

Маркевич В. В.
Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЕММ-ГЕНА *STREPTOCOCCUS PYOGENES* С ПОМОЩЬЮ ПЦР

Стрептококки относятся к числу самых распространенных возбудителей бактериальных инфекций у человека. Среди них наибольшее значение имеет *Streptococcus pyogenes* (СГА). Этот стрептококк вызывает инфекцию кожи и подкожной клетчатки, легких и мозговых оболочек, уха и глаз, клапанов сердца и ран. Но чаще всего он вызывает ангину, которая неприятна сама по себе, но особенно страшна осложнениями, в первую очередь ревматизмом. Этот микроб содержит особый белок М, похожий на белок сердечной мышцы. Поэтому антитела к этому белку, образовавшиеся после ангины, связываются с белками сердечной мышцы, повреждая ее.

Другие штаммы этого возбудителя способны вызвать воспаление почек — гломерулонефрит. Механизм повреждения почек до конца не выяснен, считается, что особые нефритогенные штаммы стрептококков группы А способны образовывать в организме иммунные комплексы, которые, выделяясь через почки, повреждают их. Эти штаммы вызывают либо ангину, либо инфекцию кожи (импетиго), причем в холодные сезоны гломерулонефрит развивается чаще после ангины, а в теплые — после импетиго.

В мире ежегодно регистрируется свыше 100 млн случаев первичной стрептококковой инфекции, с уровнем заболеваемости которой тесно связана распространенность ревматизма и гломерулонефрита. По данным ВОЗ, на поражения сердца, связанные со стрептококковой инфекцией, приходится около 50 % всех его заболеваний. Распространенность тяжелых форм СГА инфекций составляет 18,1 млн случаев. Ежегодно регистрируется 1,8 млн новых случаев генерализованной инфекции, более 111 млн случаев — кожных форм и 616 млн случаев — фарингита [1].

Среди факторов антифагоцитарной вирулентности протеин М играет ключевую роль: он занимает главное место в адгезии СГА к слизистым и коже, а также тканевой инвазии; он ингибирует альтернативный путь комплемента и фагоцитоза; он играет определенную роль в развитии токсического шока, вызывая дегрануляцию полинуклеаров. М- и М-подобные белки способны взаимодействовать с широким кругом белков крови млекопитающих, в том числе и человека, в частности с фибриногеном, фибронектином, плазминогеном, иммуноглобулинами G и A, альбумином, фактором H и другими компонентами системы комплемента. Белок М обладает свойствами суперантигена, вызывая поликлональную активацию лимфоцитов, образование антител с низким аффинитетом. Подобные свойства имеют важное значение в нарушении толерантности к антигенам, развитии аутоиммунопатологии [2].

М-белок — это суперспирализованная молекула, состоящая из четырех участков повторяющихся аминокислот. Один из них, обладающий гипервариабельно-

стью, определяет антигенные особенности стрептококков. Остальные три участка более консервативны. Часть молекулы, богатая пролином/глицином, обеспечивает включение белка в клеточную стенку, а гидрофобный фрагмент, как якорь, закрепляет белок на плазматической мембране. Уже идентифицировано более 80 М-типов стрептококков и, по-видимому, это не предел [3, 4].

В последние годы предложено использование метода определения последовательности ДНК некоторых генов для молекулярного типирования СГА. Особый интерес представляет возможность воспроизвести последовательность гена, кодирующего М-белок (*emm*-ген). Этот подход назван «золотым стандартом» молекулярного типирования стрептококков. Эта процедура включает выделение ДНК исследуемого стрептококкового штамма, амплификацию *emm*-гена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и его выделение. Показана высокая (более 80 %) степень совпадения М-типирования и типирования на основе определения *emm*-гена.

Полученная последовательность ДНК позволяет не только идентифицировать некоторые М-типы, но и определить вариации внутри М-типов, а также выявлять неописанные ранее *emm*-гены [1].

Материалы и методы. Материалом для исследования явились чистые культуры *S. pyogenes*, выделенные от клинических больных с различными гнойно-воспалительными заболеваниями. Забор патологического материала (налет и слизь с миндалин и слизистых оболочек зева при заболеваниях верхних дыхательных путей; гной из очагов поражения) производил средний медицинский персонал стационаров и поликлиник. Далее, соблюдая все правила хранения и транспортировки, материал поступал в ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии», где производилось выделение чистой культуры *S. pyogenes* из патологического материала.

Для выделения *S. pyogenes* применяли специальные среды, содержащие в своем составе нативный белок (сыворотку крови или кровь).

Штаммы стрептококков серологической группы А могут образовывать на твердых питательных средах колонии трех видов:

а) мукоидные — крупные, до 2–2,5 мм в диаметре, блестящие, гомогенные, прозрачные в проходящем свете, вязкой консистенции. Такой вид колоний характерен для свежeweделенных вирулентных штаммов стрептококка;

б) шероховатые — мелкие, 0,5–0,8 мм в диаметре, плоские, с шероховатой поверхностью, зернистой структурой, изрезанным краем;

в) гладкие — глянцевые мелкие колонии серовато-зеленого цвета в проходящем свете; характерны для слабовирулентных и невирулентных штаммов стрептококка.

При микроскопировании в препарате, приготовленном из культуры с плотной питательной среды, стрептококки располагались парами, короткими цепочками, образовывали иногда скопления, напоминающие грозди стафилококка.

Для предварительной идентификации бета-гемолитических стрептококков группы А — *S. pyogenes* — применяли диагностические диски с бацитрацином 0,04 ЕД/диск.

Тест основан на высокой чувствительности *S. pyogenes* к низким концентрациям бацитрацина (0,04 ЕД/диск), обеспечивающим создание зон задержки роста вокруг диска с бацитрацином 0,04 ЕД/диск. Другие бета-гемолитические стрептококки резистентны к таким концентрациям и поэтому не дают зоны задержки роста.

На чашке с кровавым агаром делали штриховой посев петлей или стерильным ватным тампоном испытуемой культуры бета-гемолитических стрептококков для получения сливного роста. На засеянную поверхность агара помещали диск с бацитрацином 0,04 ЕД/диск. Инкубировали чашки при температуре 36 °С в течение 18–24 ч при повышенном содержании углекислого газа 5–10 %.

По окончании инкубации измеряли размер зоны задержки роста вокруг диска с бацитрацином 0,04 ЕД/диск. Любая видимая зона задержки роста вокруг диска с бацитрацином 0,04 ЕД/диск интерпретируется, как чувствительность к этому антимикробному препарату. Зона задержки роста вокруг диска с бацитрацином 0,04 ЕД/диск означает, что данная культура подозрительна на *S. pyogenes*. Если зона задержки роста отсутствует, культура относится к бета-гемолитическим стрептококкам других видов (серологических групп).

Так как некоторые штаммы бета-гемолитических стрептококков группы С и G могут давать ложноположительные реакции, тест с бацитрацином мы проводили параллельно с тестом по определению чувствительности данной культуры стрептококка к триметоприм/сульфаметоксазолу (1,25/23,75 мкг/диск), что увеличивает достоверность результатов теста с бацитрацином, поскольку абсолютное большинство штаммов *S. pyogenes* чувствительны к бацитрацину, а стрептококков групп С и G — к смеси сульфаметоксазола и триметоприма.

На одну чашку, засеянную испытуемой культурой, помещали диск с бацитрацином 0,04 ЕД/диск и диск с триметоприм/сульфаметоксазолом 1,25/53,75 мкг/диск. Любая видимая зона задержки роста вокруг дисков интерпретировалась как чувствительность к этим антимикробным препаратам [2].

Для окончательной идентификации *S. pyogenes* использовали: стандартные биохимические тесты; посев на агар с кристаллвиолетом (селективная среда для выделения стрептококков); тест на каталазу, так как на среде с кристаллвиолетом могут расти каталазоположительные стафилококки; группоспецифическую диагностическую сыворотку к стрептококку группы А, автоматический анализатор ВИТЕК 2.

Для выявления *emm*-гена, кодирующего М протеин, из чистой культуры *S. pyogenes* вначале выделяли ДНК методом кипячения (полную бактериальную петлю суточной культуры добавляли в 200 мл лизирующего раствора и кипятили на водяной бане 10 мин.). Далее полученный клеточный дебрис осаждали ультрацентрифугированием (15 000 оборотов/мин, 10 мин) и образовавшийся супернатант использовали для постановки ПЦР.

Для выявления *emm*-гена проводили ПЦР согласно протоколу CDC (http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emm-type.htm). При этом использовали следующие нуклеотидные последовательности праймеров:

прямой — 5'-ТТАТТ(С/Г)GCT-TAGAAAАТТАА-3', обратный —
5'-GCAAGTTCTTTCAGCTTGTТТ-3'.

Объем ПЦР-смеси брали равный 50 мкл (40 мкл реагентов + 10 мкл исследуемой ДНК) и, исходя из этого, рассчитывали необходимые количества всех реагентов для проведения ПЦР. Таким образом, dNTP (смесь dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (2 mM) и Taq-буфер (состоящий из (NH₄)₂SO₄, но не содержащий MgCl₂) брали в объеме 5 мкл, MgCl₂ — 3 мкл (2,5 mM), Taq ДНК-полимеразу — 0,25 мкл (2 ед.), каждого праймера — 10 пмоль (объем, который необходимо взять, рассчитывали в зависимости от первоначальной концентрации праймеров), объем доводили до 40 мкл бидистиллированной водой и добавляли 10 мкл ДНК исследуемого штамма.

Программировали термоциклер (PTC 100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc.) в соответствии с тем, какой ген идентифицировали.

Результаты реакций учитывали путем горизонтального гель-электрофореза (100 мА, 200 В) реакционной смеси в 2 % агарозном геле с добавлением бромида этидия и последующим просмотром в УФ-свете. Амплифицированные фрагменты ДНК идентифицировали по размеру.

Результаты и обсуждение. Нами было проведено исследование 40 штаммов *S. pyogenes*, выделенных от пациентов с различными гнойно-воспалительными заболеваниями из разных районов г. Минска. В преобладающем большинстве случаев это были пациенты с заболеваниями верхних дыхательных путей. Культуры *S. pyogenes*, проанализированные нами в данном исследовании, были получены из отделения клинической микробиологии микробиологической лаборатории ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии».

Предварительно все штаммы, взятые в исследование, были идентифицированы как *S. pyogenes* указанными ранее методами.

Все 40 исследованных штаммов (100 %) дали положительный ответ при постановке ПЦР для идентификации *emm*-гена.

Так как последовательность аминокислот в М-белке является видоспецифической, а проводимая нами ПЦР является высоко специфической и чувствительной и не дает ложноположительных и ложноотрицательных реакций, ПЦР для идентификации *emm*-гена можно использовать в практическом здравоохранении для ранней диагностики инфекций, вызванных *S. pyogenes*, а также для выявления носителей. Для получения ответа требуется всего лишь несколько часов и не требуется выделения чистой культуры возбудителя из материала, взятого от больного.

Предлагаемый метод довольно прост в исполнении и может использоваться в любой лаборатории, оснащенной специальным оборудованием для проведения полимеразной цепной реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский, В. Стрептококки и стрептококкозы / В. Покровский, Н. Брико, Л. Ряпис. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2006. 546 с.

2. *Streptococcus pyogenes* : характеристика микроорганизма, выделение, идентификация и определение чувствительности к антибактериальным препаратам / К. В. Шпынев [и др.] // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2007. Т. 9. № 2. С. 104–119.

Актуальные проблемы микробиологии, вирусологии, иммунологии: материалы
научно-практической конференции
Минск, 19 октября 2018

3. *Cunningham, M. W.* Pathogenesis of group A streptococcal infections / M. W. Cunningham // Clin. Microbiol. Rev. 2000. Vol. 13. № 3. P. 470–511.

4. *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.

Репозиторий БГМУ