View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by CORE

А.А. Тотолян

НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Прошлое и настоящее *Streptococcus pyogenes*: некоторые факторы патогенности и их генетическое детерминирование

В настоящем обзоре рассматриваются два аспекта, относящихся к Streptococcus pyogenes, — возбудителю распространенных инфекций человека и их осложнений. В первой части обсуждается вопрос о сравнительной информативности лабораторных диагностических подходов и методов второй половины прошлого века, а также методов (преимущественно молекулярно-генетических), разработанных за последние 20 лет. Во второй части оценивается роль ведущих микробных факторов в патогенности возбудителя и их участие в патогенезе заболеваний, а также приводятся современные данные о различных нехромосомных элементах во внутри- и межвидовом генетическом обмене и в формировании агрессивных свойств патогена. Существующие в настоящее время возможности для детальной характеристики штаммов стрептококка группы А являются базой современной молекулярной эпидемиологии и должны использоваться лабораторной службой страны.

Ключевые слова: S. pyogenes, диагностика, патогенность, генетический обмен и регуляция.

(Вестник РАМН. 2015; 1: 63–69)

Введение

В настоящем обзоре обобщены данные последних двух десятилетий о *Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А, СГА) как о возбудителе распространенных местных, системных и генерализованных инфекций, а также осложнений со стороны жизненно важных органов человека. Они подчеркивают способность микроба эволюционировать, изменять свои свойства и функции. Разносторонние сведения о нем позволяют выявить тенденции в динамике патогенности и пластичности СГА, а также влияют на оценку реакций инфицированного организма на патогенные факторы *S. pyogenes*. Соответственно, становятся понятными отдельные сдвиги в структуре и клинической картине стрептококковых заболеваний, а также в цикличности эпидемиологических процессов, возникающих под прессом коллективного иммунитета к тем или иным факторам патогенности СГА в условиях неконтролируемого лечения антибиотиками. В северных широтах на второй план отступают манифестные формы скарлатины, гломерулонефрита, ревмокардита и пуэрперального сепсиса. С 80-х гг. XX в. и до настоящего времени видное место в структуре заболеваемости заняли вернувшиеся после вспышек 20-х гг. высоколетальные и плохо поддающиеся терапии инвазивные формы СГА-инфекции (некротичесий фасцит / миозит, синдром токсического шока, сепсис).

Тем не менее ежегодный уровень заболеваемости, инвалидизации и смертности, обусловленный *S. pyogenes* (и, соответственно, вызываемый им социально-экономический ущерб), еще сохраняется высоким независимо от очень высокой чувствительности возбудителя к β-лактамным антибиотикам пенициллинового и цефалоспоринового ряда. По неполным данным 2009–2010 гг. (сведения по России отсутствуют), в мире ежегодная заболеваемость, вызываемая *S. pyogenes*, исчисляется более чем 616 млн случаев тонзиллофарингитов, 111 млн случаев пиодермий и 660 тыс. случаев инвазивных инфекций, т.е. в среднем ежегодно около 10% жителей Земли переносят СГА-инфекцию в той или иной форме. Погибают

A.A. Totolian

Research Institute for Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Past and Present of *Streptococcus pyogenes*: Some Pathogenic Factors and Their Genetic Determination

In this review two aspects dealt with Streptococcus pyogenes — one of the leading agent responsible for infectious diseases and another related to their complications in humans worldwide — are given. In the first part of the review the comparative evaluation of laboratory diagnostic approaches and methods used in the second half of the twentieth century and molecular technologies developed during last twenty years are described. In the second part the role of the main microbial pathogenic factors as well as the data on intra- and interspecies genetic exchange with extrachromosomal genetic elements and their influence on biological properties of the pathogen are discussed. Essential for today possibilities for molecular epidemiology of streptococcal pathology approaches must be introduces in diagnostic laboratories within the country.

Key words: S. pyogenes, diagnostics, pathogeneity, genetic exchange and regulation.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 1: 63–69)

более 0,5 млн человек, в основном от инвазивных заболеваний. Еще высок уровень постинфекционных осложнений: ревматической лихорадкой заболевают около 15,6 млн, а острым гломерулонефритом — более 0,5 млн человек; умирают 233 тыс. и 5 тыс. человек, соответственно. Именно по этой причине эксперты ВОЗ рассматривают СГА как одну из ведущих причин глобальной заболеваемости и смертности [1]. В данных показателях не нашли отражения формы СГА-инфекции с аллергическим компонентом (скарлатина, рожа), а также заболевания, вызываемые стрептококками других групп (B, C и G).

До настоящего времени не вполне понятно, в какой мере приведенная картина связана с изменчивостью возбудителя. Очевидно лишь, что штаммы СГА 40–60-х гг. XX в. трудно сопоставимы с аналогичными штаммами, циркулирующими сегодня, т.к. они разнятся по ведущим признакам: типово-подтиповой вариабельности, нехромосомной наследственности, токсигенности, а также энзиматической активности. Существенные различия в методических и технологических подходах сравниваемых периодов полностью исключают это сопоставление. На смену методам классической микробиологии и серологии, анализу антигенной и экстрацеллюлярной активности *S. pyogenes* пришла современная генетика и молекулярная биология, обеспечившие успехи микробиологии, поэтому скудная информация прошлого несопоставима с богатством данных настоящего. Тем не менее расширение наших сведений о СГА допускает обоснованность новых представлений об изменчивости возбудителя и связанной с нею картины СГА-инфекций. Соответственно, изменились также методы и схемы лабораторной диагностики.

В прошлом видное место в диагностике СГА-заболеваний отводили иммунологическим реакциям нейтрализации биоактивных веществ микроба или, как их называли, «токсинов частного приложения» [2]. До недавнего времени ими пользовались для титрования в крови пациентов антител к секретируемым продуктам возбудителя: стрептолизину-О (кардиотропному гемолизину), гиалуронидазе (фактору проницаемости) СГА, дезоксирибонуклеазе В и никотинамид-аденинди-нуклеотидазе [3]. Уровень иммунного ответа на 2–3 этих антигена в 80–95% случаев позволял отличить истинную стрептококковую патологию от носительства микроба. Со временем ценность этих показателей очень пострадала по следующим причинам:

- достоверными следовало считать данные о положительной динамике титров антител минимум к двум антигенам при одновременном тестировании парных и полученных в разные периоды болезни сывороток пациента;
- интенсивная антибиотикотерапия, особенно в начале болезни, подавляла фокус инфекции, что негативно сказывалось на динамике серологических показателей;
- трактовка результатов анализа в большей мере зависела от качества сывороток пациента (содержания в них липопротеидов, присутствия окисленных продуктов) и продукции аналогичных антигенов стрептококками групп C и G;
- в каждом тесте требовалась контрольная сыворотка с известным титром антител либо стандарт антител.

Совокупность приведенных требований, несомненно, негативно влияла на информативную ценность тестов. Здесь следует добавить, что указанные ферменты СГА едва ли можно отнести к протективным антигенам, которые позволяют по иммунному ответу «судить» о степени защищенности организма от инфекции. Помимо этого, если принять во внимание, что указанные продукты разных штаммов родственны по антигенности, а СГА-инфекция у людей часто возникает повторно как результат заражения штаммом СГА иного серотипа, то остается непонятным, как следует трактовать повышение титров антител к ним: как первичную реакцию на антигенный стимул или как проявление иммунологической памяти. Таким образом, современная лабораторная практика не имеет в своем распоряжении достоверных и простых в исполнении методов для оценки уровня иммунологического ответа организма на инфицирование СГА.

Для изучения патогенеза стрептококковых заболеваний и их лабораторной диагностики наибольший интерес представляют следующие продукты микробной клетки: белки М-семейства (ведущие факторы болезнетворности СГА), эритрогенные токсины (ведущие факторы в генезе скарлатины) и А-полисахарид (маркер групповой идентичности СГА). Следует напомнить, что иммунитет к СГА является типоспецифическим, т.е. он определяется по наличию и концентрации в сыворотке крови людей типовых анти-М-антител, выявляемых в различных вариантах бактерицидного теста. Наличие антител к М-белкам определенного антигенного типа еще не исключает возможности повторных эпизодов стрептококковой инфекции при заражении штаммами различных серотипов. В настоящее время известно около 200 антигенных типов и подтипов СГА. Их география определяется климатическими и эпидемиологическими условиями региона, поэтому антигенный состав вакцин, разрабатываемых на основе М-белков, свободных от их перекрестно-реагирующих с тканями человека антигенных доменов, должен определяться циркулирующими в конкретном регионе М-типами СГА. Кроме того, смена циркулирующих в регионе М-типов СГА должна периодически приводить к обновлению антигенного состава вакцины [4].

Серотипы СГА условно, т.е. без четких границ, могут быть подразделены на «глоточные» и «кожные», соответственно, чаще вызывающие тонзиллофарингиты или пиодермии. Среди «кожных» чаще встречаются М-типы 2, 4, 9, 11, 13, 22, 25, 28, 48, 49, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 66, 68 и др. Они отличаются тем, что продуцируют фактор помутнения сыворотки (serum opacity factor, SOF) — энзим, гидролизирующий α-липопротеиды человека и некоторых млекопитающих. Типовая принадлежность SOF совпадает с их распределением по М-типу [5]. Заболевания, вызываемые данными типами, чаще осложняются острым гломерулонефритом (poststreptococcal glomerulonephritis, PSGN) либо IgA-нефропатиями [1], поэтому многие из них относят к «нефритогенным» типам в отличие от «ревматогенных», или SOF-негативных, осложняющих «глоточные» процессы ревматической лихорадкой и ревмокардитом. Классический бактерицидный тест для оценки напряженности типового иммунитета на практике не используют. Для этого целесообразнее применять опсонофагоцитарный тест. В то же время оба теста успешно могут использоваться для определения типа анти-М-антител либо уровня экспрессии М-белка штаммом-возбудителем. Наличие в образцах крови больных нескольких анти-М-антител различной типовой специфичности с высокой вероятностью будет свидетельствовать о наличии у индивида иммунитета к определенному кругу М-типов СГА.

М-тип SOF-позитивных СГА может быть также установлен по способности человеческих сывороток от пациентов подавлять активность SOF в реакции нейтрализации. Дело в том, что SOF-позитивные штаммы часто встречаются среди СГА, а SOF-фактор служит сильным

антигеном, поэтому в крови взрослых долго может сохраняться тот или иной набор типовых анти-SOF-антител. Оценку реакции нейтрализации следует выполнять с осторожностью [5], пользуясь оттитрованными анти-SOF-сыворотками человека в качестве положительного контроля. Этот подход в разных модификациях широко использовался в исследовательских целях в 80–90-е гг. прошлого века.

Ранее для идентификации СГА применяли реакцию Т-агглютинации микробных клеток посредством коммерческих наборов анти-сывороток к Т-белкам клеточной стенки микроба. Оценка ее результатов вызывала затруднения по причине того, что один и тот же Т-антиген присутствовал в штаммах разных М-типов, а штамм конкретного М-типа мог содержать ряд Т-белков. Эту сложность преодолевали путем составления кластеров М-типов, в которых встречался один и тот же Т-белок либо несколько взаимосвязанных Т-белков [3]. Сегодня к Т-типированию прибегают редко, главным образом при трудностях М-типирования. Его, возможно, ожидает судьба многих методов диагностики прошлого. Они были определяющими для своего времени, но, сослужив немалую службу, сменились новыми, более точными, простыми в исполнении (в т.ч. автоматизированными) и экспрессными методами, подходами и технологиями.

В обычных условиях лабораторная и эпидемиологическая диагностика инфекций строится на двух «китах»: оценке иммунологических реакций организма и характеристике инфекционного агента. В разные периоды прогресса науки баланс этих двух подходов может быть смещен в ту или иную сторону. Если в прежнее время для диагностики достаточно было нескольких иммунологических реакций на антитела к антигенам микроба (в случае СГА — антистрептолизин-О и анти-ДНКаза В) и минимума сведений о возбудителе (в случае СГА — вид колоний, характер гемолиза, тип Т-белка), то в настоящее время этот объем информации недостаточен, поскольку он ограничивает подходы для терапии и сказывается на полноте и качестве эпидемиологического анализа. Сегодня в диагностике СГА-инфекции микробное звено доминирует над иммунологическим. Очевидно, с годами это отставание исчезнет по мере накопления информации о факторах и механизмах иммунитета против стрептококков благодаря работам по конструированию рекомбинантных вакцин на основе протективных антигенов микроба.

Необходимо отметить, что учение о стрептококках, как будет ясно из дальнейшего изложения, ушло далеко вперед и достигло того рубежа, который допускает многофакторный мониторинг циркулирующих штаммов микроба и эпидемиологический надзор за вызываемой ими заболеваемостью по генетическим и молекулярным маркерам возбудителя. Некоторые из таких подходов приводятся ниже. К сожалению, лабораторная диагностика в области стрептококковой инфекции значительно отстает (в т.ч. и в России) от накопленных мировой наукой знаний о патогенных стрептококках, что наглядно проявляется в практике работы отечественных лабораторий. Отсутствие или ограниченность статистики по стрептококковой заболеваемости создают ложное представление о недостаточной актуальности данной патологии. Это, в свою очередь, приводит к отсутствию четкой позиции в вопросе стратегии и тактики борьбы с СГА-инфекцией у органов здравоохранения и негативно влияет на развитие нужной лабораторной базы. Слабость такой базы сказывается на патогенетической терапии СГА-заболеваний и их осложнений со стороны жизненно важных органов и систем. Итог чреват ростом инвалидизации среди детского, подросткового и юношеского населения.

Согласно ранним работам школы В.И. Иоффе [2], вероятность перехода СГА-инфицирования в скарлатинозный процесс определяется наличием или отсутствием в сыворотке крови людей антител к эритрогенному токсину А (токсин Дика или термолабильная фракция культуральной жидкости СГА). В середине XX в. в исследованиях по клинической и эпидемиологической иммунологии на многотысячных организованных детских контингентах была применена титрационная кожная проба, согласно которой лица, перенесшие скарлатину, в отличие от восприимчивых к ней, не реагировали воспалительной реакцией на внутрикожное введение этого токсина (1–4–10 кожных доз). Посредством теста по Иоффе определяли наличие и уровень антитоксического иммунитета у разных групп детей (больные скарлатиной, ангиной, носители инфекции, контактные лица в очагах инфекции и здоровые индивидуумы). В этих исследованиях была убедительно доказана ведущая роль токсина А в патогенезе скарлатины. Показано снижение антитоксического иммунитета при ранней пенициллинотерапии пациентов, что нередко приводило к повторным эпизодам болезни. В настоящее время в связи с тем, что скарлатина перестает быть частым явлением в северных широтах либо вследствие изменения ее характеристик, кожная проба, успешно применявшаяся ранее в эпидемиологии, уже не используется. С позиций сегодняшних знаний об эритрогенных токсинах СГА остается неясной роль других эритрогенных токсинов, в частности С, Н и I (кодируются, как и токсин А, генами умеренных фагов), в патогенезе скарлатины. Между тем упомянутый подход мог бы быть использован для оценки современной скарлатины, тем более что чистые препараты названных токсинов в настоящее время могут быть получены генно-инженерным путем. Мало информации имеется и о пирогенных токсинах (кроме токсина В), кодируемых хромосомными генами, в генезе стрептококковых инфекций [6].

Известно, что на долю *S. pyogenes* приходится 90% всех заболеваний, вызываемых стрептококками. Сходные, к примеру, по клинической картине инвазивные заболевания могут быть вызваны также стрептококками групп В, С и G. Инвазивность штаммов определяется суперантигенами, каковыми являются различные токсины, широко представленные не только у СГА, но и у других видов β-гемолитических стрептококков. Их присутствие у многих видов сегодня определяет межвидовой обмен соответствующими генами [7]. Эти вопросы, как и новые данные по М-белкам, обсуждаются ниже.

В отличие от М-белка или эритрогенного токсина информация о патогенных функциях полисахарида СГА скудна. Эта субстанция определяет групповую принадлежность штаммов. За последние 25 лет для группирования патогенных стрептококков получили распространение экспресс-методы диагностики, в которых HCl- либо HNO_2-экстракты культур, содержащие полисахарид, агглютинируют калиброванные частицы латекса либо клетки *Staphylococcus aureus*, несущие протеин А (является IgG Fc-рецептором для $IgG_{1,2}$ и IgG_4), с нагруженными на них молекулами специфических антител к конкретному групповому полисахариду. Полисахарид может быть также успешно экстрагирован непосредственно из первичного материала на тампоне, что сокращает время постановки реакции до 15 мин. Экспресс-методы чувствительны и просты в исполнении. Их широко используют, особенно с целью предварительной диагностики.

Для оценки иммунитета к СГА делались попытки титрования антител к А-полисахариду в крови больных. Однако рекомендованный для этого метод фактически не используется по причине недостаточной информативности.

Возвращаясь к вопросу об эволюции патогенных СГА, важно выделить некоторые механизмы их изменчивости:

- антигенный дрейф микроба под влиянием иммунологических факторов организма, в частности антител к различным доменам протективных антигенов микроба;
- внутри- и межвидовой перенос нехромосомных генетических факторов (умеренные бактериофаги, плазмиды, транспозоны, IS-элементы или встраивающиеся ДНК последовательности и «острова патогенности»);
- реакции адаптивных регуляторных систем бактерий на мутагенные и стрессорные воздействия окружающей агрессивной среды их обитания.

Имеются все основания допускать роль этих механизмов в генетическом полиморфизме и в пластичности бактерий, которые определяют клональное многообразие возбудителей и разные формы патологии, ее особенности и клинические проявления. Нет такой клинической дисциплины, в которой в той или иной форме не нашлось бы место для патологии, вызываемой *S. pyogenes*. Многоликость данной патологии отчасти зависит от многообразия комбинаций признаков патогенности в штаммах и указывает на важность изучения ведущих факторов патогенности СГА.

М-белки и их антигенный дрейф

Упомянутые выше М-белки (Emm, Mrp, Enn, Sic и др.) являются ведущими факторами болезнетворности СГА, преимущественно определяя антифагоцитарные и антикомплементарные свойства микроба, типовой характер протективного иммунитета и лиганд-рецепторное взаимодействие со многими белками крови (иммуноглобулинами G и A, альбумином, кининогеном, плазминогеном, фибронектином и фибриногеном, фракциями комплемента C_4 и H). Взаимодействие с ними не проходит бесследно для организма хозяина. В частности, благодаря «экранированию» микробных клеток это взаимодействие препятствует их опсонизации и фагоцитозу; оно нередко сопровождается продукцией антител к перечисленным белкам крови и формированием циркулирующих иммунных комплексов (CIC), часто приводящему к выраженным сдвигам в системе комплемента и цитокиновой сети с последующим формированием ряда патологических проявлений и процессов в органах и тканях. К примеру, неиммунное связывание М-белков с иммуноглобулинами за счет феномена Fc-взаимодействия приводит к синтезу анти-IgG-антител, образованию IgG – анти-IgG-комплексов и в конечном итоге к индукции патологии в жизненно важных органах (почках, сердце), нередко осложняющей СГА-инфекцию. Fc-рецепторная функция М-белков в отношении IgG [8], и, по-видимому, IgA [1], и иммунных комплексов различного генеза [9] оказалась базовым механизмом, определяющим развитие иммунного воспаления в тканях почечных гломерул и миокарда. Штаммы СГА, не обладающие Fc-рецепцией либо лишенные этой способности, не обладают нефритогенностью или кардиотропностью.

Гены, кодирующие М-белки, входят в состав *Mga*-регулона [10] в различных сочетаниях, в связи с чем структура М-белков конкретного типа варьирует в пределах различных паттернов [1], т.е. различные М-типы СГА связывают белки крови в различных сочетаниях. Можно допустить, что взаимодействие с разными белками — одно из многих проявлений способности СГА вызывать патологические процессы в органах и тканях. К примеру, штаммы, относящиеся к так называемому Е-паттерну (типы М4, М60, М63), могут приводить к IgA-нефропатиям [1]. В соответствии с изложенным, штаммы от носителей СГА, несущие природную делецию в промоторной области гена-регулятора *mga* [11], зачастую оказываются авирулентными, т.е. неспособными синтезировать М-белки. По этой причине они бывают лишены Fc-рецепторной способности и не могут вызывать развитие осложнений [9].

У разных М-типов СГА из всех М-белков постоянно присутствует Emm-белок, что позволило принять кодирующий его *emm*-ген в качестве стандарта для *emm*-генотипирования *S. pyogenes* [12]. Как известно, М-белки содержат гипервариабельную, вариабельную и консервативную область. Кодирующие нуклеотидные последовательности для первой (90 п.н. с 5'-конца *emm*-гена и следующие 60 п.н.) из них определяют конкретный М-тип или подтип СГА. На сегодня описано около 200 *emm*-типов и подтипов, хотя в 60–80-х гг. было известно лишь около 85 М-типов. Иммунитет к СГА является типовым, т.е. по существу он определяется преимущественно антителами к вариабельным фрагментам Emm-белков [13]. Под их «давлением» в аминокислотной цепи белка могут возникать ошибки, приводящие к так называемому антигенному дрейфу в М-белке и формированию нового генотипа. Таким путем микроб пытается «ускользнуть» от губительного действия специфических опсонизирующих антител и приобретает новую «личину» под новым номером. В случае, когда 90-нуклеотидная последовательность испытуемого штамма СГА оказывается гомологичной сиквенсам известных *emm*-типов менее чем на 92%, это становится основанием для регистрации нового *emm*-типа. Новый подтип регистрируют при любых нуклеотидных заменах в составе последующих 60 п.н. [12]. Природа данного феномена указывает на теоретически неограниченную возможность возникновения новых *emm*-типов и подтипов с последующим преобладанием в циркуляции в силу отсутствия у населения специфического иммунитета к ним.

Очевидно, что *emm*-типирование отличается высокой точностью и пришло на смену громоздкому, затратному и чреватому неспецифическими реакциями серологическому методу М- и SOF-типирования. Каждому географическому региону присущ свой определенный набор доминирующих *emm*-типов, а различные стрептококковые заболевания или их осложнения нередко бывают ассоциированы с конкретными *emm*-типами. Эпидемиологическая ценность этого теста очевидна. Наличие у конкретного лица типового иммунитета при необходимости по-прежнему следует определять по поведению клеток (фагоцитарный индекс) типового штамма в опсонофагоцитарном тесте в смеси с исследуемой сывороткой. Типы *S. pyogenes*, не находящие условий для паразитирования, могут исчезать из циркуляции под давлением факторов коллективного иммунитета. При его снижении они нередко возвращаются и находят новую нишу. Типичным примером служит тип М1, который перестал высеваться в большинстве стран мира в середине прошлого века и «вернулся» в конце 80-х гг., вызывая высоколетальные инвазивные заболевания.

MLST-генотипирование

Технологически *emm*-генотипирование СГА имеет общие черты с мультилокусным сиквенсным типированием (MLST), которое является инструментом углубленного эпидемиологического анализа. Штаммы СГА того или иного *emm*-генотипа сегодня могут быть подвергнуты клональному анализу в MLST. Его ST-тип определяют, сопоставляя сиквенсы внутренних областей 7 генов «домашнего хозяйства» испытуемого клона с базой данных в Gene-Bank с целью выявления его аллельного профиля по этим генам и составления формулы ST-типа [14]. Для ST-генотипирования используют ПЦР с праймерами на ряд генов: глюкозокиназы (*gki*), транспортного белка для глутамина (*gtr*), глутаматрацемазы (*murI*), белка репарации неправильно спаренных нуклеотидов (*mutS*), транскетолазы (*recP*), ксантин-фосфорибозилтрансферазы (*xpt*) и ацетил-КоА-ацетилтрансферазы (*yigL*). При этом будут получаться амплификаты размером 405–498 п.н. для их последующего секвенирования и получения сравнительных данных. В настоящее время для СГА установлено более 600 ST-генотипов, т.е. на каждый *emm*-генотип в среднем приходится по 3 ST-типа, что значительно повышает дискриминационный уровень данного подхода. Клоны таких генотипов, как ST15 и ST28, известны в качестве возбудителей инвазивных форм СГА-инфекции.

MLST обладает высокой точностью и воспроизводимостью результатов, т.е. качествами, необходимыми для эпидемиологического анализа. Недостатком является относительная дороговизна по сравнению с *emm*-генотипированием.

Обмен нехромосомными генетическими факторами

Эритрогенные токсины и роль фагов

Согласно данным литературы 60-х гг. XX в., синтез эритрогенного токсина А (SpeA) штаммами СГА связан с феноменом их фаговой конверсии [15]. Позже были обнаружены эритрогенные токсины (ЕТ) иной антигенной специфичности. Они получены в виде чистых кристаллических белков, что позволило изучить их аминокислотную и пространственную структуру, а также выявить активные центры. Как и токсин А, эритрогенные токсины SpeC, SpeH, SpeI (кроме SpeB, SpeG и некоторых других) имеют фаговое происхождение, а наличие в геномах бактерий или их фагов *spe*-генов определяют при помощи ПЦР. Конкретные *spe*-гены ассоциированы с геномами различных умеренных фагов СГА. Они встроены в разные участки генома бактерии посредством специфических ферментов — интеграз (*int*), также кодируемых фаговыми генами. Штаммы СГА обычно несут по нескольку геномов профагов или их фрагменты и различаются по сочетанию *spe*- и *int*-генов. Соответственно, спектры токсигенности штаммов должны различаться и определяться циркулирующими в каждом регионе линиями фагов.

На предмет распределения *spe*-генов были изучены коллекции штаммов СГА типов *emm1* и *emm12*, выделенные в регионах Санкт-Петербурга и Пекина [16]. В обеих коллекциях лизогения, т.е. носительство умеренных фагов, носила выраженный характер: она встречалась у 100% штаммов, и в геноме каждого было обнаружено не менее 2–3 профаговых геномов. Обращало на себя внимание и то, что штаммы типа *emm1* резко отличались от штаммов типа *emm12* по набору *spe*-генов. Первые в обоих наборах несли только гены *speA* (87–100%) и *speC* (59–97%), тогда как вторые вместо *speA* (0%) содержали гены *speH* (94–100%) и *speI* (94%), а также *speC* (89–100%). В каждом наборе штаммов встречаемость генов *speA* и *specC* находилась в обратном соотношении: чем реже обнаруживался *speA*, тем чаще встречался *speC*, и наоборот. Это обстоятельство, возможно, подтверждает версию о том, что среди людей вырос иммунитет к токсину А, и на смену ему идет токсин С или другие токсины, изменившие «лицо» современной скарлатины. Интересно, что в пекинских штаммах обоих *emm*-типов с постоянством (100%) выявлялся и другой фаговый ген (*ssa*), кодирующий суперантиген СГА — признак, характерный для штаммов с инвазивной потенцией [16]. Эта находка согласуется также с представлением об эндемичности штаммов из Китая, которые в 20–30-х гг. прошлого века вызвали большие вспышки «стрептококковой гангрены» в странах Юго-Восточной Азии. Необходимо отметить, что в наборе штаммов типа *emm49* от пациентов из США с инвазивными формами обнаруживались *spe*-гены токсинов А, Н и I (65–90%), но не С (0%), а также ген *hyl* (100%), кодирующий фаговую гиалуронидазу — фактор генерализации инфекции [17]. Очевидно, что умеренные фаги в большой степени влияют на патогенные свойства СГА, формируя проявления инфекции.

Плазмиды и транспозоны в антибиотикоустойчивости СГА

Широкое и бесконтрольное употребление антибиотиков в течение последних десятилетий для лечения инфекций привело к формированию и довольно значительному распространению лекарственной устойчивости у бактерий. Очевидно, что резистентность патогенов сохраняет болезнетворное начало в циркуляции и осложняет борьбу с инфекциями. Не является исключением и *S. pyogenes*. В 80-х гг. XX в. у СГА удалось обнаружить гигантские циркулярные плазмиды, содержащие инвертированные нуклеотидные повторы большой протяженности (до 40–80% контурной длины ДНК). В них обнаружен ряд генов, определяющих устойчивость микроба к МЛС-антибиотикам (макролидам, линкозамидам и стрептограмину) [18]. Они обладали трансмиссивностью при генетическом обмене, а сам перенос ДНК вызывал повышение уровня экспрессии факторов патогенности (М-белка и SOF-фактора) штамма-реципиента.

Не так давно у *S. pyogenes* обнаружили транспозон, гомологичный транспозону *Streptococcus pneumoniae* и несущий ген устойчивости к тетрациклину [16]. С транспозонами связывают как лекарственную устойчивость СГА, так и его способность защищаться от действия факторов иммунитета организма путем инвазии в клетки эпителия человека [19]. То, что бесконтрольное применение антибиотиков приводит к распространению устойчивости, видно из данных масштабного исследования китайских авторов (почти 500 штаммов СГА от больных детей). За десятилетний период между 1993–1994 и 2005–2008 гг. устойчивость к эритромицину возросла с 79 до 94%, к клиндамицину — с 75 до 97%, к телитромицину — с 20 до 88%. Среди штаммов, резистентных к макролидам, резко увеличилось (с 16 до 87%) число штаммов с генами *ermB*, *tetM*, *int*, *xis*, характерными для транспозонов семейства Tn916 *Escherichia coli* [20]. Согласно другому китайскому источнику, за 2009–2010 гг. «нефритогенные» штаммы СГА в 100% случаев оказались устойчивы к эритромицину и тетрациклину. При этом штаммы от других больных СГА-инфекциями были устойчивы к этим антибиотикам в 64 и 91% случаев, соответственно [21]. Сохранность генов устойчивости в природе ведет к их распростра-

нению посредством естественных механизмов горизонтального переноса (плазмиды, транспозоны), играющего ведущую роль во внутри- и межвидовом обмене и генетической гетерогенности штаммов СГА, существенных для понимания эпидемиологических закономерностей и клинических особенностей СГА-инфекций. Изложенное подтверждает положение о том, что микроорганизмы обладают высокой пластичностью в борьбе за выживание.

Другие факторы изменчивости

Очевидно, что в биологии *S. pyogenes* огромное значение имеют умеренные фаги (они составляют до 12% длины генома), а также плазмиды и транспозоны. Другие генетические элементы здесь играют меньшую роль. Например, у СГА фактически не описаны «острова патогенности» (ОП) — группы генов, контролирующие патогенные, метаболические и транспортные функции, хотя они содержат встраивающиеся IS-последовательности ДНК, обычно фланкирующие транспозоны и ОП и тем самым ведущие к их миграции и горизонтальному переносу генов. Наоборот, у *S. agalactiae* (стрептококк группы B) умеренные фаги встречаются редко, в то время как ОП чрезвычайно распространены (описано 15 таких образований) [22]. У СГА типа *emm1* (strain SF370) при полногеномном анализе наряду с 1752 генами хромосомы и 4 профагами обнаружено 11 IS-элементов [23]. Как мобильные структуры они осуществляют обмен генами между штаммами СГА, а также между СГА и другими β-гемолитическими стрептококками. Так, недавно у всех штаммов СГА типа *emm28* и ряда других генотипов, ассоциированных с заболеваниями женской мочеполовой сферы, описан новый трансмиссивный элемент RD2, кодирующий 7 секретируемых белков. RD2 существует в двух формах: интегрированной в хромосому и плазмидной. Сходный элемент был идентифицирован также у штаммов СГВ, СГС, СГG, вызывающих инвазивную патологию у человека [24]. Не исключено, что RD2 элемент претендует на роль ОП у штаммов групп A, C и G, поскольку он участвует в межвидовом горизонтальном обмене и при этом кодирует ряд продуктов. Был также описан и другой крупный (64 kb) интегрированный в хромосому конъюгативный элемент СГА, кодирующий 66 открытых рамок считывания (гены переноса, гены патогенности и устойчивости к металлам) [25]. Следует допустить, что он также может служить кандидатом в ОП, поскольку этот элемент, первоначально описанный у СГG, мог передаваться штаммам СГВ и СГА и обнаруживался в клинических изолятах, что подчеркивает роль горизонтального переноса генов в клинической патологии и в биологии болезнетворных стрептококков разных серологических групп.

Реакция регуляторных систем бактерий на воздействия агрессивной среды обитания

Проблема регуляции экспрессии отдельных генов или генома в целом — одна из самых молодых в молекулярной микробиологии. Экспрессия генов во многом является ответом бактериальной клетки на колебания ее внешней и внутренней среды. Ее реакция контролируется многими глобальными и двухкомпонентными регуляторными сенсорными системами, образующими сложноорганизованную сеть, отвечающую за позитивную (включение гена), негативную (выключение гена) и опосредованную (взаимообусловленную) регуляцию экспрессии генов. По сути, сеть формирует адаптивную реакцию клеток возбудителя, а совокупность уровней экспрессии отдельных генов определяет фенотип микроба на отдельном этапе его функционирования. Генетически контролируемый фенотип возбудителя определяет проявления его патогенности.

S. pyogenes имеет 40 индивидуальных и 13 двухкомпонентных регуляторов транскрипции генов. Кодируемые ими белки-регуляторы в соответствующих условиях определяют уровень транскрипции конкретного гена, связываясь с его промоторной областью. Так, например, транскрипция *emm*, *mrp*, *enn*-генов и последующая трансляция М-белков регулируется геном *mga* и белком-регулятором Mga. Ген *rgg* и регулятор Rgg контролируют синтез пирогенного токсина SpeB. Соответственно, мутации в генах *mga* и *rgg* приводят к подавлению синтеза М-белков и вирулентности, подавлению продукции SpeB-токсина [26].

При этом мутации в регуляторных генах могут одновременно вызывать опосредованные (т.е. через другие регуляторные звенья) эффекты. Так, *rgg*-мутант с подавленной транскрипцией гена *speB* мог проявлять повышенную продукцию ДНКазы, стрептолизина-О или НАДазы [26].

Гены-регуляторы имеются не только на хромосоме, но и на мигрирующих генетических элементах. Совокупность генов, позитивно или отрицательно регулируемая конкретной регуляторной системой, образует его регулон. Гены, регулируемые непосредственно, «обязательно», составляют «cor»-регулон, а гены, регулируемые опосредованно, — «sub»-регулон. Последний характеризуется высокой штаммовой специфичностью. Новая информация в области регуляции транскрипции генов патогенности должна помочь в расшифровке патогенетических механизмов стрептококковых заболеваний и в выявлении эффективных терапевтических мишеней.

Заключение

Сопоставление прошлых и современных данных о *S. pyogenes* продемонстрировало огромный прогресс в наших знаниях об их патогенности и о механизмах, контролирующих их генотип и фенотип. Очевидно, что в настоящее время наука обладает многими новыми подходами и технологиями для углубленного изучения возбудителя, механизмов его болезнетворной активности и ответных реакций организма. Новая информация существенна как для совершенствования лабораторной диагностики СГА, так и для изучения вызываемых ими форм заболеваний.

Конфликт интересов

Обзор подготовлен при поддержке РФФИ в рамках проекта № 14-04-00390а за 2014 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schmitt R. Studies of the pathogenesis of IgA nephropathy and Henoch–Schonlein purpura with special reference to *Streptococcus pyogenes* infections and complement. Doctoral dissertation. *Lund, Sweden*. 2012. 89 p.
2. Иоффе В.И. Вопросы иммунологии и эпидемиологии скарлатины и стрептококковых инфекций. *Л.: Медгиз*. 1956. 220 с.
3. Джонсон Д., Каплан Э., Шрамек Я., Бицова Р., Гавличек И., Гавличкова Г., Мотлова И., Криз П. Лабораторная диа-

гностика инфекций, вызванных стрептококками группы А. *Женева*. 1998. 117 с.
4. Smeester P.R., Mardulyn P., Vergison A., Leplae R., Van Melderen L. Genetic diversity of group A *Streptococcus* M protein: implications for typing and vaccine development. *Vaccine.* 2008; 26: 5835–5842.
5. Maxted W.R., Widdowson J.P. The protein antigens of group A streptococci. In: *Streptococci* and *Streptococcal* Diseases. L.W. Wannamaker, J.M. Matsen (eds). *L.: Academic Press.* 1972. P. 251–267.
6. Nelson D.C., Garbe J., Collin M. Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes* — a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biol. Chem*. 2011; 392: 1077–1088.
7. Kehoe M.A., Kapur V., Whatmore A.M., Musser J.M. Horizontal gene transfer among group A streptococci: implications for pathogenesis and epidemiology. *Trends Microbiol.* 1996; 4 (1): 436–443.
8. Burova L., Pigarevsky P., Seliverstova V., Gupalova T., Schalen C., Totolian A. Experimental poststreptococcal glomerulonephritis elicited by IgG Fc-binding M family proteins and blocked by IgG Fc fragment. *APMIS*. 2012; 120: 221–230.
9. Burova L., Pigarevsky P., Duplik N., Snegova V., Suvorov A., Schalen C., Totolian A. Immune complex binding *Streptococcus pyogenes* type M12/emm12 in experimental glomerulonephritis. *J. Med. Microbiol.* 2013; 62 (9): 72–80.
10. Thern A. Interaction between *Streptococcus pyogenes* and the human immune system. Doctoral dissertation. *Lund, Sweden.* 1998. 56 p.
11. Flores A.R., Olsen R,J., Wunsche A., Kumaraswami M., Shelburne S.A., Carroll R.K., Musser J.M. Natural variation in the promoter of the gene encoding the Mga regulator alters host-pathogen interaction in group A *Streptococcus* carrier strains. *Infect. Immun*. 2013; 81 (11): 4128–4138.
12. Facklam R., Beall B., Efstratiou A., Fischetti V., Johnson D., Kaplan E., Kriz P., Lovgren M., Martin D., Schwartz B., Totolian A., Bessen D., Hollingshead S., Rubin F., Scott J., Tyrrell G. Demonstration of emm typing and validation of provisional M types for group A *Streptococci*. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5: 247–253.
13. Lannergard J., Gustafson M., Waldemarsson J., Norrby-Teglund A., Stalhammar-Carlemalm M. and Lindahl G. The hypervariable region of *Streptococcus pyogenes* M protein escapes antibody attack by antigenic variation and weak immunogenicity. *Cell Host. & Microbe.* 2011; 10: 147–157.
14. Enright M.C., Spratt B.G., Kalia A., Cross J.H., Bessen D.E. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone. *Infect. Immun.* 2001; 69 (4): 2416–2427.
15. Zabriskie J.B., Read S.E., Fischetti V.A. Lysogeny in streptococci. In: *Streptococci* and *Streptococcal* Diseases. L.W. Wannamaker, J.M. Matsen (eds). *L.: Academic Press.* 1972. P. 101–120.
16. Полякова Е.М. Геномный полиморфизм *Streptococcus pyogenes* различных *emm*-генотипов. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. *СПб*. 2012. 18 с.
17. Suvorov A.N., Polyakova E.M., McShen W., Ferretti J. Bacteriophage content of M49 strains of Streptococcus pyogenes. *FEMS Microbiol. Lett*. 2009; 294: 9–15.
18. Boitsov A., Golubkov V., Iontova I., Malke H., Totolian A. Inverted repeates on plasmids determining resistance to MLS antibiotics in group A streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 1979; 6: 11–14.
19. Russell H.H., Shou L., Sriskandan S. Repid screen for epithelial internalization of Tn917-mutagenized *Streptococcus pyogenes*. *J. Microbiol. Metods*. 2009; 78 (1): 34–39.
20. Feng L., Lin H., Ma Y., Yang Y., Zheng Y., Fu Z., Yu S., Yao K., Shen X. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* from Chinese pediatric patients in association with Tn916 transposons family over a 16-year period. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 67 (4): 369–375.
21. Zheng M., Jiao Zh., Zhang L., Yu S., Tang G., Yan X., He L., Meng F., Zhao F., Zhang M., Xiao D., Yang Y., Wei N., Zhang J. and Wang Z. Genetic analysis of group A streptococcus isolates recovered during acute glomerulonephritis outbreaks in Guizhou province of China. *J. Clin. Microbiol*. 2009; 47 (3): 715–720.
22. Kuleshevich E., Grabovskaya K., Leontieva G., Suvorov A. The analysis of group B streptococcal gene sspB1 localized on pathogenicity island. Abstract book of XVIII Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. *Palermo, Italy.* 2011. 170 p.
23. Ferretti J.J., McShen W.M., Adjic D. Savic D.J., Savic G., Lyon K., Sezate S., Suvorov A.N., Primeaux C., Kenton S., Lai H., Lin S., Qian Y., Jia H., Zhu H., Ren Q., Najar F.Z., Song L., White J., Yuan X., Clifton S.W., Roe B.A., McLaughlin R. Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 4658–4663.
24. Sitkiewicz I., Green N.M., Guo N., Mereghetti L., Musser G.M. lateral gene transfer of streptococcal ICE element RD2 (region of difference 2) encoding secreted proteins. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 65–70.
25. Davies M.R., Shera J., Van Domselaar G.H., Sriprakash K.S., McMillan D.J. A novel integrative conjugative element mediates genetic transfer from group G streptococcus to other β-hemolytic streptococci. *J. Bacteriol*. 2009; 191 (7): 2257–2265.
26. Dmitriev A.V., McDowell E.J., Kappeler K.V., Chaussee L.D., Rieck M.S. The Rgg regulation of *Streptococcus pyogenes* influence the utilization of nonglucose carbohydrates, prophage induction, and expression of the NAD-glucohydrolase virulence operon. *J. Bacteriol*. 2006; 188 (20): 7230–7241.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Тотолян Артём Акопович, доктор медицинских наук, академик РАН, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии НИИ экспериментальной медицины

Адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, **тел.:** +7 (812) 234-94-77, **e-mail:** totolyan@hotmail.com