

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ В

ДМИТРИЕВ А.В.

За последние десятилетия отмечено широкое распространение штаммов *Streptococcus agalactiae* (стрептококки группы В, СГВ). Инфекции, вызываемые СГВ, оказались наиболее актуальными в перинатологии, в патологии беременности, плода и новорожденных. В настоящее время общепризнано, что СГВ приводят к отставанию плода в росте и развитии, к преждевременным и затяжным родам и выкидышам, а также вызывают серьезные заболевания у взрослых (пиелонефрит, цистит, артрит, офтальмит, мастит, эндокардит, остеомиелит, инвазивные инфекции). Известно, что СГВ также актуальны для ветеринарии, вызывая маститы у коров; они часто обнаруживаются в коровьем молоке [51] и, тем самым, наносят выраженный экономический ущерб молочным фермам и хозяйствам.

Принимая во внимание актуальность СГВ заболеваний для здравоохранения и ветеринарии, первоочередной задачей следует считать совершенствование лабораторной базы, практики и технологии идентификации и диагностики штаммов СГВ в целях молекулярной эпидемиологии.

Традиционными для дифференцировки штаммов стрептококка группы В являются методы определения серологического типа полисахаридной капсулы (Ia, Ib, II-IX) и ряда белковых антигенов СГВ. Тем не менее, они не лишены многих недостатков. Например, уровни экспрессии антигенов СГВ могут существенно отличаться у разных штаммов; при этом, их количество может оказаться крайне недостаточным для иммунодиагностики [8], [34], [63]. Многие штаммы СГВ не типизируются по полисахаридному антигену [33], [60]. Кроме того, результаты серотипирования не всегда бывают достаточно информативны для эпидемиологического анализа, поскольку известные в настоящее время десять серотипов СГВ едва ли отражают или исчерпывают весь спектр эпидемиологически актуальных клонов. Учитывая, что серотипирование является трудоемким и дорогим методом, характеристика штамма - возбудителя заболевания должна основываться на использовании подходов, выявляющих генетические особенности микроорганизма - так называемых молекулярных методов анализа.

Молекулярные методы анализа штаммов обладают многими достоинствами. Во-первых, они более чувствительны по сравнению с серотипированием. Во-вторых, они принимают во внимание разнообразные генетически детерминированные признаки, которые легко выявляются и не зависят от приёмов и условий культивирования. При этом, значительная консервативность общей

организации генома СГВ с одной стороны, и его подверженность рекомбинационным событиям с другой, являются основой для идентификации и дифференцировки штаммов. Большим достоинством молекулярно-генетических методов является возможность создания различных баз данных, принципиально важных для быстрого и эффективного контроля за распространенностью эпидемически актуальных клонов СГВ, возбудителей заболеваний.

#### ***ПЦР-анализ с использованием «случайных» праймеров***

Одним из методов молекулярно-эпидемиологического маркирования микроорганизмов является ПЦР-анализ с использованием «случайных» праймеров (randomly amplified polymorphic DNA assay, RAPD). Он основан на применении коротких праймеров длиной в 9-10 нуклеотидных пар, гибридизующихся с гомологичными участками хромосомной ДНК при невысокой температуре отжига. Суть этого метода заключается в том, что одна и та же последовательность нуклеотидов выполняет функции как прямого, так и обратного праймера. Если две гомологичные последовательности локализованы на разных цепях ДНК, но при этом располагаются достаточно близко друг к другу, то ПЦР может вызвать амплификацию всего фрагмента ДНК. Число и расположение гомологичных участков хромосомной ДНК могут варьировать у разных штаммов одного и того же вида, что приводит к различиям в размерах и количестве амплифицируемых фрагментов ДНК. Именно эти различия используются для эпидемиологического маркирования изучаемых штаммов.

Сравнительный анализ 223 изолятов СГВ, относящихся к семи серотипам, обнаружил 215 паттернов RAPD [60]. При этом, не удалось выявить высокой корреляции между паттерном RAPD и серотипом анализируемых штаммов [57], [60]. Исключение составили только штаммы серотипа V, которые оказались сгруппированными в один RAPD кластер [60]. По другим данным, несмотря на высокую гетерогенность паттернов RAPD, штаммы СГВ группировались в несколько генетических линий, и эти результаты коррелировали с данными по серотипированию, электрофорезу фрагментов рестрицированной ДНК в пульсирующем электрическом поле и с разными фенотипическими признаками [16], [30], [98]. Так, например, RAPD анализ позволил допустить существование генетического родства между штаммами серотипа V, устойчивыми к эритромицину [93], а также родство штаммов, выделенных из спинномозговой жидкости новорожденных [16]. Косвенным доказательством в пользу последнего допущения служат результаты анализа штаммов посредством методов пульс-электрофореза или риботипирования, которые также выявили сходные паттерны в отношении штаммов, выделенных из спинномозговой жидкости новорожденных [15], [69].

Выбор праймера - чрезвычайно важный критерий для эффективного использования метода RAPD. В зависимости от количества используемых праймеров и их последовательностей, «разрешающая способность» (index of discrimination, ID) этого метода может значительно варьировать [16], [56], [57], [60], [91], [98]. При этом, главной целью анализа обычно является достижение максимально возможного ID. Так, при комплексном анализе результатов использования метода с праймерами AP42, OPS11 и данных серотипирования штаммов ID достигал 0,97 [16]. При использовании независимых RAPD-тестов с праймерами OPS11, OPB17 и OPB18, ID возрастал до 0,9996, фактически достигнув максимально возможного значения [60].

В отдельных случаях RAPD позволяет обнаружить значимые маркеры СГВ. В частности, один из фрагментов RAPD размером в 2,4 т.п.н. и с уникальной нуклеотидной последовательностью, обнаруживался, как правило, в паттернах RAPD близкородственных инвазивных штаммов, что позволило рассматривать его в качестве филогенетически значимого маркера [70].

Несмотря на высокую «разрешающую способность» RAPD при анализе эпидемиологически несвязанных штаммов, метод может представить ценные данные для характеристики эпидемиологически взаимосвязанных штаммов СГВ. Согласно одним авторам, эпидемиологически взаимосвязанные изоляты СГВ, выделенные от матери и её ребенка, обнаруживают идентичные паттерны RAPD, что подтверждает ценность этого подхода для эпидемиологии [56]. По другим данным, изоляты СГВ, выделенные от младенцев и из грудного молока их матерей, и изученные с помощью праймера 5'-AGAGGGCACA-3', обнаружили похожие, но все же не идентичные паттерны [54]. Именно это обстоятельство может отрицательно сказаться на ценности метода RAPD в силу низкой специфичности реакции либо недостаточной воспроизводимости результатов.

Несмотря на высокую воспроизводимость результатов метода RAPD, отмеченную в ряде лабораторий [16], [98], остается крайне сложный сопоставление данных, полученных в разных лабораториях. Этому есть ряд объективных причин. Например, существенное влияние на результаты RAPD оказывает используемое в реакции количество ДНК [18], концентрация ионов магния, незначительные отклонения в температуре отжига ДНК и др. Поэтому, разработка единого протокола для анализа штаммов СГВ, анализируемых в различных лабораториях, является необходимым условием для его повсеместного использования и сопоставления получаемых данных. При этом низкая себестоимость, быстрота и простота проведения RAPD продолжают оставаться привлекательными сторонами метода для любой лаборатории мира.

### Метод фингерпринтирования

Метод фингерпринтирования СГВ заключается в гидролизе хромосомной ДНК штаммов рестрикционными эндонуклеазами, в сайтах которых содержание аденина и тимина (А+Т) выше, чем содержание гуанина и цитозина (Г+Ц). По причине невысокого содержания Г+Ц в геноме СГВ, составляющего 35,6-35,7% [36], [88], ожидаемое число рестрикционных фрагментов может достигать 100 и выше [37]. При этом предполагается, что сравнительный анализ рестрикционных паттернов позволит найти сходства и отличия между штаммами.

Так, сопоставление 54 штаммов СГВ обнаружило 28 паттернов *HindIII* рестрикции ДНК и, по сравнению с серотипированием, указало на более высокую «разрешающую способность» фингерпринтирования [19]. С другой стороны, некоторые изоляты, будучи выделенными в разных географических регионах, тем не менее обнаружили идентичные *HindIII* паттерны, что, по-видимому, должно указывать на их генетическое родство. Среди некоторых штаммов была установлена взаимосвязь между рестрикционным паттерном ДНК, серотипом и вызываемым заболеванием [64]. Так, более 50% штаммов СГВ, выделенных от больных менингитом, принадлежали к серотипу III, а большинство штаммов от больных септицемией - к подтипу Ia-3 серотипа Ia и подтипу III-3 серотипа III. При этом, рестрикционные паттерны штаммов, вызывающих септицемию, существенно отличались от таковых для штаммов, вызывающих менингит [64]. Эти данные допускают способность генетически различных линий СГВ проявлять патогенность и вызывать заболевания в областях различной локализации.

Несмотря на очевидное достоинство, например, невысокие затраты на реактивы и оборудование, метод генотипирования штаммов по рестрикционному профилю ДНК не лишен ряда недостатков. В частности, его использование подразумевает выделение из чистой культуры возбудителя хромосомной ДНК очень высокого качества. Кроме того, надо учитывать, что при получении 100 и более фрагментов ДНК, образованных такими рестриктазами как *HindIII*, *EcoRI*, *BglII* и другими [37], повышается вероятность ошибок в оценке числа и местоположения ДНК-фрагментов на электрофореграмме, как следствие трудности разделения и сопоставления большого числа фрагментов. Рестрикционные профили хромосомной ДНК различных штаммов могут различаться лишь по нескольким фрагментам, и зафиксировать эту разницу не всегда оказывается возможным [19].

Таким образом, метод фингерпринтирования представляет определенный интерес для научно-исследовательской работы, однако использование его для широкомасштабных эпидемиологических исследований представляется все же малоперспективным и трудоемким, о чем свидетельствуют всего лишь три публикации на данную тему [19], [37], [64].

### **Метод электрофореза в пульсирующем электрическом поле**

В качестве альтернативы классическому фингерпринтированию успешно используется метод электрофореза в пульсирующем электрическом поле (pulsed field gel electrophoresis, PFGE). Он состоит в гидролизе хромосомной ДНК рестриктазами *SmaI*, *NotI*, *SgrAI*, *SfiI* и другими, в рестрикционных сайтах которых высоко содержание гуанина и цитозина (Г+Ц), и в последующем разделении полученных фрагментов в агарозном геле под действием пульсирующего электрического поля. В результате образуются паттерны, состоящие из небольшого числа рестрикционных фрагментов ДНК, более доступных для сравнения и интерпретации, чем при фингерпринтировании. Несмотря на меньшее количество анализируемых фрагментов ДНК, метод PFGE является более действенным для выявления различий между штаммами СГВ [37].

В результате предпринятых исследований оптимальным для анализа оказался фермент *SmaI*, гидролизующий ДНК СГВ с образованием рестрикционных фрагментов, число которых обычно не превышает 14 [23]. Для интерпретации результатов PFGE были предложены разные подходы [83], [86]. Оптимальным оказался второй подход, согласно которому учитывается число фрагментов ДНК, различающих PFGE рестрикционные паттерны штаммов друг от друга [86]. Как показано, высокая гетерогенность *SmaI* фрагментов ДНК в пределах от 40 до 100 т.п.н. является характерной особенностью СГВ [69]. Поэтому, при сравнительном анализе штаммов СГВ наиболее информативными представляются данные о фрагментах ДНК, расположенных в указанной области, что удалось доказать при изучении коллекций штаммов СГВ, выделенных как в России, так и в Китае [23].

Анализ штаммов СГВ выявил высокую гетерогенность *SmaI* паттернов рестрикции ДНК. Например, во Франции среди 114 эпидемиологически несвязанных штаммов было выявлено 92 *SmaI* рестрикционных паттерна [69], в Японии среди 459 штаммов - 152 паттерна [85], среди 122 изолятов, выделенных в разных городах США - более 50 паттернов [20], среди 75 инвазивных штаммов, выделенных в Норвегии - 62 паттерна [76], а среди 123 изолятов из Малайзии - 48 паттернов [90].

Одной из причин значительного числа *SmaI* рестрикционных паттернов ДНК СГВ могут быть точечные мутации ДНК, приводящие к исчезновению или, наоборот, к появлению новых *SmaI* сайтов рестрикции и, как следствие, новых паттернов ДНК. Очевидно также, что паттерны рестрикции должны изменяться в результате приобретения штаммами различных мигрирующих генетических элементов, например, IS-элементов [38], [39], [71], [77], [84], транспозонов [35], [46] и бактериофагов [41], [72], [79], что может изменять число и размеры *SmaI* рестрикционных фрагментов.

Несмотря на высокую гетерогенность паттернов рестрикции ДНК СГВ в целом, многие штаммы серотипов Ia и III имеют сходные паттерны рестрикции, паттерны RAPD и паттерны ДНК-ДНК гибридизации [60]. По-видимому, это указывает на более близкое генетическое родство штаммов типов Ia и III по сравнению со штаммами других серотипов. Данное предположение косвенно подтверждается также и тем, что гены, кодирующие синтез капсульных полисахаридов типов Ia и III, являются почти идентичными [14]. За исключением серотипов Ia и III, штаммы других серотипов характеризуются паттернами рестрикции, свойственными только определенному типу [20].

Метод PFGE часто используется для мониторинга за появлением новых вирулентных клонов и эпидемически значимых штаммов СГВ. Так, например, в 1998 г. в США отмечалось резкое увеличение числа заболеваний, вызванных штаммами СГВ серотипа V [31]. В результате PFGE анализа было установлено, что 53% штаммов обладали сходными паттернами рестрикции хромосомной ДНК, что указывало на их генетическое родство, а сам клон оказался эпидемически актуальным. Во Франции анализ 64 штаммов того же серотипа V выявил 11 паттернов ДНК при PFGE [89]. При этом, один из паттернов оказался характерным для 60% штаммов и идентичным паттернам эпидемически значимых клонов, выделенных как в США, так и в Аргентине [31], [89]. Эти данные служат генетическим доказательством существования филогенетического родства между клонами-возбудителями, выделенными в весьма отдаленных друг от друга географических регионах мира. Кроме того, большинство штаммов типа V обладали устойчивостью к эритромицину [20] и характеризовались сходными рестрикционными паттернами [93].

Метод PFGE нашел свое применение при исследовании серологически нетипируемых штаммов. Было показано, что ряд нетипируемых штаммов имеют PFGE паттерны, характерные для штаммов серотипа V [5], [33], [68]. При этом, большинство нетипируемых штаммов характеризовалось сходными MLST типами и наличием генов, кодирующих синтез полисахаридной капсулы типа V [68]. Использование концентрированных солянокислых экстрактов типового капсульного полисахарида этих штаммов подтвердило принадлежность многих из них к серотипу V, а причина их нетипируемости заключалась в недостаточной экспрессии капсульного полисахарида [33].

Использование PFGE позволяет не только охарактеризовать каждый отдельный штамм СГВ, но и дифференцировать штаммы, принадлежащие к конкретному серологическому типу, на отдельные генетические линии. В основном это касается штаммов серотипов Ia, II и IV, наиболее гетерогенных по данным пульс-электрофореза. В то же время, наиболее гомогенными оказались штаммы серотипов Ib, III и V [76]. Однако по данным авторов, изучающих штаммы из других географических регионов, среди изолятов серотипа III также могли обнаруживаться различные генетические линии [9],

[48], [69]. Одна из них была представлена штаммами типа III, выделенными из спинномозговой жидкости новорожденных, больных менингитом. При этом 69% штаммов, выделенных из спинномозговой жидкости, и лишь 1,8% - от носителей, содержали в PFGE паттерне ДНК один и тот же *SmaI* фрагмент размером 162 т.п.н. [69]. Эти данные позволяют выдвинуть предположение, что лишь отдельные клоны СГВ способны поражать ЦНС новорожденных, а *SmaI* фрагмент размером 162 т.п.н. является, по-видимому, генетическим маркером штаммов, способных вызывать менингит. По данным других авторов, дифференцирующим признаком штаммов серотипа III, вызывающих менингит, является наличие *SmaI* фрагмента в 15 т.п.н. [9], что, возможно, определяется коллекцией исследуемых штаммов. Полученные результаты согласуются с многочисленными данными других авторов, согласно которым наибольшей инвазивностью обладают штаммы типа III, характеризующиеся сходными паттернами, отличающими их от штаммов других серологических типов [32], [64], [66].

Следует подчеркнуть, что метод PFGE позволяет выявить сходство у эпидемически взаимосвязанных пар штаммов, выделенных от матерей и новорожденных [7], [90] либо штаммов, выделенных от коров и работников скотоводческих хозяйств [65]. Последние характеризовались не только сходными паттернами рестрикции, но и сходными риботипами, и MLST типами [65], что свидетельствует о возможности отдельных генетических линий СГВ вызывать заболевания как у людей, так и у крупного рогатого скота.

Недавно была показана возможность сокращения продолжительности анализа PFGE до 3-х дней [6], что может повысить эффективность и масштабность использования этого метода в интересах молекулярно-эпидемиологической диагностики. Что касается использования PFGE для решения научных задач, то его полезность в этой области не вызывает сомнений.

Этот подход находит большое применение при быстром картировании генома и локализации генов на хромосоме СГВ. Так, с его использованием было установлено, что гены  $\alpha$  и  $\beta$  антигенов, ранее считавшиеся формами одного и того же белка, расположены на различных участках генома [82]. Были получены данные о размерах геномов 47 штаммов СГВ, выделенных от человека, и 35 штаммов, выделенных от животных, с локализацией на геноме ряда генов патогенности и генов «домашнего хозяйства» [23], [27], [29], что позволило установить консервативность организации генома СГВ. Кроме того, с помощью PFGE удалось выявить один из «островков» патогенности, содержащий гены вирулентности *scpB* и *lmb* [24], что впоследствии было подтверждено результатами полного секвенирования генома СГВ [36], [88].

В перспективе крайне необходимо создание единой базы данных рестрикционных паттернов ДНК СГВ, что позволит сравнивать штаммы, выделенные в разных регионах и в различные отрезки времени, а также вести мониторинг за циркуляцией эпидемически значимых штаммов СГВ.

### **Риботипирование СГВ**

Одним из молекулярных методов, позволяющих уменьшить число анализируемых фрагментов ДНК у сопоставляемых штаммов, является риботипирование. Он основан на выявлении рестрикционного полиморфизма нуклеотидных последовательностей рибосомальных оперонов и возможных различий в их числе и локализации на хромосоме. С этой целью продукты гидролиза хромосомной ДНК разделяют методом электрофореза в агарозном геле и гибридизуют с ДНК-зондами на один или ряд генов, кодирующих 16S, 23S и 5S рибосомальные РНК (гены *rrs*, *rrl* и *rrf*, соответственно), либо с зондами на их межгенные области. Этот метод может применяться как для установления видовой принадлежности штаммов, так и их внутривидовой дифференцировки. Применительно к стрептококкам, риботипирование позволяет дифференцировать штаммы в пределах вида, а также различать близкородственные и похожие по свойствам виды и идентифицировать новые подвиды [73], [94].

Одна из первых публикаций по риботипированию СГВ была посвящена сравнительному анализу «парных» изолятов, выделенных из молока матерей и от новорожденных. Было показано, что «парные» изоляты идентичны по серотипу и риботипу, что явилось одним из первых косвенных генетических свидетельств возможности заражения ребенка через материнское молоко [10]. Следует также отметить, что штаммы, выделенные из цервикального канала и влагалища рожениц, оказались генетически идентичными штаммам СГВ, выделенным из носоглотки, ушных раковин и пупочной культы новорожденных [6], [61]. В совокупности эти сведения полностью подтвердили предположение о том, что инфицирование новорожденных происходит не только внутриутробно через пораженную плаценту, но и в процессе родов и грудного вскармливания.

На основании обнаружения сходств и различий в рибосомальных паттернах, штаммы СГВ группируются в филогенетические кластеры. Например, риботипирование 114 эпидемически неродственных штаммов показало, что они группируются в 5 генетических кластеров, что согласуется с данными о существовании различных генетических линий среди СГВ [42], [60]. Для части анализируемых штаммов была обнаружена корреляция между серотипами и риботипами. При этом, большинство штаммов серотипа Ia оказалось в одном кластере, а серотипа Ib - в другом. По другим данным, наибольшая гетерогенность свойственна штаммам серотипа II, относящимся к разным риботипам [21]. По результатам риботипирования штаммы типа III также оказались в различных кластерах, однако 95% высоковирулентных инвазивных штаммов серотипа III, выделенных из спинномозговой жидкости новорожденных, входили в один кластер и были, по-видимому, генетически однородными. Тем не менее, даже эти близкородственные штаммы оказалось возможным дифференцировать методом риботипирования с использованием рестриктаз *HindIII*, *PstI* и *CfoI* [15].

Несмотря на то, что на сегодня ни одной группе исследователей не удалось выявить четкую корреляцию между риботипами и серотипами СГВ [1], [10], [12], [15], [21], [23], [47], [49], [65], [80], комплексный анализ штаммов СГВ с использованием обоих диагностических подходов позволил увеличить ID («разрешающую способность») и показать их эффективность при сочетании в эпидемиологическом исследовании [23], [47], [49].

В зависимости от фермента, используемого для гидролиза микробной ДНК, «разрешающая способность» риботипирования может значительно варьировать. По некоторым данным, из 24 использованных эндонуклеаз оптимальным оказался фермент *HhaI* [12], [49], при котором образовывалось гораздо меньшее число трудно разделяемых высокомолекулярных фрагментов ДНК, чем при использовании других эндонуклеаз. В других работах, наибольшее значение ID отмечали при использовании фермента *PstI* [47]. Так, в работе французских исследователей среди 111 штаммов СГВ было выявлено 35 *PstI* риботипов, при этом более половины всех штаммов принадлежало лишь к семи риботипам [47]. В американских исследованиях наименьший ID обнаруживался при использовании фермента *EcoRI* [21], [80], тогда как в совместных российско-китайских работах фермент *EcoRI* обнаружил максимальный ID [1], [23]. По-видимому, в известной мере этот показатель зависит от географического региона циркуляции штаммов.

При сравнении с другими подходами, применяемыми для установления степени генетического родства штаммов, риботипирование обнаружило хорошую корреляцию. Так например, штаммы СГВ, выделяемые в Бразилии от людей и коров и характеризующиеся сходными паттернами рестрикции и MLST типами, имели идентичные риботипы при использовании рестриктаз *EcoRI*, *HindIII* и *ClaI* [65]. Кроме того, штаммы, содержащие гены вирулентности *bac*, *bca*, *scpB*, *lmb*, имели сходные *EcoRI*, *HindIII* и *PvuII* рибосомальные типы [1], [23].

Существование штаммов, выделенных от животных и от людей, характеризующихся идентичными риботипами [21], [28], [65], может, по-видимому, свидетельствовать в пользу возможности передачи штаммов СГВ от одного хозяина к другому, несмотря на то, что экспериментальные доказательства такой передачи пока еще не описаны. Следует отметить, что, несмотря на высокий ID, который может быть достигнут при риботипировании, этот метод крайне редко применяется в эпидемиологии СГВ, а результаты, полученные разными исследователями, часто бывают противоречивыми. Причиной этого является использование различных ферментов для гидролиза ДНК штаммов и различных фрагментов рибосомального оперона в качестве ДНК-зондов [1], [10], [12], [23], [47], [49], [65]. Таким образом, на стандартизацию условий, включая выбор рестриктазы, ДНК-зонда и др. следует обратить внимание при сравнительном анализе штаммов СГВ.

### ***Мультилокусное типирование стрептококков группы В***

Одним из наиболее признанных в настоящее время методов молекулярной эпидемиологии является метод мультилокусного типирования (MLST). Он заключается в определении нуклеотидных последовательностей наиболее гетерогенных фрагментов бактериальной ДНК, которые, тем не менее, должны присутствовать у всех штаммов вида. В настоящее время существует база данных MLST (<http://www.mlst.net>), позволяющая осуществлять эпидемиологический мониторинг штаммов различных патогенных микроорганизмов, выделенных в различные периоды времени и в разных регионах.

Для СГВ в качестве маркерных генов выбраны 7 генов [50]. Для сравнительного анализа штаммов определенные фрагменты этих генов (размерами от 459 до 519 п.н.) амплифицируют методом ПЦР и секвенируют. На основании нуклеотидной последовательности каждого из перечисленных генов определяется его аллель, а суммарный набор аллелей 7 генов для каждого из штаммов характеризует его мультилокусный тип (MLST тип или ST- sequence type). В настоящее время для штаммов СГВ обнаружено более 500 MLST типов, а суммарные данные приведены в базе данных [http:// pubmlst.org/sagalactiae](http://pubmlst.org/sagalactiae).

Так, например, среди 152 эпидемиологически неродственных изолятов СГВ, выделенных в различных частях света и впервые охарактеризованных с помощью MLST, было обнаружено 29 типов. 14 MLST типов оказались столь уникальными, что для каждого из них был обнаружен лишь один изолят. В то же время четыре MLST типа (ST-1, ST-17, ST-19, ST-23) были характерны для 101 из 152 изолятов (66,5%) [50]. Наиболее гомогенным оказался тип ST-17, все штаммы которого относились к серотипу III и были выделены при инвазивной патологии новорожденных в разных регионах мира [50], [55], [67]. Эти данные указывают на существование особой эволюционной линии СГВ серотипа III, вызывающей инвазивные заболевания новорожденных, что подтверждается и данными других авторов [62], [69]. Штаммы типов ST-1 и ST-19 относились к разным серотипам и были, в основном, выделены от здоровых носителей. Большинство штаммов типа ST-23 относилось к серотипу Ia (68,6%), однако они выделялись как от носителей, так и от новорожденных с инвазивными инфекциями [50]. В то же время, в 100% случаев инвазивные штаммы типа ST-23 относились к серотипу Ia [55]. Штаммы наиболее часто встречающихся типов (ST-1, ST-17, ST-19, ST-23) были выделены в самых разных частях света, что свидетельствует о глобальном распространении этих клонов, по-видимому, в силу неизвестных пока еще селективных преимуществ, позволяющих им адаптироваться к организму человека [50], [55], [67].

В частности, широкая распространенность штаммов ST-1, ST-17, ST-19, ST-23 была обнаружена в Великобритании, где из 24 MLST типов, выявленных среди 83 изолятов СГВ, ST-17, ST-19, ST-23 и ST-1 оказались характерными для 14, 13, 12 и 11 изолятов, соответственно, что составило 60% от общего числа изученных штаммов [81].

Высокая распространенность штаммов ST-19, ST-17, ST-1, ST-23 и ST-9 отмечена и в Швеции [58]. Среди 158 инвазивных штаммов, выделенных от взрослых и новорожденных, выявлено 29 MLST типов; при этом 104 штамма (66%) характеризовались пятью указанными ST типами. При построении дендрограммы 29 MLST типов, характеризующей степень генетического родства штаммов различных типов, последние группировались в несколько клонотипов, каждый из которых включал в себя несколько MLST типов. В результате, 156 из 158 штаммов были сгруппированы в 5 клонотипов (CC1, CC9, CC17, CC19, CC23), каждый из которых, в основном, был представлен ST типами ST-1, ST-9, ST-17, ST-19 и ST-23, соответственно. Сравнительный анализ выявил определенную степень корреляции между серотипами штаммов и их MLST типами. Так, все штаммы клонотипа CC17 и большинство штаммов клонотипа CC19 принадлежали серотипу III, что согласуется с данными и других авторов [11]. Интересно, что штаммы клонотипа CC17 ассоциировались с инвазивной патологией новорожденных и крайне редко выделялись от взрослых. Штаммы серотипа Ib, в основном, принадлежали к клонотипу CC9, что подтверждено и другими работами [68]. Штаммы серотипа V встречались в разных клонотипах, но, в основном, принадлежали клонотипу CC1 [58], [68]. В то же время, большинство штаммов ST-23 относилось к серотипу Ia [58].

Канадские авторы изучили коллекцию из 55 штаммов серотипа III, выделенных от женщин-носителей, и 28 штаммов, вызвавших инвазивные заболевания новорожденных в течение первых 7 дней жизни [17]. Среди этих 83 штаммов обнаружено 10 MLST типов, причем 73 штамма относились к MLST типам ST-17 (25 штаммов) и ST-19 (48 штаммов). Более того, 81 из 83 штаммов принадлежал к клонотипам CC17 (ST-17, ST-31, ST-32), CC19 (ST-19, ST-35, ST-36) и CC23 (ST-23, ST-33, ST-34), что подтверждает версию о существовании нескольких генетических линий среди СГВ серотипа III.

Довольно четкая корреляция прослеживается между принадлежностью штаммов СГВ к конкретному клонотипу (MLST типу) и наличием у них определенных мобильных генетических элементов. Так, все штаммы клонотипа CC19 содержали IS1548, а все штаммы клонотипа CC17 - интрон GBSi1 [58]. Более того, штаммы ST-19 (серотип III) содержали IS861, IS1548, IS1381, ISSag1, ISSag2; штаммы ST-17 (серотип III) - GBSi1, IS861, ISSag1, ISSag2; штаммы ST-23 (серотип III) - ISSag1, ISSag2; а штаммы ST-283 (серотип III) - IS1381, ISSag1, ISSag2 [48].

Четкая корреляция обнаруживалась также между принадлежностью штамма к конкретному MLST типу и наличием у него генов поверхностных белков, участвующих в формировании вирулентного фенотипа [81]. Так, все штаммы ST-1 имели ген *alp3*, штаммы ST-19 и ST-17 - ген *rib*, а большинство штаммов ST-23 - ген *alp1*. Ген *bac* встречался среди штаммов разных MLST типов (ST-6, ST-8÷10, ST-15), которые, тем не менее, группировались в один клонотип [81], что подтверждало принадлежность штаммов с геном *bac* к самостоятельной генетической линии.

MLST типы штаммов, выделенных от животных и от человека, в основном, отличались друг от друга [11], [65]. Так, из 46 MLST типов, обнаруженных среди 361 штамма, выделенных от животных и людей, 26 MLST типов оказались специфичными для штаммов человеческого, а 17 - для штаммов животного происхождения. Тем более примечательно то, что штаммы ST-2, ST-19 и ST-23 обнаруживались среди штаммов от обоих хозяев. Кроме того, штаммы ST-61÷64, ST-72÷76, ST-100 и некоторые другие, выделенные от животных и составляющие самостоятельный кластер, оказались близкородственными инвазивным штаммам ST-17, выделенным от людей [11]. Аналогично, штаммы ST-26 (серотип V) и ST-256 (серотип V) также оказались близкородственными [65], что свидетельствует в пользу обсужденной ранее гипотезы об обмене штаммами между различными хозяевами.

Сравнительный анализ результатов MLST типирования и результатов электрофореза в пульсирующем электрическом поле показал, что между ними прослеживается четкая корреляция. В то же время, согласно другим данным, штаммы СГВ со сходными паттернами рестрикции могут принадлежать совершенно разным MLST типам [65]. Это обстоятельство позволяет заключить, что MLST типирование может быть успешно использовано при анализе штаммов, проявляющих сходные паттерны при электрофорезе в пульсирующем электрическом поле.

В целом, MLST типирование представляется методически высоко информативным, простым и надежным, хотя и наиболее дорогим, подходом для эпидемиологического анализа СГВ. Учитывая, что себестоимость MLST типирования постоянно снижается по причине внедрения новых технологий и приборов в лабораторную практику, есть все основания предсказать большое будущее и широкое применение методу MLST типирования в эпидемиологии инфекционных заболеваний и, в частности, вызываемых патогенными стрептококками.

#### *Дифференцировка СГВ по наличию инсерционных последовательностей ДНК*

Инсерционные или встраивающиеся последовательности ДНК (IS-элементы) относят к мигрирующим генетическим элементам, участвующим в эволюции микроорганизмов, в частности, за счет вызываемых мутаций и влияния на экспрессию генов, в том числе, генов вирулентного фенотипа [39], [77].

После публикации полногеномных нуклеотидных последовательностей двух штаммов СГВ [36], [88] стало очевидным, что он содержит большое количество IS-элементов. Однако лишь некоторые из них (IS861, IS1548, IS1381, ISSa4) изучены подробнее остальных [38], [39], [53], [71], [77], [84]. Каждый из IS-элементов может присутствовать в геноме в нескольких копиях, и для многих из них установлены так называемые «горячие точки» интеграции в бактериальный геном [59]. Это положение справедливо и для IS-элементов СГВ, штаммы которых могут содержать различное число копий одного и того же IS-элемента, которые располагаются в разных участках генома [36, 88]. Например, число копий IS1548 в геноме штаммов СГВ может достигать восьми и более [2, 39], IS861 - девяти [2], IS1381 - девяти [84], ISSa4 - 15 и более [77]. В частности,

в разных штаммах СГВ копии *ISSa4* обнаруживаются в отдельных «островках» патогенности, в генах «домашнего хозяйства», в гене того или иного гипотетического белка, в межгенных областях и многих других участках генома, а характерной особенностью сайтов интеграции является высокое содержание аденина и тимина (A+T), что позволяет расценивать такие области в качестве возможных «горячих точек» для интеграции *ISSa4* в геном СГВ [25].

При гибридизации гидролизованных фрагментов хромосомных ДНК разных штаммов СГВ с зондами на IS-элементы отмечается высокая степень гетерогенности паттернов гибридизации [2], [39], [84]. Так, «разрешающая способность» гибридизационного анализа с ДНК-зондом на *IS1381* могла достигать 0,99 [84]. При этом, большинство эпидемиологически связанных штаммов, выделенных от матери и ее ребенка, проявляло идентичные паттерны для *IS1381*, а также идентичные паттерны при RAPD-анализе. Эти данные указывают на ценность гибридизационного анализа с зондами на IS-элементы для нужд молекулярной эпидемиологии. Комплексный анализ паттернов гибридизации ДНК 84 штаммов СГВ с зондами на IS-элементы позволил выявить 6, 9, 13 и 38 рестрикционных паттернов ДНК, гибридизующихся с зондами на *IS1548*, *IS861*, *ISSa4* и *IS1381*, соответственно. При сравнительном анализе 84 штаммов удалось обнаружить 53 сочетания паттернов гибридизации с зондами на *IS861*, *ISSa4*, *IS1381* и *IS1548*, что позволило эффективно дифференцировать эпидемиологически неродственные штаммы СГВ [2].

К настоящему времени накоплено много сведений о распространенности IS-элементов в штаммах СГВ разных серотипов. Так, например, *IS1548* встречается, в основном, среди штаммов серотипов III и III/R, вызывающих эндокардиты [39]. С другой стороны, всего лишь 12-20% штаммов СГВ, выделенных от носителей, содержат в геноме этот IS элемент [39], [81]. *IS1381* был обнаружен у 64-77% эпидемиологически несвязанных штаммов, *ISSa4* - у 1-21% изученных штаммов, а интрон *GBS1* - у 67% инвазивных штаммов и лишь у 23% штаммов, выделенных от носителей [2], [9], [43], [77], [81], [84]. *IS861* относительно редко встречается у серотипа Ia (13% штаммов), но чаще - у штаммов серотипа Ib (58%) и, в основном, обнаруживается в штаммах серотипов II, II/R (84%) и III, III/R (81%) [2].

Анализ возможных сочетаний IS-элементов в штаммах СГВ выявил различные их комбинации и помог в идентификации ряда генетических линий. Эти данные вполне согласовывались с дифференцировкой штаммов по серотипам, MLST типам, рестрикционным паттернам и наличию генов поверхностных белков [43], [48], [81]. В частности, 94% штаммов с геном вирулентности *bac* содержали *IS1381* и *IS861* [52]. Кроме того, среди штаммов серотипа III удалось обнаружить несколько различных подтипов, характеризующихся специфическими комбинациями IS-элементов и генов поверхностных белков. Так, были обнаружены следующие сочетания IS-элементов: *IS861*, *IS1548*, *IS1381*, *ISSag1* и *ISSag2*; *GBS1*, *IS861*, *ISSag1* и *ISSag2*; *ISSag1* и *ISSag2*; *IS1381*, *ISSag1* и *ISSag2* [48].

В других работах удалось доказать, что штаммы, содержащие *ISSa4*, относятся к самостоятельной генетической линии. Действительно, все штаммы с *ISSa4* одновременно содержали *IS861* и *IS1381*, и не содержали *IS1548* или интрон *GBSi1* [2]. Все штаммы с *ISSa4* содержали также гены вирулентности *bca* и *bac*, кодирующие  $\alpha$  и  $\beta$  антигены, соответственно, и принадлежали серотипу II, а их *SmaI* рестрикционные паттерны обнаружили высокое сходство [25]. Следует подчеркнуть, что к настоящему времени не обнаружены штаммы СГВ, одновременно содержащие *IS861*, *IS1548*, *IS1381*, *ISSag1*, *ISSag2*, *ISSa4* и *GBSi1* [2]; при этом, одновременное присутствие *IS1548* и *GBSi1* оказалось, как правило, взаимоисключающим [9], [26], [38], [48].

Штаммы, выделенные от животных, также оказались высоко гетерогенными по наличию IS-элементов. Так, среди 101 штамма, выделенного от коров, 26% содержали в геноме *IS1381*, 29% - *IS861*, 48% - *ISSa4*, 9% - *IS1548*, и, в целом, среди них обнаружено 10 различных сочетаний указанных IS элементов [75]. Анализ небольшой коллекции штаммов СГВ, выделенных от лошадей, показал, что по всем анализируемым признакам они сходны со штаммами, выделенными от людей [95]. В частности, все они содержали в геноме *ISSag2*, и при этом все штаммы, относящиеся к серотипу III/R, дополнительно содержали *IS1548*.

Сравнительный анализ штаммов от человека и коров обнаружил 12 различных генетических вариантов по присутствию тех или иных комбинаций IS-элементов *IS1381*, *IS1548*, *ISSa4* и *IS861*. При этом, лишь четыре из 12 вариантов встречались у штаммов, выделенных от обоих хозяев [2]. Так, вариант, характеризующийся присутствием в геноме только *ISSa4*, был обнаружен у штаммов, выделенных от коров (23% штаммов), но не встречался среди штаммов, выделенных от человека. В то же время генетические варианты *IS861<sup>+</sup> IS1381<sup>+</sup> ISSa4<sup>+</sup> IS1548<sup>-</sup>* и *IS861<sup>+</sup> IS1381<sup>+</sup> IS1548<sup>+</sup> ISSa4<sup>-</sup>*, характерные для 30% штаммов от человека, не обнаруживали у штаммов животного происхождения [2], [75].

С учетом изложенного очевидно, что генетическое маркирование штаммов СГВ посредством зондов на IS-элементы может представлять значительный интерес для мониторинга за распространением эпидемиологически значимых штаммов СГВ в популяциях.

#### **Набор генов вирулентности - потенциальный генетический маркер штаммов СГВ**

После определения нуклеотидных последовательностей геномов СГВ было идентифицировано около 650 генов поверхностных и секретируемых белков, многие из которых существенны для формирования вирулентного фенотипа [36], [88]. Сравнительный анализ штаммов обнаружил, что большинство генов, кодирующих эти белки, входит в состав 15 областей

генома - «островков» патогенности, весьма неоднородных по своему составу. Например, «островок» XII содержит гены вирулентности *lmb* и *scpB*, «островок» IV - ген *alp2*, «островок» VI - оперон *cyl* и белки семейства LPXTG. Кроме генов вирулентности, в пределах «островков» обнаружены гены, обеспечивающие адаптацию микроба к неблагоприятным условиям среды («островки» I и XIV), и гены устойчивости к кислым значениям pH («островок» XIV). Наборы генов вирулентности, состав и структура «островков» патогенности существенно различаются у штаммов, выделенных от разных хозяев, и даже у штаммов одного и того же серотипа [36], [88]. В частности, ген *alp2* встречается лишь у некоторых штаммов серотипа III [81], а гены *scpB* и *lmb* присутствуют у 100% штаммов СГВ, выделенных от человека, и лишь у 20-21% штаммов от животных [24], [35].

На сегодня информация о распространенности генов патогенности и содержащих их «островков» систематизирована крайне недостаточно, что обуславливает необходимость детального сравнительного анализа большой коллекции штаммов СГВ. Как следствие, характеристика отдельно взятого штамма по генам патогенности и использование этих сведений для маркировки штаммов может представить большой интерес при сравнительном анализе клонов СГВ в эпидемиологических целях.

#### ***Дифференцировка штаммов СГВ методом multiplex-ПЦР***

Одним из направлений применения ПЦР в лабораторной диагностике является метод multiplex-ПЦР. Он состоит в одновременном использовании нескольких пар праймеров в одной реакции. Тем самым, при минимизации материальных затрат и без потери чувствительности метода ПЦР достигается получение значительно большего объема информации об определенных фрагментах бактериального генома у изучаемых штаммов. Учитывая, что геномы штаммов СГВ могут различаться по наличию генов вирулентности, «островков» патогенности и мигрирующих элементов, многие из которых влияют на экспрессию вирулентного фенотипа [36], [87], [88], для дифференцировки штаммов разработаны различные модификации multiplex-ПЦР. В частности, были предложены различные наборы праймеров на гены вирулентности *scpB*, *bac*, *bca* [24] или IS-элементы *ISSa4*, *IS861*, *IS1548*, *IS1381* [75]. Ожидаемые ПЦР-продукты отличались друг от друга по своим размерам, что позволяло легко разделять их в агарозном геле. В результате multiplex-ПЦР, в зависимости от наличия в штаммах искомым генов, соответствующих использованным праймерам, для каждого штамма мог быть получен характерный для него паттерн амплификации ДНК, что позволило отнести каждый из штаммов к конкретному генетическому варианту.

Еще одной разновидностью multiplex-ПЦР является использование нескольких пар праймеров, каждая из которых специфична для конкретного бактериального вида. Например, с использованием трех пар праймеров на видоспецифичные области гена *cpn60*, кодирующего стрессорный белок теплового шока GroEL, был предложен метод, позволяющий в одном образце изучаемого материала определить присутствие одного, двух или трех возбудителей мастита крупного рогатого скота: *Streptococcus agalactiae* (СГВ), *Streptococcus dysgalaciae* и *Streptococcus uberis* [22].

Метод multiplex-ПЦР достаточно прост для рутинных лабораторных исследований, однако он требует тщательности и пристального внимания на стадии планирования. На этой стадии необходим дизайн таких праймеров, которые бы не отжигались сами с собой или с другими праймерами, используемыми в реакционной смеси. В противном случае существует вероятность того, что некоторые из специфических продуктов в multiplex-ПЦР могут не образовываться. Поэтому, с увеличением числа новых маркерных генов, вводимых в реакцию, возрастает вероятность получения недостоверных результатов. Кроме того, температурный режим multiplex-ПЦР должен быть оптимален для всех используемых праймеров, а ПЦР продукты должны иметь различные размеры, легко идентифицируемые при электрофорезе. Исходя из этого, multiplex-ПЦР следует ограничивать использованием не более 5-6 пар праймеров на различные маркерные гены. Очевидно, что в число этих маркерных генов должны войти только те гены, которые присутствуют не во всех штаммах СГВ, что и позволит успешно их дифференцировать. При этом, вопрос о выборе таких генов должен решить сам исследователь, исходя из поставленной задачи.

#### ***Сравнительный анализ штаммов СГВ, выделяемых от человека и животных***

Несмотря на то, что штаммы СГВ достаточно хорошо изучены, четких критериев, указывающих на способности конкретных клонов вызывать заболевания как человека, так и животных, не существует.

Известно, что для штаммов СГВ, выделяемых от человека, как и для изолятов коровьего молока характерна гетерогенность их рестрикционных, PFGE, RAPD и IS паттернов, риботипов, MLST типов и других признаков. Однако можно привести немало примеров сходства генотипов штаммов СГВ, вызывающих патологию у обоих хозяев. В частности, сравнительный анализ коллекции штаммов от человека и животных, позволил установить, что лишь небольшая часть штаммов, выделенных от обоих хозяев, обладала сходными признаками, в частности, одинаковыми риботипами и сходными паттернами RAPD [28], [49], [60], [65]. Например, среди 17 обнаруженных *EcoRI* риботипов

СГВ, 13 встречались у штаммов, выделенных от животных, и лишь 4 риботипа - у штаммов, выделенных от обоих хозяев [80]. Аллели генов *sodA* и *hylB*, кодирующих супероксиддисмутазу и гиалуронидазу, были также, в целом, специфичны для штаммов от конкретного хозяина, однако отдельные аллели (*hyl-6.0*, *sod-1.0* и некоторые другие) встречались у штаммов от обоих хозяев [80].

Рестрикционные паттерны ДНК СГВ, выделенных от разных хозяев, проявляли сходство лишь у отдельных штаммов при анализе методом пульс-электрофореза [23], [29], [65]. Анализ на наличие IS-элементов (*IS861*, *IS1381*, *IS1548*, *ISSa4*) выявил, что из 12 сочетаний перечисленных IS-элементов лишь 4 комбинации повторяются у штаммов, выделенных от обоих хозяев [2], [75]. Анализ последовательности гена *sak0192*, кодирующего один из гипотетических белков, у 208 штаммов выявил 18 аллелей, из которых лишь 3 аллели встречались у штаммов обоого происхождения [3], [4]. Анализ на наличие генов вирулентности (*bca*, *bac*, *scpB*), кодирующих  $\alpha$ ,  $\beta$  антигены и С5а пептидазу, соответственно, выявил 6 различных генотипов СГВ, при этом лишь 2 из них (*bac<sup>-</sup> bca<sup>-</sup> scpB<sup>+</sup>* и *bac<sup>-</sup> bca<sup>+</sup> scpB<sup>+</sup>*) встречались у штаммов, выделенных от обоих хозяев [4], [24]. Гены *scpB* и *lmb*, кодирующие С5а пептидазу и белок, связывающий ламинин, и входящие в состав одного из 15 «островков» патогенности, обнаруживались у всех без исключения штаммов, выделенных от человека, и всего лишь у 20-21% штаммов, выделенных от животных [24], [35].

MLST типы штаммов СГВ, выделенных от животных, оказались, в основном, отличными от MLST типов штаммов, выделенных от человека [11], [65]. Вместе с тем, штаммы типов ST-17, ST-18 и ST-29, ассоциированные с инвазивными заболеваниями новорожденных и существенно отличающиеся от всех других штаммов, выделенных от человека, группировались в одном кластере с большим количеством других штаммов, выделенных от животных [11]. Аналогичные данные получены и при совместном анализе штаммов методами MLST и IS-типирования [44]. Именно эти данные позволили предположить, что именно клон-предшественник штаммов типов ST-17, ST-18 и ST-29 мог быть привнесен в популяцию людей от животных и оказался способным закрепиться в новой экологической нише [11], [44].

Очевидным является то, что лишь малая часть штаммов, выделенных от разных хозяев, обладает сходными признаками. Сходство характеристик таких штаммов может служить косвенным генетическим доказательством возможности обмена штаммами СГВ между человеком и животными. При этом, многие генетические признаки таких штаммов могли бы найти свое применение в качестве маркеров для эпидемиологического мониторинга возбудителей инфекционных заболеваний, выделяемых от разных хозяев.

### Альтернативные методы дифференцировки штаммов СГВ

Различные модификации хорошо зарекомендовавших себя методов позволяют разработать новые, более эффективные подходы. Так, недавно была предложена новая модификация метода multiplex-ПЦР, заключающаяся в гибридизации специфичных для СГВ ПЦР-продуктов с ДНК-зондами на конкретные гены, предварительно зафиксированные на нейлоновой мембране. Этот метод был разработан для выявления у штаммов СГВ специфичных наборов генов устойчивости к антибиотикам [97], генов поверхностных белков [96], [99], а также для определения серотипа [96]. Достоинствами этой модификации multiplex-ПЦР являются одновременный анализ большого числа штаммов СГВ и возможность многократного использования одной и той же мембраны после её несложной химической обработки.

Для изучения некоторых патогенных микроорганизмов рода *Klebsiella*, *Salmonella* и других давно и эффективно используют фаготипирование. В частности, при эпидемических вспышках была успешно продемонстрирована целесообразность идентификации фаготипа для установления возможных эпидемиологических связей между изолятами [74]. Для патогенных СГВ ранее было установлено, что типирование набором из 24 бактериофагов позволяет дифференцировать 50-80% штаммов СГВ [79], а использование бактериофагов в терапевтических целях может быть применимо для элиминирования микробов из организма [13]. Несмотря на это, фаготипирование не используется для классификации патогенных СГВ, и к настоящему времени известны лишь отдельные работы, посвященные бактериофагам СГВ [13], [41], [72], [79]. Интересно, что ряд генов СГВ гомологичны фаговым генам других микроорганизмов, например, гену пирогенного экзотоксина С (SpeC) *S. pyogenes* [87], а их приобретение штаммами СГВ может приводить к появлению у микроба дополнительных патогенных свойств. По этой причине изучение бактериофагов СГВ представляет интерес для изучения его изменчивости и выявления возможных эпидемических связей между штаммами различного происхождения.

Недавно было обнаружено, что структурная организация одной из областей генома СГВ, условно названной геном *sak0192* гипотетического белка, обладает высокой степенью гетерогенности [3]. Последнее оказалось связанным с тем, что центральная область гена содержала варьирующее количество правильно чередующихся последовательностей размерами 16 п.н. и 44 п.н., названных по аналогии со структурами *Mycobacterium tuberculosis* и *Streptococcus pyogenes* [40], [45] прямыми повторами и спейсерами, соответственно. Количество прямых повторов у различных штаммов СГВ варьировало от 0 до 5, и их последовательности оказались, в основном,

идентичными, тогда как для спейсерных участков более характерной была выраженная гетерогенность, а их количество у разных штаммов составляло от 1 до 6. Эта особенность позволила дифференцировать штаммы СГВ на ряд генетических линий. Данные такой дифференцировки коррелировали с результатами, полученными с использованием других методов, что указывает на информативность этого подхода для целей молекулярной эпидемиологии.

С тех пор, как в последнее десятилетие XX века началась эпоха секвенирования геномов не только микро-, но и макроорганизмов, вполне своевременными явились публикации о структуре, особенностях строения и составе геномов нескольких штаммов СГВ различных серотипов [36], [87], [88]. Данные сравнительного анализа выявили существование у СГВ «core»-генома, т.е., той его части, которая присутствует у всех штаммов и соответствует примерно 80% всего генома. Кроме этого, в составе генома СГВ присутствует «sub»-геном, т.е., та его часть, которая специфична для каждого конкретного штамма [87]. Именно данная переменная часть генома СГВ и представляет наибольший интерес для целей молекулярной диагностики и дифференцировки. Например, большинство инвазивных штаммов, выделенных из спинномозговой жидкости, содержат определенный набор генов, гомологичных фаговым генам, что отличает их от штаммов, выделенных от носителей [92]. На сегодня исследования «sub»-генома находятся лишь на начальной стадии, и требуется определенное время для того, чтобы их результаты были доведены до диагностической практики. Следует отметить, что внедрение новых подходов, например, таких как технология «microarray» с использованием биочипов, намного упрощает получение генетической информации и допускает масштабные исследования всего генома. Без сомнений, использование данного подхода для анализа «sub»-генома СГВ найдет свое применение в молекулярной эпидемиологии стрептококков группы В.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дмитриев А.В., Ну Y.Y., Shen A.D. и соавт, *Анализ клинических штаммов стрептококков группы В методами молекулярной генетики. Медицинский академический журнал*, 2002, 2 (2):18-27.
2. Дмитриев А.В., Shen A.D., Yang Y.H., Тотолян А.А., *Сравнительный анализ интегрированных последовательностей ДНК у штаммов стрептококков группы В*, Медицинский академический журнал, 2003, 3 (2):36-42.
3. Дмитриев А.В., Шен А.Д., Тотолян А.А., *Ген sak0192 Streptococcus agalactiae содержит прямые повторы и спейсеры - генетические маркеры для характеристики штаммов*, Мол. Ген. Микроб. Вирусол., 2007, 4, 37-41.

4. Рождественская А.С., Bhide M., Mikula I.Jr., Mikula I., Дмитриев А.В.: *Использование полиморфизма гена sak0192 Streptococcus agalactiae в качестве молекулярно-эпидемиологического маркера*, Журн. Микробиол. 2009 (принята к печати).
5. Amundson N.R., Flores A.E., Hillier S.L. et al., *DNA macrorestriction analysis of nontypeable group B streptococcal isolates: clonal evolution of nontypeable and type V isolates*, J. Clin. Microbiol, 2005, 43, 572-576.
6. Benson J.A., Ferrieri P., *Rapid pulsed-field gel electrophoresis method for group B streptococcus isolates*, J. Clin. Microb., 2001, 39, 3006-3008.
7. Benson K.D., Luchansky J.B., Elliott J.A. et al., *Pulsed-field fingerprinting of vaginal group B streptococcus in pregnancy*, Obstet. Gynecol., 2002, 100, 545-551.
8. Bevanger L., Brakstad O.G., Maeland J.A. et al., *Aberrations in expression of the antigen of Streptococcus agalactiae*, Adv. Exp. Med. Biol., 1997, 418, 999-1001.
9. Bidet P., Brahimi N., Chalas C. et al., *Molecular characterization of serotype III group B-streptococcus isolates causing neonatal meningitis*, J. Infect. Dis., 2003, 188, 1132-1137.
10. Bingen E., Denamur E., Lambert-Zechovsky N. et al., *Analysis of DNA restriction fragment polymorphism extends the evidence for breast milk transmission in Streptococcus agalactiae late-onset neonatal infection*, J. Infect. Dis., 1992, 165, 569-573.
11. Bisharat N., Crook D.W., Leigh J. et al., *Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor*, J. Clin. Microbiol, 2004, 42, 2161-2167.
12. Blumberg H.M., Stephens D.S., Licitra C. et al., *Molecular epidemiology of group B streptococcal infections: use of restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA and DNA restriction fragment length polymorphism of ribosomal RNA genes (ribotyping)*, J. Infect. Dis., 1992, 166, 574-579.
13. Brnakova Z., Farkasovska J., Godany A., *The use of bacteriophages in eliminating polyresistant strains of Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae*, Folia Microbiol., 2005, 50, 187-194.
14. Chaffin D.O., Beres S.B., Yim H.H., Rubens C.E., *The serotype of type Ia and III group B streptococci is determined by the polymerase gene within the polycistronic capsule operon*, J. Bacteriol., 2000, 182, 4466-4477.
15. Chatellier S., Huet H., Kenzi S. et al., *Genetic diversity of rRNA operons of unrelated Streptococcus agalactiae strains isolated from cerebrospinal fluid of neonates suffering from meningitis*, J. Clin. Microbiol, 1996, 34, 2741-2747.
16. Chatellier S., Ramanantsoa C., Harriau P. et al., *Characterization of Streptococcus agalactiae strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis*, J. Clin. Microbiol, 1997, 35, 2573-2579.
17. Davies H.D., Jones N., Whittam T.S. et al., *Multilocus sequence typing of serotype III group B streptococcus and correlation with pathogenic potential*, J. Infect. Dis., 2004, 189, 1097-1102.

18. Davin-Regli A., Abed Y., Charrel R.N., Bollet C., De Micco P.: *Variations in DNA concentrations significantly affects the reproducibility of RAPD fingerprint patterns*, Res. Microbiol, 1995, 146, 561-568.
19. Denning D.V., Bacer C.J., Troup N.J., Tompkins L.S., *Restriction endonucleases analysis of human and bovine group B streptococcus for epidemiologic study*, J. Clin. Microb., 1989, 27, 1352-1356.
20. Diekema D.J., Andrews J.I., Huynh H. et al., *Molecular epidemiology of macrolide resistance in neonatal bloodstream isolates of group B streptococci*, J. Clin. Microbiol, 2003, 41, 2659-2661.
21. Dogan B., Schukken Y.H., Santisteban C., Boor K.J., *Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among Streptococcus agalactiae isolates from bovine and human hosts*, J. Clin. Microbiol, 2005, 43, 5899-5906.
22. Dmitriev A., Bhide M., Mikula I., *Cpn60 gene based multiplex-PCR assay for simultaneous identification of streptococcal species*, Acta Vet. Brno, 2006, 75, 235-240.
23. Dmitriev A., Hu Y.Y., Shen A.D. et al., *Chromosomal analysis of group B streptococcal clinical strains; bac gene positive strains are genetically homogenous*, FEMS Microb. Lett., 2002, 208, 93-98.
24. Dmitriev A., Shakleina E., Tkacikova L. et al., *Genetic heterogeneity of the pathogenic potentials of human and bovine group B streptococci*, Folia Microbiol, 2002, 47, 291-295.
25. Dmitriev A., Shen A., Shen X., Yang Y., *ISSa4-based differentiation of Streptococcus agalactiae strains and identification of multiple target sites for ISSa4 insertions*, J. Bacteriol., 2004, 186, 1106-1109.
26. Dmitriev A., Shen A.D., Tkacikova L. et al., *Structure of scpB-lmb intergenic region as criterion for additional classification of human and bovine group B streptococci*, Acta Vet. Brno, 2004, 73, 215-220.
27. Dmitriev A.V., Suvorov A.N., Totolian A.A., *Physical and genetic chromosomal maps of Streptococcus agalactiae, serotypes II and III; rRNA operon organization*, FEMS Microbiol. Lett., 1998, 167, 33-39.
28. Dmitriev A., Tkacikova L., Suvorov A. et al., *Comparative genetic study of group B streptococcal strains of human and bovine origin*, Folia Microbiol, 1999, 44, 449-453.
29. Dmitriev A., Tkacikova L., Totolian A., Mikula, I., *Features of the genome structure of group B streptococci of bovine origin*, Folia Veterinaria, 2001, 45, 57-63.
30. Duarte R.S., Miranda O.P., Bellei B.C. et al., *Phenotypic and molecular characteristics of Streptococcus agalactiae isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil*, J. Clin. Microbiol, 2004, 42, 4214-4222.
31. Elliot J.A., Farmer K.D., Facklam R.R., *Sudden increase in isolation of group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulsed-field gel electrophoresis type*, J. Clin. Microbiol, 1998, 36, 2115-2116.
32. Ellis S., Kotiw M., Garland S.M., *Restriction endonuclease analysis of group B streptococcal isolates from two distinct geographical regions*, J. Hosp. Infect, 1996, 33, 279-287.

33. Ferrieri P., Cho D.S., Livdahl C. et al., *DNA restriction profiles of nontypable group B streptococcal clinical isolates*, Adv. Exp. Med. Biol., 1997, 418, 343-346
34. Flores A.E., Ferrieri P., *Molecular species of R-protein antigens produced by clinical isolates of group B streptococci*, J. Clin. Microbiol, 1989, 27, 1050 - 1054.
35. Franken C., Haase G., Brandt C. et al., *Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing scpB and lmb*, Mol. Microbiol, 2001, 41, 925-935.
36. Glaser P., Rusniok C., Buchrieser C. et al., *Genome sequence of Streptococcus agalactiae, a pathogen causing invasive neonatal disease*, Mol. Microbiol, 2002, 45, 1499-1513.
37. Gordillo M.E., Singh K.V., Baker C.J., Murray B.E., *Typing of group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis*, J. Clin. Microbiol, 1993, 31, 1430-1434.
38. Granlund M., Michel F., Norgren M., *Mutually exclusive distribution of IS1548 and GBSi1, an active group II intron identified in human isolates of group B streptococci*, J. Bacteriol, 2001, 183, 2560-2569.
39. Granlund M., Oberg L., Sellin M., Norgren M., *Identification of a novel insertion element, IS1548, in group B streptococci, predominantly in strains causing endocarditis*, J. Infect. Dis., 1998, 177, 967-976.
40. Groenen P.M.A., Bunschoten A.E., van Soolingen D., van Embden J.D.A., *Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method*, Mol. Microbiol, 1993, 10, 1057-1065.
41. Haug R.H., Hoiby E.A., Lermark G., *Serotyping and bacteriophage typing of group B streptococci*, NIPH Ann. (Norway), 1983, 6, 119-123.
42. Hauge M., Jespersgaard C., Poulsen K., Kilian, M., *Population structure of Streptococcus agalactiae reveals an association between specific evolutionary lineages and putative virulence factors but not disease*, Infect. Immun., 1996, 64, 919-925.
43. Héry-Arnaud G., Bruant G., Lanotte P. et al., *Acquisition of insertion sequences and the GBSi1 intron by Streptococcus agalactiae isolates correlates with the evolution of the species*, J. Bacteriol, 2005, 187, 6248-6252.
44. Héry-Arnaud G., Bruant G., Lanotte P., et al., *Mobile genetic elements provide evidence for a bovine origin of clonal complex 17 of Streptococcus agalactiae*, Appl. Environ. Microbiol, 2007, 73, 4668-4672.
45. Hoe N., Nakashima K., Grigsby D. et al., *Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A Streptococcus strains*, Emerg. Infect. Dis., 1999, 5, 254-263.
46. Horaud T., de Cespedes G., Trieu-Cuot P., *Chromosomal gentamicin resistance transposon Tn3706 in Streptococcus agalactiae B128*, Antimicrob. Agents Chemother, 1996, 40, 1085-1090.
47. Huet H., Martin C., Geslin P. et al., *Ribotyping of Streptococcus agalactiae strains isolated from vaginas of asymptomatic women*, Res. Microbiol, 1993, 144, 457-465.

48. Ip M., Cheuk E.S.C., Tsui M.H.Y. et al., *Identification of a Streptococcus agalactiae serotype III subtype 4 clone in association with adult invasive disease in Hong Kong*, J. Clin. Microbiol, 2006, 44, 4252-4254.
49. Jensen N.E., Aarestrup F.M., *Epidemiological aspects of group B streptococci of bovine and human origin*, Epidemiol. Infect, 1996, 117, 417-422.
50. Jones N., Bohnsack J.F., Takahashi S. et al., *Multilocus sequence typing system for group B streptococcus*, J. Clin. Microbiol, 2003, 41, 2530-2536.
51. Keefe G.P., *Streptococcus agalactiae mastitis: a review*, Can. Vet. J., 1997, 38, 429-437.
52. Kong F., Gidding H.F., Berner R., Gilbert G.L., *Streptococcus agalactiae Cb protein gene (bac) sequence types, based on the repeated region of the cell-wall-spanning domain: relationship to virulence and a proposed standardized nomenclature*, J. Med. Microbiol, 2006, 55, 829-837.
53. Kong F., Gowan S., Martin D. et al., *Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes: relationship to molecular serotypes*, J. Clin. Microbiol, 2002, 40, 620-626.
54. Kotiw M., Zhang G.W., Daggard, G. et al., *Late-onset and recurrent neonatal Group B streptococcal disease associated with breast-milk transmission*, Pediatr. Dev. Pathol., 2003, 6, 251-256.
55. Lambertsen L., Smith B., Petersen M.E. et al., *Group B haemolytic streptococci: characterization of invasive isolates from newborns in Denmark 2003-2006*, Abstracts of XVII Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, 2008, 306.
56. Limansky A.S, Guardati M.C., Sutich E.G. et al., *Characterization of clinical isolates of Streptococcus agalactiae by random amplified polymorphic DNA using degenerate oligonucleotides*, Medicina (B Aires), 1995, 55, 681-684.
57. Limansky A.S., Sutich E.G., Guardati M.C. et al., *Genomic diversity among Streptococcus agalactiae isolates detected by a degenerate oligonucleotide-primed amplification assay*, J. Infect. Dis., 1998, 177, 1308-1313.
58. Luan S., Granlund M., Sellin M. et al., *Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B Streptococcus isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching*, J. Clin. Microbiol, 2005, 43, 3727-3733
59. Mahillon J., Chandler M., *Insertion sequences*, Microbiol. Mol. Biol. Rev, 1998, 62, 725-774.
60. Martinez G., Harel J., Higgins R. et al., *Characterization of Streptococcus agalactiae isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis*, J. Clin. Microbiol, 2000, 38, 71-78.
61. Melchers W.J., Bakkers J.M., Toonen M. et al., *Genetic analysis of Streptococcus agalactiae strains isolated from neonates and their mothers*. FEMS Immunol, Med. Microbiol, 2003, 36, 111-113.
62. Musser J. M., Mattingly S. J., Quentin R. et al., *Identification of a high-virulence clone of type III Streptococcus agalactiae (group B streptococcus) causing invasive neonatal disease*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 4731-4735.

63. Nagano N., Nagano Y., Nakano R. et al., *Genetic diversity of the C protein beta-antigen gene and its upstream regions within clonally related groups of type Ia and Ib group B streptococci*, Microbiology, 2006, 152, 771-778.
64. Nagano Y., Nagano N., Takahashi S. et al., *Restriction endonuclease digest patterns of chromosomal DNA from group B  $\beta$ -haemolytic streptococci*, J. Med. Microbiol, 1991, 35, 297-303.
65. Oliveira I.C.M., de Mattos M.C., Pinto T.A. et al., *Genetic relatedness between group B streptococci originating from bovine mastitis and a human group B streptococcus type V cluster displaying an identical pulsed-field gel electrophoresis pattern*, Clin. Microbiol. Infect., 2006, 12, 887-893.
66. Oguro H., *A study of group B streptococcus with special reference to the relationship between serological type and virulence*, J. Jap. Assoc. Infect. Dis., 1983, 58, 376-384.
67. Poyart C., Tazi A., Reglier-Poupet H. et al., *Clinical characteristics, serotypes, genotypes and antibiotic resistance of group B streptococci causing neonatal invasive infections in France in 2007*, Abstracts of XVII Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. 2008, 285.
68. Ramaswamy S.V., Ferrieri P., Flores A.E., Paoletti L.C., *Molecular characterization of nontypeable group B streptococcus.*, J. Clin. Microbiol, 2006, 44, 2398-2403.
69. Rolland K., Marois C., Siquier V. et al., *Genetic features of Streptococcus agalactiae strains causing severe neonatal infections, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis and hylB gene analysis*, J. Clin. Microbiol, 1999, 37, 1892-1898.
70. Rolland K., Mereghetti L., Watt S. et al., *tRNA gene clusters at the 3' end of rRNA operons are specific to virulent subgroups of Streptococcus agalactiae strains, as demonstrated by molecular differential analysis at the population level*, Microbiology, 2002, 148, 1493-1499.
71. Rubens C.E., Heggen L.M., Kuypers J.M., *IS861, a group B streptococcal insertion sequence related to IS150 and IS3 of Escherichia coli*, J. Bacteriol, 1989, 171, 5531-5535.
72. Russel H., Norcross N.L., Kahn D.E., *Isolation and characterization of Streptococcus agalactiae bacteriophage*, J. Gen. Virol, 1969, 5, 315-317.
73. Schnitzler N., Haase G., Podbielski A. et al., *Human isolates of large-colony-forming  $\beta$  hemolytic group G streptococci form a distinct clade upon 16S rRNA gene analysis*, Adv. Exp. Med. Biol., 1997, 418, 363-365.
74. Sechter I., Mestre F., Hansen D.S., *Twenty-three years of Klebsiella phage typing: a review of phage typing of 12 clusters of nosocomial infections, and a comparison of phage typing with K serotyping*, Clin. Microbiol. Infect., 2000, 6, 233-238.
75. Shakleina E., Dmitriev A., Tkacikova L. et al., *Presence of insertion sequences (IS elements) in group B streptococci of bovine origin*, Indian J. Med. Res., 2004, 119 (suppl.), 242-246.

76. Skjaervold N.K., Bergh K., Bevanger L., *Distribution of PFGE types of invasive Norwegian group B streptococci in relation to serotypes*, Indian J. Med. Res., 2004, 119, 201-204.
77. Spellerberg B., Martin S., Franken C. et al., *Identification of a novel insertion sequence element in Streptococcus agalactiae*, Gene, 2000, 241, 51-56.
78. Spellerberg B., Rozdzinski E., Martin S. et al., *Rgf encodes a novel two-component signal transduction system of Streptococcus agalactiae*, Infect. Immun., 2002, 70, 2434-2440.
79. Stringer J., *The development of a phage-typing system for group-B streptococci*, J. Med. Microbiol (England), 1980, 13, 133-143.
80. Sukhnanand S., Dogan B., Ayodele M.O., *Molecular subtyping and characterization of bovine and human Streptococcus agalactiae isolates*, J. Clin. Microbiol, 2005, 43, 1177-1186.
81. Sun Y., Kong F., Zhao Z., Gilbert G.L., *Comparison of a three-set genotyping system with multilocus sequence typing for Streptococcus agalactiae (group B streptococcus)*, J. Clin. Microbiol, 2005, 43, 4704-4707.
82. Suvorov A., Dmitriev A., Ustinovich I. et al., *Molecular analysis of clinical group B streptococcal strains by use of  $\alpha$  and  $\beta$  gene probes*, FEMS Immunol. Med. Microbiol, 1997, 17, 149-154.
83. Suvorov A.N., Ferretti J.J., *Heterogeneity of group A pathogenic streptococci. In: Pathogenic streptococci: Present and future*, (Totolian, A.A., Ed.) Lancer Publ., St. Petersburg, Russia, 1994, p.21-24.
84. Tamura G.S., Herndon M., Przekwas J. et al., *Analysis of restriction fragment length polymorphisms of the insertion sequence IS1381 in group B streptococci*, J. Infect. Dis., 2000, 181, 364-368.
85. Tanaka D., Gyobu Y., Kodama H., *Typing of group B streptococci by pulsed-field gel electrophoresis*, Kansenshogaku-Zasshi, 1995, 69, 455-460.
86. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V. et al., *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis; criteria for bacterial strain typing*, J. Clin. Microb., 1995, 33, 2233-2239.
87. Tettelin H., Masignani V., Cieslewicz M.J. et al., *Genome analysis of multiple pathogenic isolates of Streptococcus agalactiae: implications for the microbial "pan-genome"*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2005, 102, 13950-13955.
88. Tettelin H., Masignani V., Cieslewicz M.J. et al., *Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V Streptococcus agalactiae*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99, 12391-12396.
89. Thomas-Bories I., Fitoussi F., Mariani-Kurkdjian P. et al., *Clonal relationship between U.S. and French serotype V group B streptococcal isolates*, J. Clin. Microb., 2001, 39, 4526-4528.
90. Thong K.-L., Ling G.Y., Kong L.W. et al., *Macrorestriction analysis of Streptococcus agalactiae (group B Streptococcus) isolates from Malaysia*, J. Med. Microbiol, 2004, 53, 991-997.

91. Toresani I., Limansky A., Bogado I. et al., *Phenotypic and genotypic study of Streptococcus agalactiae in vagina of pregnant women in Argentina*, Medicina (B Aires), 2001, 61, 295-300.
92. van der Mee-Marquet, N., Domelier, A. S., Mereghetti, L. et al., *Prophagic DNA fragments in Streptococcus agalactiae strains in association with neonatal meningitis*, J. Clin. Microbiol, 2006, 44, 1049-1058.
93. von Both U., Ruess M., Mueller U. et al., *A serotype V clone is predominant among erythromycin-resistant Streptococcus agalactiae isolates in a southwestern region of Germany*, J. Clin. Microbiol, 2003, 41, 2166-2169.
94. Whiley R.A., Hall L.M.C., Hardie J.M., Beighton D., *Intra-specific diversity within Streptococcus anginosus*, Adv. Exp. Med. Biol., 1997, 418, 367-369.
95. Yildirim A.O., Lammler Ch., Weiss R., *Identification and characterization of Streptococcus agalactiae isolated from horses*. Vet. Microbiol, 2002, 85, 31-35
96. Zeng X., Kong F., Morgan J., Gilbert G.L., *Evaluation of a multiplex PCR-based reverse line blot-hybridization assay for identification of serotype and surface protein antigens of Streptococcus agalactiae*, J. Clin. Microbiol, 2006, 44, 3822-3825.
97. Zeng X., Kong F., Wang H. et al., *Simultaneous detection of nine antibiotic resistance-related genes in Streptococcus agalactiae using multiplex PCR and reverse line blot hybridization assay*, Antimicrob. Agents Chemother, 2006, 50, 204-209.
98. Zhang G.W., Kotiw M., Daggard G., *A RAPD-PCR genotyping assay which correlates with serotypes of group B streptococci*, Lett. Appl. Microbiol, 2002, 35, 247-250.
99. Zhao Z., Kong F., Gilbert G.L., *Reverse line blot assay for direct identification of seven Streptococcus agalactiae major surface protein antigen genes*, Clin. Vaccine Immunol, 2006, 13, 145-149.

## TÓM TẮT

### CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU PHÂN TỬ LIÊN CẦU KHUẨN NHÓM B

Liên cầu khuẩn nhóm B (*Streptococcus agalactiae*, LCK) có thể gây ảnh hưởng đến thai nhi, làm chậm sự tăng trưởng và phát triển của bào thai, gây đẻ non và sảy thai kéo dài. Đối với người lớn, LCK nhóm B gây một số bệnh nghiêm trọng: Viêm bể thận, viêm bàng quang, viêm khớp, viêm mắt, viêm vú, viêm nội tâm mạc, viêm tủy xương, nhiễm trùng xâm nhập. Ngoài ra, LCK nhóm B gây bệnh viêm vú ở bò, được tìm thấy trong sữa bò và gây thiệt hại về kinh tế. Do tính chất nghiêm trọng của LCK nhóm B đối với ngành y tế và thú y, cần phải hoàn thiện các trang thiết bị phòng thí nghiệm và hoàn thiện công nghệ để phát hiện và chẩn đoán LCK nhóm B trong lĩnh vực dịch tễ học phân tử.

Phương pháp truyền thống để phát hiện các chủng của LCK nhóm B là phương pháp xác định typ huyết thanh màng polysaccharide (Ia, Ib, II-IX) và một số kháng nguyên protein của LCK nhóm B. Tuy nhiên phương pháp này có nhiều nhược điểm như mức độ xác định nhanh kháng nguyên của các chủng LCK nhóm B (10 chủng) cũng khác nhau, hơn nữa kết quả phân tích typ huyết thanh không phải lúc nào cũng đủ lượng thông tin để phân tích về mặt dịch tễ học. Do phương pháp phân tích typ huyết thanh công phu và tốn kém, nên người ta sử dụng phương pháp phân tích di truyền phân tử để xác định đặc tính gen di truyền của vi khuẩn gây bệnh. Phương pháp phân tích phân tử (phân tích di truyền phân tử - ND) có nhiều ưu điểm: Độ nhạy cao hơn so với phương pháp xác định typ huyết thanh, xác định được các dấu hiệu trội về di truyền mà không phụ thuộc vào phương pháp và điều kiện nuôi cấy. Tính ưu việt nổi trội của phương pháp di truyền phân tử là khả năng tạo ra nhiều cơ sở dữ liệu khác nhau để có thể kiểm soát nhanh chóng và hiệu quả sự lây truyền của tác nhân gây bệnh.

Các phương pháp phân tích di truyền phân tử bao gồm: Phương pháp PCR sử dụng môi “ngẫu nhiên” (randomly amplified polymorphic DNA assay, RAPD) - Phương pháp này dựa trên việc sử dụng các môi ngắn với chiều dài của 9-10 cặp nucleotide lai tạo với các đoạn nhiễm sắc thể tương đồng ADN ở nhiệt độ ủ thấp. Bản chất của phương pháp này là một trình tự nucleotide có thể thực hiện chức năng của môi trực diện và môi ngược. Nếu hai trình tự tương đồng nằm trên 2 sợi ADN khác nhau, nhưng vị trí gần nhau, thì phản ứng PCR có thể khuếch đại cả đoạn ADN đó. Ngoài ra người ta còn sử dụng nhiều phương pháp phân tích di truyền phân tử khác nhau như phương pháp thủy phân ADN nhiễm sắc thể của LCK nhóm B, phương pháp điện di xung điện trường, chẩn đoán phân biệt chủng LCK nhóm B bằng phương pháp multiplex-PCR (sử dụng đồng thời vài cặp môi trong 1 phản ứng)... Trong thập niên cuối của thế kỷ XX, nhờ phương pháp giải trình tự gen (sequencing), người ta đã biết được cấu trúc và thành phần bộ gen của các chủng LCK nhóm B, giúp cho việc chẩn đoán và phòng chống nhiễm LCK nhóm B có hiệu quả hơn.

*Nhận bài ngày 10 tháng 6 năm 2013*

*Hoàn thiện ngày 20 tháng 6 năm 2013*

*Viện nghiên cứu Y học thực nghiệm - Viện Hàn lâm Y học Nga, St. Petersburg*