

## МОЛЕКУЛЯРНОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА ПО-РЕДКИ ПРИЧИНИТЕЛИ НА БАКТЕРИАЛЕН ТОНЗИЛОФАРИНГИТ – СТРЕПТОКОКИ ОТ ГРУПИ С И G, БЛИЗКИ ДО ГРУПА А (*STREPTOCOCCUS PYOGENES*)

Р. Гергова<sup>1</sup>, А. Мухтарова<sup>1</sup>, Р. Марковска<sup>1</sup>, К. Михова<sup>2</sup>, Р. Кънева<sup>2</sup> и И. Митов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет, Медицински университет – София

<sup>2</sup>Катедра по медицинска химия и биохимия, Център по молекулярна медицина, Медицински университет – София

## MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF RARER CAUSATIVE AGENTS OF BACTERIAL TONSILLOPHARYNGITIS – THE GROUP C AND G STREPTOCOCCI SIMILAR TO THE GROUP A (*STREPTOCOCCUS PYOGENES*)

R. Gergova<sup>1</sup>, A. Muhtarova<sup>1</sup>, R. Markovska<sup>1</sup>, K. Mihova<sup>2</sup>, R. Kaneva<sup>2</sup> and I. Mitov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Medical University – Sofia

<sup>2</sup>Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Center for Molecular Medicine, Medical University – Sofia

<p><b>Резюме:</b></p> <p><b>Ключови думи:</b></p> <p><b>Адрес за кореспонденция:</b></p>	<p>Зачестява изолирането на бета-хемолитичните стрептококи от групи С и G (GCS/GGS) през последните години от инфекции, типични за група А стрептококи (GAS). Цел на проучването е да се установят гени, кодиращи фактори на вирулентност при български изолати GCS/GGS, и да се извърши генотипиране при доказване на <i>emm</i> гени, кодиращи М-протеина. С PCR бяха проучени 15 GCS (n = 7) и GGS (n = 8), изолирани от пациенти с тонзилофарингит за наличие на 16 гена, кодиращи фактори на вирулентност, и бяха секвенирани <i>emm</i> гени. За първи път беше извършен молекулярногенетичен анализ на GCS/GGS, изолирани в над 10% от пациентите с бактериален тонзилофарингит. При над 86% от тези изолати беше установен поне един ген, кодиращ фактори на вирулентност, характерни за <i>S. pyogenes</i>. Най-често се установява <i>slo</i> при 90% GGS, респ. 40% GCS. Беше доказано присъствието на <i>speA</i>, <i>speC</i>, <i>speF</i>, <i>speG</i>, <i>speH</i>, <i>speM</i>, <i>ssa</i>, <i>speM</i>, <i>smeZ</i> в генома на GCS/GGS, като <i>speF</i>, и <i>speH</i> гените се съобщават за първи път в литературата. <i>speM</i>, <i>speC</i> и <i>speH</i> бяха установени по-често при GCS/GGS, отколкото при GAS. Не бяха установени <i>speA</i>, <i>speB</i>, <i>speI</i>, <i>speJ</i>, <i>speK</i>, <i>speL</i>, <i>spyCep</i>, <i>sdaB</i> при GCS/GGS. При половината представители на GGS бяха секвенирани <i>emm</i> гените и за първи път в България бяха установени 3 секвенционни типа GGS – stG10.0, stG480.0 и stG6792.0. Данните насочват вниманието към повишаване на вирулентността в тези групи, което се случва през последните години и при други микробни видове и налага тяхната етиологична роля да се мониторира и проучва по-задълбочено.</p> <p>бета-хемолитични стрептококи, фактори на вирулентност, <i>emm</i> генотипиране</p> <p>Доц. д-р Р. Гергова, Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет, МУ, ул. „Здраве“ № 2, 1431 София, e-mail: rtgergova@gmail.com</p>
<p><b>Abstract:</b></p>	<p>In the recent years, isolation of beta-hemolytic streptococci from the groups C and G (GCS/GGS) from infections, which are typical for the group A streptococcus (GAS), is increased. The aim of our study is to identify the genes encoding virulence factors in Bulgarian GCS/GGS isolates similar to those in GAS, and to perform genotyping as <i>emm</i> genes encoding the M protein are detected. Using PCR, 15 strains of GCS (n = 7) and GGS (n = 8) isolated from patients with tonsillopharyngitis were studied for the presence of 16 genes encoding virulence factors, and <i>emm</i> genes were sequenced. Molecular-genetic analysis of GCS/GGS isolated in over 10% of patients with bacterial tonsillopharyngitis was performed for the first time. Over 86% of these isolates have been shown to have at least one gene encoding GAS virulence factors. The most commonly</p>

<p><b>Key words:</b></p> <p><b>Address for correspondence:</b></p>	<p>found gene is <i>slo</i> – in 90% of GGS, respectively, 40% of GCS. The presence of <i>speA</i>, <i>speC</i>, <i>speF</i>, <i>speG</i>, <i>speH</i>, <i>speM</i>, <i>ssa</i>, <i>speM</i>, <i>smeZ</i> in the GCS/GGS genome was demonstrated, with the <i>speF</i> and <i>speH</i> genes being reported for the first time in the literature. Most genes are less frequent for GCS/GGS, but some of them such as <i>speM</i>, <i>speC</i> and <i>speH</i> are found more often in these groups than in GAS. The <i>speA</i>, <i>speB</i>, <i>speI</i>, <i>speJ</i>, <i>speK</i>, <i>speL</i>, <i>spyCep</i>, <i>sdaB</i> were not found in GCS/GGS. In the half of the GGS representatives were confirmed and sequenced <i>emm</i> genes, and for the first time 3 circulating in Bulgaria serotypes of GGS (stG10.0, stG480.0 and stG6792.0) were identified with genotyping. These data draw the attention to the increase of virulence in these groups, which is seen also in other microbial species in the last years, and requires a more thorough monitoring and study of their etiological role.</p> <p>beta-hemolytic streptococci, virulence factors, <i>emm</i> genotyping</p> <p>Assoc. Prof. R. Gergova, MD, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Medical University, 2, Zdrave St., Bg – 1431 Sofia, e-mail: rtgergova@gmail.com</p>
--	--

### Увод

Стрептококи от група А (GAS) или *S. pyogenes*, са патогенни за човека микроорганизми, които причиняват широк спектър от инвазивни и неинвазивни инфекциозни заболявания, особено често в детска и юношеска възраст [1, 5, 10]. *S. pyogenes* са бактериите, притежаващи огромен арсенал от разнообразни фактори на вирулентност, които обуславят патогенетичните механизми при инфектиране [7, 9, 29]. При предходни наши проучвания е установен значителен брой (около 20), различни видове гени на вирулентността в българските изолати GAS, което доказва по-висок патогенен потенциал на щамове GAS, изолирани от български пациенти, в сравнение с повечето европейски държави, както и зависимост между някои от детерминантите с инвазивността на изолатите [9, 22].

За разлика от тях генетично родствените им стрептококи от група С (GCS) и G (GGS) доскоро са причислявани само към нормалната флора на фаринкса и интестиналния тракт. През последните години зачестяват инфекциозните заболявания, които се свързват етиологично с групи GCS и GGS и имат сходни клинични прояви с тези, причинени от група А [17, 25]. Описани са вече редица случаи, при които след заразяване с лизогенни бактериофаги GCS и GGS придобиват гени за вирулентност и продуцирайки екзотоксини, участват в етиологията на различни инфекции, както и на аутоимунни усложнения след тях [3, 4, 6, 8, 14, 15, 17]. Съобщават се както случаи на гнойни фарингити [18, 30], така и тежко протичащи инвазивни заболявания, като стрептококов токсичен шок синдром [11, 28], некротизиращ фасциит [12, 21, 26], ендокардит [20], бактериемия, сепсис [2, 4, 17] и др. Генетичното им сходство със стрептококите от група А, както и сходни-

те инфекциозни заболявания, които могат да причиняват, насочват вниманието към възможните сходни фактори на вирулентност и патогенност [13, 15, 16]. Няколко вида стрептококи могат да притежават груповите антигени С и G, вкл. *Streptococcus dysgalactiae subsp. Equisimilis*, *S. canis*, *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*, *S. equisubsp. equi*, *S. equi subsp. Zooepidemicus* и *S. anginosus group*, като най-често срещаният от тях причинител на инфекции при хора и животни е *Streptococcus dysgalactiae subsp. Equisimilis* [28]. GCS и GGS притежават няколко детерминанти на вирулентността, открити първоначално само при стрептококи група А. Те могат да експресират капсула от хиалуронова киселина, антифагоцитния М-протеин, стрептолизин О и S, стрептокиназа, С5а пептидаза, фибронектин-свързващ протеин, плазминоген и имуноглобулини от клас IgG [11, 13, 19]. Освен тях обаче *S. pyogenes* експресира голям брой различни, но структурно подобни пирогенни екзотоксини (SPE), принадлежащи към семейството на „суперантигените“. Те имат способността да се свързват с Т-клетъчните рецептори, което води до поликлонално активиране на лимфоцитите с масивно освобождаване на големи количества цитокини, които от своя страна предизвикват сходните клинични прояви, характерни за инвазивните стрептококови заболявания: треска, хипотония, шок, органна недостатъчност и др. Рядко, но вече има данни за някои от тези екзотоксини да се установяват и в GCS и GGS [3, 7, 15, 17].

**Целта** на нашето проучване е да се установят гени, кодиращи фактори на вирулентност при български изолати GCS и GGS, подобни на тези, доказани в GAS, и да се извърши генотипиране и определяне на секвенционния *emm* тип при доказване на *emm* гените, кодиращи М-протеина.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

През периода 2015-2017 г. бяха колекционирани 148 клинични изолата бета-хемолитични стрептококи от назофарингеални секрети на пациенти във възрастта от 1 г. до 68 г. (79,73% от тях са под 12 г.) с остър тонзилофарингит. 133 от стрептококовите изолати са определени като GAS, а 15 са идентифицирани като GCS и GGS. Всички щамове са идентифицирани и охарактеризирани чрез използване на подходящи културални, серологични и биохимични методи [9]. Първоначално бяха използвани рутинни критерии като наличие на бета-хемолиза, чувствителност към бацитрацин, каталаза-отрицателен тест и продукция на пиролдидиламидаза с PYR-тест. За определяне на серогрупата по Lancefield беше използван имунологичен тест Patho Dextra Strep Grouping Kit Thermo Scientific (Oxoid, UK).

ДНК екстрактите бяха извлечени по химичен начин от чиста микробна култура. За целта е използван DNA sorb-AM nucleic acid extraction kit (AmpliSens), като екстракцията е осъществена според протокола и указанията на производителя.

За откриване на гените за вирулентност бяха разработени варианти на мултиплекс PCR за следните групи фактори: стрептококови суперантигени: *speA*, *speC*, *speH*, *speF*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *ssa*; протеазни инхибитори: *speB*, *spyCEP*, *mac*, и *smeZ*, нуклеаза *daB* и *slo* (ген за стрептолизин O). Всички праймери за гените на вирулентност бяха разделени на 6 отделни микса, като всяка смес беше използвана в мултиплекс PCR. Включените в реакцията праймери и пригответените комбинации, както и китът за мултиплекс PCR са описани в наши предишни публикации [9, 22]. Четири GGS щамове, в които беше установен *emm* ген, бяха подложени на *emm* типирание според указанията на CDC (Center for Disease Control and Prevention). Праймерите, използвани за секвенционните реакции, са показани в табл. 1. PCR продуктът беше пречистен чрез Rapid PCR Clean up Enzyme Set (ExoSAP, Applied Biosystems, USA) и секвениран по Sanger: BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer, на секвенатор модел: Applied Biosystems 3130 x I Genetic Analyzer сF праймер, който обхващаше 5' края, кодиращ около 15-23 остатъка от мембранен експортен протеин, както и до 250 аминокиселини на M-протеина. Секвенциите бяха анализирани и сек-

венционните типове бяха определени с помощта на информацията в CDC уебсайта (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.html>).

Таблица 1. Използвани праймери при нуклеотидното секвениране

Primer 1	TATT(C/G)GCTTAGAAAATTA
Primer 2	GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT

## РЕЗУЛТАТИ

Подробно са проучени 15 ДНК екстракта от GCS (n = 7) и GGS (n = 8) с молекулярногенетични методи за наличие на 16 гена, кодиращи фактори на вирулентност и гени *emm*, кодиращи M-антигени. Получените от нас резултати показват, че 13 (86,67%) от щамове притежават поне един ген, кодиращ фактор на вирулентността, характерен за *S. pyogenes* (табл. 2). Най-често доказваният ген при GCS и GGS беше *slo* (GGS = 87,5%, GCS = 42%). След доказване на *emm* гена при 4 GGS изолата, той беше подложен на нуклеотидно секвениране, с помощта на което бяха установени за първи път в България 3 *emm* секвенционни типа, към които принадлежаха 50% от изпитаните представители на стрептококи от група G, а именно stG10.0, stG480.0 и stG6792.0.

Резултатите от настоящото проучване показват също, че GCS и GGS притежават гени, които кодират някои „суперантигени“, показани на табл. 2. Пет от осемте изследвани GGS (62,5%) носят гена *speG*, по-често от GAS, където ги откриваме в около половината щамове. С по-малка честота при GGS бяха установени и гените *speF* – 25%, *smeZ* – 25%, *ssa* – 12,5% (табл. 2), докато при GAS ги доказваме със следната честота: *speF* – над 60%, *smeZ* – над 81%, *ssa* – 30%, но по-често бяха доказани при GGS: *speM* – 50%, *speC* – 37,5% и *speH* – 12%, а в група A те са установени по-рядко: *speM* – 29%, *speC* – 33%, *speH* – 2% [9, 22]. Не установихме наличие на гените *speA*, *speB*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *spyCEP*, *sdaB* при GGS. Някои от изследваните щамове GCS също показаха наличие на отделни гени за вирулентност, но със значително по-ниска честота от тази при GAS – в 14% за *speF*, *speH* и *ssa*, а в 28% за *speM* (табл. 2). Само *speH* се среща по-често и при GCS, както и при GGS в сравнение с ниската честота до 2% при GAS.

Таблица 2. Честота на разпределение на гените за вирулентност при GCS и GGS, представена в проценти

Стрептокок група (брой)	speA	speB	speC	speF	speG	speH	speI	speJ	speK	speL	speM	ssa	smeZ	Spy Cep	slo
GCS (7)	0	0	0	14	0	14	0	0	0	0	28	14	0	0	42
GGS (8)	0	0	37.5	25	62.5	12	0	0	0	0	50	12.5	25	0	87.5

### ОБСЪЖДАНЕ

Експресията на ген *slo* води до биосинтеза на стрептолизин О, който е токсин, принадлежащ към семейството на цитолизините. Произвежда се от 4 вида патогенни за човека грам-положителни бактерии: *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. и *Listeria* spp. Установено е, че стрептолизин О се експресира от всички щамове и серотипове *S. pyogenes*, води до формирането на мембранни пори в неутрофилите и макрофагите, индуцира апоптоза в тях [29]. В макроорганизма срещу него се образуват антители (AST), чийто титър достига своите максимални нива най-често около 3-6 седмици след инфекцията [27]. Този показател има важно диагностично и прогностично значение при доказване на ретроспективна стрептококова инфекция, причинена от *S. Pyogenes*, и най-вече при диагностика на ревматични заболявания. Ние доказваме наличието на гена *slo* и при голяма част от щамовете GCS и GGS, което дава основание да се мисли, че стрептолизин О може да се продуцира и от повечето GCS и GGS. Някои учени показват, че 100% от изследваните щамове GGS са носители на *slo* [16, 19]. Съобщава се, че стрептолизин О, изолиран и пречистен от GCS, има сходна антигенна структура със стрептолизин О при *S. pyogenes* [23]. Описани са и редица случаи на стрептококови заболявания, причинени от GGS и GCS, при които са доказани високи нива на AST [6, 23].

Подобна честота на *speG* е описана в още едно проучване [17]. Смята се, че няма връзка между клиничните симптоми и честотата на *speG*, тъй като се открива със сходна честота както при инвазивните, така и при неинвазивните фарингеални изолати [17]. В тази връзка някои автори подкрепят хипотезата, че тежестта на GGS инфекции не се медира от суперантигените, а по-вероятно от *emm/emmL* гените, които кодират М-протеина [13, 15, 19].

Повечето гени, кодиращи "суперантигените" при *S. pyogenes*, са локализиращи в подвижни генетични елементи и се пренасят чрез фагиспеА, *speC*, *ssa* и *speM* [7]. Генният трансфер и генетичните рекомбинации между *S. pyogenes*,

GCS и GGS са вероятната причина за промяната в патогенния потенциал на стрептококовите видове [16]. Присъствието на гените *speC*, *speG*, *speM*, *ssa*, *smeZ* в генома на GCS/GGS е установено и от други автори [13], но няма данни за наличие на *speF* и *speH*. Първите са чести в изолати GAS, докато вторите са изключително редки за тази група, вкл. и за изолирани от български пациенти щамове пиогенни стрептококи [9, 22]. Ние установяваме тези гени за първи път в български изолати GCS/GGS, като редките за GAS *speH* се откриват значително по-често в генома на представители от групите GCS и GGS.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С настоящото проучване беше извършен за първи път в България молекулярногенетичният анализ на щамове GCS и GGS, изолирани от пациенти с бактериален тонзилофарингит. Беше доказано наличие в над 86% от тези изолати на поне един ген, кодиращ фактор на вирулентност, характерен за *S. pyogenes*. Най-често се установява *slo* при близо 90% от GGS и в над 40% при GCS. Беше доказано присъствието на гените *speA*, *speC*, *speF*, *speG*, *speH*, *speM*, *ssa*, *speM*, *smeZ* в генома на GCS/GGS, като по наши данни два от гените (*speF*, *speH*) се съобщават за първи път в литературата. При половината представители на GGS бяха определени секвенционните *emm* типове и за първи път с генотипирането бяха определени 3 серотипа GGS, циркулиращи в България. Тези първоначални данни насочват вниманието към евентуално повишаване на вирулентността в тези групи, което се случва през последните години и при други микробни видове и задължава лекуващия лекар да не ги подценява, а също така тяхната етиологична роля да се проучва по-задълбочено.

### Благодарност

Изразяваме благодарност за финансовата подкрепа на Медицинския университет – София, Съвет по медицинска наука, Проект № 8078/2016, Договор № Д-139/2017.

## Библиография

1. Мухтарова А, Гергова Р, Митов И. Бета-хемолитични стрептококи – тяхната актуална роля и антибиотична резистентност. Мед. преглед, 54, 2018, № 3, 24-29.
2. Bradley S et al. Group C streptococcal bacteremia: analysis of 88 cases. Rev Infect Dis, 13, 1991, 270-280.
3. Brandt CM, et al. Lack of mitogenic activity of *speG*- and *speG*dys-positive *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* isolates from patients with invasive infections. Intern J Med Microbiol, 295, 2005, 539-546.
4. Burkert T, Watanakunakorn C. Group G streptococcus septic arthritis and osteomyelitis: report and literature review. J Rheumatol, 18, 1991, 904-907.
5. Carapetis J, et al. The global burden of group A streptococcal diseases. Lancet Infect Dis, 5, 2005, 685-694.
6. Chandnani HK, Jain R, Patamasuon P. Group C Streptococcus causing rheumatic heart disease in a child. J Emerg Med, 49, 2015, 12-14.
7. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clin Microbiol Rev, 13, 2000, 470-511.
8. Davies MR et al. Distribution of group A streptococcal virulence genes in group C and G streptococci. International Congress Series, Vol. 1289. Elsevier, 2006.
9. Gergova R, Muhtarova A, Mitov I. Virulence potential of Bulgarian *Streptococcus pyogenes* clinical isolates, Comptes rendus de l'Académie Bulgare des sciences: sciences mathématiques et naturelles, 68, 2015, 1061-1070.
10. Gergova R et al. Microbiological Features of Upper Respiratory Tract Infections in Bulgarian Children for the Period 1998-2014. Balkan Med J, 33, 2016, 675-680.
11. Hashikawa S et al. Characterization of group C and G streptococcal strains that cause streptococcal toxic shock syndrome. J Clin Microbiol, 42, 2004, 186-192.
12. Humar D et al. Streptolysin S and necrotizing infections produced by group G streptococcus. Lancet, 359, 2002, 124-129.
13. Igwe EI, et al. Identification of superantigen genes *speM*, *ssa*, and *smeZ* in invasive strains of beta-hemolytic group C and G streptococci recovered from humans. FEMS Microbiol Letters, 229, 2003, 259-264.
14. Ikebe T et al. Surveillance of severe invasive group G streptococcal infections in Japan during 2002-2008. Japan J Infect Dis, 63, 2010, 372-375.
15. Kalia A, Bessen DE. Presence of streptococcal pyrogenic exotoxin A and C genes in human isolates of group G streptococci. FEMS Microbiol Letters, 219, 2003, 291-295.
16. Kittang BR, et al. emm gene diversity, superantigen gene profiles and presence of *SlaA* among clinical isolates of group A, C and G streptococci from western Norway. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 30, 2011, 423-433.
17. Korem M et al. Streptococcal pyrogenic exotoxin G gene in blood and pharyngeal isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* has a limited role in pathogenesis. J Microbiol Immunol Infect, 47, 2014, 292-296.
18. Lindbæk M et al. Clinical symptoms and signs in sore throat patients with large colony variant  $\beta$ -haemolytic streptococci groups C or G versus group A. Br J Gen Pract, 55, 2005, 615-619.
19. Lo HH, Cheng WS. Distribution of virulence factors and association with emm polymorphism or isolation site among beta-hemolytic group G Streptococcus dysgalactiae subspecies *equisimilis*. APMIS, 123, 2015, 45-52.
20. Lothar SA et al. Emerging group C and group G streptococcal endocarditis: A Canadian perspective. Intern J Infect Dis, 65, 2017, 128-132.
21. Maehara E et al. Group G streptococcal necrotizing soft tissue infection. Nishinohon J Dermatol, 78, 2016, 644-649.
22. Muhtarova A, et al. Distribution of Super-Antigens and Toxins in Bulgarian Invasive and Non-Invasive Clinical Isolates *Streptococcus pyogenes*. Acta Microbiol Bulg, 33, 2017, 151-156.
23. Okumura K, et al. Cloning and sequencing the streptolysin O genes of group C and group G streptococci. DNA Sequence, 4, 1994, 325-328.
24. Sachse S, et al. Superantigen-like gene (s) in human pathogenic Streptococcus dysgalactiae, subsp. *equisimilis*: genomic localisation of the gene encoding streptococcal pyrogenic exotoxin G (*speG*dys). FEMS Immunol Med Microbiol, 34, 2002, 159-167.
25. Salata R, et al. Infections due to Lancefield group C streptococci. Medicine, 68, 1989, 225-239.
26. Sharma M, Riad K, Mohamad F. Clinical characteristics of necrotizing fasciitis caused by group G Streptococcus: case report and review of the literature. Scand J Infect Dis, 34, 2002, 468-471.
27. Shet A, Kaplan EL. Clinical use and interpretation of group A streptococcal antibody tests: a practical approach for the pediatrician or primary care physician. Pediatr Infect Dis J, 21, 2002, 420-426.
28. Shimomura Y, et al. Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). BMC Genomics, 12, 2011, 17. doi: 10.1186/1471-2164-12-17.
29. Timmer AM, et al. Streptolysin O promotes group A Streptococcus immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. J Biol Chem, 284, 2009, 862-871.
30. Yamaguchi T, et al. Food-Borne Outbreak of Group G Streptococcal Pharyngitis in a School Dormitory in Osaka, Japan. J Clin Microbiol, 12, 2018, 17. doi: 10.1186/1471-2164-12-17.

Постъпила за печат на 19 март 2018 г.