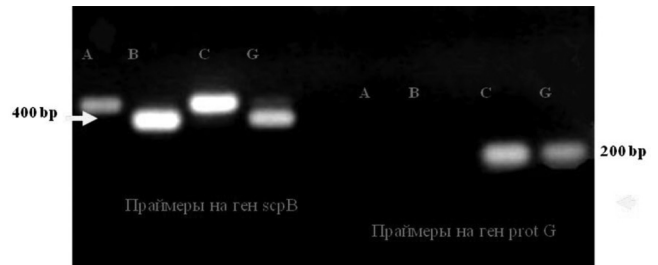


Рис. 4. PCR-диагностика стрептококков разных серогрупп и видов [37]

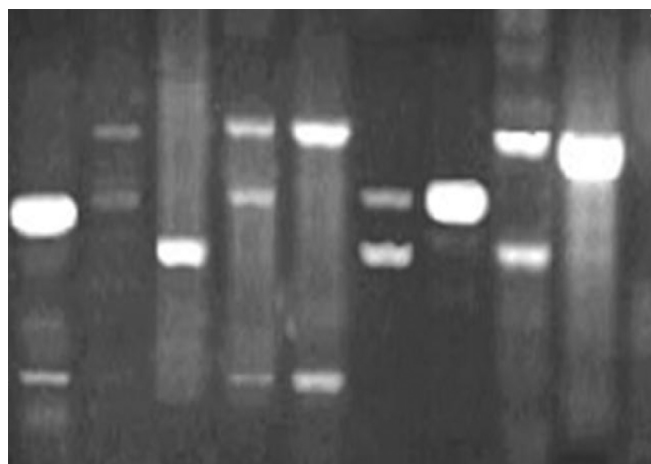
Таким образом, штамм, рассматриваемый как принадлежащий к группе А или С по гену *scr* (306 п.н.), должен быть отнесен к СГА, если он не содержит ген G-белка, или к СГС по содержанию гена G-белка. Штамм же, рассматриваемый как принадлежащий к группе В или G также по гену *scr* (255 п.н.), должен быть отнесен к СГВ по отсутствию гена G-белка либо к СGG по присутствию гена G-белка. В логических построениях можно отталкиваться и от обратного: если в испытуемых штаммах присутствует ген G-белка, то они должны быть отнесены к группам С или G, а отсутствие гена G-белка говорит в пользу групп А или В. Дальнейшая дифференцировка по виду зависит от размера гена *scr*. Эта закономерность, подтвержденная на большом числе штаммов [32], показала, что сочетание генов *S5a*-пептидазы и G-белка может служить маркером в мультиплексной технологии.

Встраивающиеся последовательности (insertion sequences), или IS-элементы как маркеры в молекулярной эпидемиологии

В отличие от *S. ruogenes*, где лизогения является правилом, у СГВ она встречается крайне редко и вряд ли может широко использоваться в качестве эпидемиологического инструмента. В то же время в геноме обоих видов можно встретиться с разнообразием IS-элементов. Один штамм может содержать до 11 элементов, причем любой из них в нескольких копиях. Для их обнаружения также следует использовать multiplex-PCR. Типичный пример по выявлению четырех IS-элементов (Sa4, 86, 1381 и 1548) у СГВ приведен на рисунке 5 [33].

Пестрая картина указывает на то, что штаммы выделены из разных источников и не связаны

эпидемиологически. Тем не менее, полиморфизм фрагментов микробной ДНК, гибридизующихся с зондами на IS-элементы, позволяет дифференцировать штаммы по IS-элементам с высоким уровнем дискриминации. К примеру, у 84 штаммов, содержащих один или несколько IS-элементов, удалось выявить 53 паттерна гибридизации [34, 35] (табл. 5).



1 2 3 4 5 6 7 8 9
ISSa4 IS861 IS1381 IS1548

Рис. 5. Штаммы СГВ различаются по содержанию IS-элементов [35]

Таблица 5

Паттерны фрагментов ДНК штаммов *S. agalactiae*, гибридизующихся с зондами на IS-элементы

IS-элементы	Количество штаммов с IS-элементом	Паттерны
IS1548	13	B1 – B6
ISSa4	21	D1 – D13
IS861	67	A1 – A9
IS1381	72	C1 – C38

С увеличением числа тестируемых IS-элементов, естественно, будет расти (и осложняться) оценка эффективности дифференцировки штаммов. В распределении штаммов по паттернам IS-элементов также отражается степень их генетического родства (рис. 6). Так, например, 9 штаммов СГВ оказались возможным разбить по степени родства на 4 группы по паттернам рестрикционных фрагментов IS861: A1 и A8; A2, A6 и A9; A4; A3, A5 и A7.

Биологические функции IS-элементов не до конца расшифрованы. Они могут присутствовать в геноме бактерии сами по себе либо фланкировать разные гены и локусы. Так, они ограничивают группы генов, объединенные в так называемые острова патогенности, или определяют вариабельность генетического состава регулонов. Приме-

ром этому служит неоднородность Mga-регулона штаммов *S. ruogenes*, негативных по OF-фактору опалесценции сыворотки. У этих штаммов IS-элемент и ген белка Sic (стрептококковый ингибитор комплемента) могут встраиваться между epp- (кодирует M-подобный белок) и scrA- (кодирует С5а-пептидазу) генами Mga-регулона, изменяя его состав и функцию [19]. Эти данные указывают на возможную роль IS-элементов в горизонтальной миграции различных генов. Ген sic характерен для наиболее вирулентных штаммов и в разных клонах содержит структурные отклонения, позволяющие СГА избегать защитных реакций организма. Sic-положительные штаммы, в отличие от Sic-негативных, длительное время персистируют в организме хозяина. Изложенное позволяет рекомендовать ген sic в качестве маркера определенного Mga-регулона и возможного предвестника тяжелой инфекции.

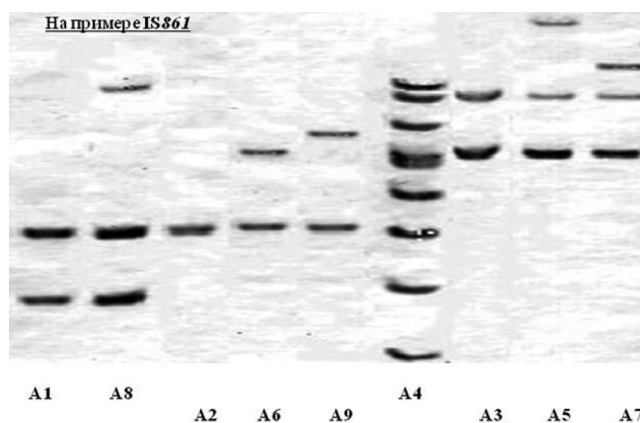


Рис. 6. Анализ IS-элементов выявляет степень генетического родства между штаммами СГВ [33, 34]

Острова патогенности как генетические маркеры

На хромосоме бактерий нередко гены патогенности организованы в так называемые острова патогенности (ОП). Они фланкированы IS-элементами и участвуют в горизонтальном генетическом обмене. У разных видов они включают различные гены, кодирующие белки клеточной стенки микроба, адгезины, инвазины, токсины и факторы, участвующие в патогенности, метаболизме, регуляции транскрипции генов и деградации биополимеров. К числу хорошо изученных относятся 13 «ОП» *S. agalactiae*, в том числе «ОП» № 12 и «ОП», недавно описанный нами [16].

Первый из них в различных сочетаниях объединяет гены scr, hyl, lmb и sspB1, кодирующие С5а-пептидазу, гиалуронидазу, ламинин-связывающий белок и участвующий в адгезии фимбриальный белок. Величина «ОП» № 12 в разных штаммах различается в зависимости от размеров межгенной

вставки между генами *scp* и *lmb*. Вставка бывает представлена фрагментом ДНК в 164 п.н. либо интроном GBSi1, фланкированным последовательностями ДНК в 67 и 97 п.н., либо IS1548-элементом, фланкированным участками ДНК в 155 и 9 п.н. (рис. 7) [36]. Указанные вставки могут быть приняты как маркеры и обнаруживаться в multiplex-PCR.

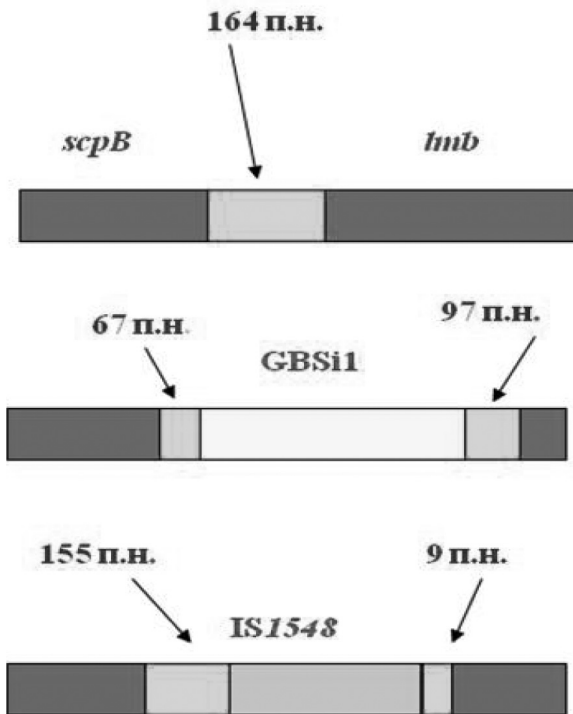


Рис. 7. Штаммы СГВ различаются по межгенной области острова патогенности, содержащего гены *scpB* и *lmb* [30]

Внимания заслуживает ген *sspB1*, встречающийся преимущественно среди штаммов, выделенных в России [37] и ассоциированных с осложненной беременностью или с инвазивными болезнями новорожденных. Анализ 74 штаммов 6 серотипов СГВ обнаружил ген *sspB1* в 22% случаях [38]. Его обнаружение методом PCR в штаммах, выделенных из наружных родовых путей беременных, особенно в третьем триместре, должно настораживать медицинский персонал роддомов в отношении выбора мер предупреждения инфицирования новорожденных. Естественно, что данный ген следует отнести к маркерным и считать фактором риска развития инвазивных заболеваний новорожденных.

Генетический анализ отдельной линии *S. agalactiae* с геном *bas* обнаружил в относящихся к ней штаммах область размером около 8900 п.н., содержащую «ОП», фланкированную IS1167 (впервые описан у *S. pneumoniae*) и IS1381. Его средняя часть занята геном *bas* и двухкомпонентной системой регуляции транскрипции, состоящей из гена сенсорной гистидинкиназы (*sak188*) и гена (*sak189*)

ДНК-связывающего белка — регулятора ответа (рис. 8) [39].

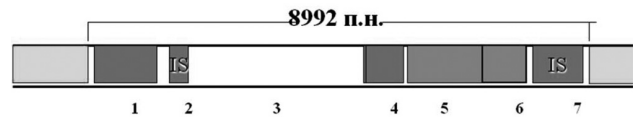


Рис. 8. Новый «ОП» СГВ содержит ген *bas* и гены двухкомпонентной системы регуляции транскрипции [39]: 1 — ген транспозазы *S. Pyogenes*; 2 — IS1167 *S. pneumoniae*; 3 — ген *bas*; 4 — ген гипотетического белка; 5 — ген сенсорной гистидинкиназы; 6 — ген ДНК-связывающего белка регулятора ответа; 7 — IS1381

В соответствии с механизмом регуляции мутации в гене *sak189* нарушают синтез регуляторного белка в области ДНК-связывающего центра, полностью подавляя транскрипцию гена *bas* и экспрессию белка *Bas* [23]. Таким образом, в дополнение к изложенному выше, маркерными генами на штаммы линии *bas+* могут служить не только ген *bas* и аллель 1.1 гена *sak192*, но и регуляторный ген *sak189*. Аналогичные подходы повышают возможности достоверной идентификации вирулентных клонов-возбудителей инфекций. В этом плане поиск новых маркерных генов может и должен быть расширен.

Другие мигрирующие генетические элементы

К мигрирующим элементам, которые участвуют во внутривидовом и межвидовом обмене, определяя геномный полиморфизм и изменения в вирулентности штаммов, относятся также транспозоны и плазмиды. Их присутствие часто связывают с антибиотикоустойчивостью бактерий. Последняя защищает патогенные виды и их вирулентные клоны, затрудняя лечение инфекций и их осложнений. Известна устойчивость стрептококков ко многим антибиотикам, кроме пенициллинов и цефалоспоринов.

Недавно у *S. pyogenes* впервые обнаружен транспозон, ранее описанный только у *S. pneumoniae*. Установлены различия в его локализации и по наличию гена устойчивости к тетрациклину — *tetM* [40]. Появление данного транспозона у нового вида является реальным показателем межвидового горизонтального переноса. При изучении СГА в стандартизованном RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) анализе в PCR со случайной затравкой у ряда штаммов был обнаружен новый фрагмент в 550 п.н. (рис. 9), нуклеотидная последовательность которого почти на 98–100% оказалась идентичной таковой ряда генов транспозона *S. pneumoniae*. Наличие данного фрагмента в геноме СГА свидетельствовало о том, что он может быть маркером присутствия полноразмерного транспозона.

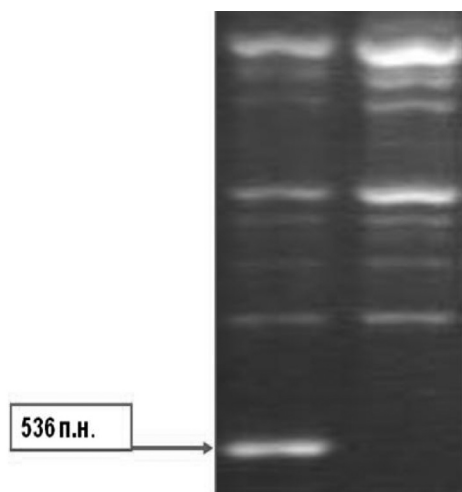


Рис. 9. Геном *S. pyogenes* содержит транспозон, имеющий 100% идентичность с аналогичным транспозоном *S. pneumoniae* [25]

Ранее нами была обнаружена серия крупных плазмид, контролирующая МЛС-резистентность СГА к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В [41 – 43]. Они присутствуют в цитоплазме микробных клеток и могут быть отделены от хромосомной ДНК центрифугированием в градиенте плотности CsCl. Их особенность состоит в наличии инвертированных ДНК-повторов большой (от 40 до 80% контурной длины) протяженности (рис. 10, 11) и в способности повышать экспрессию признаков вирулентности (размножение в крови человека и продукция ОФ-фактора опалесценции), т.е. позитивно регулировать функцию генов, контролируемых Mga-регулятором [44, 45]. Эту функцию несли не только оригинальные плазмиды, но и их укороченные производные при условии сохранения МЛС-устойчивости к антибиотикам. По-видимому, это редкий случай сопряженности в единой генетической структуре резистентности к антибиотикам и функции позитивного влияния на экспрессию факторов патогенности СГА. К сожалению, в свое время гены этих плазмид не были идентифицированы, что позволило бы использовать их в качестве маркерных ДНК.

Изучение плазмидного профиля СГА выявило в их цитоплазме криптические минициркулярные плазмиды; их обнаруживали исключительно в штаммах, находящихся в вирулентном (М-позитивном) состоянии [46]. ДНК таких плазмид можно использовать для определения фазового состояния СГА.

Заключение

Очевидно, что все перечисленные подходы и технологии крайне необходимы для разносторонней комплексной характеристики изолятов воз-

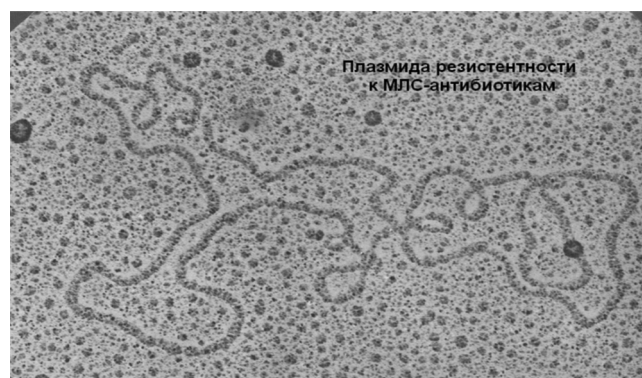


Рис. 10. Электронная микроскопия циркулярной плазмиды резистентности СГА к МЛС-антибиотикам. $\times 42\ 000$ [46]

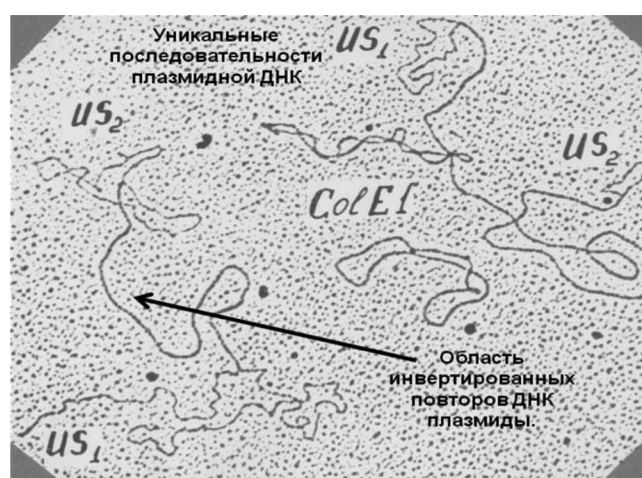


Рис. 11. Гомодуплексный анализ плазмиды МЛС-устойчивости позволил выявить области уникальных последовательностей (US) и инвертированных повторов. Для сравнения приведена референс-плазмида ColE1, $\times 28\ 000$

будителя в целях максимально полной оценки микробиологической составляющей эпидемиологической ситуации и рационального управления её процессами. Они не исчерпывают всех возможностей, но достаточны для мониторинга возбудителя, контроля за возникновением его новых вариантов и желательны для эпидемиологического прогноза. Естественно, что должны существовать оснащенные региональные структуры, отвечающие за организацию работы, аккумулирующие необходимую информацию, разрабатывающие прогноз и рекомендации. В силу стоящих перед ними задач их следует оборудовать работающими на потоке обследовательскими станциями (платформами), составленными из серии автоматизированных модулей, последовательно готовящих биоматериал для анализа и завершающего диагноза; кроме того, они должны располагать аппаратурой для крио-

банков. Эти условия отвечают требованиям современной эпидемиологии. Они крайне необходимы для контроля за эпидемиологической ситуацией в регионах страны.

Тяжелые последствия эпидемии инвазивных инфекций в 1990-е гг., вызванные возвращением «flesh-eating» стрептококков групп А, В, С и G в разных странах могли быть смягчены или ограничены, если были бы приняты во внимание предвестники 1980-х гг. по обнаружению в циркуляции новых генотипов возбудителей, а также опыт предшествующей эпидемии стрептококковой гангрены, унесшей в конце 1920-х гг. огромное число жизней в юго-восточной Азии.

Приведенные материалы подчеркивают:

- необходимость введения официального учета наиболее распространенных форм и осложнений заболеваний, вызываемых патогенными стрептококками разных видов;
- важность официального регламентирования современных технологий для идентификации и генотипирования патогенных стрептококков;
- необходимость разработки фундаментальных и прикладных вопросов геномики и протеомики патогенных стрептококков;
- целесообразность создания инновационных принципов, средств и технологий для диагностики патогенных стрептококков и профилактики вызываемых ими заболеваний.

Автор признателен сотрудникам отдела молекулярной микробиологии НИИ экспериментальной медицины РАМН за предоставленные материалы и комментарии.

Литература

1. Саморегуляция паразитарных систем (молекулярно-генетические механизмы) : монография / В.Д. Беляков [и др.]. – Л. : Изд-во Медицина, 1987. – 240 с.
2. Инфекционные болезни и эпидемиология : учебник / В.И. Покровский [и др.]. – М. : Изд-во ГЭТАР-Медиа, 2007. – 816 с.
3. Тотолян, А.А. Стрептококки группы В в патологии человека / А.А. Тотолян, А.Н. Суворов, А.В. Дмитриев. – СПб.: Изд-во Человек, 2010. 212 с.
- 3a. Suvorov, A.N. Physical and genetic chromosomal map of an M type 1 strain of *Streptococcus pyogenes* / A.N. Suvorov, J.J. Ferretti // *J. Bacteriol.* – 1996. – № 178. – P. 5546–5549.
4. Тотолян, А.А. Стрептококки / А.А. Тотолян [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство в 2 т. под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. – М. : ГЭТАР-Медиа, 2012. – т. II, гл. 21. – С. 417–435.
- 4a. Dmitriev, A.V. Physical and genetic chromosomal maps of *Streptococcus agalactiae*, serotypes II and III; rRNA operon organization / A.V. Dmitriev, A.N. Suvorov, A.A. Totolian // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1998. – № 167. – P. 33–39.
5. Филатов, Н.Н. Научно-организационные и методические основы эпидемиологического надзора за стрептококковой инфекцией группы А в условиях крупного города / Н.Н. Филатов, Н.И. Брико, И.Л. Шаханина // *Ж. микробиол.* – 1998. – № 1. – С. 40–43.
6. Thern, A. Interactions between *Streptococcus pyogenes* and the human immune system : Doctoral dissertation / A. Thern. – Lund, Sweden. : Lund University, 1998. – 56 p.
7. Schmitt, R. Studies of the pathogenesis of IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura with special reference to *Streptococcus pyogenes* infections and complement : Doctoral dissertation / R. Schmitt. – Lund, Sweden. : Lund University, 2012. – 89 p.
8. Зацюрская, С.Л. Особенности течения беременности и родов, исход для плода и новорожденного у носительниц стрептококка группы В / С.Л. Зацюрская, Н.Г. Кошелева // *Акуш. и гинек.* – 1994. – № 6. – С. 31–33.
9. Саввина, В.А. Эпидемиология и профилактика заболеваний, вызываемых стрептококками группы В у новорожденных : автореф. дис. ... канд. мед. наук / В.А. Саввина. – СПб. : СПбГМА им. И.И. Мечникова, 1999. – 19 с.
10. Facklam, R. emm typing and validation of provisional M types for group A streptococci / R. Facklam [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 1999. – № 5. – P. 247–253.
11. Maiden, M.C. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms / M.C. Maiden [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – № 95. – P. 3140–3145.
12. McShen, W.M. Genome sequence of a nephritogenic and highly transformable M49 strain of *Streptococcus pyogenes* / W.M. McShan [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2008. – № 190. – P. 7773–7785.
13. Полякова, Е.М. Молекулярно-генетическое сравнение *Streptococcus pyogenes* типов emm1 и emm12 по набору профаговых генов / Е.М. Полякова [и др.] // *Ж. микробиол.* – 2009. – № 2. – С. 18–24.
14. Schmidt, H. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis / H. Schmidt, M. Hensel // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2004. – № 17. – P. 14–56.
15. Schwartz, D.C. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis / D.C. Schwartz, C.R. Cantor // *Cell.* – 1984. – № 37. – P. 67–75.
16. Дмитриев, А.В. Геномный полиморфизм стрептококков группы В – возбудителей заболеваний человека и животных : автореф. дисс. ... д-ра биол. наук / А.В. Дмитриев. – СПб. : НИИЭМ РАМН, 2004. – 36 с.
17. Ferretti, J.J. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes* / J.J. Ferretti [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – № 98. – P. 4658–4663.
18. Tettelin, H. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae* for the microbial «pan-genome» / H. Tettelin [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – № 102. – P. 13950–13955.
19. Johansson, B. Analysis of the molecular interplay between *Streptococcus pyogenes* and its human host : Doctoral dissertation / B. Johansson. – Lund, Sweden : Lund University, 2006. – 55 p.
20. Dmitriev, A.V. The Rgg regulation of *Streptococcus pyogenes* influence the utilization of nonglucose carbohydrates, prophage induction, and expression of the NAD-glucohydrolase virulence operon / A.V. Dmitriev [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2006. – V. 188, № 20. – P. 7230–7241.
21. Дмитриев, А.В. Направленная регуляция патогенных свойств стрептококков / А.В. Дмитриев [и др.] // *Мед. акад. журнал.* – 2009. – Т. 9, № 4. – С. 50–58.
22. Rozhdestvenskaya, A.S. Inactivation of DNA-response regulator Sak189 abrogates beta-antigen expression and affects virulence of *Streptococcus agalactiae* / A.S. Rozhdestvenskaya, A.A. Totolian, A.V. Dmitriev // *PLoS ONE.* – 2010. – V. 5, № 4. – e10212.

23. Рождественская, А.С. Двухкомпонентная регуляторная система Sak188/ Sak189 и её влияние на свойства *Streptococcus agalactiae*: автореф. ... канд. биол. наук / А.С. Рождественская. — СПб.: НИИЭМ РАМН, 2011. — 20 с.
24. Lannergard, J. The hypervariable region of *Streptococcus pyogenes* M protein escapes antibody attack by antigenic variation and weak immunogenicity / J. Lannergard [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2011. — № 10. — P. 147–157.
25. Полякова, Е.М. Геномный полиморфизм *Streptococcus pyogenes* разных emm генотипов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е.М. Полякова. — СПб.: НИИЭМ РАМН, 2012. — 18 с.
26. Van der Mee-Marquet, N. Prophagic DNA fragments in *Streptococcus agalactiae* strains and association with neonatal meningitis / N. van der Mee-Marquet [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — V. 44, № 3. — P. 1049–1058.
27. Suvorov, A.N. Bacteriophage content of M49 strains of *Streptococcus pyogenes* / A.N. Suvorov [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2009. — V. 294. — P. 9–15.
28. Sun, Y. Comparison of 3-set genotyping system with multilocus sequence typing for *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) / Y. Sun, F. Kong, Z. Zhao // *J. Clin. Microbiol.* — 2005. — V. 43, № 9. — P. 4704–4707.
29. Рождественская, А.С. Использование полиморфизма гена sak0192 *S. agalactiae* в качестве молекулярно-эпидемиологического маркера / А.С. Рождественская [и др.] // *Ж. микробиол.* — 2009. — № 5. — С. 38–43.
30. Dmitriev, A. Chromosomal analysis of group B streptococcal clinical strains; bac gene positive strains are genetically homogenous / A. Dmitriev, [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2002. — № 208. — P. 93–98.
31. Dmitriev, A. *crp60* gene based multiplex-PCR assay for simultaneous identification of streptococcal species / A. Dmitriev, M. Bhide, I. Mikula // *Acta Vet. Brno.* — 2006. — № 75. — P. 235–240.
32. Dmitriev, A. Clinical diagnosis of group B streptococci by *scpB* gene based PCR / A. Dmitriev [et al.] // *Indian J. Med. Res.* — 2004. — № 119 (suppl.). — P. 233–236.
33. Дмитриев, А.В. Молекулярная эпидемиология патогенных стрептококков группы В / А.В. Дмитриев, Е.В. Шаплеина // *Ж. микробиол.* — 2003. — № 4. — С. 83–92.
34. Дмитриев, А.В. Сравнительный анализ интегрированных ДНК последовательностей у штаммов стрептококка группы В / А.В. Дмитриев [и др.] // *Мед. Акад. Журн.* — 2003. — Т. 3, № 2. — С. 45–48.
35. Shackleina, E. Presence of insertions sequences (IS elements) in group B streptococci of bovine origin / E. Shackleina [et al.] // *Indian J. Med. Res.* — 2004. — № 119 (suppl.). — P. 126–132.
36. Dmitriev, A. Structure of *scpB-lmb* intergenic region as criterion for additional classification of human and bovine group B streptococci / A. Dmitriev [et al.] // *Acta Vet. Brno.* — 2004. — № 73. — P. 215–220.
37. Суворов, А.Н. Анализ клинических штаммов стрептококков группы В на наличие генов потенциальных адгезинов, локализованных на островах патогенности / А.Н. Суворов [и др.] // *Ж. акуш. женск. болезней.* — 2005. — № 45. — С. 50–56.
38. Kuleshevich, E.V. The analysis of group B streptococcal gene *sspB1* localized on pathogenicity island / E.V. Kuleshevich [et al.] // *Abstract book of XVIII Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, Palermo, Italy.* — 2011. — P. 170.
39. Dmitriev, A. Adjacent location of the *bac* gene and two-component regulatory system genes within the putative *Streptococcus agalactiae* pathogenicity island / A. Dmitriev [et al.] // *Folia microbial.* — 2006. — № 51. — P. 229–235.
40. Полякова, Е.М. Ранее не обнаруженный транспозон штаммов *Streptococcus pyogenes*, устойчивых к действию тетрациклина / Е.М. Полякова, А.В. Дмитриев // *Вестник СПб МАПО.* — 2011. — Т. 3, № 3. — С. 68–73.
41. Голубков, В.И. Выделение и характеристика плазмиды, детерминирующей множественную резистентность к антибиотикам штаммов стрептококка группы А / В.И. Голубков [и др.] // *Молекул. биол.* — 1977. — Т. 2, № 4. — С. 909–915.
42. Boitsov, A. Restriction endonuclease analysis of group A streptococcal plasmids determining resistance to MLS antibiotics / A. Boitsov [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1979. — № 6. — P. 5–9.
43. Boitsov, A. Inverted repeats on plasmids determining resistance to MLS antibiotics in group A streptococci / A. Boitsov [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1979. — № 6. — P. 11–14.
44. Totolian, A. The genetic control of virulence markers in group A streptococci. II. Triggering effect of plasmids / A. Totolian, L. Burova, P. Christensen // *Acta pathol. microbial. Scand. SB.* — 1983. — № 91. — P. 61–67.
45. Totolian, A. The genetic control of virulence markers in group A streptococci. III. Plasmid induced switch off effect / A. Totolian [et al.] // *Acta pathol. microbial. Scand. SB.* — 1984. — № 92. — P. 65–69.
46. Голубков, В.И. Новый класс криптических плазмид стрептококка группы А и их использование в качестве векторных репликонов / В.И. Голубков, А.А. Тотолян // *Молекул. биол.* — 1983. — Вып.1. — С. 136–142.

Автор:

Тотолян Артем Акович — заведующий лабораторией генетики микробов отдела молекулярной микробиологии НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, д.м.н., профессор, академик РАМН; тел.: (812) 234-94-77; (812)234-05-42; e-mail: totolyan@hotmail.com.