

МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНОДИАГНОСТИКИ СТРЕПТОКОККОВ ГРУПП C/G

METHOD FOR MOLECULAR GENEDIAGNOSTIC OF GROUP C/G STREPTOCOCCI

**I. Abashin
N. Kozyreva
A. Gorbatov
N. Avduevskaya**

Summary. In this mini-review we considered the applied method for identifying the emm-gene in streptococci of groups C and G isolated from cattle, based on polymerase chain reaction (PCR), is a fast and accurate method for diagnosing the pathogen. The technique is based on the uniqueness of the nucleotide sequence of the pathogen, which gives a high degree of specificity. The relevance of the developed method is justified by the lack of information about the exact properties of the M-like protein of streptococci encoded by the emm-gene, which is a cellular surface-anchored protein and which presumably causes resistance to phagocytosis. For veterinary medicine, this is a new approach, in particular, when working with group C and G streptococci in cattle.

Keywords: streptococci, molecular diagnostics, emm-gene, cattle, genediagnostic.

Абашин Илья Юрьевич

Аспирант

Федеральный научный центр-Всероссийский
научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина
и Я.П. Коваленко Российской академии наук
г. Москва

abashin.il@yandex.ru

Козырева Наталия Геннадиевна

Канд. биол. наук

Федеральный научный центр-Всероссийский
научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина
и Я.П. Коваленко Российской академии наук
г. Москва

nk07-73@rambler.ru

Горбатов Александр Вениаминович

Канд. ветеринар. наук

Федеральный научный центр-Всероссийский
научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина
и Я.П. Коваленко Российской академии наук
г. Москва

incidentor@yandex.ru

Авдеевская Наталья Николаевна

Соискатель

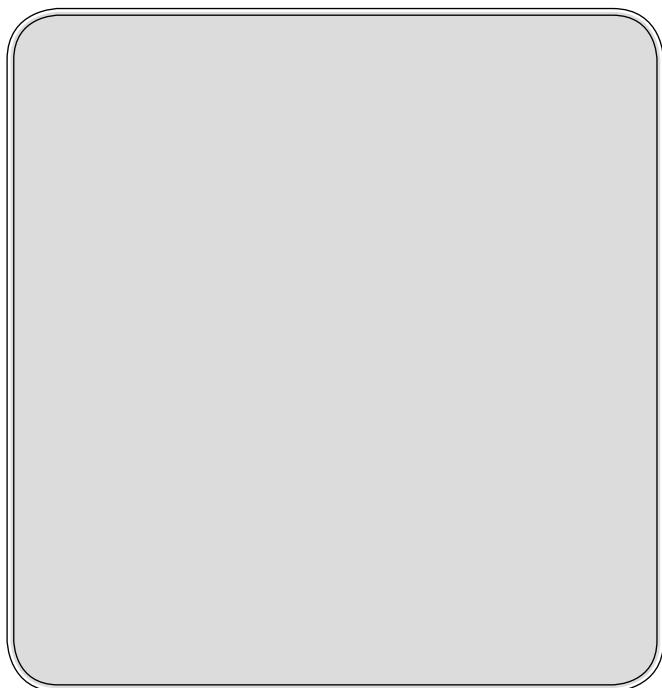
Вологодский филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН
г. Вологда

natali.avduevskaya@mail.ru

Аннотация. Стрептококкозы представляют широко распространённые заболевания, приносящие большое количество затрат в сфере сельского хозяйства, намного уменьшая прибыльность данной отрасли. Но не только снижается прибыльность той или иной отрасли, страдающей от данного патогена, но и снижается качество самой продукции.

Разработка методики получения М-белка стрептококков, принадлежит ученому — Р. Лэнсфилд. Это был трудоемкий и многоступенчатый способ выделения бактериальных белков. На смену типирования патогена по серотипам, приходят способы генодиагностики, метод emm-типирования, ставший «Золотым стандартом» диагностики стрептококковых инфекций

В данном мини-обзоре рассматривается методика применения идентификации *emm*-гена у стрептококков групп C и G, выделенных от крупного рогатого скота, на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), которое является быстрым и точным методом диагностики возбудителя. Методика основывается на уникальности нуклеотидной последовательности возбудителя, что дает высокую степень специфичности. Актуальность разрабатываемого метода обоснована недостатком информации о точ-



Иntenсивное развитие сельского хозяйства невозможно без высокого уровня иммунитета и продуктивности животных. Циркулирующие в стадах многочисленные инфекционные агенты [24,25] могут создавать серьезные экономические проблемы. Одной из таких остро стоящих проблем, являются маститы и эндометриты в молочном скотоводстве [6,19]. Среди множества важнейших этиологических агентов возникновения этих заболеваний являются стрептококки. Стрептококки — род шаровидных или овоидных, аспорогенных грамположительных, хемотротрофных, факультативно-анаэробных бактерий из семейства *Streptococcaceae*, являются паразитами животных и человека, обитают в дыхательных путях, пищеварительном и репродуктивном трактах, особенно в полости рта, носа, в толстом кишечнике [1].

По антигенным свойствам полисахаридов стрептококки подразделяются на серогруппы: *A, B, C, D, F, G* и др. В свою очередь, серогруппы состоят из сероваров, различающихся белковыми антигенами (*M*-белок, *T*-белок, *F*-белок) (классификация на основании строения *C*-карбогидрата клеточной стенки [22]). Среди вышеперечисленных групп стрептококков, циркулирующих у крупного рогатого скота, наиболее этиологически значимыми для маститов и эндометритов, являются группы *C* и *G*. Серологические и бактериологические исследования, традиционно применяемые для диагностики стрептококков достаточно длительны и трудоемки, в связи с чем возникает необходимость в более современных подходах, каковыми могут являться молекулярно-генетические методы.

ных свойствах *M*-подобного белка стрептококков, кодируемого *emm*-геном, являющимся клеточным поверхностно-закрепленным белком и, который, предположительно, обуславливает устойчивость к фагоцитозу. Дополнительное использование 16s рибосомального участка позволит повысить точность диагностики. Для отечественной ветеринарии это является новым подходом, в частности, при работе со стрептококками групп *C* и *G* у крупного рогатого скота.

Ключевые слова: стрептококки, молекулярная диагностика, *emm*-ген, КРС, генодиагностика.

Основной принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Механизм реакции основан на репликации молекул ДНК, который в природе осуществляется ферментом ДНК-полимеразой. Он же и используется для проведения реакции *in vitro*.

В ПЦР применяется повторение температурных режимов, представляющих собой цикл амплификации. Цикличность температурных режимов, увеличивает количество, ограниченного олигонуклеотидами (праймерами) фрагмента нуклеиновых кислот (НК), в геометрической прогрессии, поскольку ранее синтезированные ампликоны, короткие участки НК, на каждом цикле выступают матрицей наработки искомого участка. ПЦР позволяет даже с единственной стартовой молекулы НК получить достаточное количество продукта реакции для детекции.

Преимущества генодиагностики

Как сказано выше, повсеместно распространенным методом распознавания микроорганизмов в биологических образцах, в последнее время, стал анализ структур НК. Преимущество данного подхода состоит в отсутствии необходимости культивирования, в особенности для наиболее прихотливых культур. Тест-системы применяемы при диагностике возбудителя, основанные на амплификации НК, более чувствительны относительно других методик. В короткие сроки возможно обнаружение даже единичных аминокислот па-

тогена, предположительно находящегося в пробе [7,26]. Помимо рутинного обнаружения микроорганизма возможен вариант амплификации межгенного региона рибосомального кластера 16S рРНК и 23S рРНК, что позволяет одновременно определять, идентифицировать и дифференцировать различные таксоны прокариот [2].

Наибольшую визуализацию и удобство имеет ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией фрагментов нуклеиновых кислот, крайне специфических для геномов. Гибридизация флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, присутствующих в составе реакционной смеси, с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени сопровождается нарастанием флуоресценции. Измерение интенсивности флуоресцентного сигнала позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации.

Преимущество emm-типирования

Система типирования поверхностных полисахаридов стрептококков, созданная Р. Лэнсфилд — типичная серологическая система, основанная на реакциях антиген-антитело, зависит от приготовления типоспецифических антисывороток и антигена [21]. Сыворотки, для проведения реакции получают с помощью цельноклеточных антигенов стрептококка, используемых для иммунизации кроликов. Активные сыворотки содержат специфические антитела в серологических реакциях [23]. Производство таких сывороток остается довольно сложным процессом в крупных масштабах [12].

Самым исследованным видом стрептококков является *S. pyogenes* [10–18,29–33,35] на примере которого было показано, что ген emm *S. pyogenes* кодирует М-белок. М-белок индуцирует способность бактерии сопротивляться фагоцитозу, являясь основным фактором вирулентности. 5'-концы гена emm очень гетерогенны и кодируют специфичность серотипа [21].

Несколько критических замен нуклеотидов в 5'-области emm могут привести к появлению новых доминантных антигенных эпитопов, что приведет к образованию определенного серологического типа. В качестве альтернативы, гены emm могут время от времени подвергаться горизонтальному обмену и переходить на новый генетический фон, что делает типирование по генотипу более информативным, чем по серотипу [36]. В следствие этого, система типирования emm-гена является полезным и надежным эпизоотическим инструментом для подразделения стрептококков.

Поскольку тест-система не зависит от экспрессии гена emm и часто может различать биологически раз-

личные изоляты, которые могут быть лишь слабо антигенными или нетипируемыми, определение последовательности emm-гена может классифицировать изоляты, когда серологические методы не дают результата [12].

Биомолекулярные подходы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), предлагают значительные преимущества по сравнению с обычными методами культуральных исследований с точки зрения точности и времени выполнения [27]. Кроме того, анализы на основе ПЦР способны выявлять бактерии с медленным ростом, что приводит к значительному снижению ложноотрицательных результатов, которые, как сообщается, возникают с вероятностью 27–50% при использовании методов бактериологии [5].

Согласно Бентли и др. [8,9] изменчивость последовательности области V2 16S рРНК позволило дифференцировать 31 вид рода *Streptococcus*, включая виды *S. uberis* и *S. parauberis*, относящихся к “необычным” стрептококкам, которые, не имея серологических и биохимических различий, филогенетически различны и могут быть выделены в самостоятельные виды [37].

Секвенирование и анализ гипервариабельных участков гена 16S рРНК могут обеспечить относительно быстрые и экономичные методы оценки разнообразия и численности бактерий и могут быть полезны для обнаружения и идентификации патогенов [20,28,34,38,39].

Выводы

Таким образом, ПЦР обладает рядом сильных сторон относительно бактериологического исследования, применяемого в ветеринарии, однако, все же дополняя его. Для ПЦР присущи следующие характеристики:

- ◆ возможность визуальной интерпретации результатов;
- ◆ создание отчета по результатам выполняемого исследования, на основе визуальных данных;
- ◆ возможность сочетать изучение различных по своему функционалу участков нуклеотидных последовательностей;
- ◆ уменьшение риска не верных результатов достигается путем очистки и выделения НК и применения праймеров, специфичных для ДНК микроорганизмов;
- ◆ автоматизация метода ПЦР, тем самым обеспечивается высокая скорость работы;
- ◆ существующие протоколы постановки реакции амплификации, позволяют свести к минимуму ошибки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.А. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / А.А. Воробьев, Е.П. Быков, А.В. Пашков, А.В. Караулов, М.Я. Корн, С.А. Быков // Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова — М.: Медицинское информационное агентство, 2003. — С. 1–236.
2. Деревщикова, М.И. Использование молекулярно-генетических методов для микробиологического контроля пищевой продукции / М.И. Деревщикова, М.Ю. Сыромятников, В.Н. Попов // Техника и технология пищевых производств. — 2018. — Т. 48, № 4. — С. 87–113. DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-4-87-113>.
3. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии: Группа пенициллинов/ В.А. Аковбян, И.В. Андреева, А.С. Анкирская и др. — НИИАХ СГМА. — 2000–2007. — 57–135с.
4. Информационный бюллетень ВОЗ: спецвыпуск. Ноябрь 2016. URL: <https://whodc.mednet.ru/ru/component/attachments/download/140.html> (Дата обращения 15.11.21)
5. Ashraf A, Imran M. Diagnosis of bovine mastitis: From laboratory to farm. *Trop. Anim. Health Prod.* 2018;50:1193–1202. doi: 10.1007/s11250-018-1629-0
6. Ballas P, Gabler C, Wagener K, Drillich M, Ehling-Schulz M. Streptococcus uberis strains originating from bovine uteri provoke upregulation of pro-inflammatory factors mRNA expression of endometrial epithelial cells in vitro. *Vet Microbiol.* 2020 Jun;245:108710. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108710. Epub 2020 May 5. PMID: 32456828
7. Balasubramanian S. Solexa Sequencing: Decoding Genomes on a Population Scale / S. Balasubramanian // *Clinical Chemistry.* — 2015. — Vol. 61, № 1. — P. 21–24. DOI: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221747>.
8. Bentley RW, Leigh JA, Collins MD. Intrageneric structure of Streptococcus based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol.* 1991;41:487–494.
9. Bentley RW, Leigh JA. Development of the PCR-based hybridization protocol for identification of streptococcal species. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1296–1301.
10. Boukthir S, Moullec S, Cariou ME, Meygret A, Morcet J, Faili A, Kayal S. A prospective survey of Streptococcus pyogenes infections in French Brittany from 2009 to 2017: Comprehensive dynamic of new emergent emm genotypes. *PLoS One.* 2020 Dec 17;15(12): e0244063. doi: 10.1371/journal.pone.0244063. PMID: 33332468; PMCID: PMC7746304.
11. Ching NS, Crawford N, McMinn A, Baker C, Azzopardi K, Brownlee K, Lee D, Gibson M, Smeesters P, Gonis G, Ojaimi S, Buttery J, Steer AC. Prospective Surveillance of Pediatric Invasive Group A Streptococcus Infection. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2019 Mar 28;8(1):46–52. doi: 10.1093/jpids/pix099. PMID: 29309631.
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. emm typing and validation of provisional M types for group A streptococci. *Emerg Infect Dis.* 1999 Mar-Apr;5(2):247–53. doi: 10.3201/eid0502.990209. PMID: 10221877; PMCID: PMC2640698.
13. Friães A, Melo-Cristino J, Ramirez M; Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections. Changes in emm types and superantigen gene content of Streptococcus pyogenes causing invasive infections in Portugal. *Sci Rep.* 2019 Dec 2;9(1):18051. doi: 10.1038/s41598-019-54409-2. PMID: 31792274; PMCID: PMC6888849.
14. Frost HR, Davies MR, Delforge V, Lakhloufi D, Sanderson-Smith M, Srinivasan V, Steer AC, Walker MJ, Beall B, Botteaux A, Smeesters PR. Analysis of Global Collection of Group A Streptococcus Genomes Reveals that the Majority Encode a Trio of M and M-Like Proteins. *mSphere.* 2020 Jan 8;5(1): e00806–19. doi: 10.1128/mSphere.00806–19. PMID: 31915226; PMCID: PMC6952200.
15. Frost HR, Davies MR, Velusamy S, Delforge V, Erhart A, Darboe S, Steer A, Walker MJ, Beall B, Botteaux A, Smeesters PR. Updated emm-typing protocol for Streptococcus pyogenes. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Jul;26(7):946.e5–946.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2020.02.026. Epub 2020 Feb 28. PMID: 32120034.
16. González-Abad MJ, Alonso Sanz M. Infecciones invasoras por Streptococcus pyogenes (2011–2018): serotipos y presentación clínica [Invasive Streptococcus pyogenes infections (2011–2018): EMM-type and clinical presentation]. *An Pediatr (Engl Ed).* 2020 Jun;92(6):351–358. Spanish. doi: 10.1016/j.anpedi.2019.10.014. Epub 2019 Dec 24. PMID: 31879253.
17. Grivea IN, Syrogiannopoulos GA, Michoula AN, Gazeti G, Malli E, Tsilipounidaki K, Fouzas S, Anthracopoulos MB, Petinaki E. emm Types and clusters and macrolide resistance of pediatric group A streptococcal isolates in Central Greece during 2011–2017. *PLoS One.* 2020 May 7;15(5): e0232777. doi: 10.1371/journal.pone.0232777. PMID: 32379802; PMCID: PMC7205280.
18. Hamzah SNA, Mohd Desa MN, Jasni AS, Mohd Taib N, Masri SN, Hamat RA. Distribution of virulence genes and the molecular epidemiology of Streptococcus pyogenes clinical isolates by emm and multilocus sequence typing methods. *Med J Malaysia.* 2021 Mar;76(2):164–170. PMID: 33742623.
19. Kabelitz T, Aubry E, van Vorst K, Amon T, Fulde M. The Role of Streptococcus spp. in Bovine Mastitis. *Microorganisms.* 2021 Jul 13;9(7):1497. doi: 10.3390/microorganisms9071497. PMID: 34361932; PMCID: PMC8305581.
20. Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 1999 Jun;2(3):299–305. doi: 10.1016/S1369-5274(99)80052-6. PMID: 10383862.
21. Lancefield RC. The antigenic complex of streptococcus haemolyticus: I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of streptococcus haemolyticus. *J Exp Med.* 1928 Jan 1;47(1):91–103. doi: 10.1084/jem.47.1.91. PMID: 19869404; PMCID: PMC2131344.
22. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med.* 1933 Mar 31;57(4):571–95. doi: 10.1084/jem.57.4.571. PMID: 19870148; PMCID: PMC2132252.
23. Lancefield RC. Differentiation of group A streptococci with a common R antigen into three serological types, with special reference to the bactericidal test. *J Exp Med* 1957;106:525–44. Johnson DR, Sramek J, Kaplan EL, Bicova R, Havlicek J, Havlickova H, et al. Laboratory diagnosis of group A streptococcal infections. Geneva: World Health Organization; 1996.

24. Lewis, G.S., Uterine health and disorders. *J. Dairy Sci.* 1997 May; 80(5): 984–994. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76024-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76024-7);
25. Liang, D., Arnold, L.M., Stowe, C.J., Harmon, R.J., Bewley, J.M., 2017. Estimating US dairy clinical disease costs with a stochastic simulation model. *J. Dairy Sci.* 100, 1472–1486. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11565>
26. Liu L. Comparison of next-generation sequencing systems / L. Liu, Y. Li, S. Li [et al.] // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. — 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/251364>.
27. Park S., Zhang Y., Lin S., Wang T., Yang S. Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics. *Biotechnol. Adv.* 2011;29:830–839. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.017.
28. Schukken, Y.H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M.C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H.J., Sipka, A., Smith, D.G.E., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R.N., Seyfert, H.M., 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144, 270–289.
29. Speers DJ, Levy A, Gichamo A, Eastwood A, Leung MJ. M protein gene (emm type) analysis of group A *Streptococcus* isolates recovered during an acute glomerulonephritis outbreak in northern Western Australia. *Pathology.* 2017 Dec;49(7):765–769. doi: 10.1016/j.pathol.2017.09.001. Epub 2017 Oct 24. PMID: 29079005.
30. Tadros M, Cabrera A, Matukas LM, Muller M. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and ClinPro Tools as a Rapid Tool for Typing *Streptococcus pyogenes*. *Open Forum Infect Dis.* 2019 Oct 11;6(11): ofz441. doi: 10.1093/ofid/ofz441. PMID: 31700941; PMCID: PMC6825801
31. Tyrrell GJ, Bell C, Bill L, Fathima S. Increasing Incidence of Invasive Group A *Streptococcus* Disease in First Nations Population, Alberta, Canada, 2003–2017. *Emerg Infect Dis.* 2021 Feb;27(2):443–451. doi: 10.3201/eid2702.201945. PMID: 33496247; PMCID: PMC7853581.
32. Vela AI, Villalón P, Sáez-Nieto JA, Chacón G, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. Characterization of *Streptococcus pyogenes* from Animal Clinical Specimens, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2017 Dec;23(12):2013–2016. doi: 10.3201/eid2312.151146. PMID: 29148379; PMCID: PMC5708255.
33. Villalón P, Sáez-Nieto JA, Rubio-López V, Medina-Pascual MJ, Garrido N, Carrasco G, Pino-Rosa S, Valdezate S. Invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Spain: a microbiological and epidemiological study covering the period 2007–2019. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021 Nov;40(11):2295–2303. doi: 10.1007/s10096-021-04279-2. Epub 2021 May 27. PMID: 34046804.
34. Wagener K, Prunner I, Pothmann H, Drillich M, Ehling-Schulz M. Diversity and health status specific fluctuations of intrauterine microbial communities in postpartum dairy cows. *Vet Microbiol.* 2015 Feb 25;175(2–4):286–93. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.11.017. Epub 2014 Dec 2. PMID: 25497238.
35. Wang B, Cleary PP. Intracellular Invasion by *Streptococcus pyogenes*: Invasins, Host Receptors, and Relevance to Human Disease. *Microbiol Spectr.* 2019 Jul;7(4). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0049-2018. PMID: 31267891.
36. Whatmore AM, Kapur V, Sullivan DJ, Musser JM, Kehoe MA. Non-congruent relationships between variation in emm gene sequences and the population genetic structure of group A streptococci. *Mol Microbiol* 1994;14:619–631.
37. Williams A M, Collins M D. Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* types I and II. Description of *Streptococcus parauberis* sp. nov. *J Appl Bacteriol.* 1990;68:485–490.
38. Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GC, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology.* 2005 Jan 1;63(1):102–17. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.03.017. PMID: 15589277.
39. Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougall, S., Katholm, J., Schukken, 40. Y.H., 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16, 357–372.

© Абаши́н Илья Юрьевич (abashin.il@yandex.ru), Козырева Ната́лия Генна́диевна (nk07-73@rambler.ru),
 Горбатов Алекса́ндр Вениа́минович (incidentor@yandex.ru), Авдудевская Ната́лья Николаевна (natali.avdudevskaya@mail.ru).
 Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»