МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА МИКРОБИОЛОГИЯ

МИКРОБИОЛОГИЧНИ И ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за
придобиване на научна и образователна степен „доктор”
на

АДИЛЕ АКИФОВА МУХТАРОВА

Направление Биологически науки 4.3.
Научна специалност 01.06.12. „Микробиология”

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

ДОЦ. Д-Р РАЙНА ЦВЕТАНОВА ГЕРГОВА Д. М.

София 2018 г.

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

CDC	Center for disease control and prevention
ECDC	European center for disease control and prevention
erm(A)	ген кодиращ метилаза, отговорен за резистентността към MLS
erm(B)	ген, кодиращ метилаза, отговорен за резистентността към MLS
GAS	стрептококи от група А, *Streptococcus pyogenes*
GCS	стрептококи от група С
GGS	стрептококи от група G
mef(A)	ген отговорен за ефлукс механизма при макролидна резистентност
MLS	М -макролиди, L-линкозамиди, S-стрептограмини
MLST	Мултилокусно секвениране (Multi locus sequence typing)
PCR	Полимеразна верижна реакция (Polymerase chain reaction)
ST	секвенционен тип (sequence type)
STSS	стрептококов токсичен шоков синдром (Streptococcal Toxic Shock Syndrome)
WHO	Световна Здравна Организация (World Health Organization)
ГДП	горни дихателни пътища
ДДМ	дисково-дифузионен метод
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
МИК	минимална инхибираща концентрация
ОТФ	остър тонзилофарингит
рРНК	рибозомална РНК

	Най-честоизползванисъкращения	ii
I	**Въведение**	1
II	**Литературен обзор**	3
1	Исторически данни и таксономия на *S. pyogenes*	3
2	Морфология и физиология	4
3	Фактори на вирулентност при *S. pyogenes*	7
3.1	Свързани с клетъчната стена	8
3.1.1	Капсула	8
3.1.2	М-протеин	8
3.1.3	Други, клетъчно-асоциирани адхезини	11
3.2	Екстрацелуларни фактори на вирулентност (секретирани от живата клетка)	13
3.2.1	Хемолизини	13
3.2.2	ДНК-аза В	14
3.2.3	Стрептокиназа	14
3.2.4	Пирогенни (еритрогенни) екзотоксини	15
3.2.5	Протеази	17
3.3	Биофилм	18
4	Клиничен спектър на инфекциите, причинени от *S. pyogenes*	20
4.1	Стрептококов тонзилофарингит	24
4.2	Асимптоматично носителство на *S. pyogenes*	25
4.3	Скарлатина	26
4.4	Стрептококови кожни инфекции - еризипел и пиодермия	27
4.5	Автоимунии усложнения – остра ревматична болест и постстрептококов гломерулонефрит	27
4.6	Инвазивни стрептококови инфекции – некротизиращ фасциит и стрептококов шоков синдром	32
5	Диагностика на инфекциите, причинени от *S. pyogenes*	35

5.1	Класически: култивиране и серология	35
5.2	Бързи имунохроматографски методи	36
5.3	Молекулярно-генетични методи за бърза детекция директно в проба от пациента	36
6	Механизми на резистентност на *S. pyogenes* към антимикробни средства	37
6.1	*S. pyogenes* и чувствителността към пеницилин	37
6.2	Резистентност към макролиди, линкозамиди и стрептограмини (MLSгрупа)	38
6.3	Резистентност на *S. pyogenes* към тетрациклини	46
7	Молекулярно-биологични методи за епидемиологично типизириане на щамове *S. pyogenes*	47
7.1	*emm*–типизиране	47
7.2	Мултилокусно секвениране - Multi Locus Sequence Typing (MLST)	48
III	**Цел и задачи**	52
IV	**Материали и методи**	53
1	Пациенти	53
1.1	Разпределение по възраст	53
1.2	Групи пациенти според пола	53
1.3	Групи пациенти според клиничната диагноза	53
1.3.1	Суперфициални кожни и лигавични инфекции	53
1.3.2	Инвазивни инфекции	53
2	Контролни щамове и проучени микроорганизми	55
3	Микроскопско изследване	56
4	Изследване на пациентски проби	56
4.1	Клинични материали	56
4.2	Културелно изследване	56
4.3	Бърз имунохроматофрафски тест за директно откриване на *S. pyogenes* в клинични проби	57

5	Определяне на антимикробна чувствителност с фенотипни методи	57
5.1	Определяне на чувствителсност чрез стандартизиран ДДМ на Бауер-Кърби	57
5.2	Определяне на МИК	59
6	Молекулярно-генетични техники	59
6.1	Изолиране на бактериална ДНК	59
6.2	Полимеразна-верижна реакция (PCR)	60
6.3	RT-PCR за директно откриване на *S. pyogenes*	60
6.4	Мултиплекс PCR за идентификация на *S. pyogenes* в пациентски проби	61
6.5	Полимеразна-верижна реакция (PCR) за откриване на гени за вирулентност при *S. pyogenes*	63
6.6	Полимеразна-верижнареакция (PCR) за откриване на гени за резитентност към MLS група антибиотици	65
6.7	Полимеразна-верижна реакция (PCR) за откриване на гени за резистентност към тетрациклини	68
7	Охарактеризиране на изолатите с *emm*-типизиране при *S.pyogenes*	69
8	Мултилокусно секвениране, MLST (multilocus sequence typing)	71
9	Статистически анализ и интерпетиране на резултатите	74
V	**Резултати и обсъждане**	76
1	Разпространение на инфекциите, причинени от *S. pyogenes*	76
2	Разработване на нови, бързи методи за директно откриване на *S. pyogenes*в пациентски проби чрез молекулярно-генетични методи	84
3	Откриване на гени, кодиращи вирулентност при *S. pyogenes*	90
4	Разпространение на факторите на вирулентност при инвазивни и неинвазивни изолати *S. pyogenes*	96
5	Определяне начувствителност към пеницилин чрез фенотипни методи	102
6	Определяне на чувствителност към MLS група антимикробни средства	102

	чрез фенотипни и генотипни методи на щамове *S. pyogenes*, изолирани през 2013-2017г.	
7	Определяне на чувствителност към тетрациклини чрез фенотипни и генотипни методи на щамове *S. pyogenes*, изолирани през 2013-2017г.	112
8	Препоръки за терапия при лечение на стрептококовите заболявания	115
9	Епидемиологично охарактеризиране на щамове *S. pyogenes* чрез метода *emm*-типизиране	117
9.1	Честота на разпостранение на установените в България *emm*-типове	117
9.2	Епидемиологични данни за потенциалното покритие на 26 и 30 валентната ваксина срещу *S. pyogenes* в България	119
9.3	Асоциация между установените М-типове в страната и възможните късни автоимунни усложнения	125
10	Прилагане на новата "*emm*- клъстерна система" за епидемиологично охарактеризиране на *S. pyogenes* към българските изолати	129
10.1	Честота на разпространение на установените клъстери в страната	130
10.2	Честота на разпространение на преобладаващите клъстери при кожно-мукозни и инвазивни изолати *S. pyogenes*	131
10.3	Анализиране на връзката между доминиращите клъстери в страната и установените в тях фактори на вирулентност	134
10.4	Определяне на връзката между гените, определящи макролидната резистентност и свързаните с тях *emm*- типове	134
11	Мултилокусно секвениране - MLST (multilocus sequence typing)	140
VI	**Изводи**	144
VII	**Справка за приносите на дисертационния труд**	147
VIII	**Книгопис**	151
IX	**Оригинални статии и научна активност във връзка с дисертацията**	182

I. Въведение

Streptococcus pyogenes е основен причинител на инфекциозни процеси в оториноларингологията, педиатрията и дерматологията, а понякога и в хирургията. Тежестта на клиничните прояви на стрептококовата инфекция варират в широк диапазон – от умерено изразени, самоограничаващи се тонзилофарингити или гнойни процеси на кожата (импетиго, пиодермия, еризипел) до инфекции със системно протичане като скарлатина, а също така и до тежки, инвазивни, животозастрашаващи (абсцедиращи процеси, менингит, сепсис, токсичен шоковсиндром, некротизииращ фасциит) (Barnett T. et al. 2015; Sitkiewicz I. et al. 2010; Walker M. et al.2014). Усложненията, които се наблюдават, са най-често гнойни или абсцедиращи процеси в съседни органи и тъкани, вследствие на инвазивния характер на стрептококовата инфекция, но има и неинвазивни, коварно и бавно протичащи, трудни за диагностициране и терапевтично повлияване постстрептококови автоимунни усложнения като ревмокардит, остър гломерулонефрит, реактивен артирт, псориазис, болест на Кавазаки и др. (Стоянова М 1984; Proft T. & Fraser J. 2016; Wong S. & Yuen K. 2012).

След въвеждане на пеницилиновата терапия настъпва за кратко успокоение, че стрептококовите заболявания вече не са сериозен здравен проблем. В края на 20 век се появяват съобщения от Европа и САЩ за нови случаи на тежко протичащи стрептококови инфекции, независимо от запазената *in vitro* пеницилинова чувствителност, които създават опасения, че се появяват нови клонове *S. pyogenes* с по-висока вирулентност (Brouwer S. et al. 2016; Sowerby L. et al. 2013; Stevens D. 1995). Причините за този ренесанс в България и в други стани по света, не са достатъчно проучени (Сечанова Л. и съавт. 2015; Gergova R. et al. 2016; Segal N. et al. 2005; Luca-Harari B. et al. 2009). Нови микробиологични, молекулярно-генетични и епидемиологични изследвания анализират и разкриват стрептококовото разнообразие чрез методите на типизиране, основани на М протеините, суперантигените и

факторите на вирулентността (Lynskey N. et al. 2011; Rivera-Hernandez T. et al. 2016). Нарастващата честота на инфекциите, причинени от този микроорганизъм през последното десетилетие може да се обвърже и с новопоявилата се и динамично развиваща се резистентност към макролиди и линкозамиди (Sowerby L. et al. 2013; Rubio-López V. et al. 2012). Бързото селекциониране на резистентност към тези важни групи антимикробни средства, които при деца са единствена алтернатива на пеницилиновата терапия при алергия и първоначално неуспещно лечение с бета-лактамни антибиотици, води все по-често до трудности в терапията на респираторните инфекции в детска възраст, а също така пречи и на повлияването на тежките, животозастрашаващи инвазивни инфекции, при които трябва да се използва клиндамицин (Stevens D. 1995; Villaseñor-Sierra A. et al. 2012).

В настоящата работа се фокусира вниманието върху важното клинично и епидемиологично значение на този микробен вид, което налага бързо и адекватно поставяне на етиологичната диагноза с помощта на сигурни, съвременни и експресни методи. Освен оптимизиране на диагностиката и идентификацията на този важен причинител, с проучването на генетичните механизми, кодиращи факторите на вирулентност, видовете резистентност към важни антимикробни средства и серотиповете при *S. pyogenes* се определя прецизно токсигенния арсенал, мутагенният потенциал за развитие на нови варианти и степени на антибиотична резистентност, както и клоналния произход на българските изолати през последните пет години. Едновременно с изследванията на молекулярно ниво, развитието на резистентността се мониторира и с фенотипни методи като се се дава комплексна оценка на състоянието на проблема. Получената информация може да се използва за разработване на правилна регионална антибиотична политика и адекватна прогноза за емпирична терапия.

II. Литературен обзор

1. Исторически данни и таксономия на *S. pyogenes*

Името *Streptococcus* се споменава за първи път от Кристиян Билрот (1874г.), като „малки организми подредени по двойки и верижки“ причинители на еризипел. По-късно през 1883г. е изолиран първият щам от Friedrich Fehleisen (Fehleisen F. 1883). През следващата година Friedrich Julius Rosenbach прилага името *Streptococcus pyogenes* (Rosenbach F. 1884; Ferretti J. et al. 2016).

Този микробен вид принадлежи към сем. *Streptococaceae,* разред *Lactobacillales,* клас *Bacilli,* тип *Firmicutes* (Whiley R. & Hardie J. 2009). Въз основа на 16S рРНК-секвениране, сем. *Streptococaceae* се разделея на 3 рода: *Streptococcus, Lactococcus* и *Lactovum*. Род *Streptococcus* по настоящем, съдържа 79 вида (Toit M. et al. 2014). *S. pyogenes* е най-патогенният представител на рода *Streptococcus* (Facklam R. 2002). Съвременното таксономично подреждане е показано на **фиг.1**.

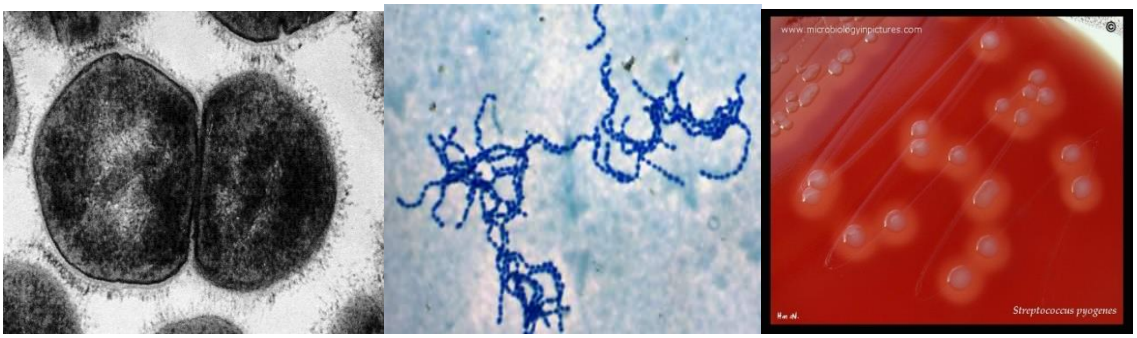
Най-ранният метод за диференциране на *S. pyogenes* от други обичайно апатогенни стрептококи е бил установяване на наличието на бета-хемолиза на кръвен агар (пълно разграждане на овнешките еритроцити). По-късно Rebecca Lancefield открива наличието на „полизахаридни антигени“ в клетъчната стена на бета-хемоличните стрептококи и въз основа на това ги разделя на 6 групи (A, B, C, E, F и G), както е отразено в **табл. 1** (Facklam R. 2002). Според класификалцията на Lancefield *S. pyogenes* са наречени още група A стрептококи (group A *Streptococcus* или съкратено GAS), тъй като притежават A-антиген, който представлява полизахарид съставен от N-ацетил глюкозамин, свързан с полимер на рамноза (Cunningham M. 2000). От **табл. 1** се вижда, че *S. pyogenes* не е единственият представител от рода, който притежава A-антиген. Други, по-редки такива са *S. dysgalactiae subsp. equisimili* и *S. anginosus*. По отношение на морфологията техните колонии са по-дребни от тези на *S. pyogenes* (Facklam R. 2002).

Според Стрептококовата лаборатория на Центъра за контрол на заболяванията (CDC) в САЩ честотата на не-GAS инфекциите при хората остава

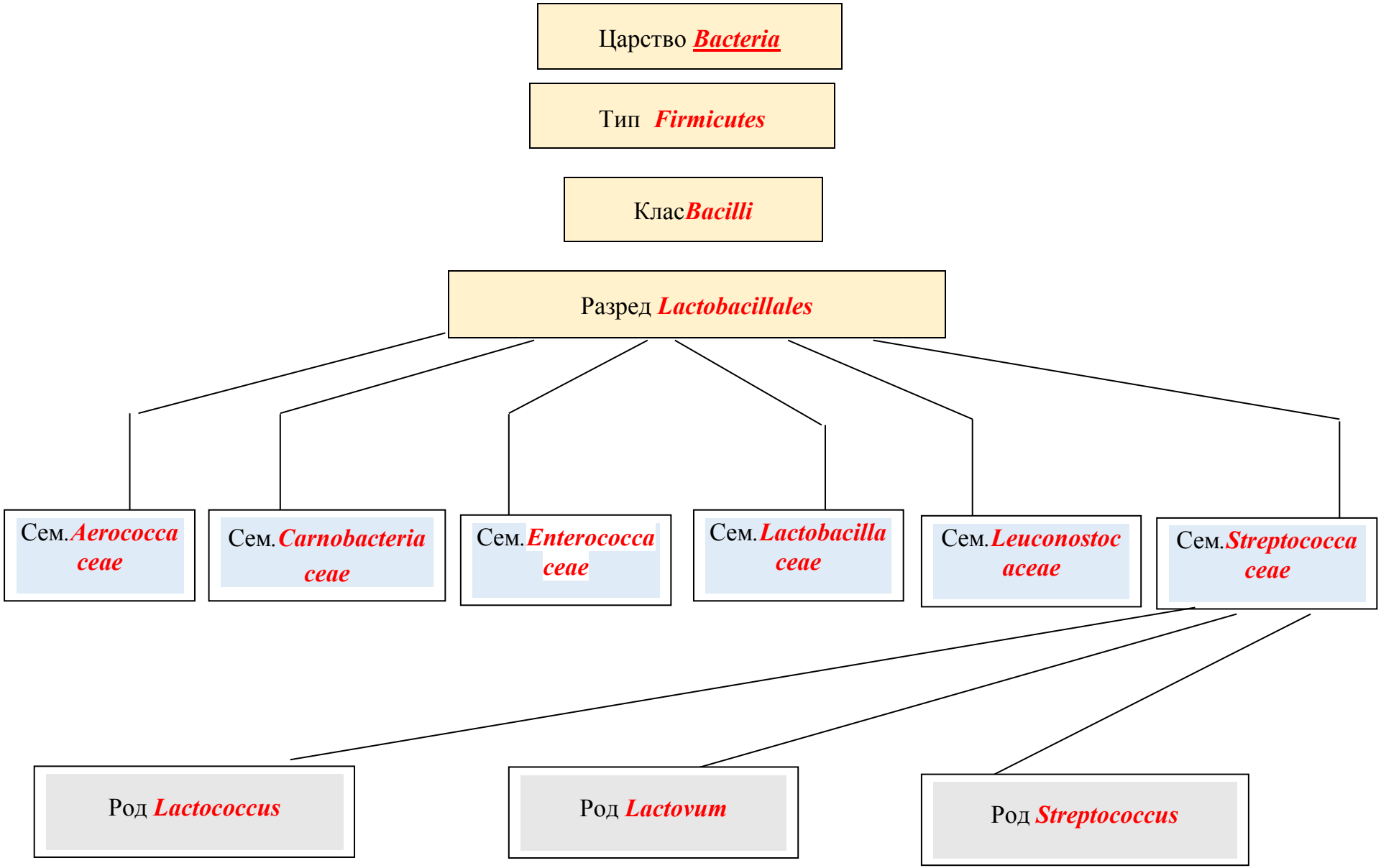
неизвестна, поради непрецизната им диагностика. Именно за това днес най-често се прилагат други два диференциращи теста: чувствителност към бацитрацин и наличие на пиролидонил аминопептидазна активност (PYR тест). *S. pyogenes* е единственият бета-хемолитичен стрептокок, който е положителен и за двата теста едновременно. Стриктната идентификация се основава едновременно на фенотипни и молекулярни методи – ДНК-техники (ДНК-ДНК-реасоциация, 16S рРНК-секвениране, протеомен анализ, мултилокусно секвениране (Facklam R. 2002)

2. Морфология и физиология

S. pyogenes са Грам-положителни, неподвижни, капсулирани от полимер на хиалуронова киселина и неспорообразуващи коки. Клетките им имат овална, сферична форма с размери от 0.6–1.0 μm, както се вижда от **фиг. 2**. Делят се в една плоскост, при което се получават къси верижки, така се установяват микроскопски от култура върху твърди хранителни среди. По-дълги верижки се наблюдават от чисти култури в течни среди и се култивират най-добре в богати хранителни среди съдържащи кръв и глюкоза (Mahon C.et al. 2007; Patterson M. 1996).



Фиг.2. Микроскопска и културелна характеристика на *Streptococococcus pyogenes:* **2.A.**Електронна микроскопия; **2.B.**Оцветяване по Грам; **2.C.** Морфология на колониите с бета-хемолиза върху кръвен агар



Фиг. 1. Таксономия на род *Streptococcus* (Bergey 2009)

Таблица 1. Корелация на стрептококовия вид и потенциалните антигени по Лансфилд (Facklam R. 2002)

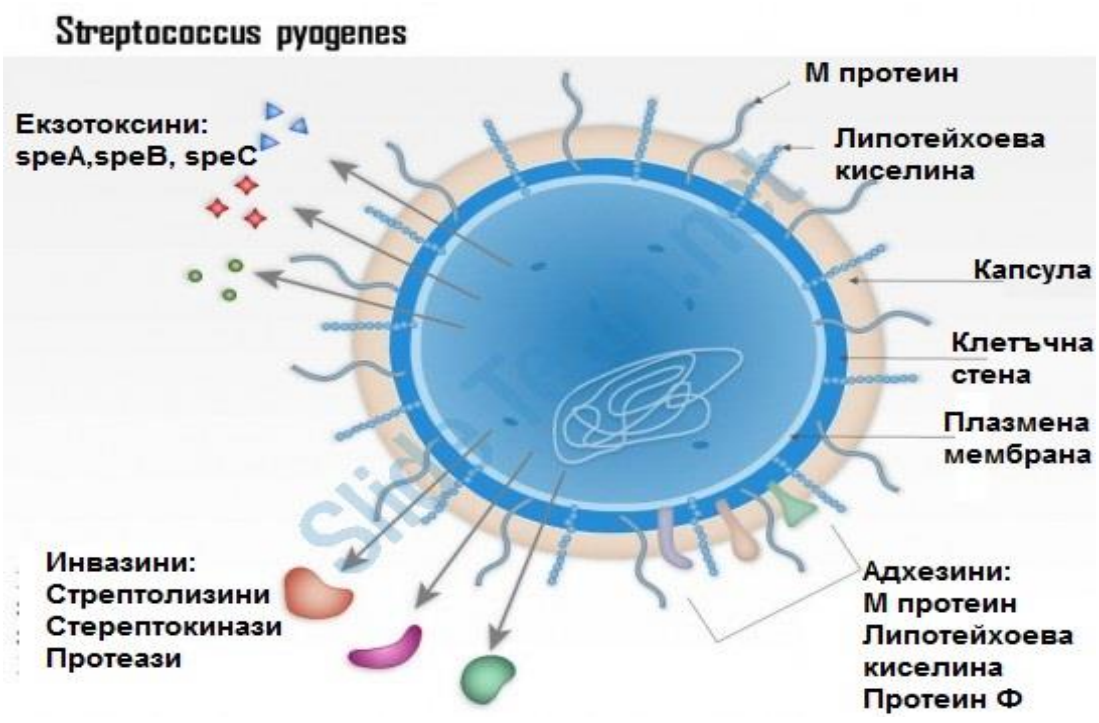
Вид	Вид антиген по Лансфилд	Гостоприемник
S. pyogenes	A	Човек
S. agalactiae	B	Човек, Крава
S. dysgalactiae subsp. Dysgalactiae	C	Животни
S. dysgalactiae subsp. Equisimilis	A,C,G,L	Човек, Животни
S. equi subsp. Equi	C	Животни
S. equi subsp. Zooepidemicus	C	Човек, Животни
S. canis	G	Куче, Човек
S. anginosus (group)	A,C,G,F	Човек
S. constellatus subsp. Pharyngis	C	Човек
S. porcinus	E, P, U, V, без антиген	Свине, Човек
S. iniae	без антиген	Делфин, Риба, Човек
S. phocae	C,F	Тюлен
S. didelphis	без антиген	Опосум

Факултативни анаероби са и извършват предимно ферментативни процеси като разлагат различни субстрати, но за тяхната идентификация имат значение само няколко ензимни реакции. Не отделят каталаза за разлика от стафилококите, нямат ескулиназна активност, която е характерна за ентерококите, но подобно на тях могат да хидролизират L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide (PYR); група A (GAS) не хидролизира

хипурат, за разлика от група B стрептококи; тестът BGUR (ß-D-Glucoronidase) е отрицателен за GAS, но е положителен при групи C и G стрептококи; продуцират левцин аминопептидаза, подобно на други бета-хемолитични стептококи, аерококи и леуконостоки (Mahon C.et al. 2007). Имат богата токсигенна и ензимна акивност във връзка с патогенезата на инвазивните инфекции, които причиняват (Mahon C. et al. 2007). Те играят роля на фактори на вирулентността и са описани в този раздел.

3. Фактори на вирулентност при *S. pyogenes*

S. pyogenes са бактерии, притежаващи огромен арсенал от разнообразни фактори на вирулентост (**фиг.3**), които опосредстват патогенетичните механизми при инфектиране - от адхезията, която е първият етап на инфекцията, до изразеното модулиране на ефекторния стадий на имунната система (Borek A. et al. 2012; Brouwer S.et al. 2016).



Фиг. 3. Фактори на вирулентност при *S. pyogenes*

3.1. Фактори, свързани с клетъчната стена (клетъчно-асоциирани)

3.1.1. Капсула

Капсулата е съставена от полимер на хиалуроновата киселина, която е неотличима по химичен състав от съответния полимер при бозайниците (N-ацетилглюкозамин и глюкуронова киселина). Има доказателства, както за ролята и на адхезин, така и за връзката на щамове с капсулна хиперпродукция с ревматични заболявания, вследствие на автоимунни процеси и тежки инвазивни стрептококови инфекции, заради изразената и антифагоцитна роля (Cunningham M. 2000; Lynskey N. et al. 2011; Стоянова М. 1984).

Кодира се от гените *hasA, hasB и hasC*, които са свързани в оперон. Степента на капсулиране е различна при различните шамове и се смята, че капсулираните щамове са по-вирулентни (Mitchell T. 2003). Хиалуроновата капсула на GAS е един от най-важните фактори за устойчивост срещу фагоцитоза. Некапсулираните мутанти щамове, при изследвания върху животински модели, показват значително по-ниска вирулентност и променени колонозационни способности. Благодарение на своята капсула *S. pyogenes* се прикрепят към фаринкса като се свързат с CD44 на епителните клетки (Schrager H. et al. 1996; Cunningham M. 2000).

3.1.2 М-протеин

Главният фактор на вирулентност, с чието участие се осъществява адхезията е М-протеинът (Cunningham M. 2000). М-протеинът се състои от 2 полипептидни вериги свързани с клетъчна мембрана. С- крайният домейн е силно консервативен, закотвен в клетъчната мембрана с LPSTGE- мотив, докато N- крайният домейн е повърхностно разположен, силно вариабилен и отговорен за серотипното разнообразие (**фиг.4**).

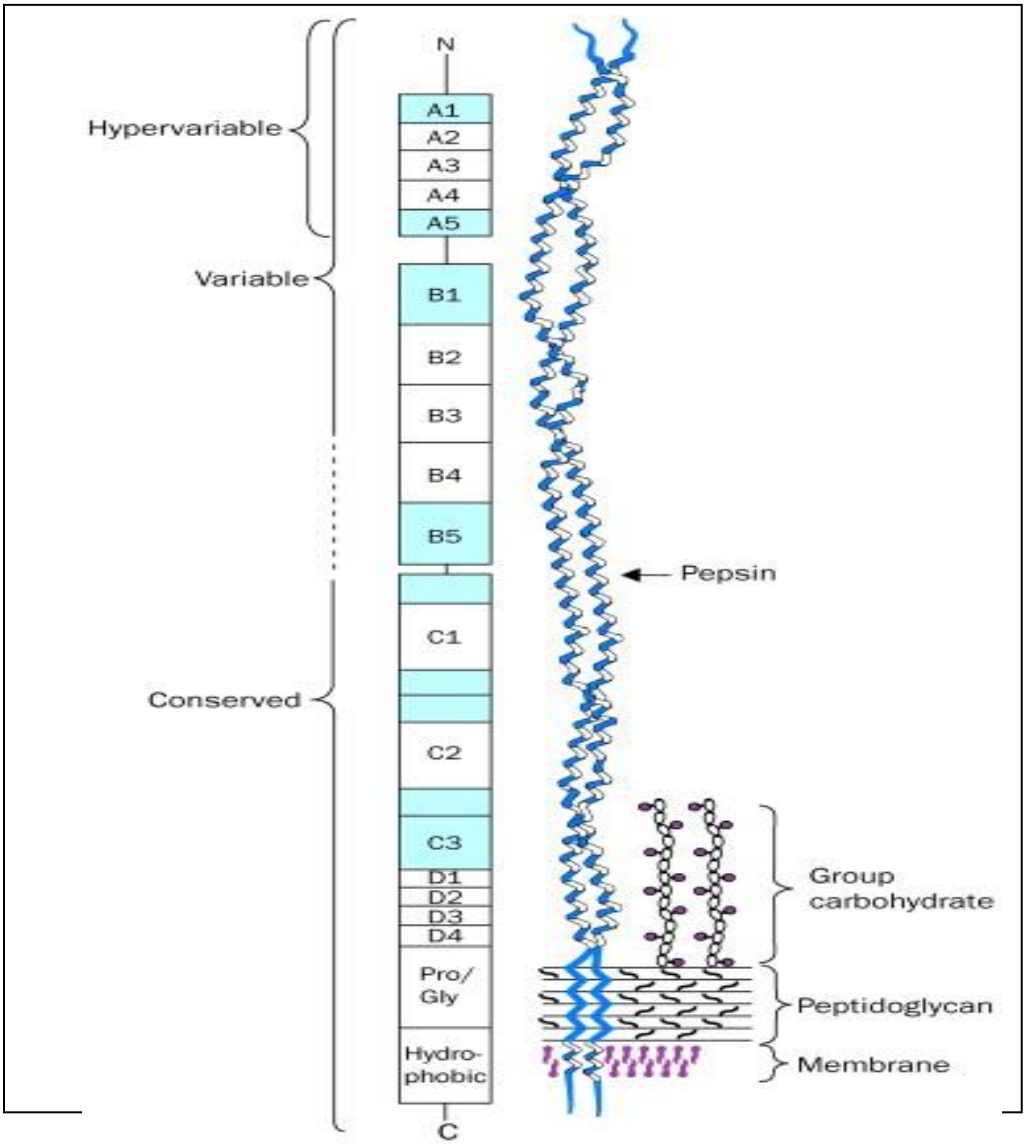
Той е най-големият повърхностен антиген и фактор на вирулентност на *S. pyogenes*, който се кодира от *emm*-ген. Участва в няколко етапа в патогенезата на GAS, вкл. адхезия, модулиране на имунната система и тъканна инвазия (Bisno A. et al. 2003). Проучено е също, че щамовете, чиито клетки са обвити с М-протеин могат ефективно да резистират на фагоцитозата чрез свързване с инхибиторните регулатори на системата на комплемента, да проявяват камуфлажен ефект, както и множество други механизми. Прекаралите остро инфекция с GAS индивиди развиват много силен и дълготраен типово-специфичен имунен отговор (Стоянова М.1984).

Титъра на типовспецифичните анитителa с времето намалява но, при някои индивиди може да се запази до 32 години (Wong S. & Yuen K. 2012)

Този придобит имунитет предпазва от последващи клинично изявени гнойни инфекции с този тип стрептококи, въпреки че същият серотип може да персистира или да реколонизира индивида в състояние на безсимптомно носителство (Fischetti V. 1989; Metzgar D.& Zampolli A. 2011).

Колкото повече индивиди се излагат на контакт със специфичния серотип, неговата пригодност към екологичната му ниша на обитание намалява, поради невъзможността за ефективно предаване в намаляваща възприемчива популация - понятие, известно като колективен имунитет (Johnson D. et al. 2002; Metzgar D. & Zampolli A. 2011).

Типизирането, основано на М-протеина се използва вече над 60 години с висока доказателствена стойност за разграничаването на щамовете с различен тъканен тропизъм (Wong S. & Yuen K. 2012). Серологичният метод за тизипизиране на М- протеина днес изцяло е заменен с генетичен метод основан на секвениране на *emm*- гена. Двата метода, серологичен и генетичен, си корелират напълно (Metzgar D. & Zampolli A. 2011; Efstratiou A. 2000; Beall B. et al. 1996).



Фиг.4. Структура на М-протеин

Синтеза на М- протеина се кодира от *emm*- ген, който понастоящем, поради голямата вариабилност на своя 5'- край се използва за типизиране чрез молекулярно-биологични техники (*polmerase chain reaction*, PCR) като „златен стандарт" за епидемиологичен маркер (Wong S. 2012; Efstratiou A. 2000). Към 2017 г. са известни >200 *emm*-типа с >1200 алелни форми, известни като субтипове (Efstratiou A. & Lamagni T. 2017).

Независимо, че са описани толкова голям брой *emm*- гени, е установено, че в по-голям процент от случаите инвазивните форми на *S. pygenes* се дължат на органичен брой *emm*- генотипове (Metzgar D. & Zampolli A. 2011)

Проучвания установяват взаимна зависимост между клиничния фенотип и доминирането на специфични серотипове сред инвазивните изолати в САЩ и Европа-повечето са M1 и M3. Проучена е и доказана връзката и между фаталния изход при инфекциите и серотипове M1, 3, 12; родилна треска и M28; епидемичен остър ревматизъм - M5 и M18 (**табл.2**); склонност към широкообхватно епидемично протичане-инфекции от M1-типа (Aziz R. et al. 2008; Beres S. et al. 2010; Luca-Harari B.et al. 2009). Серотиповото разнообразие е значително ниско сред инвазивните изолати, в сравнение с изолатите при фарингит (Metzgar D. & Zampolli A. 2011).

3.1.3. Други клетъчно асоциирани адхезини

Свързването на GAS към фарингеалните или кожните епителни клетки е най-важната начална стъпка в колонизацията на гостоприемника (Cunningham M. 2000). Първоначалният контакт се реализира посредством взаимодействие между бактериални адхезини и еукариотните клетъчни рецептори от рода на интегрини, фибриноген, колаген и екстрацелуларни матриксни протеини (фибронектин, ламинин, витронектин). Всеки отделен щам на GAS кодира множество високополиморфни протеини (Sitkiewicz I. et al. 2010). Проучена е ролята на липотейхоевата киселина (LTA) (Cunningham M. 2010). По-съвременни проучвания посочват поне 11 различни адхезина с участие в прикрепянето на бактериалната клетка към епителa, вкл. M-protein – LTA, протеин F/Sfb, 29 kDa фибронектин-свързващ протеин, глицералдехид-3-фосфат-дехидрогеназа, 70 kDa галактозо-свързващ

протеин, витронектин-свързващ протеин, колаген-свързващ протеин, серумен опалесциращ фактор, 54 kDa фибронектин свързващ протеин, FBP54, хиалуронова капсула, т.е. първата и най-важна стъпка към инфекцията е мултифакторно обусловена (Cunningham M. 2000).

Таблица 2. Асоциации между клиничната изява на стрептококовата инфекция и М-типа на *S. pyogenes* (Metzgar D. & Zampolli A. 2011)

Клинична изява	**М-тип**
Фарингит	M1,M3,M5,M6,M12,M14, M17,M19,M24
Остър ревматизъм	M1, M3, M5, M6, M11, M12, M14, M17, M18,M19, M24, M27,M29, M30, M32, M41
Епидемичен остър ревматизъм	M5,M18
Епидемии с широко разпространение	M1
Некротизиращ фасциит	M1, M3, M28
Остър стрептококов токсичен шоков синдром	M1, M3
Импетиго	M33, M41, M42, M52,M53, M70
Пуерперален сепсис	M28
Остър гломерулонефрит	M1, M4, M12, M49, M55, M57, M60
Менингит	M1, M12

Фибронектин-свързващите протеини prtF1 и prtF2 са функционално свързани, но структурно различни. Взаимодействието на prtF1 с фибронектина върху епителните клетки е първата стъпка за бактериалната интернализация (Passali D.et al. 2007). Според някои проучвания prtF1 и prtF2 са главните фактори на вирулентност, които позволяват навлизането на бактериите в респираторните епителниите клетки (Cunningham M. 2000).

Счита се, че има тясна връзка между генът за фибронектин-свързващ протеин (prtF1) и безсимтомното стрептококово носителство, тъй като 90% от щамовете при здрави носители притежават този ген, както и пациенти с персистираща стрептококова колонизация след неуспешна терапия (Neeman R. et al. 1998). Освен това, присъствието на prtF1 се свързва негативно с фомирането на биофилм при *S. pyogenes* (Baldassarri L. et al. 2006).

Според други изследвания, генът *prtF1* се среща много по-често при еритромицин резистентните щамове (89%) (Facinelli B. et al. 2001; Martin J. 2016).

След началния контакт с епителните клетки на назофарингеалната мукоза, бактериите инвазират тъканите и често се дисеминират, предизвиквайки системни реакции в организма. Множество класове фактори на вирулентност на GAS като протеази, ДНК-ази и пирогенни токсини (суперантигени) вземат участие във взаимодействията между бактериите и гостоприемника след фазата на прикрепване (Borek A. et al. 2011; TeraoY. 2012)

3.2. Екстрацелуларни фактори на вирулентност (секретирани от живата клетка)

3.2.1. Хемолизини

Към екстрацелуларните продукти на GAS се отнася **стрептолизин О**, един цитолитичен токсин, който уврежда полиморфонуклеарни левкоцити, тромбоцити, макрофаги, както и митихондрии и лизозоми. Действието му е най-добре проучено при еритроцити, където чрез перфориране на клетъчните мембрани, предизвиква изтичане на хемоглобина. Има токсичен ефект чрез ултраструктурни промени и в миокардните клетки. Вследствие значителната си антигенност при естествена инфекция у хора, той е най-широко прилаганият серологичен маркер (ASO-титър) в диагностиката на

стрептококовите заболявания и техните късни усложнения - ревматизъм и остър постстрептококов гломерулонефрит (Стоянова М. 1984).

Стрептолизин S е свързан със стрептококовата клетка хемолизин, притежаващ аналогични свойства на стрептолизин О, но не е антигенен (Стоянова М. 1984). Най-съвременни проучвания откриват протектиращата роля на двата хемолизина на GAS при т. нар. ксенофагия при интернализацията на GAS във фарингеални епителни клетки като част от локалната естествена резистентост при стрептококови инфекции (O'Seaghdha M. & Wessels M. 2013)

3.2.2. ДНК-ази

ДНК- азите са сред най-важните фактори на вирулентност, тъй като тяхното действие е насочено към молекулата на ДНК, който е критичен елемент за съществуването на всяка клетка. Смята се, че ДНК' аза се произвежда от всечки тествани щамове (Podbielski et al. 1996). Известни са 4 вида ДНК'ази (A,B,C,D) като най-често срещаната е ДНК-аза В срещу, който се образуват антитела (Eriksson A. et al. 1999).

Антителата срещу ДНК-аза В (ADNB) в случаите на остър постстрептококов гломерулонефрит, последващ кожни инфекции, причинени от GAS или след импетиго, са увеличени, за разлика от ASO-титъра и представляват ценен диагностичен маркер (Kim S. et al. 2011)

3.2.3. Стрептокиназа

Стрептокиназа (SKa) е антигенен протеин, секретиран от *S. pyogenes*. Тя индуцира възпалителен отговор чрез активиране на комплемента, което вероятно играе роля в постстрептококовите усложнения (Molaee N.et al. 2013).

3.2.4. Пирогенни (еритрогенни) екзотоксини

Стрептококовите пирогенните екзотоксини (streptococcal pyrogenic exotoxins- **spe**) принадлежат към семейството на суперантигените, които се асоциират с STSS. Суперангигените са мощни имуностимулатори, които се свързват едновременно с Т-клетките и антиген-предствящите клетки. Това свързване води до повишена секретиция на цитокини (тумornекротизиращ фактор- TNF, интерлевкин-1) и Т-клетъчни медиатори (интерлевкин-2, интерерон-гама). Неконтролируемото освобождаване на тези имуномодулатори води до хипотензия и мултиорганна недостъчност (Bisno A. et al 2003).

Стрептококовите пирогенни екзотоксини са разграничени и проучени в 4 антигенни групи –A, B, C, D. Типове A, B, C са добре проучени, като тип B е доказано протеаза (Cunningham M. 2000; Chiang-Ni C.& Wu J. 2008).

❖ **SpeB – суперантиген с протеазна активност**

Преди е описван като екзотоксин, днес е известно, че SPEB е протеаза (Chiang-Ni C.& Wu J. 2008). SPEB разцепва или разгражда екстрацелуларния матрикс в тъканите на инфектирания човек, имуноглобулини, компоненти на комплемента и дори повърхностни адхезини на *S. pyogenes* (M протеин, протеин F1, C5a-пептидазата и няколко секретирани протеина) (Nomizu M. et al. 2001).

Предполага се, че разрушаването на протеини на имунната система на гостоприемника и редица бактериални протеини помага на патогенния агент да избегне имунното очистване, да инвазира по-дълбоко разположени тъкани и да дисеминира от мястото на първичната инфекция. *SpeB* е хромозомно-кодиран. Нуклеотидната му последователност е във висока степен консервативна. Въпреки, че всички щамове *S. pyogenes* притежават s*peB*-

гена, само около 25-40% от анализираните щамове продуцират малко количество SPEB или не го експресират изобщо. Повечето от стрептококов токсичен шоков синдром (STSS)-асоциирани щамове не експресират SPEB, в сравнение с неинвазивните. Молекулярните механизми и биологичната значимост на SPEB -несекретиращите щамове са все още неизвестни (Chiang-Ni C.& Wu J. 2008)

❖ Стрептококови суперантигени

Стрептококовите пирогенни езкотоксини, наречени още еритрогенни токсини, са добре проучени с пирогенната си активност, усилване на ендотоксичния шок и суперантигенен ефект върху имунната система (Cunningham M. 2000). Понастоящем се разграничават и са проучени 11 суперантигена: SPEA, SPEC, SPEG, SPEH, SPEI, SPEJ, SPEK, SPEL, SPEM, Стрептококов суперантиген А (SSA), и стрептококов митогенен екзотоксин Z (SMEZ) (Cunningham M. 2000; Bisno A. et al 2003).

Установено е, че генът, кодиращ speA се открива в повечето изследвани стрептококови изолати от случаите на стрептококов токсичен шок, а генът, кодиращ SpeB-в 100% (Hauser A. et al. 1991).

Те са хомоложни с други пирогенни екзотоксини, като стафилококовите ентеротоксини А и С. Гените *speA* и *speC* са кодирани върху бактериофаг (Cunningham M. 2000). Според някои автори генът *speA* се среща предимно при щамове с тип-*emm*1, докато при други типове е значително по-рядък (Rantala S. et al. 2012). Генът *speC* се среща значително по-често в педиатричната популация (деца с фарингити или асимпомно носителство) отколкото при инвазивни изолати (Passali D. et al. 2007).

В групата на пирогеннните екзотоксини са включени още митогенен фактор F (SpeF), за който има данни, че може да има нуклеазна активност (Eriksson A. et al. 1999; CunninghamM. 2000).

Съществуват данни, че кумулативният ефект от експресията на специфични суперантигени, а не *emm*-типа на *S. pyogenes* корелира с инвазивния потенциал на щамовете GAS (Lintges M. et al. 2010).

Определяне на молекулярно-генетичния профил на щамовете по отношение на 11-те описани досега гена може да бъде използвано като метод на типизиране, снабдяващ с ценна информация относно клиничния изход при инфекциите от изследваните стрептококови изолати (Lintges M. et al. 2010)

3.2.5. Протеази

В допълнение на литичния ефект от **SPEB -протеазата** върху тъканите на инфектиран с GAS се установява и богат набор от протеолитични ензими въвлечени в модулиране на имунния отговор (Sitkiewicz I. et al. 2010)

C5A-пептидазата разцепва хемотаксичния компонент на комплемента C5A и инхибира привличането на фагоцитните клетки до мястото на инфекцията (Cunningham M. 2000).

SpyCEP (ScpC) катализира разцепването и инактивирането на хемокина IL-8, също нарушавайки привличането на очистване, както и допринася за дисеминиране от меките тъкани (Zingaretti C. et al. 2010).

Чрез протеомен анализ е установено, че повечето патогенни щамове *S. pyogenes* секретират протеин нар. **Mac** , който се свързва с CD16 на човешките PMN, инхибира фагоцитозата и продукцията на реактивен кислород и така спомага на *S. pyogenes* да избегне действието на PMN (Lei B.

et al. 2001). Други изследвания демонстрират, че **mac** има и протеазна активност срещу човешките IgG (von Pawel Rammingen U. et al. 2002)

❖ **Стрептококов инхибитор на комплемента** (**SIC**)

SIC е описан през 1996г. като инхибир на системата на комплемента блокиращ C5b-C9 мембранно-атакуващия комплекс (Fernie- King B. et al.). Генът, кодиращ този протеин е с изразен полиморфизъм и се използва в молекулярни проучвания за разработване на *sic*-генното секвениране като метод на типизиране за установяване на епидемиологично свързани щамове (Efstratiou A. 2000). IdeS/MAC разцепва човешкия IgG и блокира фагоцитозата (Sitkiewicz I.& Hryniewiecz W. 2010).

3.3. **Биофилм**

Доказано е, че *S. pyogenes* образува биофилм, който се свързва пряко с намалена чувствителност към антимикробни средства и такава към действието на клетките и факторите на имунната система. Отговорен е също за дълго персистираща микробна колонизация и рецидивиращи инфекции (Cevallos M. 2008; Hall-Stoodley L. et al .2004; Gergova R. et al. 2015; Gergova R**.** et al. 2016; Usha H. et al. 2010). Проучванията показват, че щамове изолирани от пациенти с неуспех при лечение, формират биофилм *in vitro* и имат по-високи МИК към стандартно използваните за лечение антибиотици (Lembke C.et al. 2006).

Таблица 3. Участие на отделни фактори на вирулентността на *S. pyogenes* и техните вероятни ефекти при различни клинични изяви на инфекция

Клинична изява	**Фактор на вирулентност**	**Ефект**	**Референции**
Скарлатина	SPEA, SPEC SPEB	Обрив, малинов език, десквамация на кожата; дисеминиране от мястото на първична инфекция, участие в патогенезата на острия постстрептококов гломерулонефрит	Cuningam, 2000 Chiang-Ni, 2008
STSS Кожни инфекции Некротизииращ фасции Тонзилит Пневмония Пуерперален сепсис Бактериемия Салпингит Артрит,Пиомиозит Менингит, Перитонит Ендокардит	M-тип; Експресия на гени от Sag-генния профил: (SPEA,SPEC,SPEG, SPEH,SPEI,SPEJ, SPEK,SPEL,SPEM, SSA,SMEZ); slaA***	Активиране на имунен отговор чрез индуциране продукцията на проинфламаторни цитокини (TNFα,β, γIFN, IL-1,2,6) от човешки макрофаги и Т-лимфоцити, последващ шок и органна недостатъчност	Kittang, 2011 Efstratiou, 2000 Luca-Harari,2009
Инфекции с тежко клинично протичане	M-тип; капсулна хиперпродукция (мукоидна морфология)	Адхезия към гостоприемниковите Клетки; Резистентност към фагоцитоза; Некротични лезии в животински модел	Tamayo, 2010

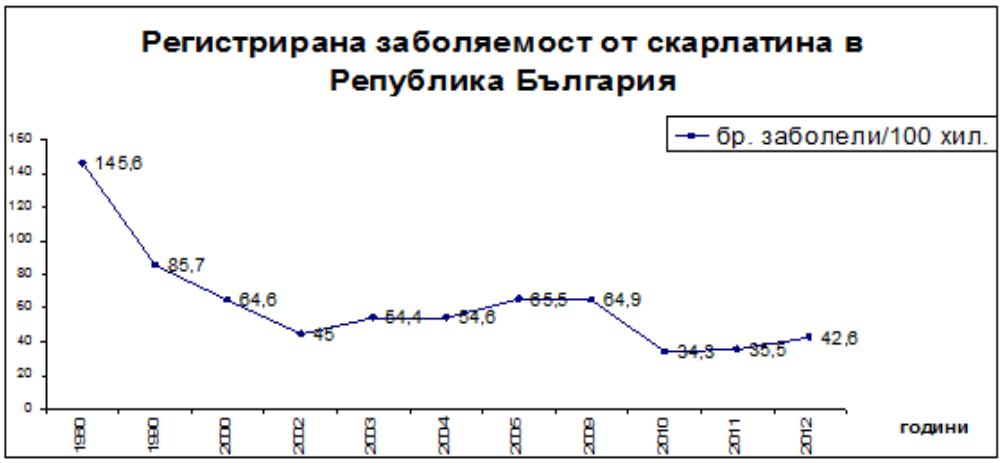
4. Клиничен спектър на инфекциите причинени от *S. pyogenes*

S. pyogenes принадлежи към микробните видове с най-висока вирулентност, причиняващи инфекции със склонност към епидемично протичане (Wong S. & Yuen K. 2012). Тежестта на клиничните прояви на стрептококовата инфекция варират в много широк диапазон: от по-леко протичащи тонзилофарингити или гнойни инфекции на кожата (импетиго, пиодермия, еризипел), инфекции със системно протичане (скарлатина), до тежки, инвазивни, животозастрашаващи (абсцедиращи процеси, токсичен шоков синдром, некротизиращ фасциит, сепсис) (**табл.4**) (Barnett T. et al. 2015; Sitkiewicz I. & Hryniewicz W. 2010; Sowerby L. et al. 2013; Walker M. et al. 2014). Усложненията, които се наблюдават, са два вида: най-често перитонзиларни или други абсцеси, вследствие на инвазивния характер на стрептококовата инфекция и по-рядко неинвазивни, негнойни, но трудни за диагностициране и терапевтично повлияване постстрептококови автоимунни усложнения като остър постстрептококов гломерулонефрит, остър ревматизъм, реактивен артирт, псориазис, болест на Кавазаки (тежък системен васкулит с последващи сърдечно-съдови увреждания и развитие на аневризма у деца). Понякога стрептококвите инфекции започват като доброкачествено протичащи, но при неправилна диагноза, лечение или рецидивиране на инфекцията се усложняват (Descheemaeker et P. al. 2000; Proft and Fraser 2016; Sitkiewicz I. & Hryniewicz W. 2010; Wong S. et al. 2012). Някои от тези усложнения са с висок леталитет, над 15% или инвалидизиране на пациента (Carapetis J. et al. 2005; McMillan D. et al. 2013). GAS ежегодно заразяват повече от 600-700 млн. хора с респираторни и кожни инфекции по целия свят, в т.ч. се развиват около 650 000 инвазивни инфекции, включително и некротизиращ фасциит и в резултат от тежките

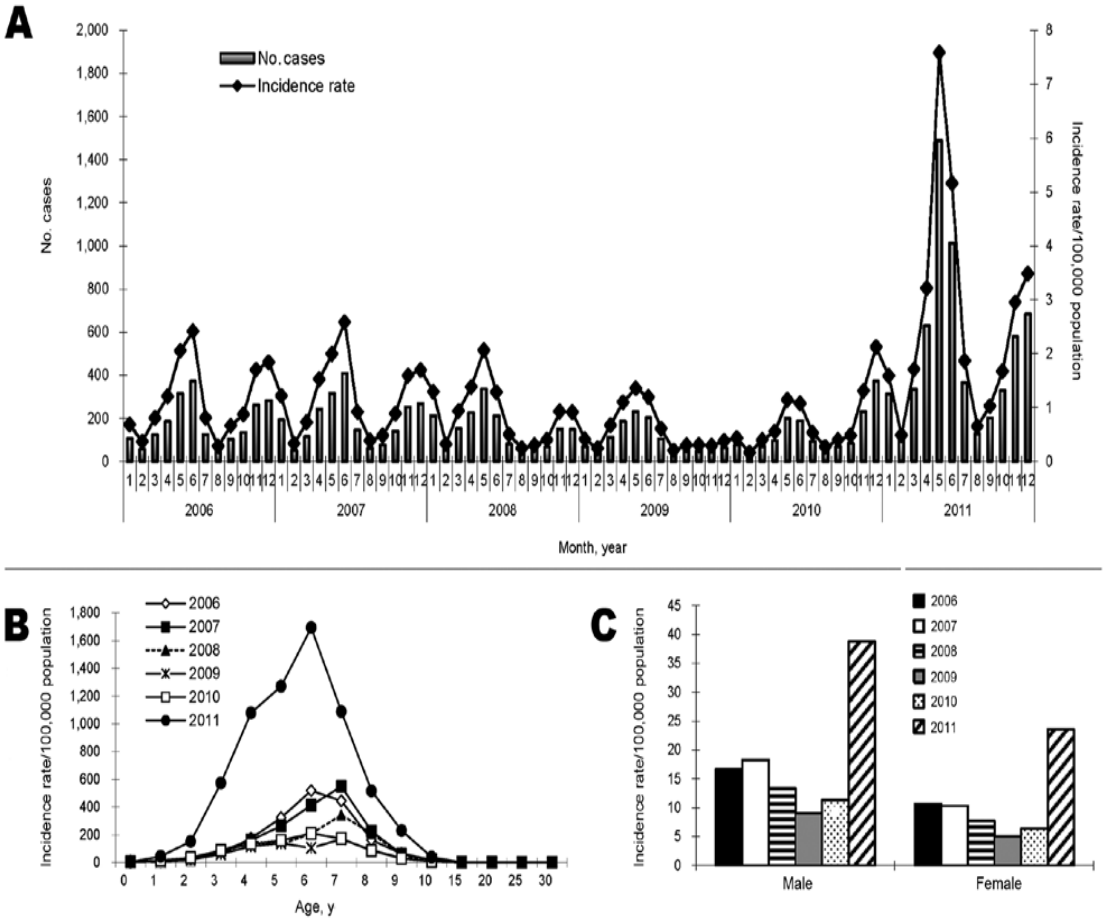
стрептококови инфекции над 500 000 случая завършват летално (Carapetis J. et al. 2005;Wong S. & Yuen K. 2012). Има данни, че 10 – 23% от болните с GAS инвазивни инфекции умират преди 7мия ден от развитието на инфекцията (Wong S. & Yuen K. 2012). Над 15% от децата ученици и 5-10% от възрастните в развитите страни се засягат от стрептококови инфекции, а в развиващите се страни честотата около е 7 пъти по-голяма (Gergova R. et al. 2015; Segal N. et al. 2005; Wong S. & Yuen K. 2012). Според данни на Центъра за превенция и контрол на инфекциозните заболяваня в САЩ, за 2005 г. има общо 15.6 млн. случаи с ревмокардит, от които 282 000 са новооткрити усложнения на GAS инфекции, а ежегодната смъртност от това заболяване е около 233 000 човека (Leclercq R. 2002; Wong S. & Yuen K. 2012).

Епидемиологичните проучвания не са установили с категоричност кои са причините, довели до предшестващото понижаване на заболяемостта и смъртността от стрептококови инфекции. Съществуват известни индикации, че повторяемите инфекции от подобни М-типове повсеместно, засягащи населението в детска възраст в продължение на десетилетия и поколения, водят до известна степен към придобит имунитет. Обсъжда се и възможна еволюция на щамовете GAS към по-слабо вирулентни, но не и по-слабо инфекциозни варианти. Микробните фактори наред с намаляване на пренаселеността в индустриализираните страни, могат частично да обяснят спада в тежестта на стрептококовите инфекции (Quinn R. 1982).

В България стрептококовата инфекция, подлежаща на задължителна регистрация, съобщаване и отчет, е скарлатината Наредба № 21 за реда за регистрация, съобщаване и отчет на заразните болести. Издадена от МЗ,Обн. ДВ. бр.62 от 29 Юли 2005г., изм. ДВ. бр.52 от 8 Юли 2011г. Справка с официалната здравна статистика разкрива следната динамика на заболяемостта от скарлатина в България, представена на **Фиг.5.**



Фиг. 5. Заболяемост от скарлатина в България през периода 1980-2012г. (НЦОЗА, НЦЗИ, НЦЗПБ)



Фиг. 6. Заболяемост от скарлатина през 2006 – 2011 в Китай (Yang P. et al. 2013)
A. разпределение по месеци и години; **B.** възрастово разпределение;
C. разпределение по пол и години (по данни от СЗО)

В български проучвания за определени региони на страната се посочва, че заболяемостта от скарлатина е с епидемични стойности и неконтролирано разпространение на този етап (Халова Б. 2012; автореферат).

След въвеждане на антибиотичната употреба през 40-те години на миналия век, инвазивните инфекции с GAS намаляват за период от около 40-50 години. След успокоението, че стрептококовите инфекции вече не са сериозен здравен проблем след въвеждане на пеницилиновата терапия, отново в края на века се появяват съобщения за нови случаи на тежко протичащи GAS инфекции. Случаите са докладвани основно от САЩ и Европа,пораждайки опасения, че се появяват нови клонове с по-висока вирулентност (Lamagni et al. 2005; Lee G. & Wessels M. 2006; Schwartz B. et al. 1990). През 80-те години започва глобално разпространение на хипервирулентни щамове (принадлежащи към серотип M1T1), причиняващи инвазивни инфекции (Aziz R. & Kotb M. 2008) и локално повишена заболяемост от ревматизъм (Smoot J. et al. 2002; Smoot L. et al. 2002). Сравнителен геномен анализ при епидемия от GAS в Канада разкриват нови данни от популационната генетика. Популацията на GAS - щамовете не е статична, а се формира от множество субпопулации в рамките на специфичните *emm*-типове. Всяка епидемия се причинява от рязка смяна на типа (Beres S. et al. 2010) . Това може да обясни традиционните познати в епидемиологията цикли от 4-7 години в епидемиите, причинени от GAS. Ключова особеност на *emm1* клоновете е способността да превключват бързо към хипервирулентен фенотип по време на инфекция, установено с методите на транскрипционния и протеомен анализ (Lynskey N. et al. 2011), довеждащи до транскрипционни промени, които се явяват жизненоважни за индуциране на хипервирулентност на циркулиращия клон (Aziz R. et al. 2010)

S. pyogenes става много актуален етиологичен агент през последнитегодини, както в България, така и в други страни по света, но причините за ренесанса на стрептококовите инфекции все още не са изяснени (Р. Гергова и съавт. 2013a; Р. Гергова и съавт. 2013b; Aziz R. & Kotb M. 2008; Gergova et al. 2015; Lamagni et al. 2008; Sitkiewicz I. & Hryniewiecz W. 2010). Въвеждането на ваксините от началото на 2010 г. срещу *S. pneumoniae u H. influenzae type b* в имунизационния календар на Република България насочват вниманието в посока за възможна промяна на типичните етиологични причинители на определени инфекции, както се наблюдава и в други страни от Европа, особено в оториноларингологията (Сечанова Л. и съавт. 2015; Pumarola F. et al. 2013; Setchanova L. et al. 2012;Setchanova L. et al. 2013a; Setchanova L. et al. 2013b)

Нуждата от по-ефективни антибиотици и в идеалния случай разработването на ваксина, осигуряваща протективен имунитет срещу доминиращите инвазивни серотипове е водеща в академичните проучвания на *S. pyogenes*. В по-слабо развитите страни не се наблюдава доминиращо разпространение на единични хипервирулентни клонове и главната заплаха при заболявания, причинени от GAS, остава ревматичната болест (Lynskey N. et al. 2011).

4.1. Стрептококов тонзилофарингит

S. pyogenes е най-често срещаният причинител на остър, бактериален тонзилофарингит, като причинява 15-30 % от фарингитите при деца, най-често в предучилищна и ранна юношеска възраст и при 5-10 % от заболелите възрастни (Gergova R. et al. 2015; Segal N. et al. 2005; Wong S. & Yuen K. 2012). Инкубационният период на стрептококовия фарингит е от 2-5 дни. Тонзилофарингитът протича с остро начало, висока температура и изразен токсико-инфекциозен синдром. Локалните възпалителни промени варират от

катарално възпаление до тежко изразено, гнойно, което понякога се усложнява с перитонзиларен абсцес. Тонзилофарингитите, които са най-чести през есенно-зимния сезон се свързват с по-късни усложния като остър ревматизъм. За разлика от тях пиодермиите и еризипела, които са най-чести през летния сезон, се усложняват с остър постстрептококов гломерулонефрит, защото холестрола в дермалните клетки неутрализира част от токсините и възпрепятства развитието на ревматични усложнения. (Стоянова М. 1984; CunninghamM 2000).

Най-честите серотипове свързани с тонзилофарингити и ревматизъм са M1, M3, M5, M6, M14, M18, M19. М-типовете 2, 49, 57, 59, 60 и 61 се свързват с нефритни усложнения след пиодермия и еризипел (Cunningham M.2000).

4.2. Асимптоматично носителство на *S. pyogenes*

Смята, че 12% от децата в училищна възраст и 5% от възрастните са асимпоматични носители на *S. pyogenes* (Efstratiou A. & Lamagni T. 2017; Shaikh N. et al. 2010). Това носителство може да продължи с години без развитие на заболяване. Хората, при които се наблюдава стрептококово носителство (хронична, асимптоматична назофарингеална колонизация) обикновено не са заразоносители, тъй имат малък резервоар от слабо или авирулентни щамове (Kasper K. et al. 2014).

Не съществува точно определение на термина “носителство”. Някои автори смятат, че като носители се определят пациенти, които дават положителнен растеж на посявка от гърлен секрет, но са асимптоматични. Според други автори терминът се отнася за пациенти, които дават положителнен растеж на посявка от гърлен секрет, но без да развиват активен имунологичен отговор (покачване на AST или антиДНК’аза Б антитела) (DeMuri G. & Wald E. 2014).

Преобладава схващането, че носителството на *S. pyogenes* носи малък риск/ или не носи от развитие на автоимунни усложенения (Oliver J. et al.

2018; Zacharioudaki M. & Galanakis E. 2017; DeMuri G. & Wald E. 2014), затова не се пропоръчва санирането му с антимикробни средства (Shulman S. et al. 2012).

Ерадикация на стрептококовото носителство се препоръчва при деца попадащи в рискова група (фамилна анамнеза от ревматично заболяване или локално повишена заболяваемост от фарингит) (Martin J. 2016)

Терапията включва пеницилин в комбинация с рифампин или монотерапия с клиндамицин (Zacharioudaki M. & Galanakis E. 2017; Martin J. 2016), тъй като антимикробната терапия при стрепткоковия тонзилофарингит не ефективна за ерадикция на *S. pyogenes* при носителоство (Roberts A. et al. 2012).

4.3. Скарлатина

Скарлатината е инфекциозно, системно, токсин-медиирано заболяване, протичащо с характерен симптомокомплекс от кожен обрив и остър стрептококов тонзилофарингит. Заболяването е описано още през 17-ти век от Sydenham (Goodall E. 1926; Dochez A. 1925). През 19 ти век причинява епидемии с висока смъртност в Европа и Северна Америка, които затихват едва след откриването на пеницилина през 1943г. (Wessels M. 2016). Епидемиите от скарлатина бяха все по-редки през XX век, но през последното десетилиетие отново се докладваха нови епидемии във Виетнам (2009г.), Великобритания (2011г.), Испания (2011г.), Китай (2011г.), Канада (2012г.), САЩ (2012г.), Хонконг (2012г.) (Wong S. & Yuen K. 2012). В Пекин през 2011г. беше докладвано над 6000 случая на скарлатина, като стойностите бяха епидемични през сезоните пролет-лято и бяха засегнати предимно деца под 10г. възраст (**фиг. 6**) (Yang P. et al. 2013).

Смята се, че щамовете причиняващи скарлатина притежават гени за един или повече пирогенни екзотоксини A, B, C, известни днес като стрептококови суперантигени. Тези токсини водят до увреждане на малките

кръвоносни съдове, респ. микроциркулацията в кожата и характерният обрив, зачервяване и десквамация, наблюдавани при скаралатина (Cunningham M. 2000). Наличието на повече гени за екзотоксини води до кумулативен ефект и по-тежко протичане на заболяването. Проучанията показват тясна връзка между щамовете носещи гените *ssa, speA* и *speC* и скарлатина (Silva-Costa C.et al. 2014).

4.4. Стрептококови кожни инфекции - еризипел и пиодермия

Кожните инфекции са сезонни, обикновено се наблюдават през летните месеци. Щамовете приняващи кожни инфекции са различни от тези, които причиняват тонзилофарингити и остра ревматична болест (Cunningham M. 2000). Те са силно нефритогенни и могат да доведат до усложнение като остър постстрептококов гломерулонефрит. Входна врата на инфекцията са най- често локални травми по тялото (Bisno A. & Stevens D. 1996).

4.5. Автоимунни усложенения: остра ревматична болест и остър постстрептококов гломерулонефрит

Острият ревматизъм е автоимунно заболяване, което се развива след прекарана инфекция от *S. pyogenes* (най-често бактериален фарингит или скарлатина). Ревматизмът се счита за най-честата причина за придобити сърдечни заболявания при деца в училищна възраст, по целият свят. Среща се най-често в по-слабо развитите страни, поради недостатъчната профилактика на стрептококовите инфекции. Региони с повишена честота на ревматизъм са Южна Африка, Северна Австралия (аборигените), Хавай, Шри Ланка и др. , където се достига до над 20 заболели на 1000 в сравнение с общностите в развития свят с адекватен достъп до медицинска помощ, където честотата е 0,2-0,5 случая на 1000. Най-често засяга деца на възраст 5-15 години и настъпва приблизително 14-28 дни след бактериален фарингит или скарлатина.

Таблица 4. Клинични изяви при стрептококови инфекции (Cole J. et al. 2011)

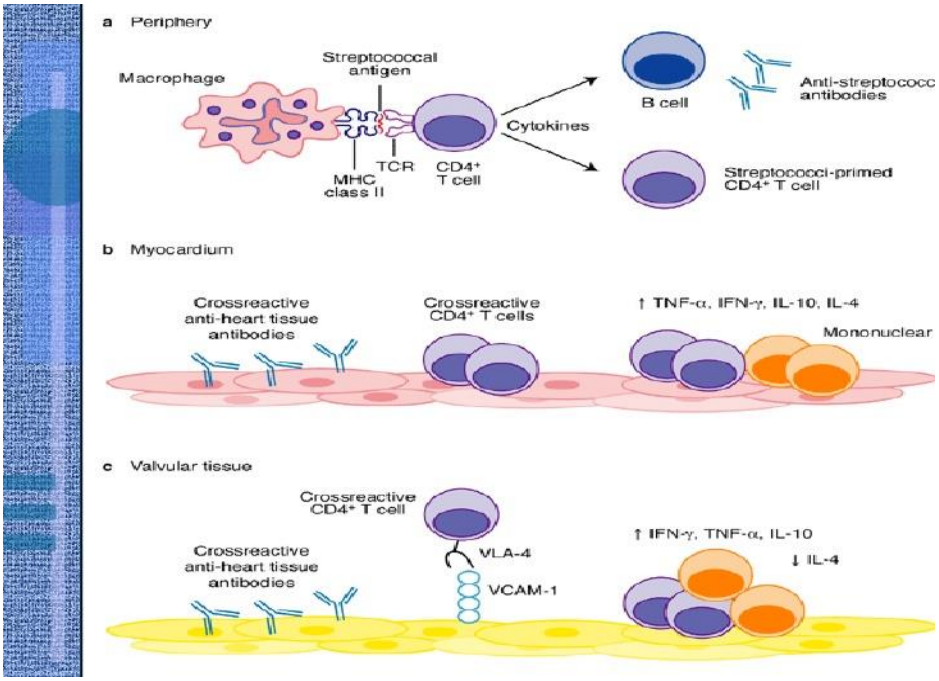
Заболяване	Симптоми
I. Суперфициални	
1. Фарингит	Болки в гърлото, висока температура, гнойни налепи по сливиците
2. Импетиго	Суперфициални, не-фоликулярни пустули
II. Автоимунни усложения	
• Ревматична болест на сърцето	Увреждане на митрална или аортна клапа, развитие на митрална стеноза
• Остра ревматична болест	Увреждане на сърцето, вулвит, артрит, хорея,erythema marginatum
• Остър постстрептококов гломерулонефрит	Хематурия, оток, хипертония, след прекаран стрептококов фарингит или пиодермия
III. Инвазивни	
1. Стрептококов токсик шок синдром	Висока температура, хипотония, мултиорганна недостатъчност
2. Бактериемия	Висока температура, гадене, повръщане
3. Некротизиращ фасциит	Висока температура, бързо разрушаване на фасциите, мускулите и прилежащата тъкан
4. Целулит	Зачервяване и възпаление на кожата, свързана с болка и оток
5. Септичен артрит	Висока температура, възпалени стави на долните крайници
6. Следродилен сепсис	Поддържане на висока температура след раждане или повтарящи си покачвания до 10 дни след раждане, или аборт
7. Други: менингит, пневмония, остиомиелит, перитинзиларен абцес	Изразен токсико-инфекциозен синдром и конкретни симптоми според локализацията

Това е времето, което е необходимо на инфектираният организъм за изработването на антитела срещу повърхностните антигени и токсичните продукти на GAS, някои от които са сходни с човешки антигени и по-късно образуваните срещу тях кръстосано реагиращи имуноглобулини или вече готовите имунни комплекси атакуват определени тъкани и малки кръвоносни съдове (**Фиг.7**) (Cunningham M. 2000; Lynskey N. et al. 2011, Стоянова М. 1984). Ревматизмът засяга сърцето, ставите, кожата и нервната система. Съществуват 5 основни клинични прояви, които са известни като критериите на Джоунс. Симптомите включват болки в корема, висока температура (треска), кардиологичен проблем (удължен P- R интервал при електрокардиограма), болки в ставите (артрит), кръвотечение от носа, кожен обрив (erythema marginatum), Хорея на Сиденхам (емоционална нестабилност и неволеви движения, които засягат предимно крайниците) (Cunningham M. 2000).

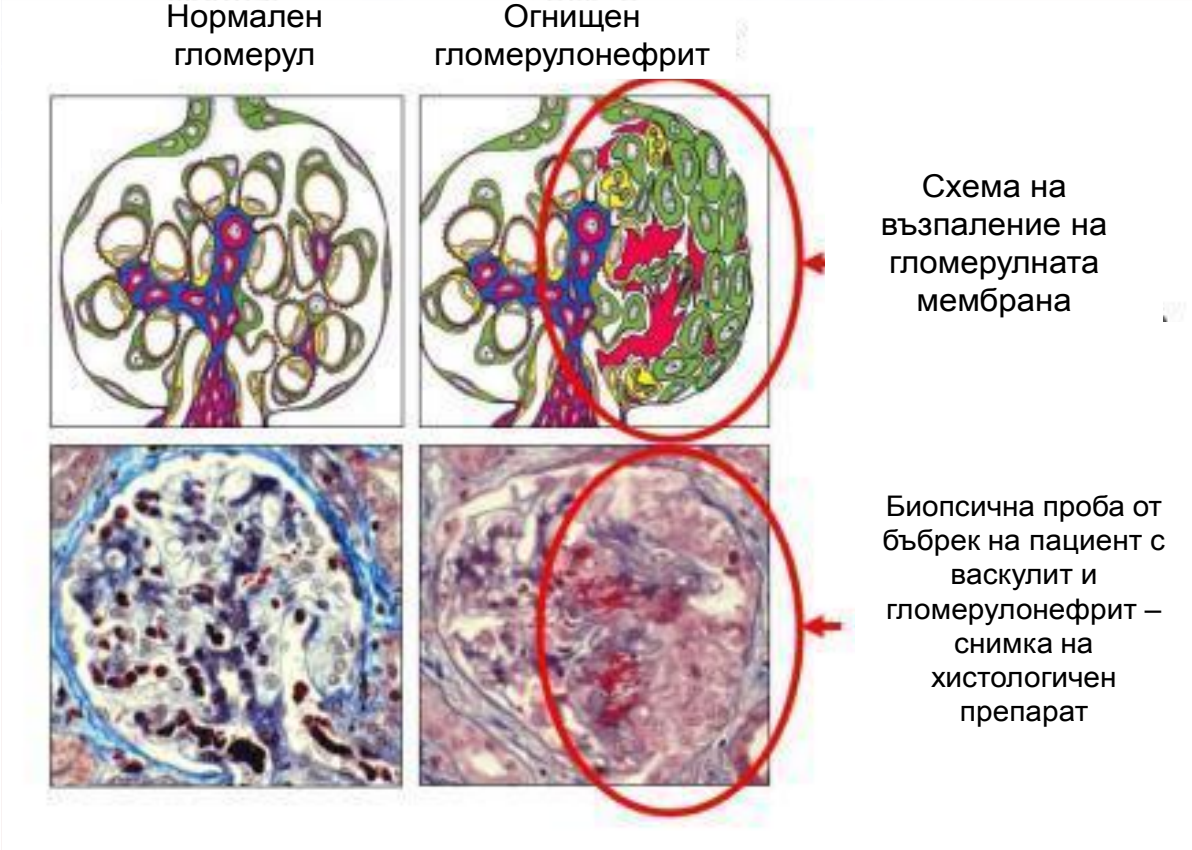
Многобройни проучвания показват, че някои щамове *S. pyogenes* нар. "ревматогенни", носят по- голям риск от развитие на остра ревматична болест. (Esposito S. et al. 2015). Някои от тези типове са: M1, M3, M5, M6, M11, M12, M14, M17, M18, M19, M24, M27, M29, M30, M32, M41 (**табл. 2**) (Metzgar D. & Zampolli A. 2011).

Острият постстрептококов гломерулонефрит се предизвиква от нефритогенни щамове, причинители на стрептококов тонзилофарингит и кожни стрептококови инфекции. Среща се предимно при деца и юноши, 2 пъти по- често при деца от мъжки пол. Заболяването се развива от 1 до 2 седмици след боледуване от тонзилофарингит или 3-4 седмици след бета-стрептококова кожна инфекция. Нефритогенността на щамовете е тясно свързана с специфичните М- типове. Така например най-честите М-типове свързани с кожна инфекция и остър постстрептококов гломерулонефрит са M2, M49, M42, M56, M57, M60, докато свързаните с тонзилофарингит и

гломерулонефрит са M1, M4, M12 и M25, както е отразено в **табл.2** (Cunningham M. 2000). По отношение на патогенезата на заболяването има няколко предположения. Най-разпространено е схващането, че заболяването възниква вследствие на образуване на нефритогенни имунни комплекси, които се образуват в кръвният ток, натрупват се в гломерулите, водят до производство на химични медиатори и цитокини, които активират системата на комплемента и предизвикват възпаление в гломерулите. Антигени за възникването на имунният комплекс могат бъдат: NAPlr (нефрит-свързан плазмин), SPEB (стрептококов пирогенен екзотоксин B), стрептокиназаи др. (Rodriguez-Iturbe B. & Haas M. 2016; Rodriguez-Iturbe B. &Musser J. 2008). SPEB се открива в биопсиите от гломерулите на 67% от пациентите болни от гломерулонефрит, докато нормалните биопсии са позитивни за SPEB само в 16% от случаите (Cunningham M. 2000).

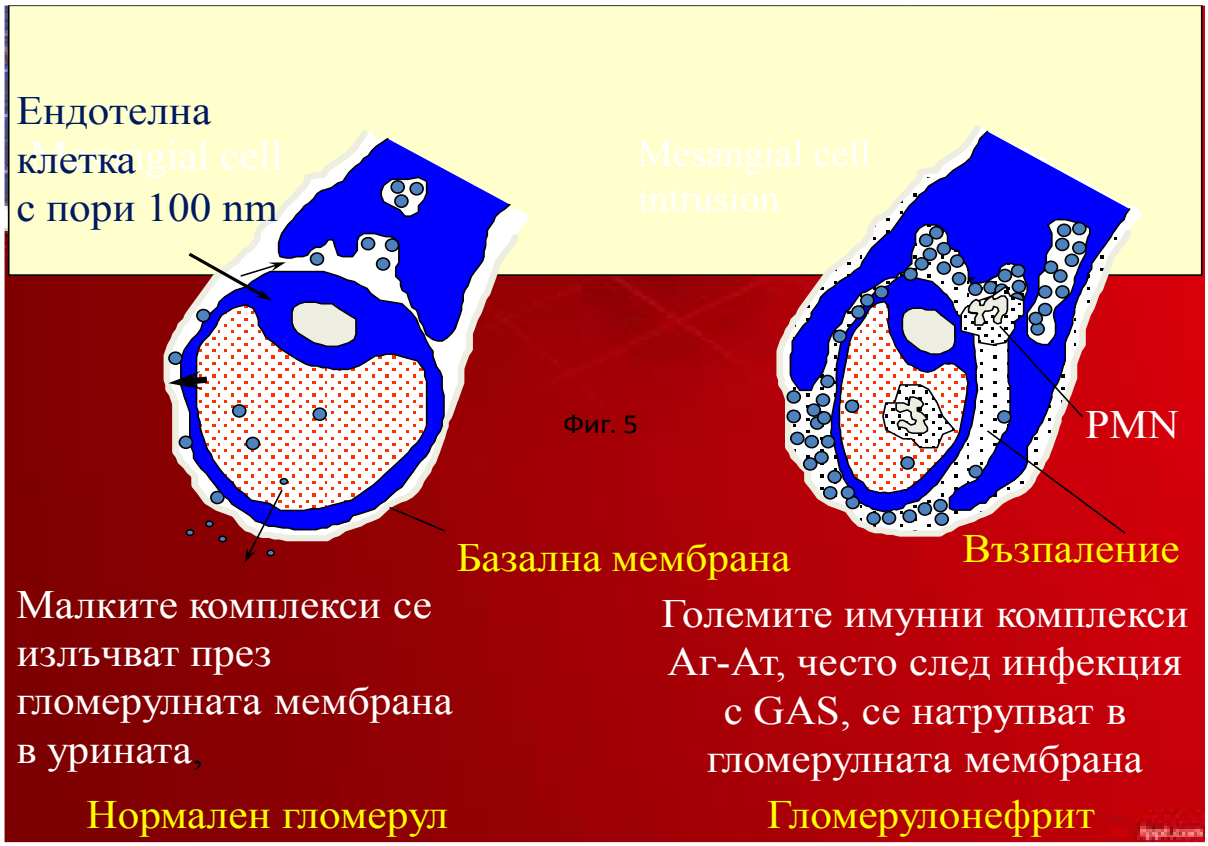


Фиг. 7. Развите на автоимунна реакция при ревмокардит



Фиг. 8.Схема и хистологичен препарат от нормален гломерул и от увреден вследствие на васкулит

Други автори подкрепят хипотезата, че антигенът и антитялото достигат поотделно в бъбреците и се срещат в или извън базалната мембрана на гломерула, предизвиквайки образуване и натрупване на имунен комплекс *in situ* (**Фиг.8 и 9**). Образуването на комплекси *in situ* се благоприятства от катийонните антигени, които проникват улеснено през отрицателно зареденатa базална мембрана на гломерула (Rodriguez-Iturbe B. & Haas M. 2016).



Фиг. 9. Схема на нормален гломерул и гломерулонефртни поражения

4.6. Инвазивнини стрептококови инфекции:некротизиращ фасциит и стрептококов токсик шок синдром (STSS - Streptococcal Toxic Shock Syndrome)

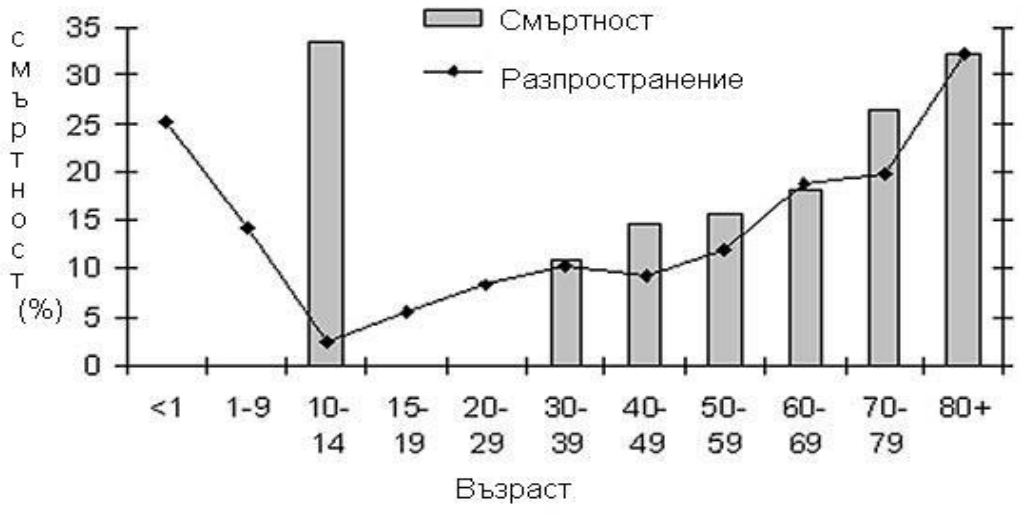
През 1987г. Кон за първи път описва заболяване подобно на стафилококовият шоков синдром нар. Токсичен шок подобен синдром (toxic shock-like syndrome). По-късно през 1989г. STSS е описан подробно от Стивънс (Stevens D. et al. 1989; Stevens D. 1995). Стрептококовият шоков синдром се характеризира с хипотония и мултиорганна недостатъчност. Често протича едновременно с некротизиращ фасциит. Прогресират бързо и се характеризират с висока смъртност - 30-60 % смъртност в рамките на 72-96 часа (Stevens D. 2000; Stevens D. 1995). Проникналите през локални кожни травми GAS, поразяват мускулите, фасциите, вагиналната мукоза, уретрата, много други органи и довеждат до септицемия. Пациенти със

симптоматичен фарингит рядко развиват STSS. Могат да бъдат засегнати хора от всички възрасти, предразполагащи заболявания не са регистрирани (Stevens D. 1995). Най –често срещаните изолати от пациенти с STSS са серотипове: M1, M3, M12, M28 (**Табл.2**). В повечето от случаите се откриват SPEA и SPEB, които предизвикват Т- клетъчна пролиферация и водят до производството на тумор некротизиращ фактор α и β, интерлевкин-1, интерлевкин- 6 , интерлевкин- 2 и гама-интерферон. Пеницилинът е по-малко ефективен поради краткият следантибиотичен период и инокулум ефекта. Затова лечението при STSS включва клиндамицин и интравенозен гамаглобулин (Stevens D. 2000). Според много автори, клиндамицинът подтиска продукцията на токсини от *S. pyogenes* по време на log-фазата (Sawai J. et al. 2007; Coyle A. et al. 2003). Некротизиращият фасциит е животозастрашаваща, меко тъканна инфекция, което може да започне от травма на всяка една анатомична част, но засяга най-често горните и долните крайници (Cunningham M. 2000). Заболяването се характеризира с прогресивно унищожаване на фасциите с честота 2-3 см/ час (Misiakos E. et al. 2014). Именно затова е популярно с назаването „синдром на бактериите, която ядат месо“ (flesh-eating bacteria syndrome) (Misiakos E. et al. 2014).

Инфекцията най-често е смесена с аеробни Грам-негативни бактерии, анаероби или други видове стрептококи. В 70% от случаите болните са с придружаващо заболяване- диабет (Wong C. et al. 2003; Misiakos E.et al. 2014). Други предразполагащи състояния са имуносупресия,хроничен алкохолизъм, хронична бъбречна недостатъчност и чернодробна цироза (Misiakos E. et al. 2014).Инфекцията обикновено започва от хиподермата или повърностните фасции. Синергистичното действие на факторите на вирулентност на причинителя и специфичните фактори на гостоприемника са ключови за развитието на болестта. Инвазивните причинители водят до

тромбоза на съдовете, които се намират в хиподермата и това води до тъканна исхемия. От своя страна, тъканната исхемия спомага за разпространението на инфекцията като се стига до кожна некроза. Според последните проучвания, некротизиращият фастиит може да бъде разделен на 4 типа: Iтип- полимикробен тип, който засяга предимно пациенти с няколко съпътстващи заболявания, като напр. диабет. II тип- мономикробен тип, който се причинява най- често от GAS и по- рядко от *S. aureus*.

Наблюдава се при хора без сериозни съпътстващи заболявания като започва предимно от крайниците. При този тип рискът от STSS е голям. III тип- мономикробни инфекции, причинени най- често от *Clostridium* ssp. VI тип се причинява най-често от *Candida* spp. и *Zygomycetes*. Среща при имунокомпрометирани гостоприемници, след травма. Микробиологича диагноза се получава обикновено при 75% от случаите. Хемокултурите са положителни едва при 25% от пробите, докато пробите взети от мястото на нараняване при хирургична интервенция са положителни при 80 % (Misiakos E. et al. 2014). Проучване направено през 2005г., включващо 306 инвазивни *S. pyogenes* инфекции, показва, че 37% от заболяванията са меко тъканни инфекции, 28% бактериемии, 10% пневмонии и 10% SSTS. От пациентите с меко тъканни инфекции 5% имат миозит, 28% целулит, 68% некротизиращ фасциит (Hollm-Delgado M. et al. 2005).Също така е показано, че 25 % от пневмониите предизвикани от *S. pyogenes* са придружени от SSTS (Sakai T. et al. 2017). Повечето инвазивни GAS инфекции засягат хора на възраст над 40 години (**Фиг.10**) (Hollm-Delgado M. et al. 2005).



Фиг. 10. Разпределение по възраст на заболеваемостта и смъртността от инвазивни стрептококови инфекции (Hollm-Delgado M. et al. 2005)

5. Диагностика на GAS инфекциите

5.1. Класически методи: култивиране и серология

5.1.1. За културелно изследване на пробите от пациенти, в които може да се очаква да се изолира като етиологичен агент *S. pyogenes* се използва кръвен агар (КА), приготвен с добавяне на 5% дефибринирана овнешка кръв. За предпочитане е да се използва Колумбия агар. Пробите от стерилни в норма ниши, особено взети по инвазивен начин трябва да се обогатяват в булон на Тод. Инкубацията на петритата се извършва при температура 35 - 36°C, в атмосфера с повишено съдържание на CO_2 (5-10%) за 24 ч. (Mahon C. et al. 2007). Предварителната идентификация се осъществява въз основа на морфологията на колониите на КА, наличието на β-хемолиза, негативен тест за каталаза, чувствителност към бацитрацин, наличие на пиринидолариламидазна активност и латекс аглутинация за определяне на груповият антиген А (Mahon C. et al. 2007).

5.1.2. С изследването на серумна проба за антистретолизинов титър (ASO) се определя наличието на антитела в серума на пациента срещу цитолитичния екзотоксин стрептолизин О, като за целта има разработени различни варианти на тази реакция – класически вариант с хемолизин и хемолитични система от овнешки еритроцити, латекс аглутинация, турбидиметричен метод. Този тест има важно диагностично и прогностично значение за установяване на стрептококовите инфекции и развитие на техните автоимунни усложнения, особено за риска от ревматизъм и остър постстрептококов гломерулонефрит (Стоянова М. 1984).

5.2. Бързи имунохроматографски методи

Най-често при деца със съмнение за скарлатина или стрептококов тонзилофарингит, суспектната диагноза може бързо да бъде потвърдена при използване на имунхроматографски тест за доказване на груповия антиген А на стрептокока. Бързият имунохроматофраски тест е много лесен, бърз, евтин и полезен метод за скрининг от гърлени секрети, но не е еквивалентен на рутинната микробиологична посявка и не дава представа за антимикробната чувствтелонст. Фалшиво отрицателни резултати се получават, тогава когато броят на бактериите е малък (под 1000 кл/мл) и респ. концентрацията на бактериалните антигени е ниска (Upton A. et al. 2014).

5.3. Молекулярно-генетични методи за бърза детекция директно в проба от пациента

През последните години все по-често се използват молекуляро-генетичните методи в микробиологичната диагностика, както на трудни за култивиране и некултивируеми причинители, така и за бърза детекция на важни етиологични агенти, както и на техни гени за вирулентност и резистентност. Чрез използването на PCR могат да бъдат открити малки концентрации GAS, независимо дали са живи или мъртви. При коректно

изпълнение тази техника е много специфична и чувствителна (Tsatsaronis J. et al. 2014). При използването на ДНК базиран тест за откриване на GAS е важно използването на задължително присъстващи в бактериалния геном елементи. Такива са например гените, кодиращи протеазните инхибитори *speB* и *spyCep* и още една ДНКаза - s*daB* (Ghoname N. et al. 2014.; Shulman S. etal. 2012; Tse H. et al. 2012).

6. Механизми на резистентност на *S. pyogenes* към антимикробни средства

6.1. *S. pyogenes* и чувствителността към пеницилин

Пеницилинът се използва рутинно за лечение на инфекции, причинени от *S. pyogenes* повече от 60 години и е впечатляващо, че въпреки това бактериите са запазили своята чувствителност (Wong S. и Yuen K. 2012; Imöhl M. & van der Linden M. 2015). През последните години се съобщава за бързо покачване на случаите на неуспех при лечение на с бета-лактамни антибиотици (Markowitz M. et al. 1993). В някои региони на света, неуспешното лечение с пеницилин се увеличава драматично и стига стойности до 40% (Brook I. 2013, Passali D. et al. 2007). Счита се, че има няколко причини за това: 1) възможността на този микробен вид за вътреклетъчно персистиране, благодарение на по-изразената капсула и особено, когато е обвит в биофилм, както и слабото проникване на пеницилина в тонзиларните епителните клетки; 2) продукцията на бета-лактамази от други обитатели на горните дихателни пътища, които често се срещат като коколонизатори или ко-участници в инфекциозния процес – такива са *S. aureus, Heamophilus spp, Moraxella cararrhalis,* някои анаероби (Pichichero M. & Casey J. 2007; Cattoir V. 2016; Passali D. et al. 2007; Schaar V. et al. 2013); 3) ранното иницииране на антибиотична терапия също води до потискане на адекватен имунен отговор на гостоприемника и забавя

оздравителните процеси (Pichichero M. & Casey J. 2007); 4) протективната ролята на други нормалните обитатели на ГДП, които отделят бактериоцини и се конкурират за хранителни вещества с патогенните (Brook I. 2013)

6.2. Резистентност към макролиди, линкозамиди, стрептограмини (MLS група)

Макролидите са антибиотици на първи алтернативен избор при алергични пациенти и в случаите на слаб терапевтичен отговор към лечението с пеницилин (Dundar D. et al. 2010; Seppala H. et al. 1992).

Те са група антимикробни средства с химична структура на макроциклични лактони с многочленен пръстен, съдържащ от 14 до 20 атома, базична аминозахар и неутрална захар (**фиг.11**). Продуцират се от бактерии от род *Streptomyces*. Основната химична структура на този клас антибиотици е представена от макроцикличен лактонен пръстен. В зависимост от броя на атомите въглерод в пръстена макролидите се подразделят на 14 - членни (Erythromycin, Clarithromycin, Roxithromycin и др.), 15 - членни (Azithromycin) и 16 - членни (Spiramycin, Josamycin, Midecamycin, Rokitamycin и др.). Класификацията на антибактериални препарати от тази група е представена в **Табл. 5.** Еритромицинът е с 14-членен лактонен пръстен е първият открит и продължително използван в клиничната практика макролид (Kanoh S. & Rubin B. 2010).

Ефект на тяхното действие е спиране на белтъчния синтез в 50S субединицата на бактериалната рибозома. След свързването на макролидния агент с голямата субединица на рибозомата се инхибира тРНК и транслацията на белтъчния продукт във фазата на елонгация, синтезиран от бактериалната клетка. Тази група антимикробни средства е особено предпочитана в педиатричната практика, поради ниската токсичност, фармакокинетичните и фармакодинамичните предимства на новите представители (Leclerc R. 2002).

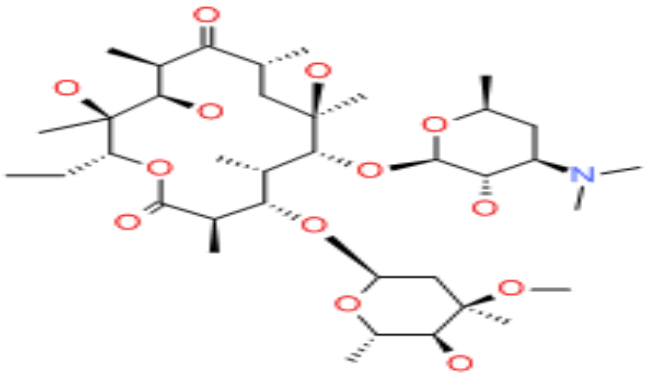
Макролидите проявяват бактериостатичен ефект, но при определени условия (високи концентрации и ниска микробна плътност) е възможен и бактерициден ефект.Те проникват с макрофагите в мястото на възпалението, което води до по-висока концентрация във възпалително огнище, отколкото в серума.Освен антибактериален ефект, макролидите оказват и противовъзпалително и имуномодулиращо действие. Имуномодулиращият ефект провокира активността на неутрофилите и хемотаксиса, опсонизация, фагоцитоза и вътреклетъчно убиване, както и продукцията на възпалителни медиатори и цитокини, което липсва при бета-лактамните антибиотици (Sharma S. et al. 2007). Макролидите и линкозамидите имат различни химична структура, но сходен механизъм на действие. Техният спектър на действие включва Грам положителни коки и пръчковидни бактерии, предимно *Streptococcus sp.p Staphylococcus sp*., *Corynebacterium sp.*, Грам-отрицателни коки (*Neisseria spp.)* и интрацелуларни бактерии като *Chlamydia* и *Rickettsia spp*. (Leclercq R. 2002). За разлика от пеницилина, ефикасността на клиндамицина не се влияе от размера на инокулума и растежната фаза на бактериите във възпалителното огнище (Stevens D. 1995). Клиндамицинът също така супресира синтеза на токсини и инхибира синтеза на М-протеина, чрез последния механизъм вероятно подпомага фагоцитозата на GAS (Stevens D. 1995) и намира приложение в лечението на тежки стрептококови мекотъканни инфекции (Villaseñor-Sierraa A. et al. 2012).

През последните години се съобщава за бързо нарастване на макролидната резистентност както в Европа, така и в страните извън нея: Франция (22.4%) (Bingen E. et al. 2004), Финландия (22%) (Pesola A. et al. 2015), Испания (32%) (Rubio-Lopez V. et al. 2012), Корея (21.5%) (Bae S. et al. 2007), Италия (17.9%) (Oliveri R. et al. 2015), 12.5 % в Сърбия (Opavski N. et

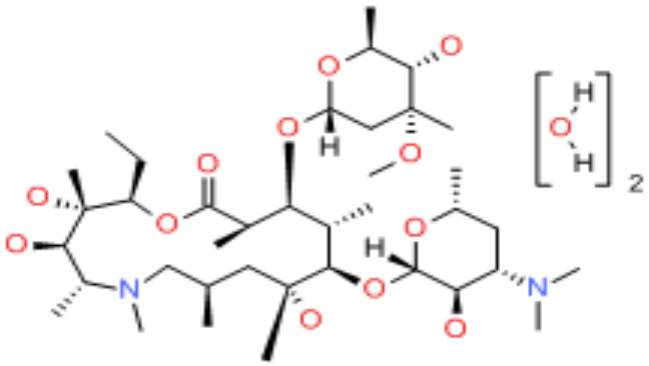
al. 2015), 20.4% в Гърция (Michos A.et. al. 2016), 12% в Полша (Szczypa K.et al. 2004).

Таблица 5. Класификация на макролиди и линкозамиди

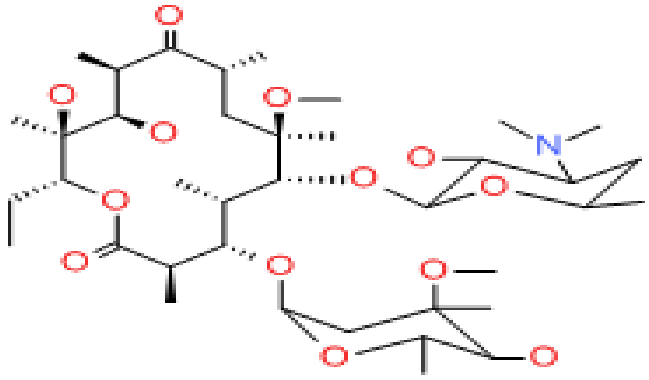
14С МАКРОЛИДИ	• Clarithromycin • Dirithromycin • Erythromycin • Flurithromycin • Roxithromycin • Troleandomycin
15С МАКРОЛИДИ	• Azithromycin
16С МАКРОЛИДИ	• Josamycin • Kitasamycin • Midecamycin • Miocamycin • Rokitamycin • Spiramycin
КЕТОЛИДИ	• Cethromycin • Modithromycin • Solithromycin • Telithromycin
ЛИНКОЗАМИДИ	• Clindamycin • Lincomycin • Pirlimycin
ОКСАЗОЛИДИНОНИ	• Linezolid • Tedizolid



А. Еритромицин



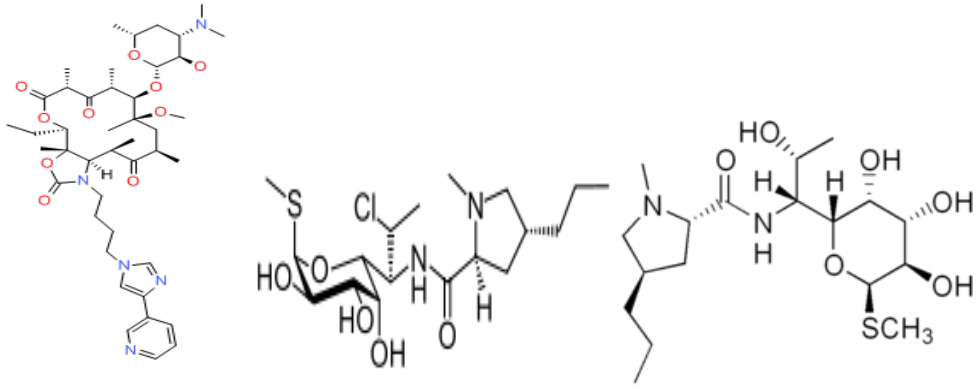
В. Азитромицин



.

C. Кларитромицин

Фиг. 11. Химична структура на макролиди



A. B. C.

Фиг. 12. Химична структура на кетолиди и линкозамиди

A. Телитромицин; B. Клиндамицин; C.Линкомицин

У нас първото проучване само с фенотипни методи на Дечева, Сечанова, Чанкова от 2001 г. установява, че степента на еритромицинова резистентност е ниска за периода 1995 - 2001г. - едва 2,1% (Detcheva A. et al. 2002). През периода 1998-2014г. в България намалява драстично

чувствителността към макролиди при всички Грам-положителни коки, в т.ч. и GAS, причинители на инфекции на горните дихателни пътища (ИГДП), и достига до 1/3 от стафилококовите и пневмококовите изолати от амбулаторни и хоспитализирани български пациенти (Гергова Р. 2013a; Гергова Р. 2013b; Gergova R. et al. 2016).

S. pyogenes притежавадва главни механизма на макролидна резистентност*:* **модификация на мишената за свързване на антибиотика** и **ефлуксна система**.

• **Модификация на мишената на свързване на антибиотика**

Осъществява се от ензими от семейството на рРНК-метилазите, метилиращи аденинов остатък в 23S рибозомната субединица на голямата субединица (50S) на рибозомата, което води до конформационни промени, редуциращи свързването на макролиди, линкозамиди и стрептограмини от група В към рибозомата. Адениновият остатък е разположен в консервативен участък от рибозомата и играе ключова роля при свързването на антимикробното средство към рибозомата. Вследствие на диметилирането свързването на антибиотика е нарушено. Резултатът е ко-резистентност към трите групи антибиотици (MLSB фенотип). MLSB – фенотипът може да бъде експресиран като конститутивен (cMLSB) и индуцибилен (iMLSB). Метилазите се кодират от *erm* (erythromycin ribosome methylation) гените, които са разделени на 4 класа: *erm(A), erm(B), erm(C) и erm(F).* При *Streptococcus* sp. метилазите се кодират най- често от клас *erm(A)* и *erm(B)*-субклас TR (Leclercq R. 2002; Villasenor-Sierra A. et al. 2012). Класовете *erm(A)*и *erm(C)* са характерни за *Staphylococcus* sp., а *erm(F)* за *Bacteroides* и други анаероби. При индуцибелният MLSB фенотип, бактериите продуцират неактивна матричнаРНК (мРНК), която неможе да кодира метилаза. Активирането се осъществява чрез пренареждане на мРНК, само в присъствието на макролиден индуктор. Това позволява на рибозомата

транслирането на метилаза кодиращата секвенция. Индуцибелният MLSB фенотип се доказва чрез ДДМ като наличието на антагонизъм между еритромицин и клиндамицин индикира продукция на индуцибелна продукция на метилаза (Leclercq R. 2002). От друга страна, при cMLSB фенотип, активна метилаза се продуцира без да е необходимо наличие на индуктор.

- **Ефлуксна система**

При втория механизъм (ефлуксна система), транспортни протеини изпомпват 14- и 15-членните макролиди от клетката, но не и 16-членните, т.нар. М-фенотип. Кодират се от *mef(A*) и *msr(D*) – гените (Leclercq R. 2002; Malhotra-Kumar S. 2005). Mef-гените са представени от 4 субкласа: *mef(A), mef(E), mef(I), mef(O)*. За първи път *mef(A)* е описан при *S. pyogenes*, докато гените *mef(E)* и *mef(I)* при *Streptococcus pneumoniae*. Изследване, което включва глобална колекция от 1175 *mef*-позитивни щама *S. pyogenes* показва, че 95.4% от тях носят гена *mef(A),* а останалите 4.6% са от друг субклас.

Всеки субклас са свързва с различни мобилни генетични елементи. При *S. pyogenes mef(A)*се намира в състава на транспозон Tn1207.3, фаг химера Ф10394.4 и елемент Фm46.1. Мозаеченият вариант *mef(A/E)*се свързва често с генът на тетрациклинова резистеност *tet(O)* и се пренасят от генетичен елемент подобен на профаг Фm46.1. В допълнение, генът *mef(A)*се среща най-често при шамове от тип: *emm1, emm2, emm3, emm4, emm9, emm12 и emm75,* докато типове като *emm22, emm77, emm87 и emm89* не са описани като носители на *mef*-детерминанти (Hadjirin N. et al. 2014; Del Grosso M. et al. 2016).

Вторият ген, отговорен за активен ефлукс на 14Си 15С-членните макролиди от цитоплазмата е *mrsD*. Той се намира непосредствено след *mef*-гена (Brenciani A. et al. 2010).

Набелязват се два подхода в търсенията на причините за увеличението на макролидната резистентност и наблюдаваните резки отклонения в степените и за различни периоди от време в различни географски региони. При първия се търси връзка между повишената честота еритромицин - резистентни щамове GAS и повишената консумация на макролиди в популацията. Има данни, че рестрикцията в употребата на макролиди бива последвана от понижение в нивата на резистентност (D'Humières C. et al. 2012). Други данни посочват, че степента на еритромицинова резистентност на GAS в определен период от време се задържа на определено ниво, независимо от локалната употреба на макролиди и зависи пряко от специфичния М-тип (кодиран от *emm*-гена) на доминиращия стрептококов щам (D' Humières C. et al 2012). Със статистически анализ се потвърждава, че при смяна на циркулиращия еритромицин - резистентен щам с чувствителен такъв, се променя рязко фенотипът на резистентност, както и се понижава заболяемостта и това не зависи от локалната макролидна употреба (динамична епидемиология). Надзорът на разпространението на специфичния М-тип осигурява информация с висока прогностична стойност за очакваната клинична тежест, епидемиологичните особености и фенотипа на резистентност (D' Humières C. et al. 2012).

Изследва се и относителният дял на различните фенотипове на резистентност към макролиди, линкозамиди и стрептограмини. Мултицентрови проучвания за продължителен период сочат доминирането на М-фенотип на еритромицинова резистентност с нива 14-35% (Испания,1996-2007). За същия период М-фенотип на резистентност е характерен и за САЩ, Мексико, Франция, Италия, Руска федерация

(Филиманова Ю. 2010 автореферат; Bingen E. et al. 2004; Olivieri R. et al. 2015; Villasenor-Sierra A. et al. 2012).

В същите или други страни в други периоди от време се установява доминиране на MLSB-фенотипът, т.нар. *erm(B)* кодиран механизъм - Франция, Турция като разликите се обясняват с различия в локалните антибиотични политики (Dundar D. et al. 2010).

Индуцибелният iMLSB и iMLS-D механизъм (*ermTR*-кодиран) превалира сред изолатите от пациенти с инвазивни стрептококови инфекции, установено в различни части на света (Villasenor-Sierra A. et al. 2012). У нас за периода 1995-2001 г. са представени и трите фенотипа на резистентост с iMLSB най-чест, следван от M -фенотипа, cMLSB - най-рядък (Detcheva A. et al. 2002)

6.3. Резистентност на *S. pyogenes* към тетрациклини

Тетрациклините са широкоспектърни антибиотици с бактериостатичен ефект. Те инхибират транслацията като се свързват с 30S субединицата на рибозомата и блокират влизането на аминоацил тРНК в А- позицията на рибозомата. Описани са три механизма на резистентност към тетрациклини: инактивиране на тетрациклините, активен ефлукс и протекция на рибозомите. При Грам-положителните бактерии резистеността към тетрациклин/миноциклин се кодира най- често от *tet(M)* гена, по- рядко от гените *tet(O), tet(Q), tet(S), tet(T) tet(W),* които кодират протеини участващи в механизма на рибозомната протекция. Активният ефлукс при тези бактерии се кодира от гените *tet(K)* и *tet(L)* (Cattoir V. 2016).

При GAS, най-често докладваните гени за резистентност към тетрациклини са*: tet(M), tet(O) tet(S) и tet(T).* Смята се, че генът *tet(M)* се пренася чрез конюгативни транспозони, които лесно преминават от хромозома в хромозома. През последните години се съобщава са асоциация между макролидната и тетрациклиновата резистеност при GAS. Генът *tet(O)*

се свързва най-често с гените за макролидна резистентност *mef(A)* и *erm(A),* докато генът *tet(M)* с erm(B) (Brenciani et al. 2007; Ayer et al. 2007).

Разпространението на тетрациклиновата резистеност при GAS варира в широки граници: 18% в Турция (Dundar et al. 2010), 42% в Иран (Jasir et al. 2000), 50% в Бразилия (De Melo et al. 2003), 6-44% в Португалия (Pires et al. 2005), 33.7% в Дания (Hammerum et al. 2004), 38% в САЩ (Ayer et al. 2007), 92% в Китай (Chang et al. 2010), 13.1% в Испания (Betriu et al. 2004).

7. Молекулярно - биологични методи за епидемиологично типизиране на щамове *S. pyogenes*

7.1. *emm* - типизиране

Молекулярното типизиране на *S. pyogenes* се основава на секвенирането на *emm*-гена, който кодира повърхностен протеин, основен фактор на вирулентност с антифагоцитен ефект, нар. М-протеин. Този метод се явява един от най-използваните подходи при молекулярното типизиране на този микроорганизъм. Генът съдържа хипервариабилен 5‘ N-терминален регион, на който се дължи огромното антигенно разнообразие на *S. pyogenes* (Baroux N. et al 2014). Почти всички епидемиологични изследвания определят стрептококовите щамове според техния *emm*-тип, затова *emm*-типизирането представлява основна база за разбиране на епидемиологията и генетична структура на вида.

До днес са познати 223 *emm*-типа (Sanderson-Smith M. et al. 2014), които еволюционно са разделени на 4 основни филогенетични линии:A, B,C, D, E. Тези линии показват добра връзка с тъканният тропизъм. Щамове, принадлежащи към линиите B и C са редки, затова най-често са групирани като линия A-C (McGregor K. et al. 2004). Проучванията показват, че щамовете, които принадлежат към линиите A-C, са свързани най- често с назофаринкса, докато към линия D принаделжат кожни изолати от импетиго.

Линия Е е т.нар „обща“ линия, към нея принаделжат изолати и от двете места. (Bessen D. et al 2000; McMillan D. et al. 2013).

През последните години е разработена нова система за типизиране на *S. pyogenes* нар. *emm*-cluster system, която е основана на почти пълното секвениране на *emm*-гена. Тази система класифицира *emm*-типовете в 48 отделни *emm*-клъстера. Всеки клъстер съдържа тясно свързан М-протеин със сходна структура и функция (Chiang-Ni C. et al. 2016). При тази система дървото е разделено на 2 клади- X и Y. Клада X се състои от 6 основни *emm*-клъстера- E1-E6. Клада Y е разделена на 2 субклади- Y1 и Y2, а те се разделенени на 10 *emm*-клъстера: D1-D5 и A-C1 - A-C5. Разпределението на *emm*-типовете в клъстерната система е представена в **табл. 6.**

7.2. Мултилокусно секвениране - Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Мултилокусното секвениране е метод, който позволява изследване на молекулярната епидемиология и популационната генетика на микроорганизмите. При този метод, за всеки щам на *S. pyogenes* 400-500bp вътрешни фрагменти на седем “housekeeping” гени: *gki, gtr, murI, mutS, recP, xpt, yqiL* се амплифицират с PCR от хромозомна ДНК с двойка праймери, както е представено в **табл.7** в раздел „**Материали и методи**” (Enright M. et al. 2001). Амплифицираните фрагменти се секвенират във всяка посока с праймерите, които са използвани за първичната амплификация. Секвенциите на всеки от седемте локуса се сравняват с всички познати алели на този локус. Последователности, които са идентични с известен алел, имат същият алелен номер.Тези алели, които се различават дори в един нуклеотид, се означават с нов алелен номер. Алелите на всеки от седемте локуса определят алелния профил на всеки изолат и неговия секвенционен тип (ST). До момента са известни 100 уникални алелни комбинации (алелни профили).

Броят на уникалните алелели на всеки от седемте „housekeeping" гени варира: 21(mutS) до 35 (recP) (Enright M. et al. 2001). Предимство на метода, освен неговата висока продуктивност, ефективност е и свободния достъп за стандартизиране и интерпретиране на получените резултати (https://pubmlst.org).

Таблица 6. Разпределение на *emm*-типовете в *emm*-клъстери

clade	*emm* cluster	*emm* types represented
X	E1	4, 60, 78, 165, 176
X	E2	13, 27, 50 , 66, 68, 76, 90, 92, 96, 104, 106, 110, 117, 166, 168
X	E3	9, 15, 25, 44, 49, 58, 79, 82, 87, 103, 107, 113, 118, 144, 180, 183, 209, 219, 231
X	E4	2, 8, 22, 28, 73, 77, 84, 88, 89, 102, 109, 112 , 114, 124, 169, 175, 232
X	E5	34, 51, 134, 137, 170, 174, 205
X	E6	11, 42, 48, 59, 63, 65, 67, 75, 81, 85, 94, 99, 139, 158, 172, 177, 182, 191
X	Singletons	164, 185, 211, 236
Y	D1	36, 54, 207
Y	D2	32, 71, 100, 115, 213
Y	D3	123, 217
Y	D4	33, 41, 43, 52, 53, 56, 56, 64, 70, 72, 80, 83, 86, 91, 93, 98, 101, 108, 116, 119, 120, 121, 178, 186, 192, 194, 208, 223, 224, 225, 230, 242
Y	D5	97, 157, 184
Y	A-C1	46, 142
Y	A-C2	30, 197
Y	A-C3	1, 163, 227, 238, 239
Y	A-C4	12, 39, 193, 228, 229
Y	A-C5	3, 31, 133
Y	Singletons	5, 6, 14, 17, 18, 19, 23, 24, 26, 29, 37, 38, 47, 57, 74, 105, 122, 140, 179, 218, 233, 234
Outliers	Outliers	55, 95, 111, 215, 221, 222

Обобщение

S. pyogenes е описан за първи път в материали от болни с еризипел преди повече от 140 г. и след въвеждане на пеницилиновата терапия е настъпил период на успокоение, че неговата роля е под контрол. През последните години този микробен вид се преоткрива отново, най-вече с появата на по-вирулентни клонове и превръщането му в опасен причинител, както на сериозни усложнения след тонзилофарингити, така и на животозастрашаващи, инвазивни инфекции. Натрупват се нови данни за богатата ензимна акивност, която е във връзка с патогенезата на инвазивните инфекции, които зачестяват, както и за огромния арсенал от токсини и суперантигени, противодействащи успешно на всички нива и на естествената резистентност и на имунната система. Типично за патогенезата на тези инфекции е, че техният причинител отслабва имунния отговор от гостоприемника и това подпомага проникването, дисеминирането на *S. pyogenes* и увреждането на макроорганизма от неговите токсични продукти. Кумулативният ефект от разнообразните фактори на вирулентност, както и доминирането на някои М-типове се считат за основна причина за особено тежкото и фатално протичане на някои инвазивни стрептококови инфекции.

Въвеждането на ваксинопрофилактика в Европа, респ. и в България през 2010 г. срещу хемофили и пневмококи е другата причина за зачестяването на стрептококовите респираторни инфекции, защото се освобождава ниша, която се запълва с микробни видове, срещу които няма разработена ваксина.

Бързото селекциониране на резистентност към широко използваните макролиди в детска възраст, които са единствена алтернатива на бета-лактамите при децата, затруднява още повече ерадикацията на стрептококите и повишава риска от усложнения. През последните двадесет години в България няма проучвания за гените, кодиращи макролидна

резистентност, както и данни дали тази резистентност е кръстосано реагираща с линкозамидите, които са първи избор при тежки инвазивни инфекции.

За епидемиологията и прогнозирането на тежестта на очакваните стрептококови инфекции в даден регион е важно да се изучават циркулиращите през годините *emm*-генотипове. За България няма информация кои клонове *S. pyogenes* са чести за страната и кои преобладават при по-тежки клинично протичащи инфекции. Трябва да се натрупат достатъчно данни от епидемиологично типизиране на български клинични изолати, за да може да се прогнозира и епидемиологията на свързаните с GAS заболявания.

Зачестяването на инфекциите, с етиология *S. pyogenes,* както и трудностите в терапията им, налагат от една страна да се оптимизира и осъвремени диагностиката, а от друга да се проучват и мониторират, както циркулиращите *emm*-генотипове, така и генотипа на резистентността. Това ще ускори поставянето на етиологичната диагноза особено при тежки инфекции в практиката, ще създаде епидемиологична база данни, които ще бъдат полезни за най-уязвимите групи пациенти, ще се ускори и подпомогне избора на правилна емперична терапия при тежки и животозастрашаващи инфекции. Информацията от генетичните проучвания върху вирулентността и резистентноста на *S.pyogenes* може да послужи и при разработване и евентуално апробиране варианти на ваксина в нашия географски регион.

III. Цел и задачи

Цел на настоящия дисертационен труд е:

Да се оптимизира диагностичния алгоритъм за бърза етиологична диагноза на инфекциите, причинени от *S. pyogenes*, да се проучат факторите на вирулентността и резистентността към важни групи антимикробни средства на клинично значими изолати *S. pyogenes* и да се извърши епидемиологично типизиране на циркулиращите *S. pyogenes*.

За осъществяване на тази цел си поставихме **следните задачи**:

1) Да се създаде колекция от замразени *S. pyogenes* и от екстракти на техните геномни ДНК, от клинично-значими щамове, изолирани от български пациенти с различни стрептококови инфекции

2) Да се разработят молекулярно-генетични методи (PCR, Real Time-PCR) за бърза етиологична диагноза на инфекции, причинени от *S. pyogenes*.

3) Да се проучи антибиотичната чувствителност към основни за терапия групи антимикробни средства: пеницилини, макролиди, линкозамиди, тетрациклини. Да се определят механизмите на макролидната и тетрациклинова резистентност.

4) Да се направят препоръки за емпирична терапия на инфекциите причинени от *S. pyogenes,* в зависимост от установените данни за резистентност в нашата страна.

5) Да се проучат важни фактори на вирулентността от групите на токсините, ензимите и супрантигените

6) Да се типизират колекционираните изолати чрез определяне на *emm*-генотиповете и съответните им MLST типове, както и анализиране на връзката между установените клонове, гените на резистентност и клиничната диагноза.

IV. Материали и методи

За осъществяване на целите на дисертационният труд бяха използвани микробиологични, имунохроматографски и молекулярно - генетични методи за диагностициране и идентифициране на *S. pyogenes* директно в клинични проби от пациенти, а за допълнително охарактеризиране на изследваните изолати бяха използвани биохимични, микробиологични, серологични и отново различни варианти на молекулярно – генетичните техники за доказване на важни гени, кодиращи вирулентност, резистентност, епидемични типове и определяне на клоналност при проучвания бактериален вид.

1. Пациенти

Клинично значимите изолати *S. pyogenes,* включени в дисертационния труд са от 445 пациенти, изследвани през периода 2013-2017г. Болните, чиито данни са използвани в проучването бяха разделени в различни групи според критериите: възраст, пол, клиничните диагнози. Пациентите бяха от цялата страна, но преобладаващият брой от тях бяха от гр. София (168), София – област (72), Северозападна България (105), Югозападна България (58), по-малко от Североизточна България (36) и най-малко от Югоизточна България (16). Малка част от тях бяха хоспитализирани (122), в някоя от сл. Университетски болници в София: „Св. Иван Рилски", Детска клиника на „Александровска болница", УНГ клиника „Царица Йоана" и във Варна „Св. Марина" - предимно тези с инвазивни инфекции, а останалите бяха лекувани амбулаторно, след установяване на етиологиата и чувствителността към антимикробни средства, защото състоянието на болните позволяваше (323).

1.1. Разпределение по възраст беше: 0 до 2 г., 3-7г., 8-17г., 18-60г., над 60г.

1.2. Групи пациенти според пола: мъже и жени

1.3. Групи симтоматични пациенти според клиничната диагноза:

1.3.1. Суперфициални кожни и лигавични инфекции: тонзилофарингит, скарлатина, вулвовагинит, еризипел, импетиго.

1.3.2. Инвазивни инфекции (засягащи стерилни в норма органи и тъкани): перитонзиларен абсцес, среден супуративен отит, синуит, мекотъканни инфекции, некротизиращ фасциит, сепсис, токсичен шоков синдром, менингит, пневмония.

При изследването на част от пациентите на възраст 1-17 г. с диагноза тонзилофарингит и перитонзиларен абсцес, през периода ноември 2015 - февруари 2017 са изследвани 167 проби по 4 метода: класически с бактериална посявка, бърз имунохроматогафски тест, RT-PCR с праймери за гена *spyCEP*, мултиплекс PCR с праймери за *speB* и *spyCEP* . За тази цел от всеки пациент бяха взети по 3 проби гърлени секрети с тампони или пунктат от перитинзиларени абсцес. С първия тампон в транспортна среда беше правена посявката, вторият, който беше сух, без среда беше използван за имунологичния метод, а от третия беше екстрахирана ДНК за PCR техниките. Пациентите с тонзилофарингит или скарлатина не бяха приемали никакви антимикробни препарати поне 1 седмица преди вземането на материала, докато при 15 от пациентите с перитонзиларен абсцес имаше предходна антимикробна терапия. Всички тестове в това проучване бях извършени след получаване на подписано информирано съгласие от родител или законен настойник на детето.

Пробите за култивиране бяха транспортирани с универсална полусолидна транспортна среда на Стюарт (Deltalab, Испания) до няколко часа в лабораторията, където са обработвани веднага. Тампоните, които бяха използвани за имунохроматографски тест се изпращани без транспортна среда и се съхранявани при хладилни условия, при 4°C най-много до 2-3 часа след

вземането на материала. За ДНК екстракция пробите бяха транспортирани и съхранявани в специална течна транспортна среда на Стюарт и в единични случаи са престоявали до 18 часа, замразени при температура - 20°C, в преобладаващия брой случаи екстракцията е извършвана в рамките на същия ден.

2. Контролни щамове и проучени микроорганизми

Бяха използвани 5 референтни щама *S. pyogenes* ATCC 21 547, *S. mutans* ATCC 35668 *S. pneumoniae* ATCC 49619*; Enterococcus faecalis* ATCC 29212*; Staphylococcus aureus* ATCC 29213; от Американската типова микробна колекция. В експерименталната дейност бяха използвани и голям брой други клинични щамове, изолирани в диагностичната лаборатория към Катедрата по медицинска микробиология МУ София, от които беше екстрахирана ДНК. За доказаване специфичността на праймерите, които бяха използвани за бърза детекция на *S. pyogenes* директно в проби на пациента бяха включени в реакцията ДНК от следните микроорганизми: Грам-позитивни: *Streptococcus agalactiae – Group B Streptococcus* (GBS), *S. anginosus - Streptococcus gr.C (GCS), S. bovinum - Streptococcus gr.D (GDS), S. mutans, S. mitis, S. sanguis, S. gordonii, S. constelatus, S. pneumoniae, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Corynebacterium diphteriae, C. pseudodiphteriticum, C. minutissimum, Erysipelothrix risiopathiae, Actinomyces newii, Listeria monocytogenes, L. ivanovi*; Грам-негативни: *Moraxella catarrhalis, Haemophillus influenzae, H. parainfluenzae, Kingella kingae, Eikenella corrodens, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa,* както и изолирана ДНК от *Candida albicans.*

За съхранение след идентификацията, щамовете бяха замразявани и съхранявани в двойно концентрирано сухо обезмаслено мляко (Skim milk BBL) с криопротектор при - 70°C. Когато се налагаше да бъдат използвани, замразените

или лиофилизирани щамове бяха ресуспендирани в триптиказа-соев бульон, след което трикратно субкултивирани на кръвен агар (КА). След опресняването на щамовете бяха проучвани биохимичните им свойства и едва тогава бяха използвани в експеримент.

Всички колекционирани щамове бяха изследвани освен микробиологично, серологично и с разширен набор от фенотипни тестове беше определяна тяхната антимикробна чувствителност, а с молекулярно-генетични методи бяха установени техните гени, кодиращи фактори на вирулентност и на резистентност.

3. Микроскопско изследване

Микроскопското изследване беше извършвано с помощта на рутинна процедура за оцветяване по Грам (модификация по Atkins) с оцветителен набор на Merck. Първоначално бяха оцветявани по Грам директни натривки за охарактеризиране на храчките, пунктатите, хемокултурите, ликвора, както се препоръчва за тези изследвания (Carrol K. 2002).

4. Изследване на пациентски проби

4.1. Клинични материали бяха: гърлен секрет, ранев секрет, вагинален секрет, пунктат от перитонзиларен абсцес**,** пунктат от средно ухо**,** пунктат от синуси**,** храчка**,** хемокултура**,** ликвор.

4.2. Културелно изследване

Микробиологичните посявки бяха направени на Колумбия агар с 5% овнешка кръв (BBL, Germany). За евентуално съпътстващата микрофлора бяха посявани и на шоколадов агар (Oxoid, UK) за хемофили, на Мак Конки (Oxoid, UK) за невзискателни Грам-отрицателни и на хром агар за патогенни гъбички (BBL, Germany). Пробите бяха култивирани едно денонощие при 36°C, с 5-10% CO_2. Първоначално суспектните за *S. pyogenes* бяха идентифицирани по рутинни критерии като наличие на бета-хемолиза, чувствителност към бацитрацин,

каталаза отрицателен тест и PYR положителен тест. За по-детайлно изследване бяха използвани идентификационни тестове Crystal GP (BBL, Germany) или RapID STR System (Remel, Biotech Ltd, UK). За определяне на серогрупата по Lancefield използвахме антигенен тест PathoDxtra Strep Grouping Kit Thermo Scintific (Oxoid, UK).

4.3. Бърз имунохроматографски тест за директно откриване на GAS в клинични проби

Бързият имунохроматографски тест беше изпълняван според указанията на производителя (StrepA Antigen Rapid Test, Ultimed Products, Deutschland).

Процедурите по антигенната екстракция и виуализация на тестовете бяха извършвани от тампоните с клинични проби - гърлен секрет и от гноен пунктат.

5. Определене на антимикробна чувствителност с фенотипни методи

Антимикробната активност на различни вещества от всички важни групи антибактериални средства, подходящи за лечение на стрептококови инфекции беше определяна с помощта на дифузионно-дисковия метод на Бауер-Кърби и за по-прецизни резултати с минимални инхибиращи концентрации (МИК). За тази цел беше използвана най-съвременния метод на Е-тест, според указанията на EUCAST 2017. Качественият контрол на тестовете за чувствителност е извършван с *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

5.1.Определяне чувствителността чрез стандартизиран дисково-дифузионен метод на Бауер-Кърби на Мюлер-Хинтон агар

Изготвяна беше антибиограма с бактериален инокулум 0.5 по Мак Фарланд ($1.5x10^6$CFU /ml) на Мюлер-Хинтон агар, с 5% дефибринирана конска кръв и 20% Никотинамид Амид Динуклеотид. Посявката на стандартизирания инокулум от чиста 24 часова микробна култура *S. pyogenes* беше извършвана с памучен тампон, за всяко петри – с различен тампон, с трикратно завъртане на петрито на 60°C. След плътно покриване на петрито с иноколума бяха поставяни дисковете, импрегнирани с антибиотици в точно определенаконцентрация. Петритата с

антибиограми бяха култивирани 18 часа при 36°C, с 5% CO_2. Диаметрите на зоните на задръжка са измервани при отворен капак на петрито и отразена светлина (EUCAST 2017). За изпитване на чувствителността към пеницилин и други бета-лактамни антибиотици е използван диск, натоварен с бензилпеницилин 1 unit. След инкубирането са отчитани резултатите за зоната на задръжка набактериалния растеж според изискванията на EUCAST 2017, където граничната стойност на диаметъра е 18 мм, т.е. над тази стойност са чувствителни и с диаметър по-малък от посочения са пеницилин нечувствителни. За определяне на MLSB фенотипът на щамовете е използвана комбинация от антибиотичните дискове еритромицин (15µg) и клиндамицин (2µg),поставени на разстояние 12-16mmот ръб до ръб (EUCAST 2017). Интерпретацията на резултатите за MLSB фенотип беше направена отново според изискванията на EUCAST 2017 и критериите, отразени в **табл. 7.**

Табл. 7. Възможни MLSB фенотипни варианти при *S. pyogenes*

Фенотипна макролидна резистентност	**Описание**
iMSLB- индуцибелен тип	Наличие на антагонизъм между клиндамицин и еритромицин т.нар **D- зона**
cMLSB- конститутивен тип	Липса на зона на задръжка около еритромицин и клиндамицин (R към еритромицин и клиндамицин)
M- тип	R към еритромицин, S към клиндамицин (без D- зона)

За определяне на чувствителността към тетрациклини беше използван антибиотичен диск тетрациклин с концентрация 30µg. Изолатите със зона на задръжка ≥ 23 mm бяха определени като чувствителни на тетрациклин,

миноциклин, доксициклин, а тези със зона на задръжка < 20 mm бяха определени като резистенстни (EUCAST 2017).

5.2. Определяне на МИК

Определяне на МИК чрез Е-тест стрип беше извършен според инструкциите на EUCAST 2017. Беше използван Мюлер-Хинтон агар с 5% дефибринирана конска кръв и 20% Никотинамид Амид Динуклеотид, разлят с 4 mm дебелина на слоя в петриева паничка. Бактериалният инокулум беше подготвен от 24 часова микробна култура *S. pyogenes*, стандартизирана до $1.5x10^6$ CFU/ml (оптичен стандарт 0.5 MacFarland). Посявката на стандартизирания инокулум беше извършвана с памучен тампон, за всяко петри – с различен тампон, с трикратно завъртане на петрито на 60°C. След плътно покриване на петрито с иноколума, беше поставяна лентичката, фабрично напоена в градиент с изпитваното антимикробно вещество, т.нар. Е-тест. Обикновено на петри бяха поставяни по две лентички. След инкубация при 36°C за 24 часа бяха отчитани МИК, изразяващи се в стерилни зони около лентичките като нивото, на което свършваше стерилното петно се приемаше за МИК, изразена в mg/L.

6. Молекулярно-генетични техники

6.1. . Изолиране на бактериална ДНК

ДНК екстрактите са извлечени по химичен начин от чиста микробна култура *S. pyogenes* или от пациентска проба, суспектна за инфекция с този микрообрганизъм. За целта е изолзван DNAsorb-AMnucleic acid extraction kit (AmpliSens) като екстракцията е осъществена според протокола и указанията на производителя. Получените ДНК екстракти са съхранени при -70°Си са използвани при моно- и мултиплекс PCR с детекция в гел-електрофореза или за RT-PCR, т.е. в реално време, без да е необходимо използването на електрофореза

6.2. Полимеразна-верижна реакция (PCR)

Принципът на реакцията се състои в намножаването (амплифициране) на фрагмент двойноверижна ДНК, който съдържа търсената нуклеотидна последователност и служи за Матрица. Двойно-верижната ДНК се денатурира термично и освобождаващите се единични вериги се хибридизират с два къси олигонуклеотида с точно определена последователност, които се явяват стартери (т. нар. праймери) на синтезата на ДНК и маркират търсената последователност. От всеки праймер протича удължаване на новосъздадената верига чрез една ДНК-полимераза. От 1988г. започва използването на ДНК-полимеразата на *Thermus aqaticus* (Tag-полимераза). Многократно повтаряне на етапите на денатуриране, хибридизиране и ДНК-синтез, чрез цикъл на термичен режим, води до почти експоненциално размножаване на специфични региони ДНК, фланкирани от двойка праймери, от които започва ДНК синтеза с помощта на термостабилната ДНК полимераза. С помощта на подходяща двойка праймери може да се определи наличието на търсена последователност в проба от минимални количества генетичен материал. Методът се използва за откриване на различни важни етиологични агенти с цел да се ускори и улесни диагностиката и идентификацията директно в клинични материали. Освен с тази цел все по-често се прилага и за установяване на гените на вирулентност и антибиотична резистентност, както и като начална стъпка от протокола при други техники, например при MLST и секвениране на гени.

6.3. RT-PCR за директно откриване на GAS в клинични проби

Бактериалните лизати бяха получени директно от проби на пациента. Секвенициите на праймерите за гена *spyCEP,* който е характерен и специфичен за този бактериален вид F- GATCCGGCCCATCAAAGCAT, R-AGCTGCCACTGATGTTGGTG бяха проверени за специфичност чрез програмата

Basic Local Alignment Search Tool в базата данни на NCBI (Bethesda, MD) (HTTP //: www.nbi.nlm.nih. GOV / BLAST). За положителна контрола беше използвана геномна ДНК от щам *S. pyogenes* ATCC® 21 547. За извършване на RT-PCR беше приготвена реакционна смес с краен обем 24 µl, който се състои от следните компоненти: 6.25 µl универсален мастър микс (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany - съдържащ AmpliTaq Gold полимераза, dNUTPs, MgCl2, реакционен буфер), 100 nM of fluorescence-labeled TaqMan probe, 1 µl от ДНК пробата и 300 nM от всеки праймер за гена *spyCEP*. Амплификацията на ДНК пробите беше направена по следната програма: първоначална денатурация - 95°C за 3 мин, следващи 30 цикъла с денатурация - 95°C за 30 сек, удължаване на ДНК веригата - 54°C за 40 сек, след тях финална елонгация - 72°C – 1 мин. Реакцията беше осъществена в апарат Line-Gene K machine (Bioer Technology Co., LTD., Bio Flux, Corporation, Tokoy, Japan).

6.4. Мултиплекс PCR за идентифициране на GAS в клинични проби

Изолираната бактериална ДНК от клиничната проба на пациента беше подлагана на амплификация с праймери за два гена: *speB* и *spyCEP*, както е показано в **табл.8.,** в 25 ul реакционна смес. Поредиците на праймера се проверявани за специфичност, като се използва Basic Local Програма за търсене по подравняване (BLAST), достъпна в базата данни на NCBI (Bethesda, MD) (http: www.nbi.nlm.nih.gov/BLAST). Избрани бяха тези гени, защото са типични за *S. pyogenes* и се срещат при всички щамове (Gergova R. et al 2015) Протоколите на амплификацията са следните: първоначално денатуриране 95 °C в продължение на 3 минути; денатуриране 95 ° C - 35 сек; разширение 72 ° C - 1 min 30 sec; температура на отгряване 53 ° C за 40 секунди; Крайно удължение 72°C - 7 минути. Амплифицираните гени се разделят в 2% агарозен гел в продължение на 90 минути при 120 V, оцветяват се с етидиев бромид (0.5 ug / mL) и се откриват чрез UV трансилуминация (дължина на вълната 312 nm).

Продуктите на PCR бяха идентифицирани въз основа на техния очакван размер на фрагмента (*speB* - 952 bp, *spyCEP* - 786 bp), представен на **Табл.8.** За положителна контрола беше използвана ДНК от щам *S. pyogenes* ATCC 21 547.

Таблица 8. Използвани праймери за доказване на GAS с PCR директно в пациентска проба

Гени	Праймер (F* 5`→3`)	Праймер (R** 5`→3`)	Ампликон
speB	AGACGGAAGAAGCCGTCAGA	TCAAAGCAGGTGCACGAAGC	**952 bp**
spyCEP	GATCCGGCCCATCAAAGCAT	AGCTGCCACTGATGTTGGTG	**786 bp**

* F - Forward
** R – Reverse

За доказване на специфичността на праймерите и респ. като отрицателни контроли в двата варианта на PCR бяха използвани геномни ДНК, изолирани от чисти бактериални култури на микроорганизмите, описани по-горе - осемнайсет Грам-позитивни, от девет Грам-негативни и от една кандида, които могат да се открият в назофаринкса.

6.5. PCR за откриване на гени на вирулентност при *S.pyogenes*

За откриване на гените за вирулентност бяха разработени варианти на мултиплекс PCR за следните групи фактори: ДНК- зи: ***sdc, sdaB, sdaD, spd3***; стрептококови суперантигени: ***speA, speC, speH, speF, speI, speJ, speK, speL, speM, ssa***; протеазите: ***speB, spyCEP, mac; sic*** (стрептококов инхибитор на комплемента) и ***slo*** **(**ген за стрептолизин О). Всички гени бяха разделени на 6 отделни микса като всяка смес беше използвана за мултиплекс PCR.

Включените в реакцията праймери и приготвените комбинации са показани в **табл. 10**. Всеки праймер е проверяван за специфичност в Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program availableat the NCBI database (Bethesda, MD) (http//:www.nbi.nlm.nih.gov/BLAST). Амплификацията е провеждана в реакционна смес с общ обем 25 µl, съдържаща 12.5 µl готов Taq-микс за мултиплекс рекации, по 1µl от всеки използван праймер, 2µl ДНК екстракт и ddH_2O до 25µl. Количеството на използваната ddH_2O вариране при различните комбинации, поради различния брой на използваните праймери във всеки микс. Температурният профил за амплификация на отделните комбинации от гени е показана в **Табл. 9.**

Анализирането на резултатите, получени след амплификацията се извършва с хоризонтална електрофореза. Приготвен е 2 % агарозен гел. Използваната агароза е SeaKem LE Agarose, Lonza, USA, 2 g от нея се прибавяни към 100 ml 10x TAE буфер (Tris/ледена оцетна киселина/0.5M EDTA) и е разтопявана до пълна прозрачност в микровълнова печка. Към разтопената агароза са добавяни 10 µl - 1% разтвор на интеркалиращ агент-етидиевбромид. След изливане във формата са изчаквани 20-30 мин. за полимеризация. В ямките на гела се накапвани по 10 µl PCR продукт и 2 µl Loading buffer предварително смесени.

Използван е маркер за молекулно тегло PCR Sizer 100 - 1000 bp DNA Ladder. Отнего са накапвани по 6 µl. Електрофорезата протича при 120 mV и е с времетраене 60 мин. След края на електрофорезата пробите са отчитани на UV - илюминатор при 312nm.

Таблица 9. Програми за откриване на гени за вирулентност

	Първоначална Денатурация	**Денатурация**	**Хибридизация**	**Удължаване**	**Финално удължаване**
Програма 1	95°C 3 min	95°C 25 sec	60°C 25 sec	72°C 1 min 30 sec	72°C 7 min
Програма 2	95°C 3 min	95°C 35 sec	60°C 40 sec	72°C 1 min 30 sec	72°C 7 min
Програма 3	95°C 3 min	95°C 35 sec	58,8°C 35 sec	72°C 1 min 30 sec	72°C 7 min
Програма 4	95°C 5 min	95°C 40 sec	57°C 35 sec	72°C 1 min 30 sec	72°C 7 min
Програма 5	95°C 5 min	95°C 35 sec	54,7°C 40 sec	72°C 1 min 30 sec	72°C 7 min

Таблица 10. Миксове и използвани праймери при доказване гените за вирулентност на *S. pyogenes*

Гени за вирулентност	**Праймери (5`→3`)**	**T ˚Схибридизация**	**Размер на ампликона (bp)**
Програма 1 andмикс 1		60°C 30 sec	
Sdc	AAGCTTAGAAACTCTCTCGCCA		600
	AGTTCCAGTAATAGCGTTTTTCCGT		
SdaB	TATAGCGCATGCCGCCTTTT		440
	TGATGGCGCAAGCAAGTACC		
SdaD	TTTACGCTGAATCGGGCACT		295
	GGCTCTGGTTTGCTTTCCCA		
spd3	GCCGCTTCTTCAAACTCTTCG		784
	ATCGTCGTACTTGGCAAGGTT		
Програма 2 and микс 2		59°C 40 sec	
SpeL	CCTGAGCCGTGAAATTCCCA		657
	ACACCAGAATTGTCGTTTGGT		
SpeK	CCTTGTGTGTGTATCGCTTGC		568
	TTGCTGTCCCCCATCAAACT		
speC	GCCAATTTCGATTCTGCCGC		405
	TGCAGGGTAAATTTTTCAACGACA		
SmeZ	TTTCTCGTCCTGTGTTTGGA		246
	TTCCAATCAAATGGGACGGAGAACA		
SpeM	ATCGCTCATCAAACTTTTCCT		496
	TTGTGTGTGTATCGCTTGC		
Програма 3 and микс 3		58,8°C 35 sec	
speH	TGAGATATAATTGTCGCTACTCACAT		480
	CCTGAGCGGTTACTTTCGGT		

speG	TGGAAGTCAATTAGCTTATGCAG		384
	GCGAACAACCTCAGAGGGCAAA		
speJ	TCCTTGTACTAGATGAGGTTGCAT		286
	GGTGGGGTTACACCATCAGT		
		57°C 40 sec	
Програма 4and микс 4			
Ssa	AAGAATACTCGTTGTAGCATGTGT		678
	AATATTGCTCCAGGTGCGGG		
speI	TTCATAGACGGCGTTCAACAA		176
	TGAAATCTAGAGGAGCGGCCA		
Mac	TCTTGCCCTGTTGAAAGTGT		389
	CGAGGTGGTATTTTTGACGCC		
Програма 5 and микс 5		53°C 40 sec	
speB	AGACGGAAGAAGCCGTCAGA		952
	TCAAAGCAGGTGCACGAAGC		
spyCEP	GATCCGGCCCATCAAAGCAT		786
	AGCTGCCACTGATGTTGGTG		
Slo	GCCAATGTTTCAACAGCTATT		400
	CGGAGCTGCACTAAAGGC		
Програма 6and mix 6		55 °C 45 sec	
speA	AGGTAGACTTCAATTTGGCTTGTGT		576
	GGGTGACCCTGTTACTCACG		
speF	TACTTGGAT CAAGACG		782
	GTAATTAATGGTGTAGCC		
Sic	TTACGTTGCTGATGGTGTATATGGT		150
	TTGATAGAGGGTTTTCAGCTGGC		

6.6. Полимеразо-верижна реакция (PCR) за откриване на гени за резистентност към MLS група антибиотици

Първоначално е изпълнена PCR със следните гени за резистентност: *mef(A), erm(A), erm(B).* Използваните праймери са представени на **табл.11** и са потвърдени за специфичност чрез програмата Basic Local Aligment Search Tool.

Мултиплекс PCR са извършени в реакционна смес с краен обем 25 µl, съдържаща: 12.5µl готов микс за мултиплекс, по 1µl от всеки праймер, 2µl ДНК екстракт и 4.5µl дестилирана вода. Концентрацията за всеки от праймерите е по 10 pmol/µl. Амплификацията е извършена при параметри показани на **табл. 12.** за 30 цикъла.

Таблица 11. Използвани праймери при доказване гените за резистентност на *S. pyogenes*

Гени за резистентност	**Секвенция на праймера (Forward 5`→3`), (Reverse 5`→3`)**	**Размер на ампликона (bp)**
mef(A)	F- CAA TAT GGG CAG GGC AAG R- AAG CTG TTC CAA TGC TAC GG	317
erm(A)	F- CCC GAA AAA TAC GCA AAA TTT CAT R- CCC TGT TTA CCC ATT TAT AAA CG	590
erm(B)	F- TGG TAT TCC AAA TGC GTA ATG R- CTG TGG TAT GGC GGG TAA GT	745

Таблица 12. Температурни условия за провеждане на мултиплекс PCR за детекция на гени: *mef(A), erm(A), erm(B).*

Етап	Температура	Време
Първоначална денатурация	95°C	4min
Денатурация	95°C	30s
Хибридизация	60°C	40s
Елонгация	72°C	90s
Финална елонгация	72°C	7min
Крайна фаза	4˚C	∞

6.7. Полимеразо-верижна реакция (PCR) за откриване на гени за резистентност към тетрациклини

За доказване на гени резистентност към тетрациклини беше използван мултиплекс PCR в обем 25 µl, съдържаща: 12.5 µl готов микс за мултиплекс, по 1 µl от всеки праймер, 2 µl ДНК екстракт и 6.5 µl дестилирана вода. Концентрацията за всеки от праймерите е по 10 pmol/µl. Амплификацията е извършена при следните параметри: първначална денатурация- 95°C за 3min, денатурация- 95°C за 30s, хибридизация- 55°C за 30s, елонгация - 72°C за 90s и крайна елонгация - 72°C за 7 мин. Амплификацията беше извършена за детекция на гените tet(M) и tet(O) за 30 цикъла. Бяха използвани следните праймери:

tet(O) F-AACTTAGGCATTCTGGCTCAC,
tet(O) R-TCCCACTGTTCCATATCGTCA;
tet(M) F-AGTGGAGCGATTACAGAA,
tet(M) R- CATATGTCCTGGCGTGTCTA.

Получените ампликони бяха разделени на гел-електрофореза, а размерите на продуктите бяха *tet(M)* = 158 bp, *tet(O)* = 515 pb.

7. Охарактеризиране на изолатите *S. pyogenes* с *emm*-типизиране

През последното десетилетие бяха разработени много молекулярни техники за изследване физиологията, вирулентността, резистентността към антимикробни средства и филогенетичните връзки между изолатите *S. pyogenes* в различни географски региони. Проследява се появата и разпространението на нови по-вирулентни клонове, връзката им с появата не епидемични взривове или обвързаността им с по-тежко и фатално протичане на стрептококовите инфекции.

Разработена е вече нова технология за автоматично секвениране – използват се дидезоксинуклеотиди, белязани с различни флуорохроми. На всеки от нуклеотидите съответства цвят на ивицата в гела, който добре се различава в автоматичен режим. На секвениращ гел могат да се определи последователността на около 700 до 1000 нуклеотида в зависимост от използваните капиляри. Методът осигурява много точна информация за определяне на дивергенция и неродственост между видовете, негово основно приложение е при филогенетичните анализи на междувидово ниво. Причините за това са две: 1) на междувидово ниво, промените в отделна секвенция са достатъчно доказателство за интерпретиране на произхода и еволюционната история на видовете; 2) на подвидово ниво, секвенционните промени в самостоятелен локус в повечето случаи не са достатъчни за дискриминиране между високородствени, но не съвсем идентични изолати и обикновено не осигуряват достатъчна информация за клъстерни анализи. За да се получи такава информация, трябва да се секвенират няколко локуса, което увеличава времето необходимо за получаване на информация.

За определяне принадлежността към отделен *emm*-генотип на български клинично значими изолати *S. pyogenes* беше използван нуклеотидно секвениране на *emm*-гените.

Беше осъществено секвениране на представителна извадака от 218 щама *S. pyogenes*. За целта беше амплифициран ДНК сегмент с PCR микс, съдържащ: обем 20 µl, съдържаща: 10 µl микс за моноплекс, по 1µl от всеки праймер, 2µl ДНК екстракт и 6 µl дестилирана вода. Концентрацията за всеки от праймерите е по 10 pmol/µl, според следния протокол: първоначална денатурация на 94°C за 5 min и 30 cycles: при 94°C за 30 s, 55°C - 30 s, 72°C - 30s и 72°C -5min. PCR продуктът беше пречистен чрез Rapid PCR Cleanup 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 3130xl Genetic Analyzer cF праймер, който обхващаше 5' края, кодиращ около 15-23 остатъка от мембранен експортен протеин, както и 60 до 250 аминокиселини на M протеина (**табл.13).**

Проверката на секвенциите беше извършено чрез Chromas Lyte версия 2.01. Определянето на emm-генотиповете беше осъществено в оторизиран сайт за *emm*-типизиране - https://www.cdc.gov/streplab/m-proteingene-typing.html

Изолатите *S. pyogenes* с различен тип от тези в базата данни на сайта, бяха повторно *секвенирани* и последователностите бяха подадени първо в www.cdc.gov. ,от където бяха получени номера на *emm*- типовете и след това бяха подадени в NCBI банката.

Таблица 13. Използвани праймери при нуклеотидното секвениране

Primer 1	GGGAATTCTATTSGCTTAGAAAATTAA
Primer 2	GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT

8. Мултилокусно секвениране, MLST (multilocuss equence typing)

Този нов прецизен метод се разработва в лабораториите на Martin Maiden, Dominique Caugant, Ian Feavers, Mark Achtman and Brian Spratt и се разглежда като един от най-важните успехи при молекулярното типизиране за последното десетилетие (Boers S. etal 2012; Feil E etal 2004). Чрез него се позволява диференциране на изолатите на молекулярно ниво, които с конвенционалните методи като тестовете за чувствителност към антибиотици и серотипизиране не могат да бъдат ясно разграничени.

Бактериалните щамове *S. pyogenes*, принадлежащикъм различни *emm*-генотипове бяха анализирани с MLST. На седем постоянно присъстващи при *S. pyogenes* гени (housekeepinggenes) бяха определени алелните профили и принадлежността към съответния секвенционен тип, което осигурява данни за проследяване на еволюционната биология на вида. След ДНК екстракция, за всеки щам са изпълнени по 7 различни PCR амплификациизa седемте консервативни локуса при *S. pyogenes.* Седемте консервативни гени и използваните праймери са представени в **табл. 14.**

Таблица 14. Седемте консервативни гени и използваните праймери за **MLST**

Гени	**Праймери (5' → 3')**	**Ампликон**
gki-up ***gki-dn*** глюкозо-киназа	GGCATTGGAATGGGATCACC TCTCCTGCTGCTGACAC	498 bp
gtr-up ***gtr-dn*** глутамат транспортиращ протеин	GAGGTTGTGGTGATTATTGG GCAAAGCCCATTTCATGAGTC	450 bp
murI-up ***murI-dn*** глутаматрацемераза	TGCTGACTCAAAATGTTAAAATGATTG GATGATAATTCACCGTTAATGTCAAAATAG	438bp
mutS-up ***mutS-dn*** протеин, участващ при ДНК поправка	GAAGAGTCATCTAGTTTAGAATACGAT AGAGAGTTGTCACTTGCGCGTTTGATTGCT	405bp
recP-up **recP-dn** транскетолаза	GCAAATTCTGGACACCCAGG CTTTCACAAGGATATGTTGCC	459bp
xpt-up **xpt-dn** ксантинфосфорибозил трансфераза	TTACTTGAAGAACGCATCTTA ATGAGGTCACTTCAATGCCC	450bp
yqiL-up **yqiL-dn** ацетил-Ко-Аацетилтранфераза	TGCAACAGTATGGACTGACCAGAGAACAAGATGC CAAGGTCTCGTGAAACCGCTAAAGCCTGAG	434bp

В главната реакционна смес са прибавяни всички реагенти, а след това праймерите и геномната ДНК от проучваните щамове (**табл. 15**).

Таблица 15. Реакционна смес за MLST

Компонент	**Количество**
Таг-микс	12.5µl
ddH2O	8.5µl
Праймер F	1µl
Праймер R	1 µl
ДНК екстракт	2µl
Краен обем	25µl

Условията за провеждане на MLST - PCR за 7-те консервативни локуса при *S. pyogenes* са показани в следващата **табл.16.**

Таблица 16. Температурни условия за провеждане на PCR за мултилокусно секвениране (MLST).

Етап	**Температура**	**Време**
Първоначална денатурация	95°C	5min
Денатурация	95°C	45s
Хибридизация	54°C	45s
Елонгация	72°C	45s
Финална елонгация	72°C	5min
Крайна фаза	4˚C	∞

Отчитането на резултатите от амплификацията е след гел-електрофореза с 2% агарозенгел за 40 min, при 120 mV. Използван е маркер за молекулно тегло PCR Sizer 100 - 1000 bp DNA Ladder (BioLabs, NewEngland, САЩ).

Определянето на MLST типовете беше според публикуван протокол https://pubmlst.org/spyogenes/Enright et al. 2001 Infect Immun69:2416-27 и алените профили бяха определени в https://pubmlst.org/spyogenes/.

9. Статистически анализ и интерпретиране на резултатите

За да се увеличи познавателната стойност и достоверността на дисертационния труд, беше използван алтернативен и дисперсионен статистически анализ при обработка на получените резултати (Величкова Н. 2006; Калоянов Т. 2004; Сепетлиев Д. 1976). Самият анализ беше извършен с подходящи статистически показатели, изразени в проценти.С помощта на този анализ бяха изчислени показателите за относителен дял, с цел да се докаже доколко наблюдаваната разлика е била в резултат на случайни фактори или е била породена от съществуваща закономерност. При репрезентативните проучвания се наблюдават само част от случаите, а получените резултати се обобщават за всички, в т.ч. и за ненаблюдаваните случаи. При това обобщение се допуска т.нар. репрезентативна грешка (Δ).

$$\Delta = t\sqrt{\frac{pq}{n}}$$

където t е коефициент, свързан с гаранционната достоверност, която подсигурява изследователя срещу допускане на погрешна преценка относно величината Δ,n е броят наблюдавани случаи, p е намереният процент, а q - допълващият процент

до 100. За сравнение на две независими, средноаритметични величини (х иу) със стандартните им отклонения ($\chi \pm \sigma$) и доверителни интервали бяха прилагани критериит и F, известни още като t - и F - разпределение или разпределение на Стюдънт и респ. Фишер

$F=\sigma^2_x / \sigma^2_y$

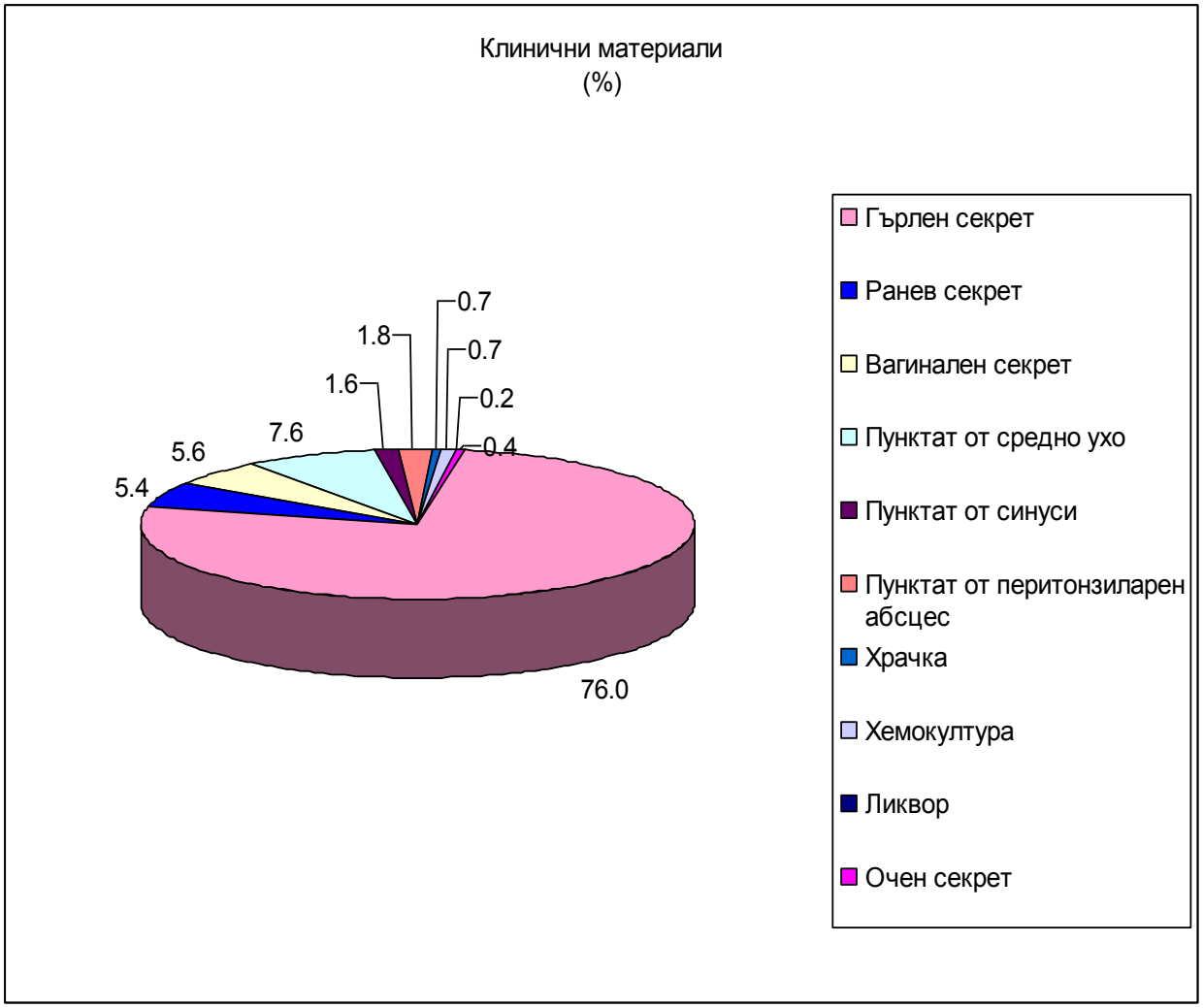
Където F е случайна величина, х и у – две случайни, независими величини,σ^2_x е общата дисперсия, а σ^2_y– междугрупова дисперсия. Получените стойности по формулите се сравняват със стойностите на t- и F-коефициентите, които са представени в таблици. (Величкова Н. 2006; Калоянов Т. 2004; Сепетлиев Д. 1976). Данните са представени със стандартно отклонение (Δ). Използвани са Стюдънт и Фишер тест и SPSS за Windows, Version 16.0. (SPSS Inc.,Chicago, USA). Резултатите се приемани за сигнификанти само при $P< 0.05$.

V. Резултати и обсъждане

1. Разпространение на инфекциите, причинени от *S. pyogenes*

В проучването бяха включени 445 щама *S. pyogenes,* изолирани през периода 2013-2017г. от гърлени секрети, рани, вагинални секрети, пунктати от перитонзиларен абсцес, пунктати от средно ухо, пунктати от синуси, храчка, хемокултура, ликвор, чието разпределение е представено на **фиг.17.** Болните, чиито данни са използавни в епидемиологичното проучване бяха разделени в различни групи според критериите: възраст, пол, клинични диагнози. Разпределението на пациентите с изолати *S. pyogenes* (GAS) по пол е представено във **фиг. 18**. Преобладаващата част от пациентите (59%, n=262) със стрептококовите инфекции бяха от женски пол. Подобни данни за разпределението на пациентите със заболявания, причинени от *S. pyogenes* по пол са характерни за скандинавските страни като Норвегия и Дания (Meisal R. et al. 2010; Lamagni T. et al. 2008). За разлика от нашите резултати, в други европейски страни като Чехия, Германия, Гърция, Италия и др., по-голяма част от болните са мъже (Lamagni T. et al. 2008).

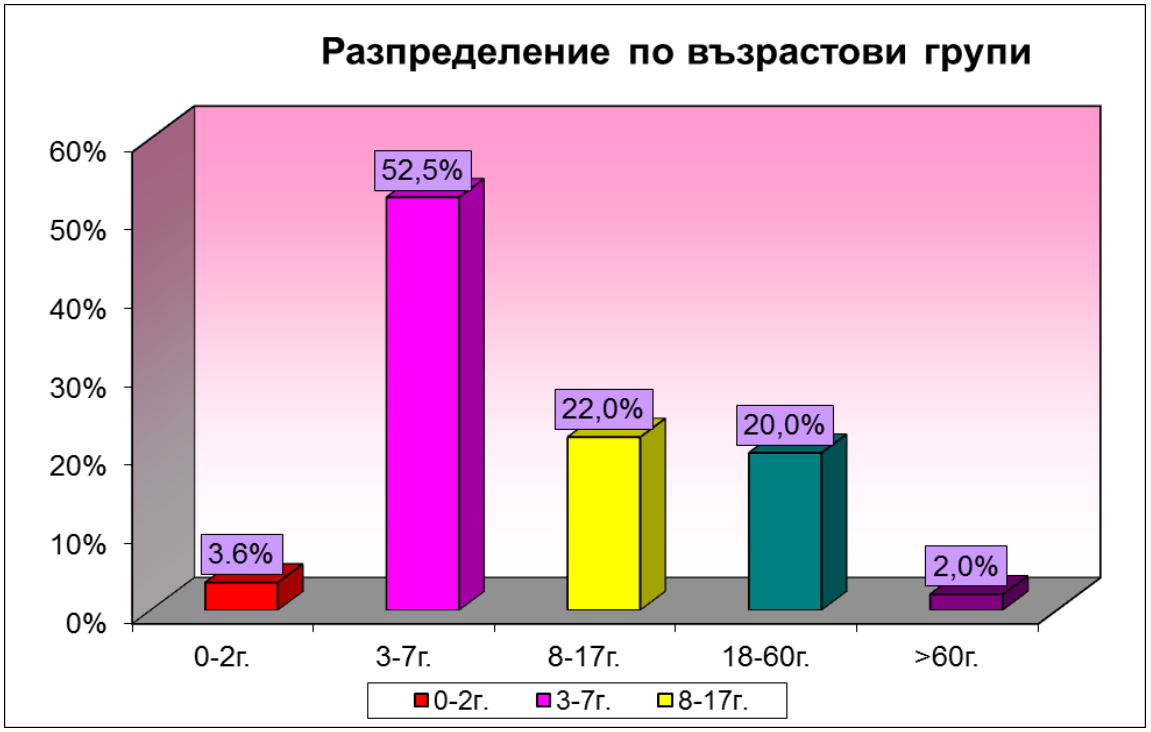
Щамовете *S. pyogenes* бяха изолирани от всички възрастови групи: от 0 до 86г. Разпределението на пациентите със стрептококови изолати по възраст е представено на **фиг. 19.** Най- голям беше делът на пациентите от 3 до 7 г. (52.5%, n= 233). Приблизително еднакво количество щамове са изолирани от болни във възрастовите групи 8-17г. (22%, n= 98) и 18-60г. (20%, n= 89). Значително по-малък е делът на изследваните със стрептококови инфекции деца от 0-2г. и възрастните над 60 г. възраст и респ. изолатите от тези групи са най-редки (**фиг. 19).**



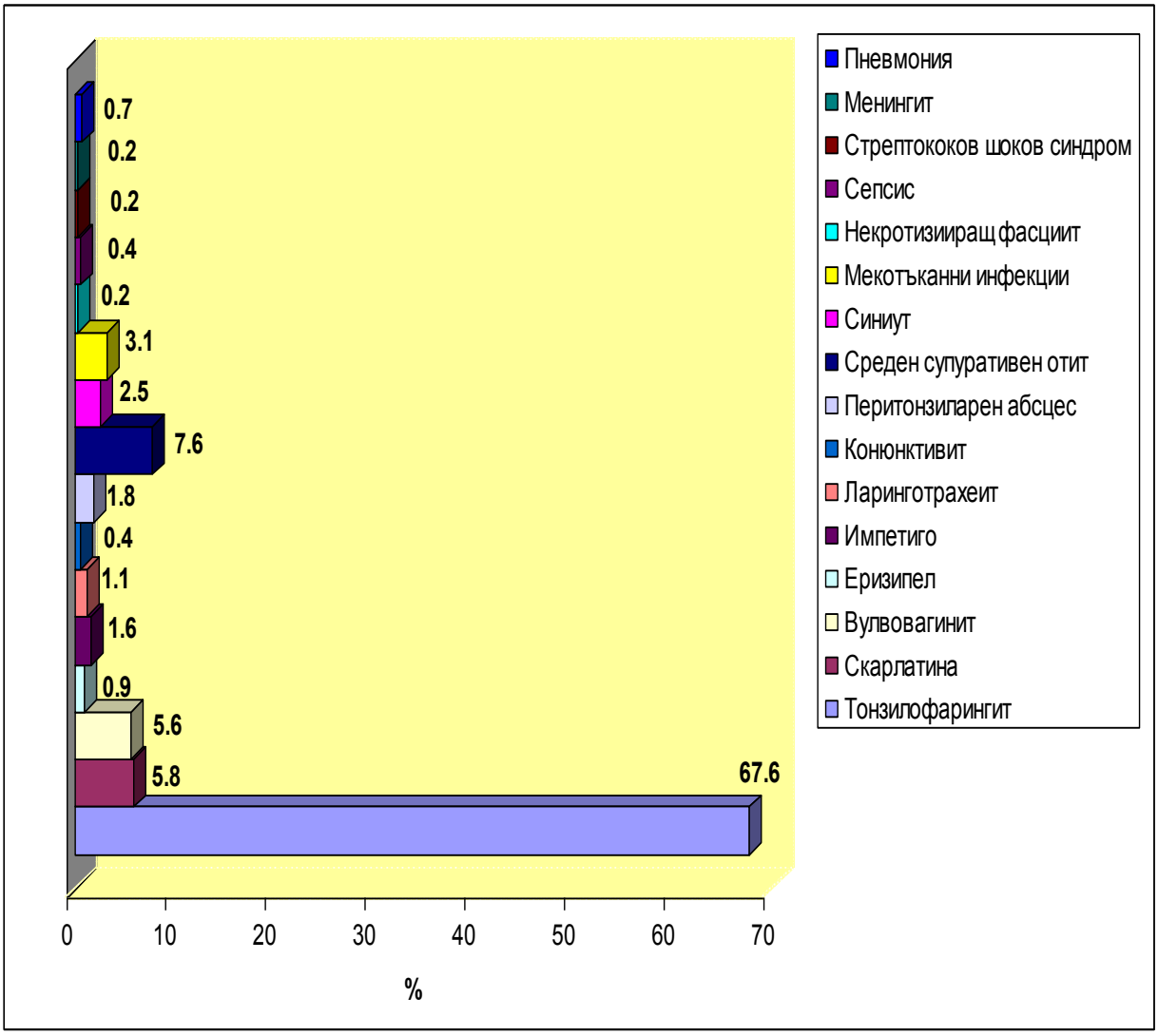
Фиг. 17. Разпределението на щамовете *S. pyogenes* според вида на материала



Фиг. 18. Разпределение на пациентите с изолати *S. pyogenes* по пол.



Фиг. 19. Разпределение на пациентите с изолати *S. pyogenes* по възрастови групи



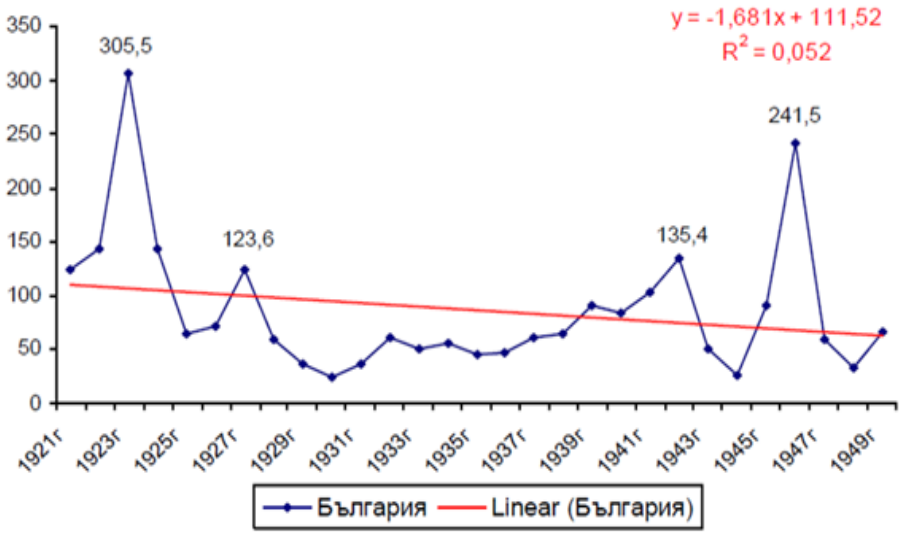
Фиг. 20. Разпределение на пациентите с изолати *S. pyogenes* според клиничните диагнози

Разпределението на пациентите според клиничната диагноза на пациентите е представено на **фиг. 20.** Почти 70% (n=301) от щамовете са изолирани от пациенти с диагноза тонзилофарингит. Известно е, че *S. pyogenes* е най-честият причинител на остър бактериален фарингит и засяга предимно деца в училищна възраст - 5 до 15г. (Shulman S. et al. 2012; Martin J. et al. 2004). Многобройни проучвания дават основание да се приеме, че стрептококите от група А са причинители на 15 до 30% от острите тонзилофарингити в детска възраст (Bisno A. 2001). Заболяемостта от тях варира в различните страни, както и в рамките на една страна, което се определя от сезона, възрастовата група, социално-икономическите условия, фактори на външната среда, качеството на здравната система (Kaplan E. 1996). Болните от тонзилофарингит, са естествен резервоар на този микроорганизъм и са един от факторите за неговото разпространение и развитие на инвазивни заболявания при възрастните (Factor S. et al. 2005).

Сред стрептококовите заболявания в нашето проучване беше значителен делът на средния супуративен отит - 7,6% (n= 34), от всички доказани инфекции с тази етиология за този период. По литературни данни, *S. pyogenes* причинява до 4% от случаите на остър среден отит при деца и често е придружен с инфекция на горните или долните дихателни пътища (Segal N. et al. 2005; Shulman S. et al. 2005).

Приблизително 6% (n=26) от щамовете GAS бяха изолирани от пациенти със скарлатина. Заболяването е възникнало и се е развивало епидемиично през XIXвек и е станало по-рядко и по-леко протичащо след въвеждане на антибиотичната употреба за развитите страни през XX век. Въпреки това, през последните 10 г. се съобщава за възникване на нови епидемии в някои страни, като Великобритания през 2014г. и Хонконг през 2011г. (Wong S. и Kwok-Yung Y. 2018; Turner C. et al. 2016)

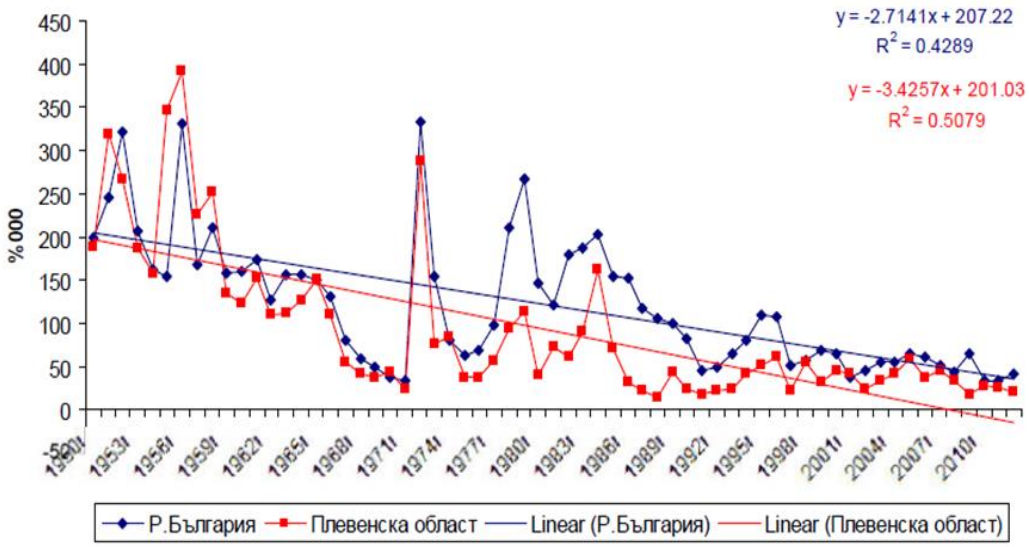
Справка с официалната здравна статистика разкрива следната динамика на заболяемостта от скарлатина в България, представена на **фиг.21.**



Фиг. 21. Заболяваемост от скарлатина в България през периода 1921-1949г. (Иванова Т. 2014, автореферат)

Периодът 1921-1949 г. се характеризира с началото на надзора и контрола на болестта, вкючващи регистрация на болните, тяхната изолация и карантиниране на контактните (Иванова Т. 2014, автореферат). Заболяемостта от скарлатина в интервала 1921-1927 г. е висока, следва междуепидемичен период със заболяемост под 61.9‰, през 1930 г. заболяемостта е едва 24.3‰. От 1938 г. се наблюдава ново повишение, през следвоенните години заболяемостта е висока, вероятно поради по-пълната регистрация.

Периодът 1950-2012 г. се отличава с ефективен епидемиологичен контрол на скарлатината. Началото е поставено през 50-те години, когато започва масовото прилагане на пеницилина и създаването на специализирани органи за борба с инфекциозните заболявания. Анализът, базиран върху официалните данни, посочва три големи епидемични вълни през този период (**фиг. 22**)



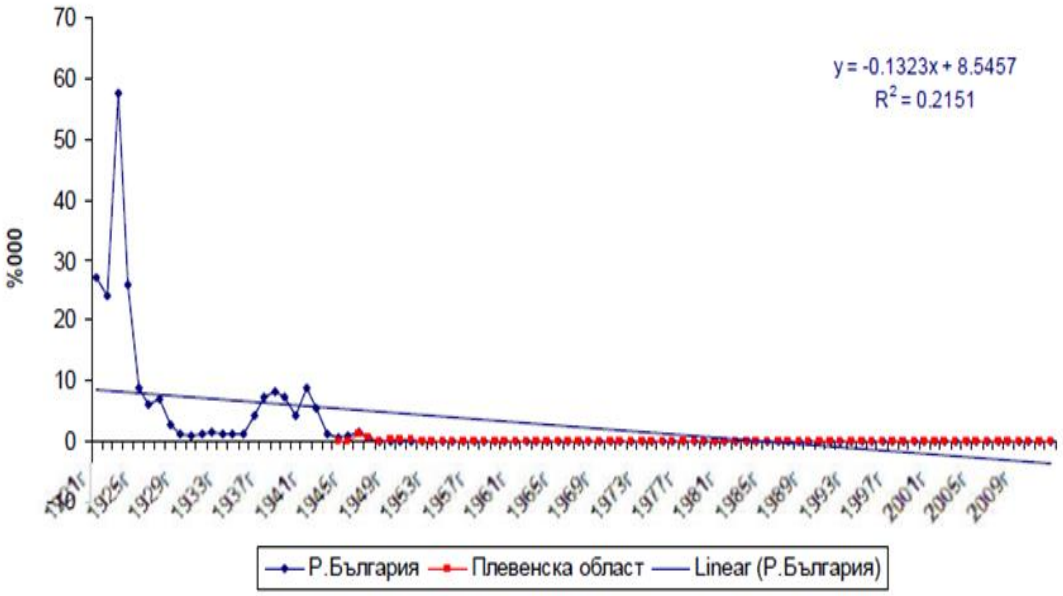
Фиг. 22. Заболяваемост от скарлатина в България и Плевенска област през периода 1950-2012г. (Иванова Т. 2014, автореферат)

Трендовата линия на заболяемостта от скарлатина в България през периода 1950-2012 г. е с отрицателен наклон, тенденцията на заболяемостта показва снижение (**фиг. 22**).

През втория разглеждан период употребата на пеницилин в лечението на скарлатината е високоефективно и води да трайно снижение на заболяемостта. Проучвания на Стоилова Й. (2009) също демонстрират ролята на рутинното лечение с пеницилин като трайно действаща причина, формираща измененията в интензивността на епидемичния процес. Наблюдаваната периодичност в епидемичния процес се свързва както с натрупване на възприемчиво население, така и с настъпващи промени във вирулентността и разпространението на серологичните типове на стрептококите от група А. Смъртността и леталитетът при скарлатината показват непрекъснато снижаване, както в нашата страна, така и в почти всички страни по света (Иванова Т. 2014 автореферат; Briko N. et al. 2003, Czarkowski M. et al. 2010).

Базирайки се на регистрираните стойности на тези показатели, могат да се разграничат три периода: период на високи показатели, обхващащ времето от 1921 г. до 1944 г., втори период на ниски показатели - от 1945 г.

до 1974 г. и трети период – след 1975 г. с практически почти нулеви смъртност и леталитет (**фиг. 23**).



Фиг. 23. Смъртност от скарлатина в България и Плевенска област през периода 1921-2012г. (Иванова Т. 2014, автореферат)

Стремителното спадане на смъртността и леталитета при скарлатината, започнало след 50-те години на миналия век, е обусловено от трайно действащия фактор – употребата на пеницилин (Иванова Т. 2014 автореферат).

Епидемиологичните проучвания не са установили с категоричност кои са причините, довели до предшестващото понижаване на заболяемостта и смъртността от стрептококови инфекции. Съществуват известни индикации, че повторяемите инфекции от подобни М-типове повсеместно, засягащи населението в детска възраст в продължение на десетилетия и поколения, водят до известна степен към придобит имунитет (Quinn R. et al. 1982).

Обсъжда се и възможна еволюция на щамовете GAS към по-слабо вирулентни, но не и по-слабо инфекциозни варианти. Микробните фактори наред с намаляване на пренаселеността в индустриализираните страни, могат частично да обяснят спада в тежестта на стрептококовите инфекции (Quinn R. et al. 1982).

2. Разработване на нови, бързи методи за директно откриване на *S. pyogenes* в пациентски проби с помощта на молекулярно-генетични техники

Бяха изследвани 167 деца и юноши (на възраст 1-17 г.) с възпалителни заболявания на горните дихателните пътища: тонзилофарингит (152) и перитонзиларен абсцес (15). За доказване на стрептококовата инфекция бяха приложени едновременно и сравнени следните четири метода:

- ❖ Класически метод с бактериална посявка
- ❖ Бърз имунохроматогафски тест (rapid immunochromatographic test - RICT)
- ❖ Новоразработен мултиплекс PCR за гените *speB* и *SpyCEP,*
- ❖ Новоразработен дизайн на real time - PCR с праймери за *spyCEP*

При извършване на **конвенционалното културелно изследване** на 167 клинични проби от пациенти с тонзилофаринит и перитонзиларен абсцес бяха изолирани *S. pyogenes* от 140 проби от 152 от болни с бактериален тонзилофарингит и само 5 от 15 за перитонзиларен абсцес. От един перитонзиларен абсцес беше изолиран *S. anginosus*.

Бързият имунохроматографски тест показа положителен резултат при 135 от теставаните проби (130 - тонзилофарингит, 5 перитонзиларен абсцес). 10 от пробите взети от пациенти с тонзилофарингит показаха отрицателни резултати с бързият имунохроматографски тест. При конвенционална посявка тези проби показаха бактериален растеж в микробно число < 1000 cfu/ml след обогатяване в бульон на Тод. Един пунктат от перитонзиларен абсцес показа фалшиво положителен резулатат при тестване с RICT, тъй като при конвенционална посявка тази проба показа растеж на *S. anginosus*, а

разработените от нас генетични методи бяха отрицателни при този пациент. Положилителен бърз имунохроматографски тест е илюстриран на **фиг. 24**.
Разработените в проучването молекулярно-генетичните методи (**Real-time PCR и мултиплекс PCR**) показаха положителни резулутати при 159 (n=148 тонзилофарингита, n=11 перитонзиларни абсцеси) от тестваните 167 проби.

При използването на ДНК базиран тест за откриване на GAS е важно използването на задължително присъстващи в бактериалния геном елементи. Такива са например гените, кодиращи протеазите *speB* и *spyCep* и още една ДНКаза – *sdaB* (Gergova R. Et al. 2015; Shulman S. et al. 2012; Sumby P. et al. 2005; Tse H. et al. 2012) . При настоящето проучване RT-PCR беше извършена с праймери за гена *spyCEP* – хромозомен ген, кодиращ протеазен инхибитор, който промотира резистентност на GAS срещу действието на неутрофилите чрез освобождаване на IL-8 и други хемокини (Turner C. et al. 2009) и е доказан във всички изследвани български щамове GAS. Мултиплекс PCR беше извършен с праймери за гените *speB* и *spyCep*.

Специфичността на използваните праймерите беше доказана с 28 ДНК екстракта от различни видове Грам-позитивни бактерии (18): *Streptococcus agalactiae – Group B Streptococcus (GBS), S. anginosus – Streptococcus gr.C (GCS), S. bovinum – Streptococcus gr.D (GDS), S. mutans, S. mitis, S. sanguis, S. gordonii, S. constelatus, S. pneumoniae, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Corynebacterium diphteriae, C. pseudodiphteriticum, C. minutissimum, Erysipelothrix risiopathiae, Actinomyces newii, Listeria monocytogenes, Listeria ivanovi*; Грам-негативни бактерии (9): *Moraxella catarrhalis, Haemophillus influenzae, Haemophillus parainfluenzae*, *Kingella kingae, Eikenella corrodens*, *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomona saeruginosa, Acinetobacter baumannii* и най-честият клиничен изолат от кандидите *Candida albicans*. С нито един микробен вид не се получи положителен PCR, както във варианта на мултиплекс с електрофореза, така и при варианта на реакцията, визуализиран в реално време, без електрофореза. Това потвърди на 100% специфичността на

праймерите и респ. на молекулярно-генетичните методи, базирани на тях за доказване на стрептококвата етиология. След тестването на 4-те метода едновременно установихме, че генетичните методи **real-time PCR (*spyCep*) и мултиплекс PCR (*speB, spyCep*)** показват най-висока чувствителност (табл. 17).

Таблица 17. Резултати от едновременното изследване на 167 клинични проби по 4 метода за диагностика на *S. pyogenes*.

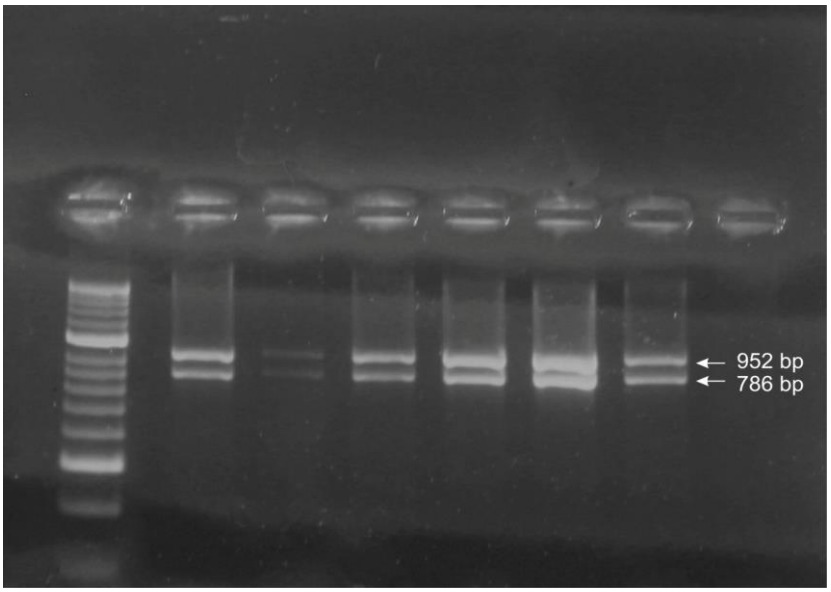
Диагноза на пациента	Брой (+) проби с рутинна посявка No (% ±Δ)	Брой (+) проби с RICT No (% ±Δ)	Брой (+) проби cRT-PCR No (% ± Δ)	Брой (+) проби с мултиплекс PCR No (% ± Δ)
Тонзилофарингит	140	130	148	148
Перитонзиларен абсцес	5	5	11	11
Общ брой изследвани проби	145 (**86.83** + 5.13)	135 (**80.84** + 5.97)	159 (**95.21** + 3.24)	159 (**95.21** + 3.24)

За положитена контрола в молекулярно-генетичните методи беше използвана ДНК от *S. pyogenes* ATCC® 21547, изолирана при същите условия както са изоларини ДНК продукти и от другите проби.

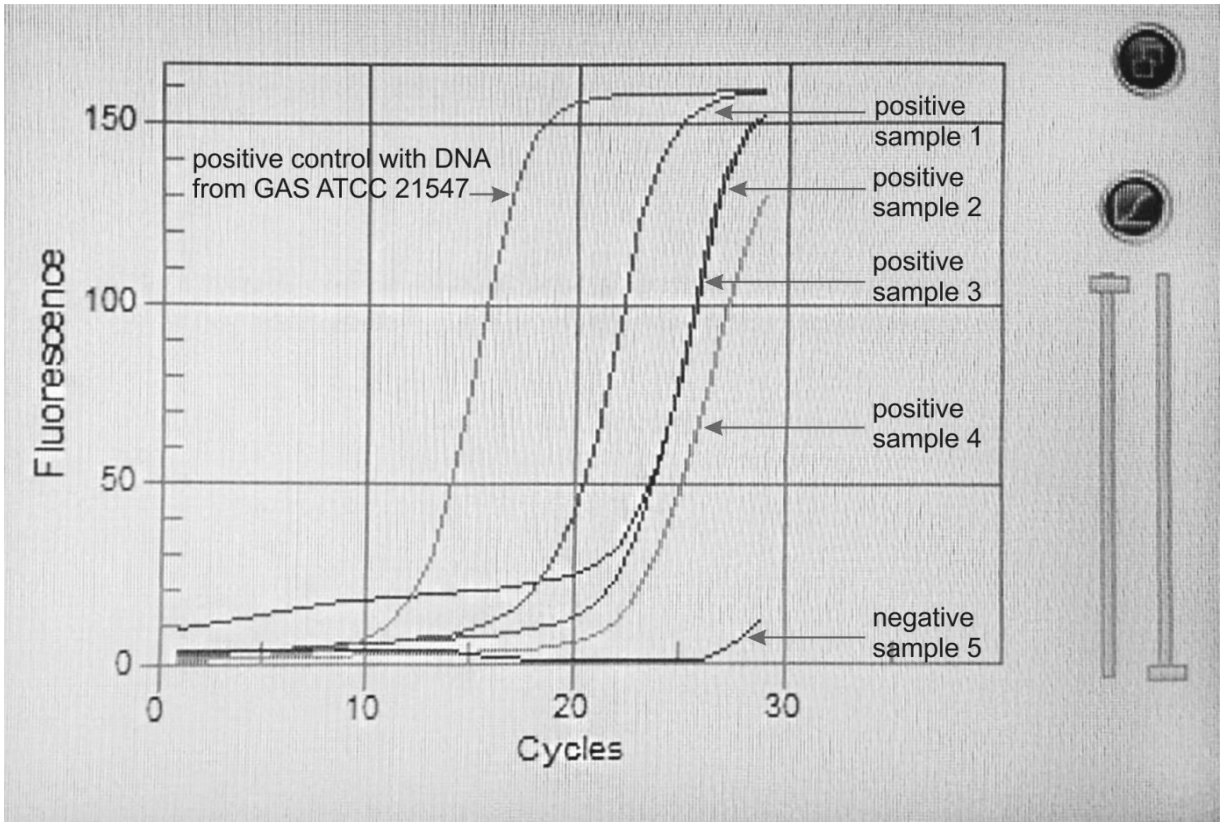
Някои от резултатите получени чрез мултиплекс PCR са представени на **фиг. 25,** а тези real-time PCR – на **фиг. 26.** Молекулярно-генетичните техники бяха положителни и в проби с изключително малък брой жизнеспособни – под 1000 кл/мл и с несигурна виталност на бактериалните клетки, което потвърждава изключителната чувствителност на новоразработените методи.



Фиг. 24. Положителен RICT на *S. pyogenes*



Фиг. 25. Мултипллекс PCR – агароза гел елктрофореза. Ампликоните: s*peB* – 952 bp и *spyCEP* – 786 bp. Пътека 1 – ДНК маркер 100 bp; Пътека 2 – позитивна контрола с ДНК от *S. pyogenes* ATCC 21547; Пътеки 3-7 положителни клинични проби; пътека 8 – отрицателна проба.



Фиг. 26. Real Time PCR. Установяване на таргетната молекула на *spyCEP* с помощта на флуоресцентно багрило. Първата крива е с позитивна контролна ДНК след 10 цикъл; Следващите близо до 20 цикъл - 4 позитивни клинични проби; Последната крива след 25 цикъл е отрицателна проба.

Понякога конвенционалното микробиологичното изследване е трудно, особено, когато материалите за изследване са пунктати от абсцеси или други биологични течности, които съдържат бактерицидни фактори от системата на комплемента, възпалителни медиатори, фагоцити и др., убиващи или потискащи развитието на бактериите в изкуствени хранителни среди (Tsatsaronis J. et al. 2014). Нашите резултати от микробиологичното изследване на тонзилофарингити и перитозиларни абсцеси показаха липса на растеж при 8.38% (n=14) от пробите, които имаха положителни резултати от PCR за детекция на GAS. Самостоятелното изследване чрез културелен метод не е достатъчно за навременното и коректно откриване на живи патогенни бактерии и/или в случаите, когато антимикробната терапия вече е започнала и потиска техния растеж *in vitro*.

Бързият имунохроматофраски тест е много лесен, бърз и успешен метод за скрининг от гърлени секрети, но не е еквивалентен на рутинната микробиологична посявка. Фалшиво отрицателни резултати се получават, тогава когато броят на бактериите е малък (под 1000 кл/мл) и респ. концентрацията на бактериалните антигени е ниска (Upton A. et al. 2014). Фалшиво положителни резултати се получиха само в случаите, когато пациентът е бил колонизиран с редки стрептококови видове, които носят А антиген по Lancefield, но не е *S. pyogenes* (SlingerR. etal. 2011; SpellerbergB. etal. 2016). Използваният от нас StrepAAntigenRapidTest, (UltimedProducts, Deutschland) GmbH (UM) показва най-добра чувствителност Upton A. и колектив (UptonA. etal. 2014), които доказват, че този тест има най-висока чувствителност сред 4 други тествани от тях RICT.

С използването на PCR могат да бъдат открити малки концентрации GAS, независимо дали са живи или мъртви. При коректно изпълнение тази техника е много специфична и чувствителна (TsatsaronisJ. etal. 2014). Разликата между двата ДНК теста беше само в тяхната бързина, като резултата беше в полза на RT-PCR – с около час - два по-бързо и по-лесно. Освен това при този вариант на гентичния метод се избягва електрофорезата. Единственото, което е необходимо е по-скъпа апаратура за извършване на тази реакция.

С помощта на конкретното сравнително проучване, за първи път в България, бяха разработени два нови варианта на генетични методи за бърза диагностика на GAS директно в проби от пациенти. Новите PCR техники показаха 100% специфичност и чувствителност при сравнение с рутинния културелен метод и бързия имуно-хроматографски.

2. Откриване на гени, кодиращи вирулентност при *S. pyogenes*

Бяха приготвени 445 ДНК екстракта и бяха тествани за наличие на гени кодиращи ДНК-азите: ***sdc, sdaB, sdaD, spd3***; стрептококовите суперантигени: ***speA, speC, speH, speF, speG, speI, speJ, speK, speL, speM, ssa***; протеазите: ***speB, spyCEP, mac; sic*** (стрепткоков инхибитор на комплемента) и ***slo*** **(**ген за стрептолизин О) и ***smeZ*** (митогенен екзотоксин Z) – общо 21 гена. Наличието на генитите *speB, spyCep, sdaB* при всички изследвани от нас щамове, прави възможно използването им при идентификацията на *S. pyogenes* чрез молекулярно-генетични методи или използването им като положителна контрола при PCR-техники.

Честота на разпространение на факторите за вирулентност на българските клинични изолати *S. pyogenes* и тяхното сравнение и съпоставка с честотата срещане в други страни по света, са показани в **табл. 18**.

Настоящото проучване показа, че гените *speB, spyCep, sdaB* и *slo* се срещат в 100% от изследваните от нас щамове *S. pyogenes* (**табл. 18**)

SpeB е хромозомно кодирана цистеин протеаза, която се открива във всички изследвани щамове, но се експресира само при някои от тях. Ензимът разгражда компоненти от извънклетъчният матрикс като фибронектин, плазминоген и витронектин, цитокини, хемокини, C3b от комплемента, IgA, IgM, IgD, IgE както и разгражда/активира компоненти от собствената клетъчна повърност на *S. pyogenes* (Nelson D. et al. 2011; HytoÈnen J. et al. 2001). Генът *speB* участва в пост-транслационната регулация на синтеза на други вирулентни фактори и кодира стрептококови протеини, свързани с мукозна колонизация и образуване на биофилм в инвазивни типове (Berman H. et al. 2014). Идентични данни за абсолютното присъствие на *speB* във всички изследвани стрептококови изолати (**табл. 18**) са докладвани за Нова Зеландия и Китай (Yang P. et al. 2013; Proft T. et al. 2003). Подобни резултати с минимални разлики са получени и в Индия (Mathur P. et al. 2014).

Таблица 18. Честота на разпространение на факторите за вирулентност (%) на българските клинични изолати *S. pyogenes* в сравнение с честотата, публикувана за други страни по света.

Фактори на вируленстност	България **(%)**[a]	Португалия[b]	Дания[c]	Швеция[d]	САЩ[e]	Бразилия[f]	Нова Зеландия[g]	Австралия[h]	Япония[i]	Китай[J]	Индия[k]
ДНКази											
sdc	**65.5**										
sdaB	**100**										
sdaD	**55.4**										
spd3	**51.8**										
Токсини											
speA	**31.5**	32.08	25-40	11	55	42	31	35	67	22.1	7.5-40
speC	**28.6**	51.46	24-60	64	45	43	42	50	76	99.4	24-30
speF	**63.5**										
speG	**49.7**	86.88	13-99	90	100	100	100	90	78	99.7	84
speH	**4.3**	17.08	1-88	20	30	36	26	19	40	76.2	28.5
speI	**25.2**	15.21	0-88		17	62	16	17		76.0	15
speJ	**66.8**	32.71	0-71	24		14	100	51		21.5	30
speK	**28.7**	24.58	85-87		42	0	15	9		0.6	
speL	**27.6**	9.17	85-92		1	0	5	8		1.1	27
speM	**29.0**	9.17	83-91		44	5		8		2.2	25
ssa	**28.7**	35.42	14-31		28	8	32	22	40	97.7	16.5
smeZ	**80.2**	96.04	38-50		100	99	92	95		97.7	89
slo	**100**										
Протеази											
spe B	**100**						**100**			**100**	**80-97**
spy CEP	**100**										
mac	**82.4**										
sic	**35.8**										

[b]Friães et al. (2012);[c]Ekelund et al. (2005); Luca-Harari et al. (2008); Lintges et al (2010)[d]Darenberg et al. (2007); [e]McMilan et al. (2006)
[f]Berman et al. (2014); [g]Proft et al. (2003)[h]Commons et al (2008); [i]Ikebe et al (2002); Dhanda et al (2011)[j]PengYang et al. (2013); [kj]Mathur et al. (2014)

Ние установихме 100% присъствие на *SpeB* при всички изолати, с което потвърждаваме твърдението на много автори, че вероятно *SpeB*е хромозомно кодиран ген (HytoÈnen J. et al. 2001)

Протеазата *spyCEP*, която отново присъства във всички български щамове *S. pyogenes* инхибира неутрофилите чрез специфично разцепване на IL-8 и други хемокини, един от многофункционалните пептиди в защита на гостоприемника. Това репресира фагоцитарната защита и допринася за по-висока вирулентност като регулира протеолитичната активност и участва в патогенезата на инвазивна инфекция на меките тъкани. Така *spyCep* способства за избягване фагоцитиращото действие на неутрофилите и играе ключова роля при разпространението на бактериалната инфекция при инвазивните мекотъканни стрептококови инфекции (Zinkernagel et al. 2008). Няма налични понастоящем данни за честотите и географското разпределение на spyCEP, но тези данни са необходими и важни, защото продуктите на гените *speB* и *spyCep* са и едни от потенциалните кандидати за ваксина срещу *S. pyogenes* (Tutner C. et al. 2009; Morefield G. et al. 2014). В животински модел, spyCEP антиген стимулира защитните антитела, които неутрализират активността на IL-8 разцепване (Zingaretti C. et al. 2010).

Следващият ген, който се установяваше при всички тествани от нас щамове *S. pyogenes* беше *slo* (**табл. 18**). 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*, както и от други бета-хемолитични стрептококи, генетично сходни с GAS, като някои представители на група С и гр. G, а в резултат на действието на токсина е формирането на мембранни пори в неутрофилите и макрофагите, с индуцирана апоптоза в тях (Timmer A. et al. 2009).

В наше проучване, доказваме, наличието на генът *slo* и при значителна част от изследваните щамове GCS и GGS.

В макроорганизма срещу този токсин се образуват антитела (AST), чийто титър достига своите максимални нива най-често около 3 до 6 седмици след инфекцията (Shet et al. 2002). Този показател има важно диагностично значение при доказване на ретроспективна стрептококова инфекция, причинена от *S. pyogenes,* както и прогностична стойност при установяване на ревматични заболявания и другите автоимунни усложнения.

Суперантигените са голямо семейство термостабилни екзотоксини, мощни митогени, които имат способността да стимулират прекомерна пролиферация на Т-лимфицитите и по този начин блокират ефекта на имунния отговор. Експресират се от малък брой бактериални видове като *S. pyogenes, S. dysgalactiae* (group C *Streptococcus*), *S. equi* (group G streptococci), *Staphylococcus aureus* и някои вируси (Proft T. & Fraser J. 2016). Те предстявляват фактори за вируленстност, които играят важна роля в развитието и патогенезата на инвазивните инфекции (Hauser et A. al. 1991).

Данните от нашите проучвания са сравнени с тези от Дания, Швеция, Португалия, САЩ, Бразилия, Нова Зеландия, Австралия, Япония, Индия и Китай (**табл. 18**). Някои от суперантигените на *S. pyogenes* като *speI, speJ, speK, speL, speM,* се срещат по-често в български изолати в сравнение с тези в Португалия, Швеция, Австралия, Бразилия и Индия (**табл. 18**). Суперантигените при *S. pyogenes* са един от основните рискови фактори за развитието на инвазивни стрепткокови заболявания (Zeppa J. et al. 2017). Въпреки това обаче, за самостоятелната роля на всеки един от екзотоксините се знае твърде малко. При експериментално клониране на rSPEJ изолирани от пациенти с SSTS е установено, че протеинът е силно антигенен, показва 41% сходство със стуктурата на SPEA и че лицата с имунитет към SPEA са имунизирани и към SPEJ. SPEJ е пирогенен и летален за зайци, стимулира мощна пролиферация както на заешки, така и на човешки лимфоцити (McCormick J. et al. 2001).

Ние показахме, че 66.8% от българските щамове *S. pyogenes* са *speJ*+, стойност много по-висока от наличните до момента данни са някои страни от Европа, САЩ, Индия, Китай. Изключение прави само Нова Зеландия, където генът се открива при 100% от изследваните щамове (Proft T. et al. 2003)

В проучените от нас проби, *SpeL* и *speM* са открити заедно (с изключение на един щам), подобно на резултатите за португалски и австралийски изолати (Proft T. et al. 2003; Friães A. et al. 2012; Commons R. et al. 2008) и много често са в комбинация със *SpeK*. Това, че се откриват почти винаги заедно предполага наличието на стабилна генетична връзка между тях (Proft T. & Fraser J. 2016). Причината е, че един и същ бактериофаг *fspe*L / M съдържа двата гена заедно (Proft T. et al. 2003).

Според някои автори, комбинацията от гените *speK, speL* и *speM* е характерна за щамове, които се свързват с автоимунни усложнения като остър ревматизъм (Proft T. & Webb P. et al. 2003; Proft T. & Fraser J. 2003; Commons R. et al. 2008)

Други гени, кодиращи суперантигени като *speC, speG, speH* се срещаха с по-ниска честота при нас, отколкото в страни като Дания, Швеция, САЩ, Бразилия, Нова Зеландия, Австралия, Япония, Китай (**табл. 18**).

Получените от нас резулатати, за честотата на разпространение на гените *speA, ssa*, бяха сходни с тези, които са докладвани в Португалия, Нова Зеландия и Австралия (**табл. 18**)

Генът *speA* е един от най-често изследваните поради множеството данни, които показват връзка между гена и SSTS (Chaussee M. et al. 1996; Musser J. et al. 1991) и други инвазивни заболявания (40%-90%) (Tyler S. et al. 1992; Luca-Harari B. et al. 2008; Imöhl M. et al. 2010). Смята се, че при неинвазивни изолати се среща значително по-рядко (15%-20%) (Sriskandan S. et al. 1999).

S. pyogenes е често срещана причина за инвазивни инфекции и основна роля за това играят извънклетъчните ДНК-зи (Hasegawa T. et al. 2010). Нашите резултатите показаха, че всички изследвани изолати имат поне един ген за ДНК-за (*sdaB*), повече от 65% - два гена за ДНК-зи- *sdc* (65.5%), а повече от половината носят и гените *sdaD* (55.4%), *spd3* (51.8%). Няма данни за тези генетични елементи в *S. pyogenes* от други страни. До момента са известни 4 вида екстрацелуларни ДНК-ази при *S. pyogenes*- A, B, C и D. ДНК-зи A и C имат като специфичен субстрат ДНК, докато ДНК-ази B и D са по-малко специфични и действат към двата вида нуклеинови киселини: ДНК и РНК. B (sdaB) е хромозомно кодирана и се среща във всички щамове *S. pyogenes,* потвърдено и от нашите данни. Останалите 3 вида, присъстват само при част от изследваните щамове, което предполага, че са кодирани от подвижни генетични елементи, например бактериофаги (Broudy T. et al. 2002). Производство на множество ДНК-зи с различни субстрати дава предимство при оцеляването на тези причинители в гостоприемника, което допринася за развитието и разпространението на инфекциозния процес. ДНК-зата, кодирана от гена sdc е отговорана за способността да устои на опсонизиране и фагоцитоза (Hasagawa T. et al. 2010). Трябва да се отбележи, че генът *sdaD* беше установяван най-често в пробите от рани, ($P<0.05$), което е още едно потвърждение за участие на този ензим в инвазивността на стрептококовите причинители на по-дълбоки тъканни инфекции.

Генът *mac* се откриваше при 82.4% от изследваните от нас щамове. Продуктът на *mac* гена понижава значително вродения имунен отговор и се продуцира от патогенни щамове, вкл. M1. (Voyich J. et al. 2004; on Pawel-Rammingen U & Björck L. 2003).

3. Разпространение на факторите на вирулентност при инвазивни и неинвазивни изолати *S. pyogenes*

В настоящото проучване беше направено сравнение между честота на разпространение на 21 фактора на вирулентност между неинзваивни изолати и изолати от стерилни области на човешкото тяло които могат да бъдат разгледани на **табл. 19**. Щамовете бяха разделени на 2 групи: инвазивни и неинвазивни, според мястото и начина на тяхното изолиране. Първата група включваше изолати от суперфициални мукозни инфекции като назофарингиални и вагинални секрети, както и такива от кожни инфекции като импетиго и еризипел (n=368). Втората група се състоеше от щамове, изолирани от: хемокултура, ликвор, пунктати от перитонзиларен абсцес, пунктати от средно ухо, пунктати от синуси, раневи секрети от дълбоки мекотъканни абсцеси (инвазивни, n=77).

След статистическа обработка на получените резултати беше установено, че гените за важните суперантигени като *speA, speF, speL, speM* са по-често срещани в инвазивните български изолати *S. pyogenes*, което може да обясни по-високият инвазивен потенциал на тези щамове (**фиг. 28**).

Нашите данни също потвърдиха връзката между инвазивните изолати и *speA* в 43% ($P<0.05$), въпреки че неговата самостоятелна роля по време на инвазивната инфекция е все още неясна (Sriskandan S. et al. 1999). Генът *speA*, се открива в повечето щамове *S. pyogenes* изолирани при STSS в САЩ и в малък брой от щамовете изолирани при неинвазивни заболявания, резултати сходни на получените от нас (Proft and Fraser, 2016). Интересен е фактът, че в нашето проучване беше включен 1 щам *S. pyogenes*, който беше изолиран от пациент с STSS и при този стрептококов изолат наличието на *speA* не се установи.

Подобно на нашите данни, генът *speA* се среща при 40% от инвазивните щамове *S. pygones* изолирани в Дания (Luca- Harari B. et al. 2008), както и в инвазивните щамове изолирани в повечето от Европейските страни (Creti R. et al. 2007).

За разлика от нашите резултати в Дания, един от най-често срещаните гени при инвазивните изолати е *speG* (Bianco S. et al. 2006), но той се доказва само при половината от нашите инвазвивни и неинваивни изолати **(табл. 19)**. В Германия, генът *SpeA*, както и при нас се срещаше значитително по-често при инвазивните изолати, заедно с *speJ*, който при нас се откриваше с подобна честота и при двете групи изолати, без сигнификантна разлика между тях (Lintges M. et al. 2010).

Генът *speM* срещаше при 22.9% от инвазивните изолати в Норвегия, а генът *speL*- при 3.4% от тях (Meisal R. et al. 2010). При нас съответните гени се срещаха с по-висока честота, а именно при 40% от инвазивните щамове (**табл. 19**).

SpeF, който е разпространен при 98.1% от инвазвните щамове в Норвегия (Meisal R. et al. 2010), докато при нас честита беше по-малка - 75% от тях.

Други излседвания показват, че гените *speM* и *speL* се срещат по-често при изолати от фарингити (Friães A. et al. 2012)

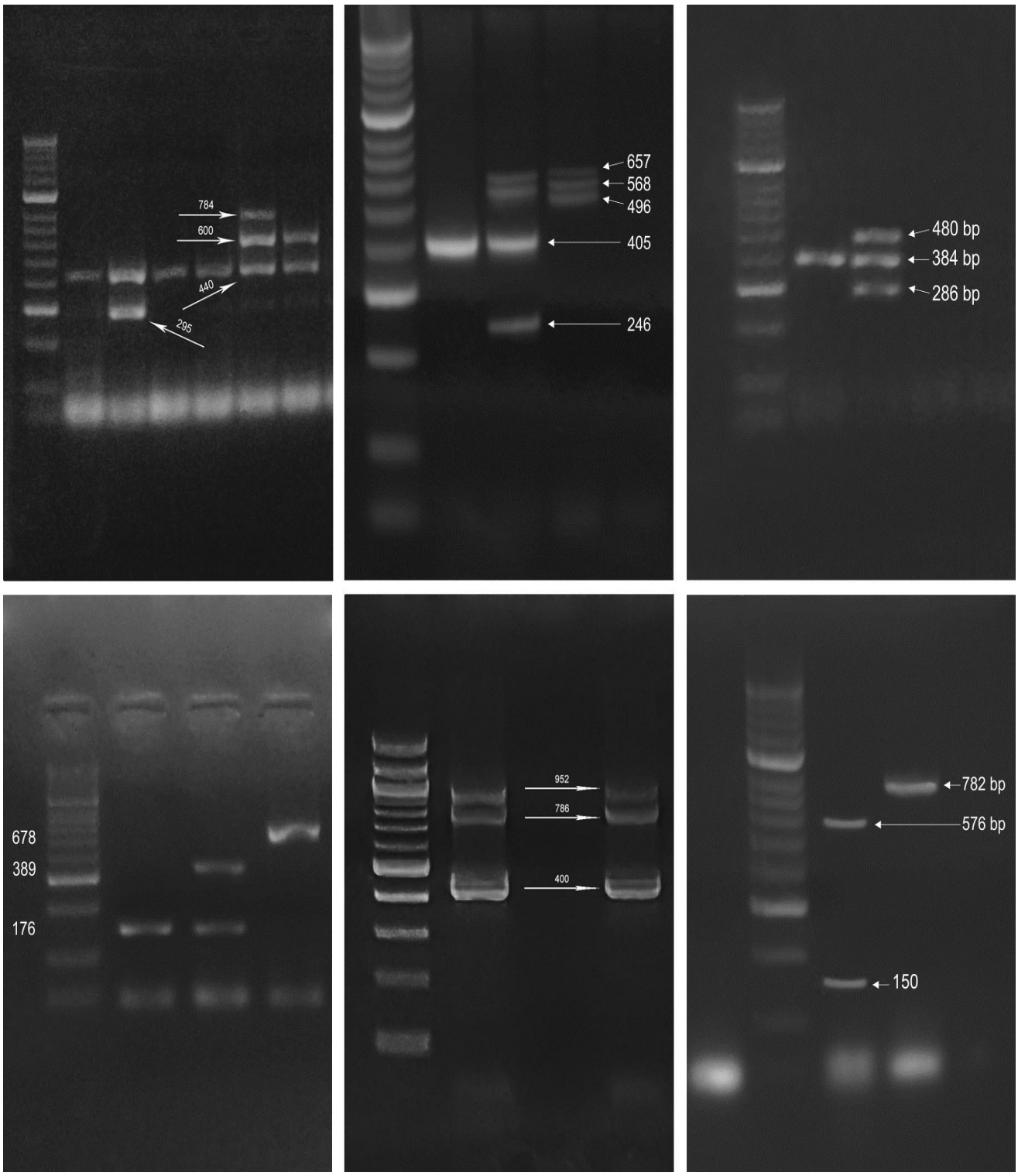
Всички изследвани щамове, от инвазивни и от неинвазивни инфекции, бяха положителни за гените *speB, spyCep, slo, sdaB* (**табл. 19**).

Значението на някои от суперангигените при инвазивнивните щамове остава под въпрос, тъй като се срещат с подобни честоти както при инвазивните, така и при неинвазивните щамове (Descheemaeker P. et al. 2000; Rivera A. et al., 2006; Imohl M. et al. 2010).

Таблица 19. Честотата на разпространение на гените за вирулентност при извазивни и неинвазивни изолати *S. pyogenes*.

Гени за вирулентност	**Инвазивни изолати (n=77)**		**Неинвазивни (n=368)**		**P- value***
	Брой	**%**	Брой	**%**	
speB, spyCep, slo, sdaB	77	***100***	368	***100***	1.000
Mac	61	***79***	315	***86***	0.7085
smeZ	61	***79***	299	***81***	0.9252
speJ	53	***69***	238	***65***	0.7674
speG	38	***49***	184	***50***	1.0000
Sdc	51	***66***	238	***65***	0.9209
sdaD	43	***56***	202	***55***	1.0000
spd3	41	***53***	185	***50***	0.8302
speA	33	***43***	74	***20***	**0.0028**
speF	58	***75***	190	***52***	**0.0001**
speL	30	***39***	60	***16***	**0.0013**
speM	31	***40***	65	***18***	**0.0017**
speK	23	***30***	101	***27***	0.7897
speI	19	***25***	95	***26***	1.000
SpeC	21	***27***	110	***30***	0.7924
speH	5	**6**	8	**2**	0.0639
Ssa	23	**30**	101	**27**	0.7897
Sic	28	**36**	130	**35**	0.9032

*Удебеленият и подчертан текст показва статистически значима стойност ($p<0.05$).

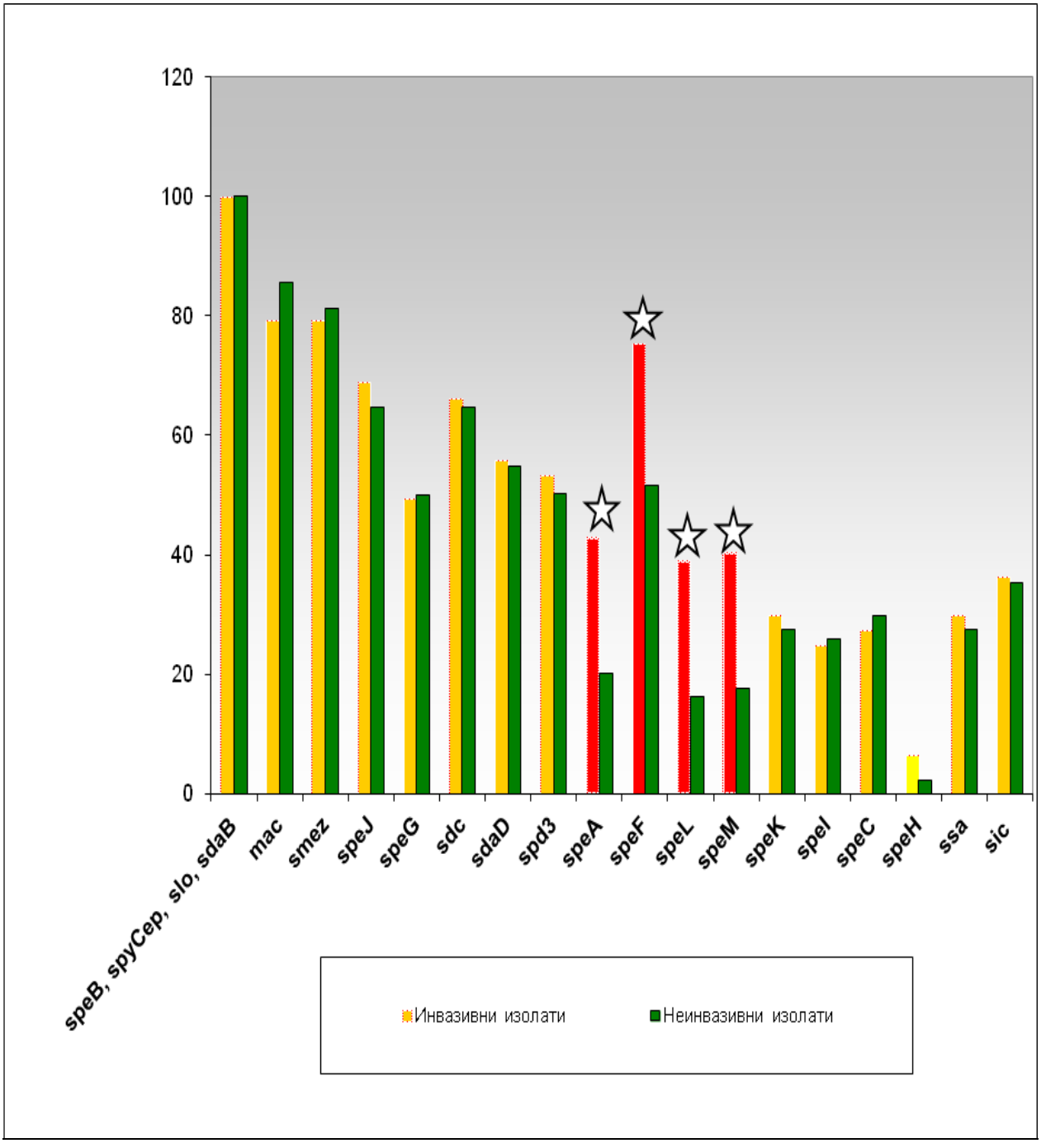


Фиг. 27. Гел-електрофореза ампликони от гени на *S. pyogenes* , кодиращи ДНК-ази, суперантигени и екзотоксини. (Миксове 1, 2, 3, 4, 5, 6)

Последните изследвания показват, че патогенните свойства на *S. pyogenes* са свързани със наличието на по-голям на брой фактори на вирулентност и техният кумулативен ефект може да бъде предиктор/показател за инвазивността на щамовете (Vlaminckx B. et al. 2003; Sumby P. et al. 2005; Golińska E. et al. 2016).

Такъв голям брой токсини, суперантигени, нуклеази,протеази, съдържащи се предимно в неинвазивни изолати представлява резервоар и риск за увеличаване на инвазивните стрептококови инфекции в дадения географския регион. Това би могло да затрудни стандартното лечение на тонзилофаригит и скарлатина, които са и най-честите стрептококови заболявания и да доведе до по-чести техни усложнения с абсцедиращ характер или с автоимунен механизъм.

При събиране на назофарингиални секрети от пациенти с диагноза тознилофарингит беше установено, че при 15 от пациените, изолираните стрептококи принадлежаха към други, по-редки групи. Бета-хемолитичните стрептококи от Group C – GCS и Group G – GGS понякога са част от нормалната флора на горните дихателни пътища и кожата, но са описани редица случаи, при които след заразяване с лизогенни бактериофаги те придобиват гени за вирулентност и участват в етиологията на различни инфекции, често продуцирайки екзотоксини, като причиняват: фарингит, кожни инфекции, неонатални инфекции, бактериемии, ендокардити, менингити, артрити, остеомиелити и др., подобно на GAS (Bradley S. et al. 1991; Burkert T. et al. 1991; Salata R. et al. 1991).



Фиг. 28. Сравнение между установените фактори на вирулентност при за инвазивни и неинвазивни изолати *S. pyogenes.*

Забележка: Със звездичка са означени суперантигените при които се наблюдава сигнификантна разлика в честотата на разпространение

4. Определяне на чувствителност към пеницилин чрез фенотипни методи

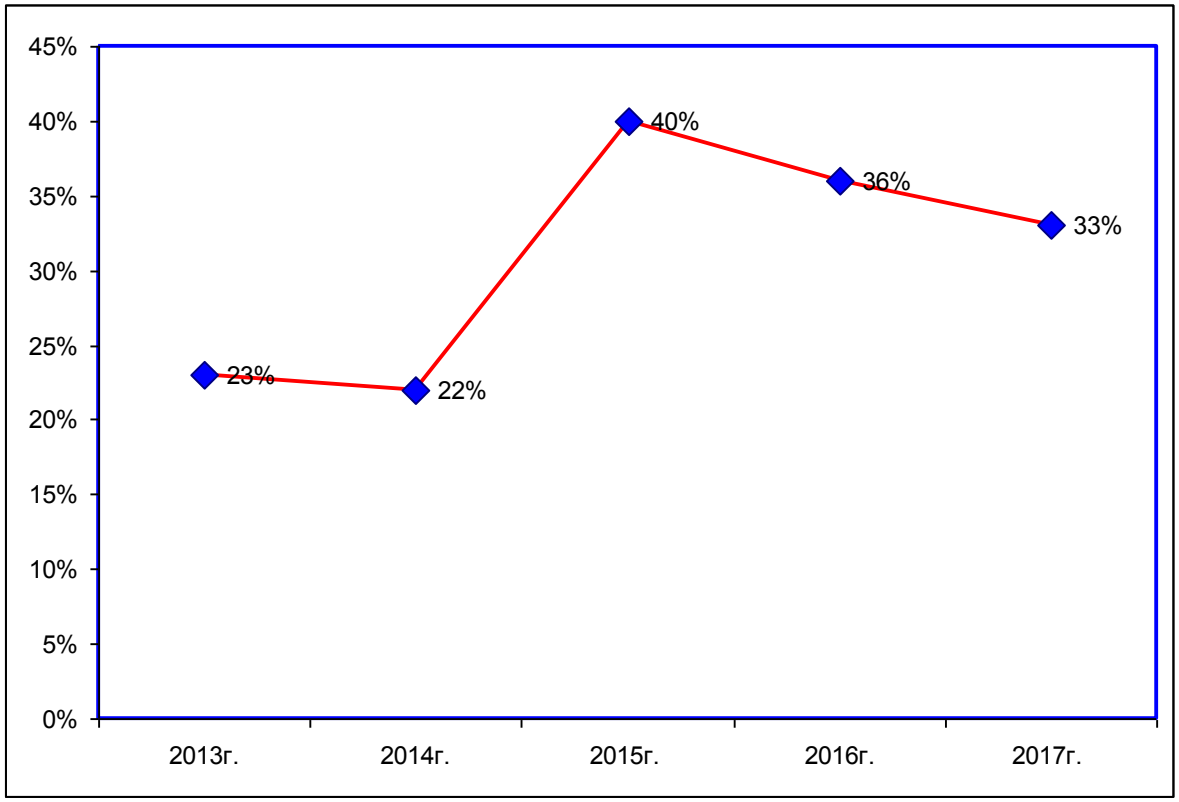
При определяне чувствителността на 445 изолата *S. pyogenes* по ДДМ на Бауер-Кърби не бяха установени изолати с намалена такава към пеницилин.

5. Определяне на чувствителност към MLS група антибиотици чрез фенотипни и генотипни методи при щамове *S. pyogenes* изолирани през периода 2013-2017г.

Данните за степента на резистентност при *S. pyogenes* към макролидни антибиотици имат съществено практическо значение за по - надеждно проучване на емпиричното лечение на стрептококови инфекции и общата оценка на тенденциите в разпространението на резистентността. За тези цел е необходимо да се анализират генетичните механизми, както и свързаната с тях фенотипна проява на това явление.

Настоящият дисертационен труд показа, че през 2013-2017г. **31.4%** (n=140) от колекционираните щамове *S. pyogenes* бяха макролид- резистентни. Промените в разпределението на макролид- резистентните щамове през годините са показани в **табл. 20**. Степента за резистентност на *S. pyogenes* към MLSгрупа антибиотици беше вариабилна и показваше тенденция за нарастване през годините (**фиг.29**).

През 2013г. беше установено, че 23% (n=14) от изследваните щамове бяха макролид - резистентни. През следващата година (2014г.) степента за резистентност беше сходна с тази от предходната година - 22% (n=21). Интересен е фактът, че през 2015г. установихме рязко увеличаване на резистентността, почти до 40% (n=40). През следващите 2 години се наблюдаваше задържане на степента на резистентност с лек спад в процента на резистентните изолати, като през 2016г. бяха 36%, а през 2017г. достигна 33% (**фиг. 29**).



Фиг. 29. Разпространение на макролид - резистентните щамове *S. pyogenes* през 5 годишен период (2013-2017г.).

За да установим фенотипната проява на резистентността към MLSB използвахме едновременно 2 метода: дисково-дифузионен метод на Бауер-Кърби, изпълнен според указанията на EUCAST, както и определяне на МИК с помощта на Е- тест.

Макролид-резистентният фенотип на тестваните щамове беше определен чрез ДДМ на Бауер-Кърби с дискове еритромицин и клиндамицин, изпълнен според указанията на EUCAST. От изследваните 445 щама *S. pyogenes*, 140 щама бяха еритромицин-резистентни, от които 80 щама показаха М- фенотип, 21 щама показаха индуцибелен MLSB фенотип и 39 щама- конститутивен MLSB фенотип (**табл. 21**)

На всички еритромицин резистентни щамове (n=140) беше определен МИК към еритромицин, кларитромицин, азитромицин и клиндамицин, чрез Е-тест. Получените от нас резултати при тестване на МИК, както и тяхната

корелация с MLSB –фенотиповете, определен чрез ДДМ, са показани на **табл. 21**.

Всички щамове колекционирани през 2013г. -2017г. (n=445) бяха тествани чрез генетичен метод- мултиплекс PCR, за установяване на гените отговорни за макролидната резистентност- *mef(A), erm(A), erm(B).* Щамовете (n=305), които бяха чувствителни към еритромицин чрез ДДМ, показаха липса на съответните гени, а останалите 140 еритромицин- резистентни щама притежаваха поне един от трите генетични детерминанта (**табл. 20**). Настоящият дисертационен труд показа, че **57.1%** от еритромицин- резистентните щамове *S. pyogenes* бяха носители на *mef(A)* самостоятелно, 20% в комбинация с *erm(B)* и 2% в комбинация с *erm(A).* За първи път в България беше установено, че 11.4% от макролид- резистентните щамове са носители на *erm(B)* самостоятелно и 20% в комбинация с *mef(A). Erm(A)* + бяха 9.3% от макролид-резистентните щамове *S. pyogenes* самостоятелно и 2% в комбинация с *mef(A)* (**табл. 20)**

Корелацията между макролид-резистентният фенотип, МИК към еритромицин, кларитромицин, азитромицин, клиндамицин и генетичните детерминанти обуславящи тези резистентност са показани на **табл. 21.**

Всички щамове, които показваха М-фенотип, бяха положителни за гена *mef(A)* (n=80), показано на **табл. 21**. Генът *mef(A)* кодира протеини с функция на „ефлуксни помпи“, които обусляват резистентност към 14 и 15 членните макролиди, но не и към 16 членните. Наличието на *mef(A)* в българските изолати *S. pyogenes* обуславяше ниски до средни нива на МИК към 14-, 15- членните макролиди: еритромицин (1-4 mg/l МИК), кларитромицин (0.75-4 mg/l) и азитромицин (1-4 mg/l МИК), с изключение на 1 щам, който показа МИК 32 mg/l. При щамове, които носят генът *mef(A)* МИК на еритромицин и азитромицин бяха почти идентични- от 1-4mg/l, докато МИК на кларитромицин в повечето случаи бяха с едно разреждане по-малко. Clindamycin като представител на линкозамидните антибиотици показа 100% чувствителност при всички щамове, за които бе доказан ефлукс механизъм.

Щамовете, които показваха индуцибелен MLSB фенотип, носеха предимно генът *erm(A)* (n=13), рядко *erm(B)* (n=5), или малка част от щамовете носеха комбинацията *mef(A)+erm(A)* (n=3), показано на **табл. 21**. Наличието на *erm(A)* обусляваше предимно високи стойности на МИК към еритромицин, кларитромицин, азитромицин- МИК 4- ≥256 mg/l, но не и към клиндамицин Всички щамове, които показваха конститутивен MLSB фенотип, бяха носители на *erm(B)* и показаха високи МИК към еритромицин, кларитромицин, азитромицин и клиндамицин (**табл.21**).

Подобни флуктуации в честота на разпространение на макролидната резистентост през годините се наблюдава и в други страни. Така например Гърция докладва рекордно високи стойности на резистентност към макролиди при *S. pyogenes* през 2000г. - 40%, данни сходни на получените от нас през периода 2015-2016г. (Syrogiannopoulos G. et al. 2001). През следващите години, резистентността в Гърция спада от 30% през 2008г. до 10% през 2013г. (Michos A. et al. 2016). Подобна ситуация се наблюдава и в Италия, където през 2000г. 38% от *S. pyogenes* са били макролид резистентни (Bassetti M. et al. 2000), през 2003-2005г. резистентността спада до 18.9% (Creti R. et al. 2007) и достига до най-ниски нива - 5.2% през 2012г (Olivieri R. et al. 2005). Във Франция през 2004-2005г. макролидната резистентност е била 14.9% и е спаднала до 3.6% след 10 години - 2012г. (d'Humières C. et al. 2012; Richter S. et al. 2008).

Причините свързани с разпространението на еритромициновата резистеност при бета-хемолитичните стрептококи не са напълно изяснени (Silva-Costa C. et al. 2015).

Прекомерната употреба на определени антимикробни средства носи риск от селекция на резистентни щамове, които представляват своеобразен "резервоар" от генетични детерминанти на резистеността **(**Marosevic D. et al. 2017**).** Европейският център за профилактика и контрол върху заболяванията (ECDC), в последният си доклад за наблюдение на потреблението на антимикробни средства в обществото (извън болнична среда) показва, че макролидите са третата най-често използвана група антибиотици в Европа**.**

Същият доклад показва, че макролидите и линкозмидите са втората най-често използваната група антимикробни средства в България, след групата на пеницилините, а през 2008-2012г. се докладва за значително увеличение на консумацията на линкозамиди в България, в сравнение с предишни години (Weist K. et al. 2014**)**. Според някои автори, различията в антибитичната резистентност при *S. pyogenes* към макролиди в различните страни се обясняват най вече различията в обема на локалната употреба на антимикробните средства в дадена страна (Albrich W. et al. 2004).

От друга страна, в някои страни нарастването макролидната резистентст продължава, независимо от локалната упротреба на макролиди в обществото. В Словения, въпреки 21% намаление на употребата на макролиди в обществото, резистентността сред неинвазивните изолати *S. pyogenes*, се е удвоила. В Португалия, е установено постояно намаляване на макролидата резистентност от 20% през 1999г. до 12% през 2006г., достигайки най-ниската стойност от 1% през 2013г. Това намаляване на изследваната резистентност се е осъществило въпреки че употребата на макролиди в страната се е увеличила. Следователно, промяната в честота на макролидната резистентност не е свързана винаги сконсумацията на макролиди в обществото, а вероятно играят роля и други фактори (Silva-Costa C. et al. 2015).

Други автори смятат, че промяната в честотата на макролидната резистеност при *S. pygenes* се свързва с разпространение на специфични серотипове (Kaplan E. et al. 1997). Така например нарастването на еритромицинова резистентност при *S. pyogenes* в Япония е била свързвана с разпространението на серотип T12 (Nakae M. et al. 1977), а в Финландия със серотип T4M4 (Bingen E. et al. 2000).

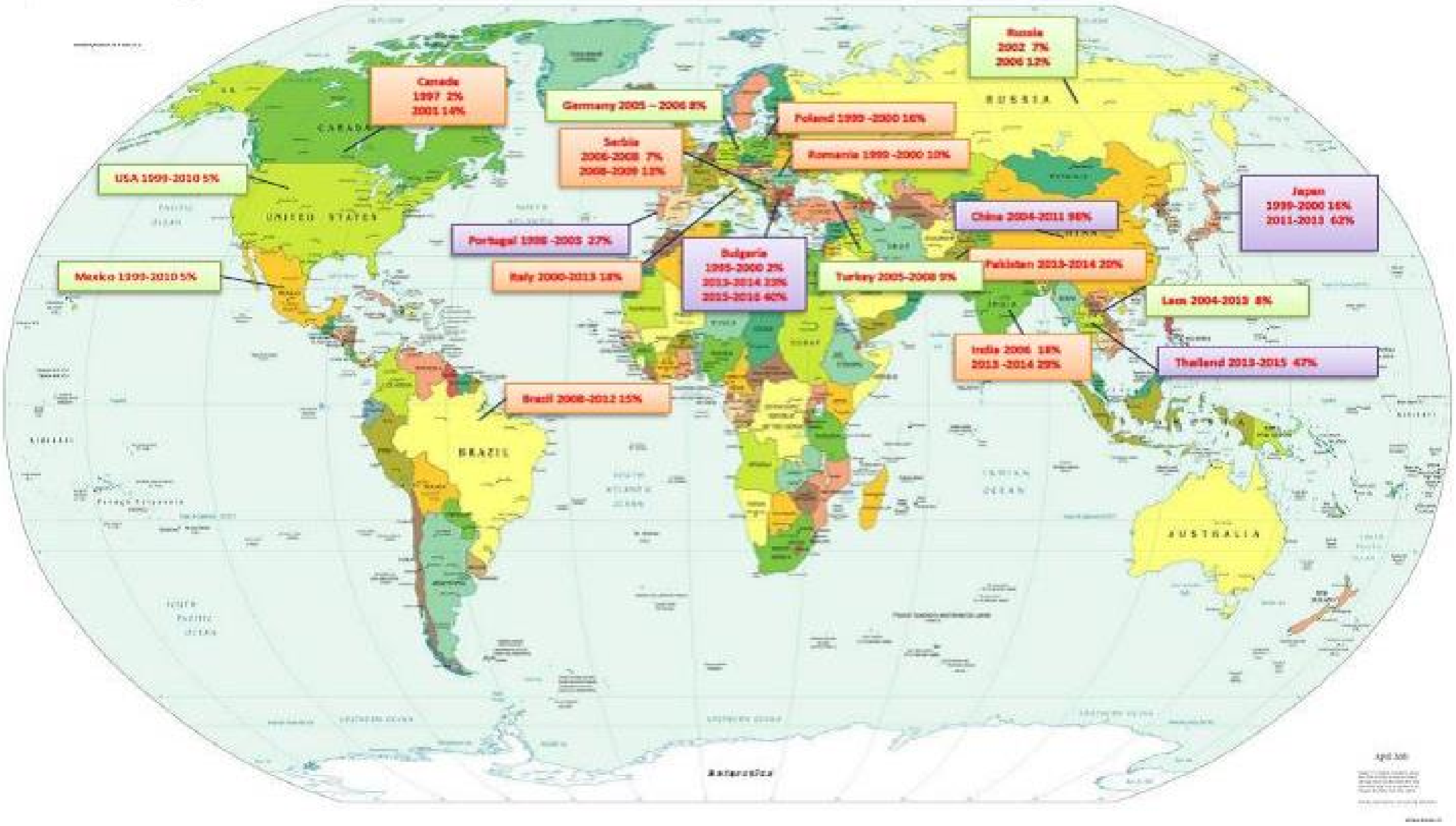
Следователно причините свързвани в увеличаването на макролидната резистеност в България **могат** да бъдат свързани с 2 фактора: от една страната прекомерната локална употреба на макролиди и линкозамиди в обществото (която селектира **резистентни щамове, които са резервоар за гени за резистентност)** и с разпространение на специфични резистентни серотипове /M-типове(клонове).

Нашите резултати показаха, че степента на резистентност на *S. pyogenes* към макролидната група антибиотици в България, постепенно нараства. Последните налични данни за страната, изработени с генотипни и фенотипни методи, са докладвани от д-р А. Дечева и колектив (Detcheva A. et al. 2002). Те показват, че през 1995-2001г. степента на еритромициновата резистеност е била ниска (2.1%), с преобладаващ индуцибелен MLS фенотип. През следващите години (1998-2014г.) проучване направено с фенотипни методи, показва тенденция за увеличаване на степента за резистентност към макролиди от 10% през 2009г. до 23% през 2014г. (Gergova R. et al. 2016). В настоящото проучване получените резултати за 2013-2014г. бяха сходни, проблизително 23% от щамовете носят различни генетични детерминанти обуславящи резистентност към MLS група антибиотици. Щамовете изолирани през следващите 2 години (2015-2016г.) показаха, че почти 40% от тях съдържат поне един от 3 те генетични детерминанти обуславящи резистентност, самостоятелно или в комбинация (**табл. 21**). През 2017г. се наблюдаваше тенденция за спад в резистентността, въпреки че стойността все още остава висока спрямо съседни на България страни като Турция напр. 3%-5% (Soyletir G. et al. 2016; Çiftçi E. et al. 2003) и Сърбия - 12.5% (Opavski N. et al. 2015). Разпространението на макролидната резистентост при *S. pyogenes* в световен мащаб може да се види на **фиг. 30**.

Мултицентърно проучване, включващо 10 страни от Източна и Централна Европа, вкл. и България показва, че през периода 2000 - 2001г. макролидната резистентност в района е била средно 9.7%, с най-високи стойности в Словакия - 30%, Чехия -17.3% и Хърватска - 16% (Bozdogan B. et al. 2003; Nagai K. et al. 2012). Този доклад показва също, че българските макролид резистентни щамове носят гените *mef(A)* и *erm(A),* но не се устстановява *erm(B)* (Bozdogan B. et al. 2003; Nagai K. et al. 2012). Преобладаващ механизъм на резистентност характерен за България, Хърватска, Гърция, Испания и Италия е бил т.нар. ефлуксна помпа, кодиран от *mef(A)*.

Таблица 20. Честота на разпространение на генетичните детерминанти, обуславящи макролидна резистентност при 140 макролид-резистентни *S. pyogenes*, изолирани през периода 2013-2017г.

Гени за резистентност	**Година**					
	2013 n (%)	**2014 n (%)**	**2015 n (%)**	**2016 n (%)**	**2017 n (%)**	**през 5-те години n (%)**
mef(A)	6 (49)	14 (67)	22 (55)	17 (63)	21(55)	80 (57.1)
erm(A)	3 (21)	1 (5)	2 (5)	3 (11)	4(11)	13 (9.3)
erm(B)	1 (7)	2 (10)	4 (10)	1 (4)	8(21)	16 (11.4)
mef(A) &erm(A)	1 (7)	1 (5)	0 (0.00)	1 (4)	0 (0.00)	3 (2.1)
mef(A)&erm(B)	3 (21)	3 (14)	12 (30)	5 (19)	5(13)	28 (20)
Общ брой на резитентните щамове за годината	14 (23)	21 (22)	40 (40)	27 (36)	38 (33)	140 (31.4)
Общ брой на всички тествани щамове	60	95	99	75	116	445



Фиг. 30. Разпространение на макролидната резистентност в България и световен мащаб.

В резултатите от другите страни, включени в проучването, доминира *erm(A),* кодиращ РНК- метилаза (Bozdogan B. et al. 2003). Голяма част от проучванията направени в през последните 10 години, с цел проследяване и контрол на увеличаващата се макролидна резистентност при инвазивни и неинвазивни щамове *S. pyogenes* показват, че М-фенотипът, кодиран от *mef(A)* ген, е преобладаващ както в Централна и Източна Европа, така и в САЩ, Мексико, Япония и др (Gracia M. et al. 2009; Gajic I. et al. 2014; Takahashi T. et al. 2016; Villasenor- Sierra A. et al. 2012; Stathi A. et al. 2008; Olivieri R. et al. 2015; Green M. et al. 2006). Проучване направено от Giovanetti E. et al. 2005, показва че всички познати елементи на генът *mef(A*), са кодирани от бактериофаг и това е причината за бързото разпространение на този генотип в популацията на *S. pyogenes*. Генът *mef(A)* се носи от дефектен траспозон Tn1207.1, който много често е свързан с *tet(O),*обуславящ резистентност и към тетрациклини (Giovanetti E. et al. 2015).

Генът *ermB*, до преди 15 години, не е откриван в България (Nagai K. et al. 2012). Настоящят дисертационен труд показва, че през последните 5 години, щамовете носители на *ermB* са сред най-често срещаните еритромицин резистентни българските изолати - в 20% (**табл. 21**). Генът кодиращ, резистентност към всички предствители на MLS група антибиотици, е най-често срещаният генотип в страни като Франция, Германия, Турция и Корея (Bingen E. et al. 2004; Takahashi T. et al. 2016; Imohl M. et al. 2015; Dundar D. et al. 2010; Blay C. et al. 2011)

Таблица 21. Корелация между гените за резистентност към MLSB при клинични щамове *S. pyogenes* и тяхната фенотипна проява, за 5 годишен период (2013г. - 2017г.)

Фенотип **Брой щамове**	**MIC (mg/L)** **Erythromycin**	**MIC (mg/L)** **Azithromycin**	**MIC (mg/L)** **Clarythromycin**	**MIC (mg/L)** **Clindamycin**	***mef(A)*** **(% ± SD)**	***erm(A)*** **(% ± SD)**	***erm(B)*** **(% ± SD)**	***mef(A) & erm(A)*** **(% ± SD)**	***mef(A) & erm(B)*** **(% ± SD)**
М–фенотип **n=80**	1 - 32	1 – 32	0.75 - 16	0.125 - 0.25	80	0	0	0	0
Индуцибелен MLSB **n=21**	4 - > 256	4 -> 256	2 - 256	0.125- 0.5	0	13	5	3	0
Конститутивен MLSB **n=39**	32- > 256	> 256	> 256	0.75 -> 256	0	0	11	0	28
Общ брой **n= 140**					80 (**57%**±8.20)	13 (**9%**±4.74)	16 (**11%**±5.18)	3 (**2%**±2.31)	28 (**20%**±6.62)

6. Определяне на чувствителност към тетрациклини чрез фенотипни и генотипни методи на щамове *S. pyogenes*, изолирани през 2013-2017г.

В настоящият дисетационен труд беше установено, че **10.3%** (n=46) от тестваните изолати *S. pyogenes* бяха резистентни към тетрациклин.

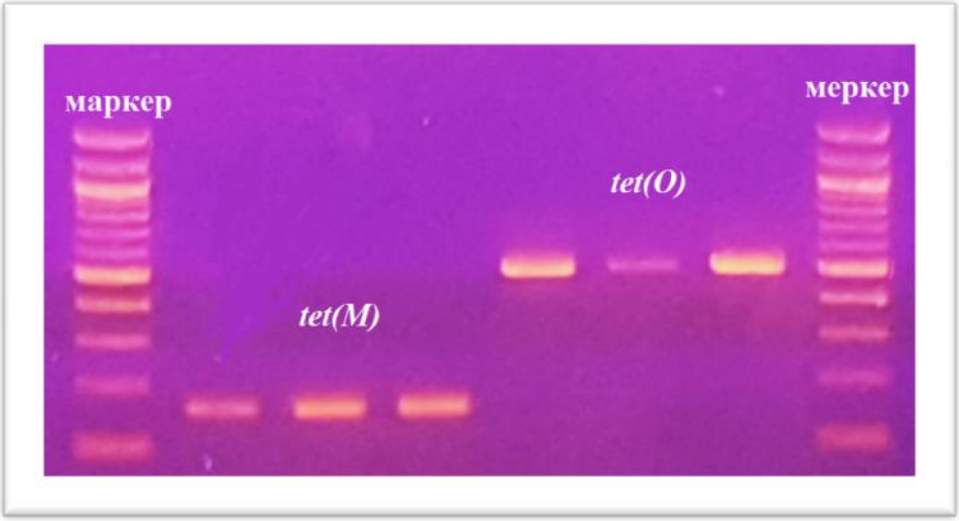
Тетрациклиновата резистентност беше тествана чрез диск тетрациклин по ДДМ според указанията на EUCAST 2017. 46 щама (10.3%) показаха фенотипно резистентност към тетрациклин. Всички щамове бяха тествани чрез генетичен метод- мултиплекс PCR, за наличие на гените *tet(M)* и *tet(O)*. Фенотипно чувствителните щамове, показаха липса на съотвените гени за резитентност. От всичките тетрациклин резистентни щамове 85% (n=39) бяха *tet(M)* положителни и 15% (n=7) *tet(O)* положителни **(фиг.31)**.

Гените *tet(M)* и *tet(O)* обуславят резистентност към тетрациклини по механизма на рибозомната протекция. Протеините осъществяващи протекцията са разположени в цитоплазмата и се свързват с рибозомите обратимо (Schnappinger D. & Hillen W. 1996).

В световен мащаб разпространието на тетрациклиновата резистеност при GAS варира в широки граници: 18% в Турция (Dundar D. et al. 2010), 19.4% в Сърбия (Opavski N. et al. 2015), 42% в Иран (Jasir A. et al. 2000), 50% в Бразилия (DeMelo M. et al. 2003), 6-44% в Португалия (Pires R. et al. 2005), 33.7% в Дания (Hammerum A. et al. 2004), 38% в САЩ (Ayer V. et al. 2007), 92% в Китай (Chang H. et al. 2010), 13.1% в Испания (Betriu C. et al. 2004).

Подобно на нашите резулатати в Израел също, почти 90% от тетрациклин резистентните щамове са носители на *tet(M)* (Nir-Paz R. et al. 2006).

Като цяло резистеността към тетрациклин/миноциклин при *S. pyogenes* се кодира от *tet(M)* гена, по-рядко от гените *tet(O), tet(Q), tet(S), tet(T) tet(W),*които кодират протеини участващи в механизма на рибозомната протекция (Cattoir V. 2016). Стрептококите придобиват резистенстност към тетрациклини чрез хорозонтален генен трансфер (Ayer V. et al. 2007), а най-често срещаните генетични детерминанти- *tet(M)* и *tet(O)*, се пренаст чрез мобилни генетични елементи (транспозони) (Nir-Paz R. et al. 2006).



Фиг. 31. Гени за резистентност към тетрациклини *tet(M)*-158bp, *tet(O)*-515pb.

През последните години все по-често се съобщава за асоциация между макролидната и тетрациклиновата резистеност при GAS. Генът *tet(O)*се свързва най-често с гените за макролидна резистентност *mef(A)*и *erm(A),* докато генът *tet(M)*с *erm(B)* (Brenciani A. et al. 2007; Ayer V. et al. 2007). Транспозон Tn1207.1 пренася елемент *tet(O)-mef(A)*, а транспозони от семейстовото на Tn916 - *tet (M)* (Brenciani et al. 2007).

В настоящото проучване генът *tet(M)* беше преобладаваща генетична детеминанта при тетрациклин-резистентните щамове в 85% и се установяваше, както при макролид - чувствителните, така и при макролид-резистентните *S. pyogenes*. По-рядко се срещаше *tet(O),* в 15%, но по-често корелираше с макролидната резистентност.

Проучване направено за страната през 2006г. показва, че 63.9% от българските макролид-резистентни щамове *S. pyogenes*, са резистентни и към тетрациклини и хлорамфеникол (Decheva A. et al. 2006). В настоящото проучване беше установено, че 46% (n=21) от тетрациклин - резистентните щамове бяха и макролид резистентни (**табл.22**). Генът *tet(M)* беше преобладаващ и се установяваше както при макролид чувствителните, така и при макролид-резистените *S. pyogenes*. От всичките *tet(M)* положителни изолати

(n=39), чувствителни на макролиди бяха 23/39 (59%), а резистентни на макролиди бяха 16/39 (41%). В нашето проучване значима връзка между тетрациклиновата резистеност обусловена от *tet(M)* ген и макролидната такава, не беше намерена. При *tet (O)* положителните, които бяха 7 изолата *S. pyogenes*, от които 2/7 (29%) бяха макролиди-чувствителни, 5/7 (71.5%) бяха макролид-резистентни: n=3 *erm(A)*+, n= 2 *mef(A)*+, може да се твърди, че се наблюдава по-често зависимост с макролидната резистентност.

Интересно е откритието на Brenciani et al. 2007, който установява, че генът *tet(M)* присъства в генома и на някои от тетрациклин - чувствителни, но макролид - резистенти щамове *S. pygenes*. След като *tet(M)* може да присъства в „тиха форма" при някои тетрациклин - чувствителни щамове вероятно разпространението на транспозините от семейство Tn916, които са носители на *ermB* е много по-широко отколкото се предполага (Brenciani et al. 2007).

В настоящтото проучване, чувствителни на тетрациклин изолати, които са носители на *tet(M)* не бяха намерени.

Таблица 22. Разпределение на генетичните детерминанти при тетрациклин-резистентните щамове и връзка с чувствителността им към MLS група антибиотици.

Гени определящи резистентност към тетрациклин	***Tet (M)*** **n(%)**	***Tet(O)*** **n(%)**	**Общо n(%)**
	39(85)	7(15)	46(100)
МИК	>256	>256	
Брой на щамовете, които са резистентни към тетрациклин и макролиди едновременно	16(41)	5(71.5)	21(46)

В заключение може да се каже, че степента на тетрациклиновата резистентност в нашето проучване показва ниски нива в сравнение със страните съседки като Турция и Гърция, където общата резистентност е около 18-19%. Това може да се обясни с факта, че 77.9% (n=347) от включените в нашето

проучване щамове са изолирани от пациенти в педиатрична възраст, където приложението на тази група антимикробни средства е изключително ограничено. Като цяло в България се наблюдава спад в употребата на тетрацикиклини в през периода 2008-2012г (Weist K. et al. 2012).

7. Препоръки за терапия при лечение на стрептококови заболявания

С откритето на пеницилина, започва началото на антибиотината ера и това води до значително намаляване на инфекциозните заболявания по цял свят. Настъпва успокоение, че стрептококовите заболявания вече не са сериозен здравен проблем в развитите страни, но след 80те години на XX век започват някои забележителни промени в световната епидемиология на стрепткоковите заболявания (Efstratiou A. & Lamagni T. 2017). През последните 2 десетилиетия се регистрират тревожно високи стойности на заболяваемост от стрептококовите инфекции в световен мащаб (Lamagni T. et al. 2008; Steer A. etal. 2012; Carapetis et al. 2012). Това поставя отново на дневед ред проблема с терапията на тези заболявания.

Според нашето проучване, както и на много други автори по цял свят, *S. pyogenes* остава чувствиителен на пеницилин, независимо че има данни за единични изолати с леко намалена чувствителност *in vitro* (Imöhl M. et al. 2015; Camara M. et al. 2013; Silva-Costa et al. 2015). Поради липса на доказана резистентност, пеніцилините все още остават първи избор при лечение на стрептококовите заболявания и могат да бъдат използвани за емпирична терапия. Антимикробното средство е препочитано и поради неговата проверена ефективност, безопасност, тесен спектър и ниската цена (Bisno A. et al. 1997; Shulman S. et al. 2012). За лечение на стрептококов тонзилофарингит, при пациенти без установена алергия към пенилин, се препоръчва перорален аминопенцилинов препарат в 10-дневен курс за постигане на максимална ерадикация на микроорганизма (Bisno A. et al. 2002; Shulman S. et al. 2012). Амоксицилинът често се използва вместо пеницилин V при малки деца, тъй като се смята, че имат еднаква ефективност (Bisno A. et al. 2002).

Лечението на пациенти, с установена пеницилинова алергия, може да се осъществи с първа, втора и някои от трета генерация цефалоспорини за 10 дни (при доказана липса на кръстосана свръхчувствителност и към тези препарати), или препарат от MLS група, най-често кларитромицин, азитромицин или клиндамицин) (Shulman S. et al. 2012). Но във втория случай е наложителна антибиограма, поради бързото развитие на резистентност.

S. pyogenes е един от най-честите причинители на кожни инфекции по цял свят. Причинява инфекции на повърхностния слой на кожата (импетиго), на епидермиса (еризипел), покожната тъкан (целулит), фасцията (некротизиращ фасциит) и др. (Stevens D. & Bryant A. 2016). В много от тези случаи изолирането на причинителя остава трудна задача, а своевременното лечение е наложително (Johansson L. et al. 2010). Лечението на по-леките кожни инфекции може да се осъществи с пеницилинов препарат или с първа генерация цефалоспорини (Stevens D. et al. 2005; Stevens D. & Bryant A. 2016). При по-тежки форми на кожни инфекции или некротизииращ фасциит се препоръчва висока доза парентерален пеницилин или пеницилин с бета-лактамазен инхибитор (амоксицилин+клавуланова киселина, ампицилин+сулбактам или трета генерация цефалоспорини – цефотаксим или цефтриаксон) заедно с клиндамицин (Stevens D. etal. 2005; Stevens D. & Bryant A. 2016; Parson P. et al. 2018). Използването на клиндимацин, като инхибитор на синтеза на протеини, е силно препоръчително (Andreoni F. et al. 2017). Антимикробното средство има редица предимства: добро тъканно разпределение, действа и по време на стационарна фаза на бактериалният растеж, инхибира производството на бактериалните протеини, вкл. ензими, токсини и суперантигени (Andreoni F. et al. 2017; Rejan S. 2012). При доказана резистентност към клиндамицин като възможна алтернатива може да се използва линезолид или хлорамфеникол (Andreoni F. et al. 2017).

8. Епидемиологично охарактеризиране на щамове *S. pyogenes* чрез метода *emm*-типизиране

Типизирането въз основа на *emm* гените е най-често използваният епидемиологичен маркер за охарактеризиране и мониториране на изолираните клинични щамове *S. pyogenes* по целия свят, откакто е внедрен и използван за първи от Beall B. et al. 1996. Ние извършиихме *emm*- типизиране на представителна извадка от 182 щама *S. pyogenes* изолирани през 2013- 2017г. от материали с различни клинични диагнози: тонзилофарингит, скарлатина, вулвовагинит, импетиго, еризипел, перитонзиларен абсцес, среден супуративен отит, синузит, сепсис, токсик шок синдром, некротизиращ фасциит, пневмония, менингит. Получените от нас резултати за разпределението на *emm*-типовете на българските изолати *S. pyogenes* според клиничните диагнози е показано на **табл. 23.**

Сред изследваните от нас щамове бяха открити 15 различни *emm*-типа и 27 *emm*-подтипа. Два от субтиповете бяха уникални - *emm*3.132 и *emm*3.133. Те за първи път се установяват в света при нашето проучване и техните секвенции бяха депозирани в GenBank NCBI с номерата MG869722 и MG869723.

9.1. Честота на разпространение на установените в България *emm*-типове.

Преобладаващите *emm*-типове в България бяха основно 7: *emm*1 заедно с подтиповете *emm*1.0, *emm*1.33, *emm*1.6 - 24.7%; *emm*3 заедно с *emm*3.1, *emm*3.32, *emm*3.93 и намерените от нас нови субтипове *emm*3.132 и *emm*3.133- 19.2%; *emm*4 и *emm*4.14 - 11%, *emm*12 със субтипове *emm*12.00, *emm*12.37, *emm*12.49, *emm*12.5, *emm*12.59 - 11%; *emm*28, *emm*2 - 6.0%, *emm*89 – 5.5% (**фиг.32**). Останалите генотипове се срещат в под 5 процента. На **фиг. 32** може да се види, че най- често срещаният *emm*-генотип сред българските щамове *S. pyogenes* беше *emm*1 (24.7%). Този резултат корелира напълно с тези получени в много други части на света - САЩ (O'Loughlin R. et al. 2007), Австралия (O'Grady K. et

al. 2007), Япония (Ikebe T. et al. 2007) и Европа (Wahl R. et al. 2007; Lamagni T. et al. 2005). Тип *emm3*, заедно със субтиповете *emm*3.1, *emm*3.32, *emm*3.93 и намерените от нас нови субтипове *emm*3.132 и *emm*3.133, съставяваше общо 19.2% от *emm*- типовете циркулиращи в страната и беше вторият по честота на разпространение (**фиг.32**)

Много автори съобщават, че *emm*1 и *emm*3 имат най-висок потенциал на вирулентност и се изолират предимно при инвазивни стрептококови инфекции (Luca-Harari B et al. 2009; Ferretti J. et al. 2001; Tamayo E. et al. 2010). Типовете *emm*1 и в по-малка степен *emm*3, са тези, които най-често се асоциират с възникване на епидемии и причиняват инфекции с летален изход (Imöhl M. et al. 2017; Siljander T. et al. 2010). Ние доказахме, че преобладаващата част от българските щамове *S. pyogenes* изолирани пред последните 5 години принадлежат към *emm*1 и *emm*3, което алармира за потенциалният риск от увеличаване на стрептококовите заболявания в страната ни, причинени от силно вирулентни щамове.

В нашето проучване, следващите по честота на разпространение типовете бяха *emm*4 и *emm*12 (11%) (**фиг.32**). Епидмиологичните анализи показват, че *S. pyogenes* от клон *emm*12 е бил причина за възникването на голямата епидемия от скарлатина в Китай през 2011г. (YouY. et al. 2018).

Генотиповете *emm*3 и *emm*12 показаха най-висока степен на полиморфизъм с подтиповете: *emm*3.0, *emm*3.1, *emm*3.132, *emm*3.133, *emm*3.32, *emm*3.93 и *emm*12.00, *emm*12.37, *emm*12.49, *emm*12.5, *emm*12.59 (**табл.23**)

Проучване, което анализира стрептококовите заболявания в множество Европейски страни, показва че типовете *emm1*, *emm*3, *emm*28 са били преобладаващи и в други Европейски страни, а най-разпространените *emm*-типовете сред деца на възраст 0-17г., са *emm*1 (26%), *emm*12 (11%), *emm*4 (10%) and *emm*3 (10%) (Luca-Harari B. et al. 2009). Тази резултати са почти идентични с получените от нас, вероятно защото повечето от изследваните по нас щамове бяха изолирани именно от пациенти в същия възрастов диапазон. В Испания,

преобладаващите *emm*-типове също се припокриват с нашите, с известни различия в честота на разпространение (Rivera A. et al. 2006). Мултицентърно прочуване, включващо страни от цял свят като Азия, Тихиокеанските острови, Африка, Латинска Америка показва, че най-често срещаните генотипове в тези райони са *emm*1, *emm*12, *emm*28, *emm*3 и *emm*4, подобно на най-разпространените в България, но се открива статистически значима разлика в честота на разпространение в различните региони (Steer A. et al. 2009).

Интересно е, че *emm*28 е най-често срещаният тип в Дания, Финландия, Швеция, докато *emm*3 е много рядко срещан в Чехия, Финландия, Гърция и Швеция за същия период (Luca-Harari B. et al. 2009). В САЩ преобладаващите генотипове *S. pyogenes* са *emm*1.0, *emm*3.0 и *emm*12.0 (O'Loughlin et al. 2007), в Хонг Конг- *emm*1 и *emm*4 (Chan et al. 2009), а *emm*1 е изключително рядък (0.4%) в Тайланд (Paveenkittiporn et al. 2016).

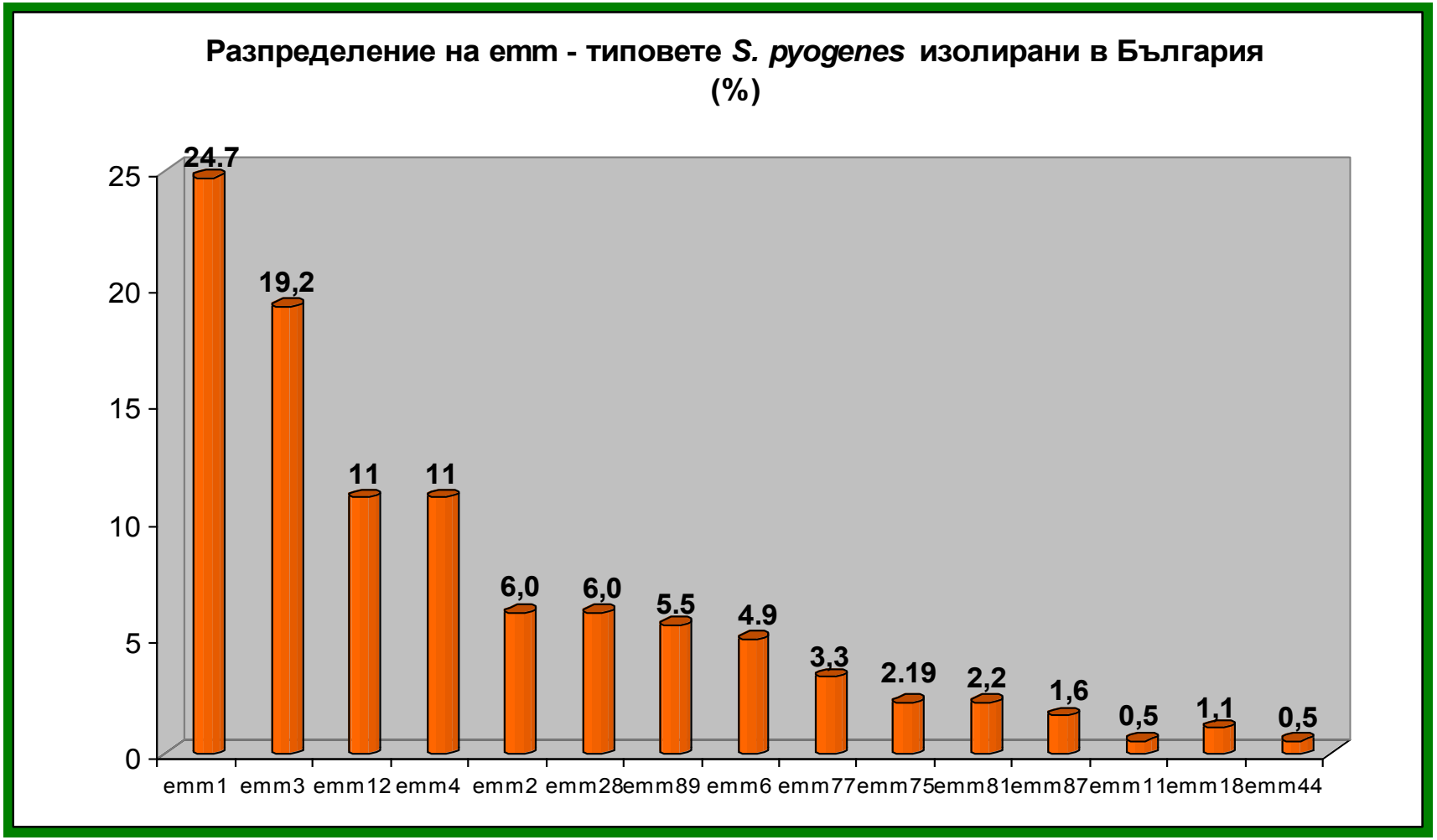
Според нашето проучване типове, срещани с честота на разпространение <10% в страната бяха: *emm*2, *emm*28, *emm*89, *emm*6.4, *emm*77, *emm*75, *emm*81, *emm*87, *emm*11, *emm*18.32, *emm*44 (**фиг.32**).

9.2. Епидемиологични данни за потенциалното покритие на 26 и 30 валентната ваксина срещу *S. pyogenes* в България

Увеличаващата се честота на GAS инфекциите през последните години, както и тежкото им протичане, насочват авторите към търсене на възможни варианти са потенциална ваксина срещу *S. pyogenes*. М-протеинът, кодиран от *emm*-гените, е силно имуногенен и в серума се откриват серотип - специфични антитела, които са протективни и предпазват от повторна инфекция със същият серотип.

Таблица 23. Разпределениена *emm*-типовете и *emm*-клъстерите на 182 щама *S. pyogenes,* изолирани от български пациенти с различни заболявания през периода 2013-2017г.

		Изолати от мукозни и кожни инфекции (n=122)					**Изолати от дисеминирани инвазивни инфекции (n=60)**						**Общ брой**
***emm* cluster**	***emm*- типове**	Ерзизипел [a] и импедиго[b]	Скарлатина	Тонзило-фарингит	Вулво-вагинит	Пери-тонзиларен абсцес	Среден отит	Синуит	Мекотъканни инфекции	Некортизиращ фасциит	сепсис[c] и TSS[d]	пневмония[e] и менингит[f]	
A-C3	*emm* 1.0	4 [a]	3	20	2	1	6	2	1	1	1[c]	1[e]	42
A-C3	*emm* 1.33			1									1
A-C3	*emm* 1.6	1[b]		1									2
A-C4	*emm*12.00		1	7								1 [e]	9
A-C4	*emm* 12.37			3									3
A-C4	*emm* 12.49			1									1
A-C4	*emm* 12.5		1	3	1		1						6
A-C4	*emm*12.59			1									1
A-C5	*emm* 3.0						1		1				2
A-C5	*emm* 3.1		5	4		3	6		7		1[d]		26
A-C5	*emm* 3.132	1 [b]											1
A-C5	*emm* 3.133						1						1
A-C5	*emm* 3.32						1		2				3
A-C5	*emm*3.93		1					1					2
E1	*emm* 4.0	1[b]	4	10	1		1		2				19
E1	*emm* 4.14	1[b]											1
E3	*emm* 44.0			1									1
E3	*emm* 87.0			3									3
E4	*emm* 2.0			5	1	1	2		1			1[f]	11
E4	*emm* 28.0			4	1		3	2			1 [c]		11
E4	*emm* 77.0	2[b]		2		1	1						6
E4	*emm* 89.0			7	3								10
E6	*emm* 11.0											1 [e]	1
E6	*emm* 75.0	1[b]		3									4
E6	*emm* 81.0	2 [a]		1		1							4
M6	*emm* 6.4		1	4	1	1	1	1					9
Clade Y	*emm* 18.32			2									2
Общ брой		**13**	**16**	**83**	**10**	**8**	**24**	**6**	**14**	**1**	**3**	**4**	**182**



Фиг. 32. Разпределение на установените в България *emm* - типове, представено в %.

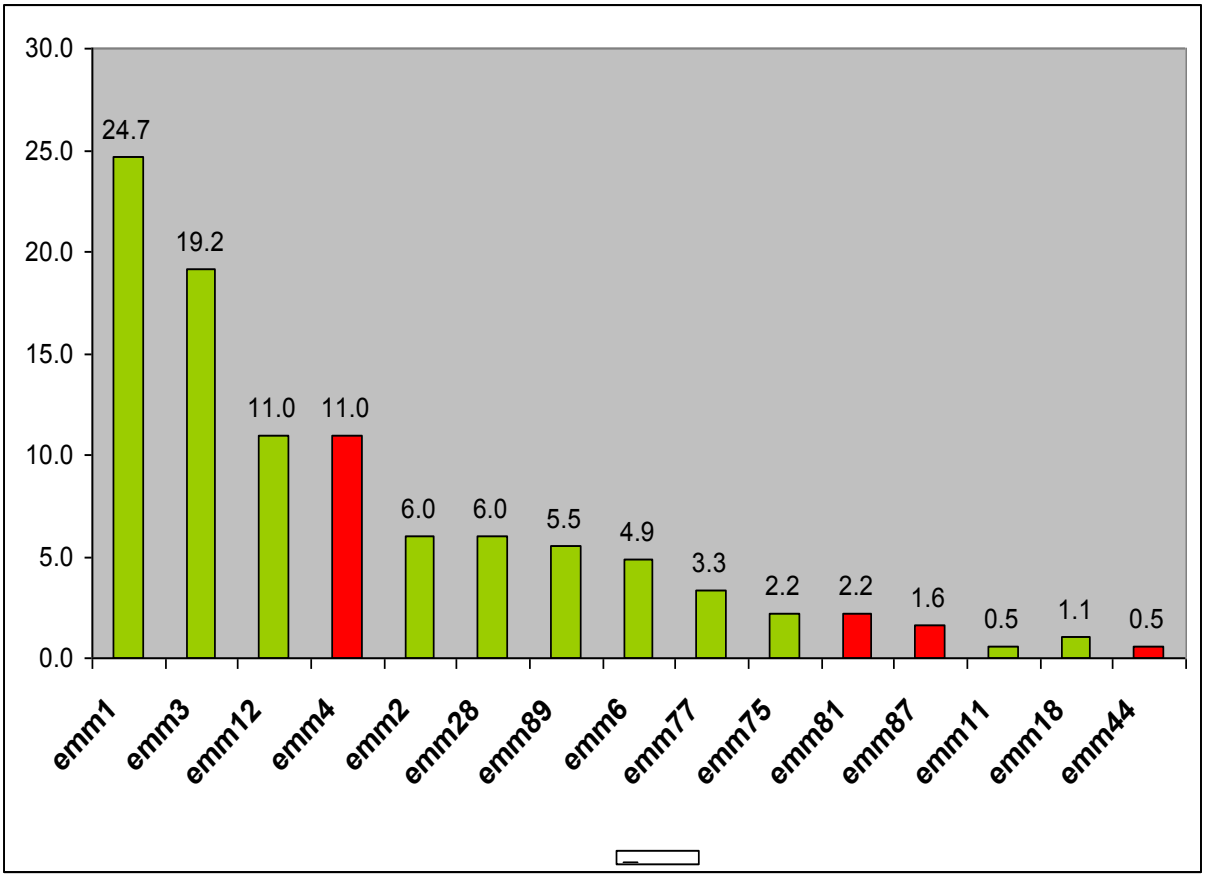
Разработена е 26-валентна GAS ваксина (вкл. включваща М типове 1, 1.2, 2, 3, 5, 6, 11, 12, 14, 18, 19, 22, 24, 28, 29, 33, 43, 59, 75, 76, 77, 89, 92, 94, 101 (Steer A. et al. 2009) на базата на М-протеина, за която се смята, че е най-безопасна и имуногенна за човешката популация. В допълнение, съществуват сигнификантни различия в М-типовото разпространение, както по региони, така и в зависимост от клиничните форми. Наличните данни предполагат, че тя ще покрие повечето серотипове, причиняващи заболявания в САЩ, Канада и Европа. Ваксината има ограничено покритие на щамове GAS, разпространени в Африка и средно ниво на покритие в Азия и Близкия Изток (Steer A. et al. 2009).

Резултатите от типизирането показват, че експрименталната 26-валентната ваксина срещу *S. pyogenes* включва 84.4% от *emm*-типовете, доказани в настоящия труд, че са циркулиращи в България (фиг. 32). Следователно тя би имала добро, но не пълно покритие в страната.

Наличните до момента данни за М-типовото разнообразие на циркулиращите в България щамове *S. pyogenes* са оскъдни. Такива са налични само за Плевенският регион, докладвани от Т. Иванова през 2014г., където е установено, че преобладаващите М – типове, доказани фенотипно при назофаригиалните изолати *S. pyogenes* са: М25, М8, М12 (Т. Иванова 2014, автореферат). Тези данни показват известни различия с получените от нас резултати. Сред изследваните от нас щамове *S. pyogenes*, не бяха открити такива, принадлежащи към генотип М25 и М8, които са пробладаващ в региона около Плевен.

Проучванията показват големи различия в разпространението на *emm*-типовете в страни с ниски доходи като Африка, Индия, страни с по- високи доходи като Азия, Среден Изток и Европа, Северна Америка. В развитите страни 26 - валентната ваксина покрива над 70% от циркулиращите *emm*-типове, докато при по-слабо развитите само 24-62%. Това се дължи на факта, че в тези региони се открива голямо разнообразие от М-типове, без преобладаващи типове сред тях (Steer A. Et al. 2009; Baroux N. et al. 2014). Причините, свързани с тези различия

все още не са установени. Едно от основните предпоставки са различията в клиничните заболявавяния превалиращи в различните георгафски райони. Така например импетигото е ендемично в много части от Африка и Азиатско-тихиокенски регион, но много рядко срещано в страни с високи доходи. Голямото разпространение на импетигото в тропичските страни е причина за циркулирането на голям брой *emm*-типове, които показват тропизъм към кожата (pattern D). В контраст с тях, в страните с умерен климат преобладават *emm*-типове свързани с тропизъм към епителните клетки на фаринкса (pattern A–C).



Фиг. 33. Възможен обхват на покритие на 26-валентната ваксина срещу *S. pyogenes* в България (- тези генотипове са включени във ваксината; - тези генотипове не са включени във ваксината)

Смята се, че има 2 основни причини възпрепятстващи по нанатъшното реализиране на ваксината. От една страната органиченото покритие на ваксините в Африканските и Тихоокенските страни, а от друга страна промените в циркулиращите типове след време и възникването на нови. Подобна замяна на пробладаващите типове с други типове е регистрирано в САЩ, само че новите преобладаващи типове отново са включени в състава на 26- валентната ваксина срещу *S. pyogenes*. Това означава, че въвеждането на многовалентната М-специфична ваксина в САЩ изглежда е стабилна стратегия и би било оправдано за относително дълъг период от време (Steer A. et al. 2009).

Данните за покритието на 26- валентната ваксина в страните от Европа са по-оскъдни. Едно от проучванията показва, че тя би покрила 69% от щамовете изолирани в Кипър, Чехия, Дания, Финландия, Франция, Германия, Гърция, Италия, Румъния, Швеция, Великобритания (Luca-Harari B. et al. 2009).

Въпреки това, усилията за разработване на нова, ефективни ваксина продължават. Проучва се нова 30 - валентна ваксина, която съдържа 4 различни хибридни белтъка съдържащи 7 или 8 М-протеинови фрагмента, свързани в комплекс. Тя е силно имуногенна при зайци и предизвква бактерицидни антитела, дори и срещу някои типове, които не са включени във ваксината, което означава че възможностите на ваксината се простират далеч отвъд включените в нея М- протеинови фрагмента (Dale J. et al. 2011).

Новата 30- валетна ваксина покрива повечето М-типове, които не се включени в 26- валетната, като: М4, М29, М73, М58, М44, М78, М118, М82, М83, М81, М87, и М49. Серотиповете, които се съдържат в 26- валетната, но не се покриват от 30-валентната са: М1.2, М43, М13, М59, М33, М101, и М76 (Dale J. et al. 2011)

Резултатите от типизирането показват, че новата 30-валентна ваксина потенциално би покрила всички стрепотококови *emm*-типове, доказани в настоящето проучване. Следователно нейното въвеждане в страната изглежда е добра стратегия за предотвратяване на инфекции от *S. pyogenes* в бъдеще, както и за предотвратяване на късните им усложенения.

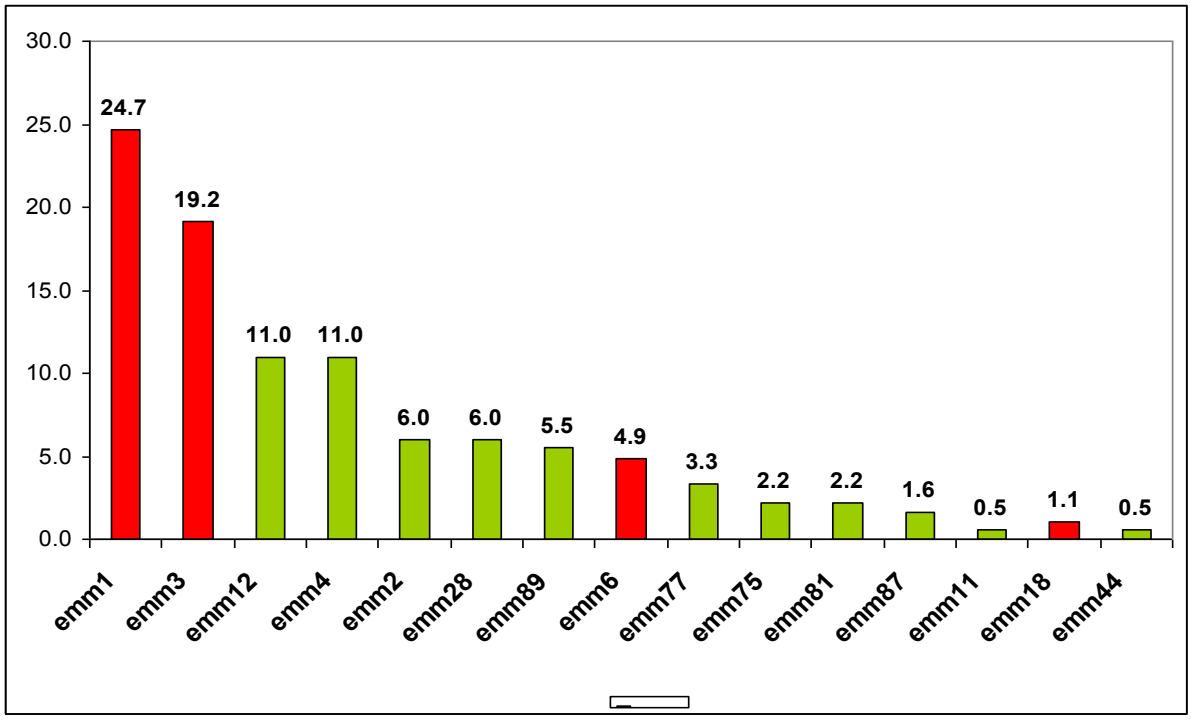
За разлика от 26-валетната ваксина, която има по-малко покритие, но е преминала предклинични изпивания и клинични изпитвания-фаза I и фаза II, които показват добра имуногенност и безопасност за хората, 30-валентата е все още в процес на клинични изпитвания и нейната безопасност предстои да бъде изпитвана (Steer A. et al. 2016).

9.3. Асоциация между установите *emm*-типове в страната и възможните късни автоимунни усложенения

Като цяло, М-типовете се свързват тясно с тъканният тропизъм и патогенезата на *S. pyogenes* инфекциите. Самоограничаващите се стрептококови инфекции дават предпоставка за развитие на по-късни животозастрашаващи усложнения, като дисеминиране в меките тъкани или сепсис, а в други случаи постинфекциозни автоимунни синдроми като остър гломерулонефрит, ревматична болест на сърцето, остър ревматизъм и хорея на Сиденхайм, болест на Кавазаки, реактивен артрит, псориазис и др. (Carapetis et al., 2005; Cunningham et al., 2000; Descheemaeker et al., 2000; Kirvan et al 2003; Proft and Fraser, 2016). Преобладаващите в страната ни генотипове, *emm*1 и *emm*3, са тясно свързани с постстрептококови негнойни усложенения, дължащи са на молекулярната мимикрия на някои М-протеинови антигени и образуваните срещу тях кръстосано-реагиращи антитела в организма (Kirvan C. et al 2003; Tamayo E. et al. 2010).

По литературни данни М-типовете, които най-често се свързват с ревматична болест са: M1, M3, M5, M6, M14, M18,M19, M24, M27, M29 (Metzgar D. & Zampolli A. 2011; Shulman S. et al. 2006). **Настоящият дисертационен труд показа, че 49.9% от разпространените при нас *emm*-типове са ревматогенни и носят потенциален риск от развитие на това автоимунно усложение (фиг. 33), освен това прави впечатление, че първите три най-чести генотипа в България са именно от групата на ревматогенните**.

Тази стойност е тревожна за страната, тъй като е три пъти по-висока от други страни като напр. Гърция, където рематогенни само 16.3% от изолатите (Koutouzi F. Et al. 2015).

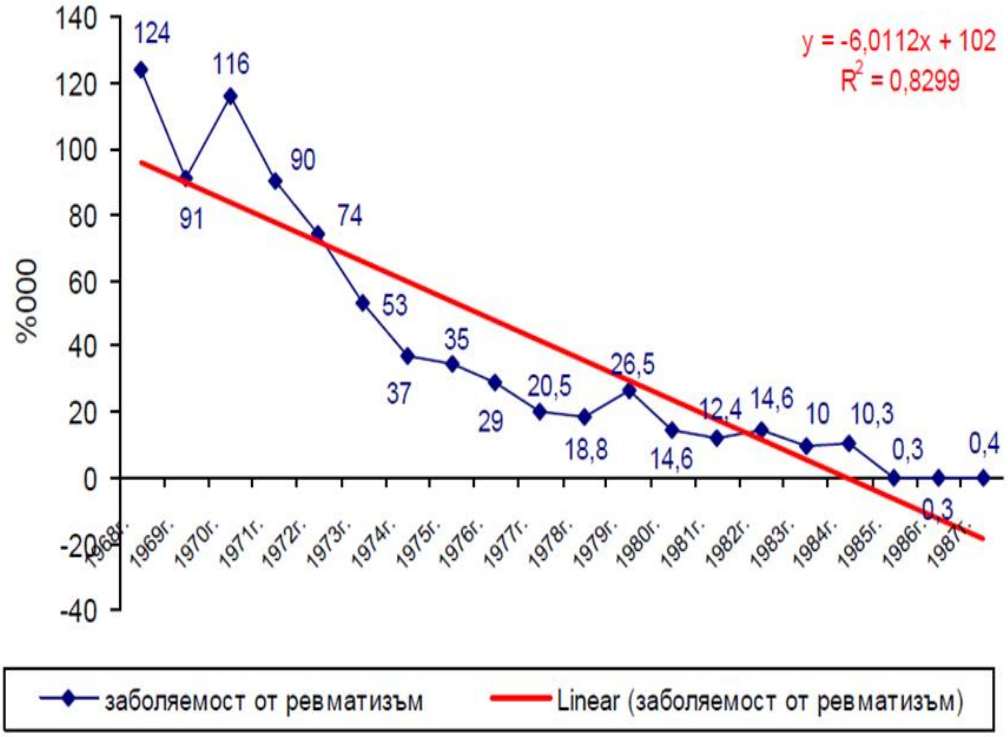


Фиг. 34. Разпространение на *emm*-типовете при *S. pyogenes* и диференциация между реваматогенни и неревматогенни генотипове
(-ревматогенни; -неревматогенни).

Официалната информация относно заболяваемостта от остър ревматизъм и хронични ревматични болести на сърцето в детска възраст в България датира от средата на 60-те години на миналия век, когато под ръководството на WHO започва изпълнение на Програма за профилактика на острите стрептококови заболявания и ревматизма в детска възраст (Петкова Т. 2014 автореферат).

Динамиката на заболяваемостта от ревматизъм в България в детска възраст през периода 1968-1987 г. е представена графично на **фиг. 35**. Началото на разглеждания период се характеризира с висока заболяемост. През 1968 г. индексите достигат до 124‰, след което заболяемостта спада четирикратно на 29‰ през 1976 г. и достига до 0.4‰ през 1987 г. Анализът на динамичните

промени, показва прогресивно намаляващи индекси на заболяемостта. След 1985г. е достигнат биологичният минимум – под 4‰.



Фиг. 35. Заболяваемост и тенденция на късната ревматична болест в България в детска възраст, 1968-1987г.

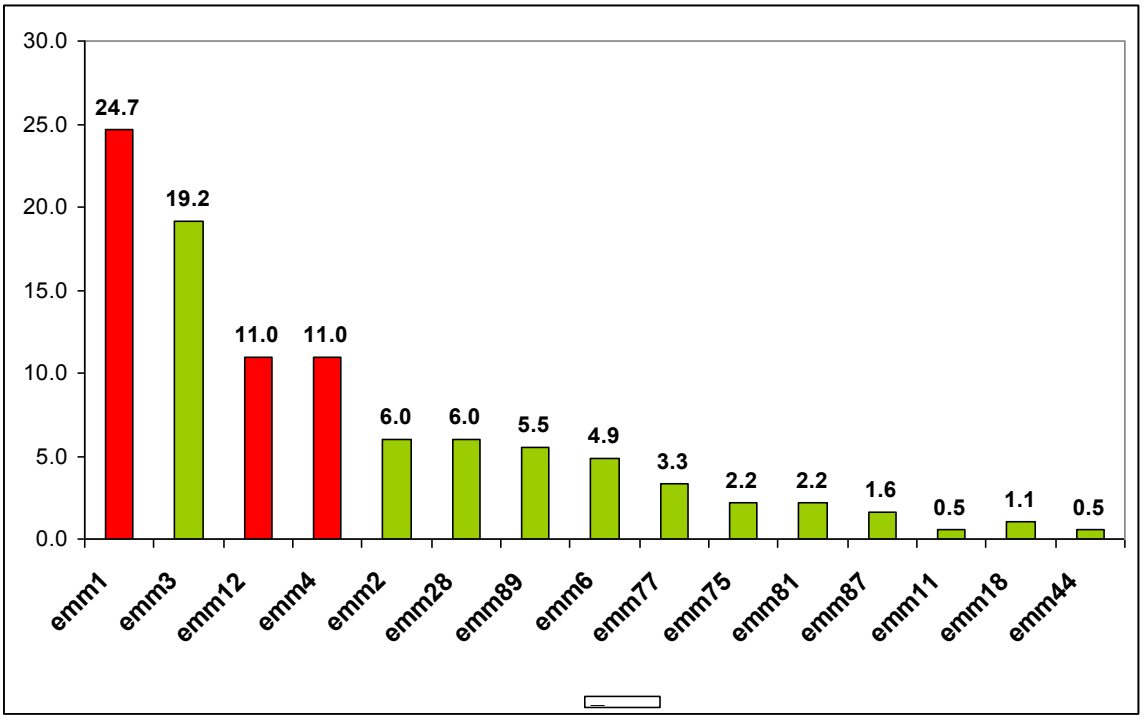
След 1988 г. в нашата страна не са извършвани широки скринингови проучвания за откриване на скритите прояви на ревматична болест и на хроничните ревмокардиопатии, в резултат на което липсват точни статистически данни.

Проучване направено от д-р Т. Петрова, 2014г. за заболяваемостта от остър ревматизъм и хронични ревматични болести на сърцето през 2000-2012г. показва, че острият ревматизъм и хроничните ревматични болести на сърцето в нашата страна през последното десетилетие се поддържат под биологичния минимум (Иванова Т. 2014г. - автореферат).

По литературни данни, М-типовете, които най-често се свързват с остър постстрептококов кломерулонефрит са: M1, M4, M12, M49, M55, M57, M60 (Metzgar D. & Zampolli A. 2011).

На **фиг. 36** е може да се видят разпространените у нас нефритогени *emm* - типове, които **съставляват общо 46.7% от циркулиращите в страната типове.** Прави впечатление, че отново три от най-честите *emm*-гени, доказани в настоящето проучване са кодиращи М-типове, принадлежащи към нефритогенните такива.

През последните три десетилетия честота на острият постстрептококов гломерулонефрит е намаляла значително, а в Централна Европа е почти изчезнала през последните години, но поради изразената динамика в епидемиологията и патогенезата на стрептококовите инфекции, риска от тези коварни усложнения не може да изчезне (Rodriguez-Iturbe B. & Musser J. 2008).



Фиг. 36. Разпространение на *emm*-типовете при *S. pyogenes* и връзка с нефритогенни типове - ■

10. Прилагане на новата "*emm* - клъстерна система" за епидемиологично охарактеризиране на *S. pyogenes* към българските изолати

Типизирането с е*mm*-гени е „златен стандарт" за изследване на молеркулярната епидемиология на *S. pyogenes* (Bisno A. et al. 2003) и показва големи различия в М-типовото разпространение, както на регионално, така и национално ниво, а също така и в страни с високи и ниски доходи. Това възпрепятсва реализирането на типово-специфичните ваксини, които се базират на типово-специфични антитела срещу хомоложния М - тип, но не и към хетероложни М - типове. Затова тя не е приложима в страни с ниски доходи, където се наблюдават множество М - типове, без преобладаващи сред тях конкретни серотипове.

Предклиничното развитие на 30-валентната ваксина е показало, че *invitro* се създават кръстосано реагиращи антитела срещу изолати, експресиращи М - протеини, които на са включени във ваксината (Dale J. Et al. 2011).

През 2014г. от Sanderson-Smith М. и колектив са предложили нова система за епидемиологично типизиране нар. *emm*-клъстерна систама, която класифицира множеството *emm*- типове в 48 клъстера на базата на структурни и свързващи сходства на М-протеина (Baroux N. et al. 2014).

Новата клъстерна система цели да даде "рамка за разбиране" на т. нар. феномен на кръстосаната защита. Тя не е в противоречие с типово-спацифичната парадигма, а предлага допълнителна хипотеза за страните с ниски доходи, където типово специфичната ваксина би имала ниско покриитие (Baroux N. et al. 2014).

Основава се на 4 биоинформационни критерия:

1. Филогенеза - монофилетичен или парафилетичен таксон
2. Статичиески тест likelihood-ratio test (aLRT) >80%
3. Мимимум 70% идентичиност между всички М – типовете

10.1. Честота на разпространение на установените клъстери в страната

В настоящият дисертационен труд новата клъстерна система за типизиране беше приложена към 182 изолата *S. pyogenes*. Нашите резултати показаха, че българските изолати пренадлежат към 8 различни *emm*- клъстера: A-C3 (n=45, 24.7%), E4 (n=38, 20.9%), A-C5 (n=35, 19.2%), следвани от A-C4 (n=20, 11%), E1 (n=20, 11%), E6 (n=9, 4.9%), M6 (n=9, 4.9%), E3 (n=4, 2.2%), cladeY (n=2, 1.1%) (**табл. 24**).

Настоящото проучване е първото в страната, в което се прилага „новата *emm*- клъстерна система" за типизиране на *S. pyogenes* и едно от малкото в Европа до момента. Подобен епидемиологичен анализ е направен единствено в Гърция, където са устновени 13 клъстера, от които преобладаващи са: E4, A-C3, A-C4, E1 (Koutouzi F. et al. 2015).

Извън Европа, данни са налични за Северна Америка (Shulman S. et al. 2014; Smeesters P. et al. 2017), за държави от Тихиокенаският регион (Нова Каледония, Фиджи, Австралия) (Baroux N. et al. 2014), за Нова Зеландия (Williamson D. et al. 2015) и Тайван (Chiang-Ni. et al. 2016) и резултатие са много различни.

При сравняване на българските клъстери с тези в съседна Гърция и страните от Северна Америка, може да се види известно пропокриване на преобладаващите клъстери, но е интересен фактът, че клъстер A-C5, който е един от пребладаващите при нас (19.2%), в Гърция и Северна Америка се среща много по-рядко, към него принаделжат само 7-9 % от щамовете (Koutouzi F. e tal. 2015; Shulman S. et al. 2014).

В страните от Тихиокенсият регион пребладаващите клъстери (D4, E3, E2, E6) (Baroux N. et al. 2014) не показват почти никакво сходство с тези получени в България, Гърция и Северна Америка.

Прилагането на клъстерната система за типирине към *S. pyogenes* изолати от Тайван, показва резулатати подобни на нашите, независимо от далечното

географско разположение, т.е превалиране на клъстерите A-C4, E1, E6 и A-C3, но там те се срещат с различна честота, в сравнение с нашия регион (Chiang-Nic. Etal. 2016).

Проучване направено от Shulman S et al. 2014 установява, че преобладаващите в при нас клъстери, A-C3 и E4, се свързват най-често с фарингити, а Williamson D. et al. 2015 установява, че E4 е един от преобладаващите клъстери при ревматични заболявания.

10.2. Честота на разпространение на преобладаващите клъстери при кожно-мукозн и инвазивни изолати *S. pyogenes*

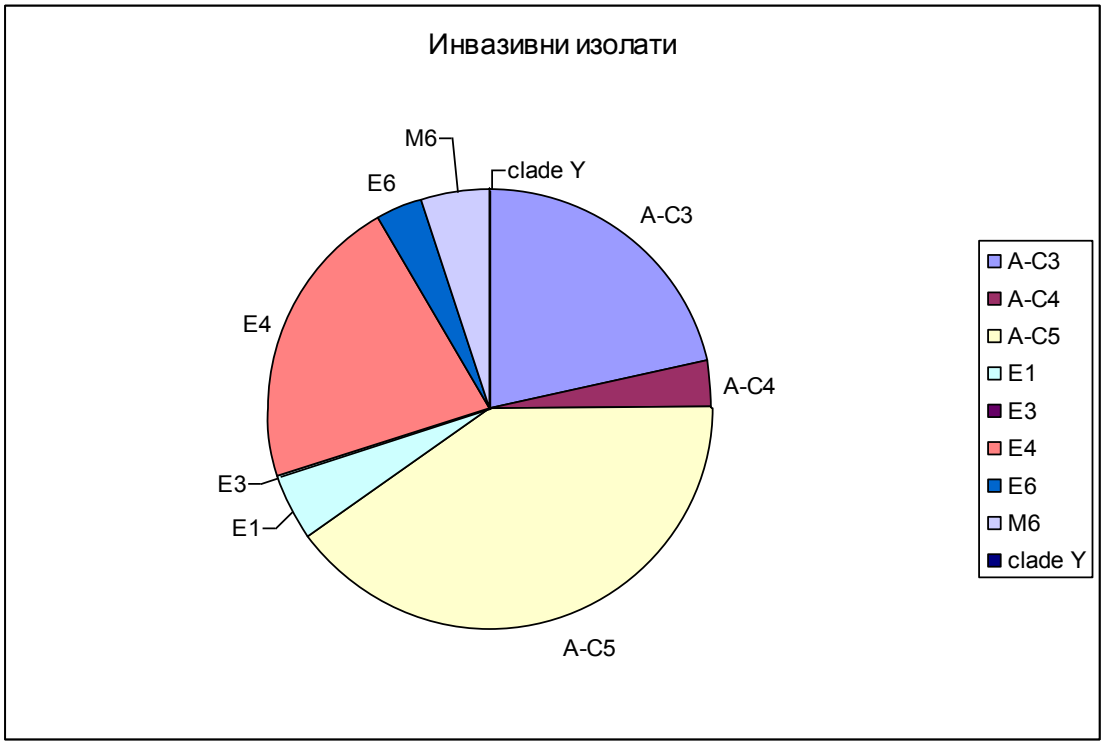
В настоящото проучване също беше направен беше опит да се търси корелация между установените в страната клъстери и мястото на изолиране на клиничните щамове *S. pyogenes*. За целта щамовете *S. pyogenes*, които бяха включени в клъстерната система бяха разделени на 2 групи:

1. Кожни и мукозни изолати (n=122)
2. Инвазивни изолати (n=60)

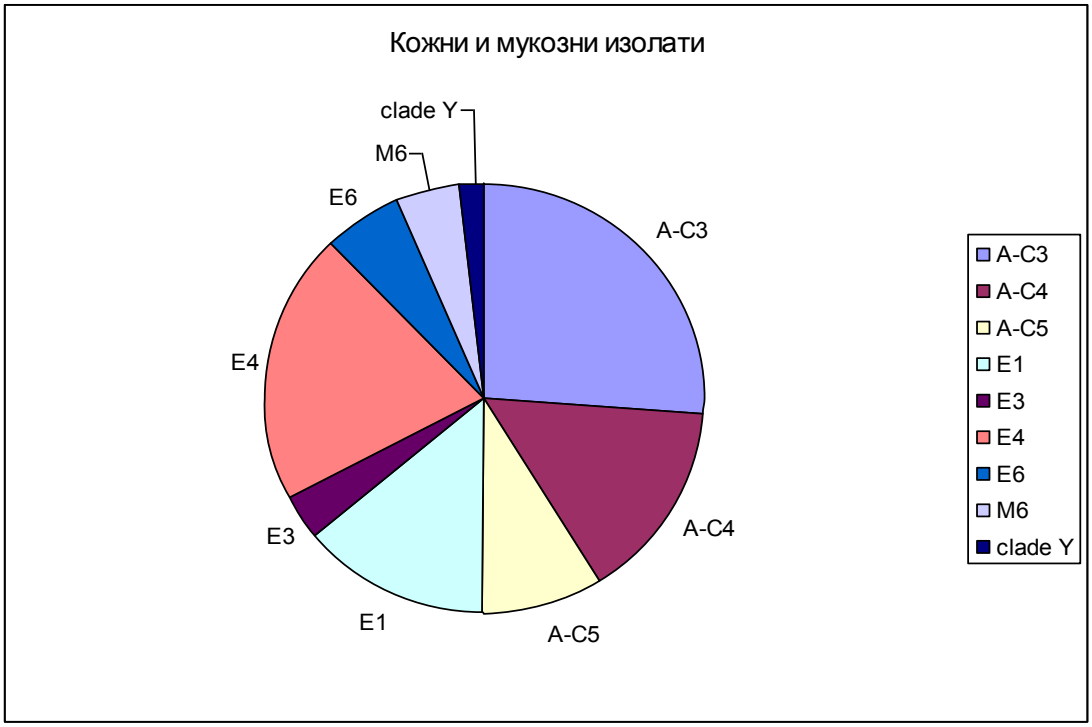
Разпределението на клъстерите, заедно с включените в тях *emm*- типове, според мястото на изолиране на щамовете, са показани на **табл. 24** (**фиг. 36**)

След извършване на подходяща статичическа обработка на получените от нас резулатати беше установено, че клъстер A-C4 (*emm*12) се асоцииира значително с кожните и мукозните изолати ($p<0.05$), а клъстер A-C5 (*emm*3) се свързваше сигнификантно с инвазивни изолати.

Изследване включващо клинични щамове *S. pyogenes,* изолирани в Тайван показва статистическа значима асоциация между клъстер A-C4 и фарингит и скарлатина ($p<0.05$), между E1 и скарлатина, E6 със целулит и други суперфициални кожни инфекции (Chiang-Nic. et al. 2016).



а)



б)

Фиг. 37. Разпределение на клъстерите включващи *emm*- типовете
а)при кожно-мукозни изолати (n=122)
б)Инвазивни изолати (n=60)

Таблица 24. Клъстерна система за епидемиологично охарактеризиране на щамове *S. pyogenes,* разделени на 2 групи.

***emm* клъстер/ *emm*- тип**	**Група I. Кожни и мукозни изолати n=122 (%)**	**Група II. Инвазивни изолати n=60 (%)**	**Общ брой n (%)**	**P**
A-C3/ *emm*1	32 (26.2)	13 (21.7)	45 (24.7)	0.5852
A-C4/ *emm*12	**18 (14.8)**	**2 (3.3)**	20 (11.0)	**0.0224**
A-C5/ *emm*3	**11 (9.0)**	**24 (40,0)**	35 (19.2)	**0.0001**
E1/ *emm*4	17 (13.9)	3 (5.0)	20 (11.0)	0.0810
E3/ *emm*44,87	4 (3.3)	0 (0.0)	4 (2.2)	0.3040
E4/ *emm*2,28,77,89	25 (20.5)	13 (21.7)	38 (20.9)	0.8484
E6/ *emm*11,75,81	7 (5.7)	2 (3.3)	9 (4.9)	0.7199
M6/ *emm*6	6 (4.9)	3 (5.0)	9 (4.9)	1.0000
Clade Y/ *emm*18	2 (1.6)	0 (0.0)	2 (1.1)	1.0000
Общ брой	122 (100)	60 (100)	182 (100)	

Забележка: Удебеленият и подчертан текст показва статистическа значимост ($p<0.05$).

10.3. Анализиране на връзката между доминиращите клъстери в страната и установените в тях фактори на вирулентност

В нашето проучване анализирахме връзката между ключовият фактор на вирулентността при *S. pyogenes* - М-протеинът и другите важни детерминанти на вирулентността- суперантигени, нуклеази, протеази и др.

Корелацията между клъстерите и чесотата на срещане на 21 фактора на вируленстност при *S. pyogenes* са представени в **табл. 25**.

Беше извършена статическа обработка на данните анализиращи връзката между преобладаващите в страната клъстери и суперантигените (**табл. 26**)

В настоящото проучване беше установено, че клъстер A-C3 се асоциира значително по- често със суперантигените *SpeA, speG, speJ*, докато клъстер E4 се свързваше по-често със суперантигенът *speC*.

Някои автори смятат, че наличието на гените *speA* и *speJ* в генома на *S. pyogenes*, предотвратява навлизането на бактериофаги съдържащи *speH* и *speI* (Commons et al. 2008).

Подобни резулатати са получени от Descheemaeker et al. 2000, които показват, че повечето изолати с *emm*1 (A-C3) носят гените *speA*, *speG* и *smeZ* и са без *speC*, *ssa, speH*.

10.4. Определяне на връзката между гените определящи макролидната резистентност и свързаните с тях *emm*- типове.

В настоящият дисертационен труд беше извършено *emm*- типизиране на общо 67 изолата *S. pyogenes*, носещи трите гена определящи макролидната резистентност- *mef(A), ermA, ermB*.

Нашите предварителни проучвания показаха, че *mef(A),* е най-често срещаната генетична детерминанта определяща макролидната резисистеност сред българските щамове *S. pyogenes* (**табл. 20**). Голяма част от проучванията направени в през последните 10 години, съобщават че *mef(A)* ген е домиращият генетичен детерминант сред макролид резистентните щамове както в Централна

и Източна Европа, така и в САЩ, Мексико, Япония и др (Gracia M. et al. 2009; Gajic I. et al. 2014; Takahashi T. et al. 2016; Villasenor- SierraA. et al. 2012; Stathi A. etal. 2008; Olivieri R. et al. 2015; Green M. et al. 2006). Поради тази причина генът е най-често изследваният през последните години.

Ние извършихме *emm*- типизиране на общо 38 щама *mef(A)* положителни *S. pyogenes* и установихме, че циркулиращите *emm* клонове сред тях са изключително хетерогенни. *mef(A)*+ *emm*- типове разпространени в страната бяха: *emm*1, *emm*2, *emm*3, *emm*4, *emm*6, *emm*12, *emm*28, *emm*89 (**табл. 25**)

Тези данни показват, че причината в увеличаващата се макролидна резистенстност в региона вероятно не се дължи на разпространение на определен клон, носител на *mef(A).*В Италия, резулатите са подобни на нашите т.е изолатите с М-фенотип, показали принадлежност към почти всички типове, характерни за региона (Zampaloni C. et al. 2003). Докато в Испания, резулатите показват, че увеличаването на макролидната резистеност при *S. pyogenes* в региона се дължи на *mef(A)*+ щамове принадлежащи основно към 2 *emm* клона (*emm*4, *emm*75) (Alberti S. et al. 2003).

За разлика от тях, генът *ermB,* самостоятелно или вкомбинация с *mef(A),* беше вторият по-честота на разпространение генетичен детерминант сред българските макролид резистентни щамове *S. pyogenes*.

Настоящият дисертационен труд показа, че почти 87.5% (n=14/16) *ermB*+ щамове в страната принадлежат към единствен клон - *emm*28.0 (**табл. 27**).

Единственото и последно прочуване за разпространението на *emm*-типовете сред макролид резистентните щамове *S. pyogenes* в България, за периода 1995- 2005г., показва, че щамовете като цяло са хетерогенни, без преобладаване на определен клон. Това проучване не установява *emm*28, сред макролид резистентните щамове в България (Decheva A. et al. 2006).

Таблица 25. Честота на разпространение на факторите за вирулентност при установените в проучваното *emm*- клъстери

Гени за вирулентност	*emm* клъстери (брой щамове)																					
	A-C3 (45)		A-C4 (20)		A-C5 (35)		E1 (20)		E3 (4)		E4 (38)		E6 (9)		M6 (9)		Clade Y (2)		Общ брой (182)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)		
speA	29	64	5	25	17	49	8	40	2	50	11	29	2	22	2	22	2	100	78	43		
speC	5	11	9	45	8	23	7	35	1	25	31	81	9	100	4	44	2	100	76	42		
spe F	31	69	14	70	18	51	5	25	2	5	30	79	8	89	8	89	1	50	117	64		
spe G	32	71	14	70	18	51	2	10	0	0	18	47	5	55	7	78	2	100	98	54		
spe H	3	7	6	30	1	3	0	0	1	25	2	5	1	11	0	0	1	50	15	8		
spe I	10	22	8	40	2	6	3	15	1	25	3	8	1	11	2	22	1	50	31	17		
spe J	41	91	11	55	16	45	5	25	2	50	14	37	3	33	1	11	0	0	93	51		
spe K	4	9	4	20	16	45	5	25	2	50	9	24	1	11	1	11	1	50	43	24		
spe L	1	2	1	5	7	20	3	15	1	25	2	5	2	22	1	11	1	50	19	10		
spe M	1	2	1	5	7	20	2	10	1	25	2	5	2	22	1	11	1	50	18	10		
sdc	18	40	3	15	25	71	3	15	2	50	14	37	5	55	5	56	2	100	77	42		
sda D	30	67	11	55	14	40	6	30	0	0	8	21	4	44	0	0	0	0	73	40		
spd 3	13	29	2	10	2	6	4	20	0	0	12	31	2	22	3	33	2	100	40	22		
ssa	10	22	5	25	15	43	11	55	1	25	5	13	2	22	2	22	0	0	51	28		
SmeZ	38	84	18	90	32	91	15	75	4	100	28	74	9	100	4	44	1	50	149	82		
mac	37	82	11	55	31	88	11	55	4	100	33	87	6	67	8	89	2	100	143	79		
sic	24	53	1	5	3	9	5	25	0	0	4	10	4	44	1	11	0	0	42	23		
speB	45	100	20	100	35	100	20	100	4	100	38	100	9	100	9	100	2	100	182	100		
sda B	45	100	20	100	35	100	20	100	4	100	38	100	9	100	9	100	2	100	182	100		
SpyCep	45	100	20	100	35	100	20	100	4	100	38	100	9	100	9	100	2	100	182	100		
slo	45	100	20	100	35	100	20	100	4	100	38	100	9	100	9	100	2	100	182	100		

Таблица 26. Разпространение на суперантигените при преобладаващите в страната *emm*-клъстери.

	A-C3 (*emm1*) [N=45] n (%)	E4 (*emm2,28,77,89*) [N=38] n (%)	**P**
speA	29 (64)	11 (29)	**0.0019**
speC	5 (11)	31 (81)	**0.0001**
spe F	31 (69)	30 (79)	0.3298
spe G	32 (71)	18 (47)	**0.0423**
spe H	3 (7)	2 (5)	1.0000
spe I	10 (22)	3 (8)	0.1277
spe J	41 (91)	14 (37)	**0.0001**
spe K	4 (9)	9 (24)	0.0768
spe L	1 (2)	2 (5)	0.5906
spe M	1 (2)	2 (5)	0.5906
ssa	10 (22)	5 (13)	0.3929

Забележка: Удебеленият и подчертан текст показва статистическа значимост ($p<0.05$).

Това ни показва, че този клон вероятно е внесен в страната от съседни Европейски страни, където през този период се докладава нараствена на макролидната резистност свързана с мултирезистентен клон *emm*28. Първото съобщение за връзката между *ermB* и *emm*28, е направено в Белгия, през 2003г., където се установява, че 14 от 16-те изолирани макролид и бацитрацин - резистентни щама *S. pyogenes*, са носители на *ermB* и принадлежат към *emm*28 (Malhotra-Kumar S. et al. 2003). Година по-късно в Испания се докладва за необичайно нарастване на неивазивни бета- стрептококови заболявания, причинени от мултирезистентен клон *emm*28 (Perez-Trallero E. et al. 2004). За същият период във Франция се съобщава, че всички макролид и бацитрацин резистентни щамове, включени в съответното прочуване, принадлежат към уникалният клон - *emm*28 (Mihaila-Amrouche L. et al. 2004), за който се счита че е основната причина за увеличаването на макролидната резистенстност в региона (Bingen E. et al. 2004).

Табл. 27 показва, разпределнието на *emm*- типовете при *ermA*+ изолати. Генът *ermA* обуславя индуцибелен MLSB фенотип, който се свързва с високи нива на резистентност към макролиди и ниски към линкозамиди.

Според нашето прочуване генът беше третата по честота на разпространение сред макролид резистентните *S. pyogenes*. В настоящото проучване бяха типирани общо 13 *ermA*+ щама, от които 5/13 (38%) принадлежаха към *emm*12, отново5/13 щама (38%) принаделжаха към *emm*77 и 3/13 към *emm*89.

Въпреки хетерогенността, която се откриваше при *ermA*+ щамове, може да се каже, че типовете *emm*12 и *emm*77 бяха преобладаващи. Подобни резултати са съобщавани и в Германия, където всички *ermA*+ били от тип *emm*77, а всички *ermB*+ - *emm*28 (Reinert R. et al. 2003).Вероятната връзка между клон *emm*77 и *ermA* се подозира и в други Европейски страни (Littauer P. et al. 2006; Szczypa K. et al. 2004)

Настоящият дисертационен труд показва, че увеличаването на макролидната резистентност в България през последните години може да се дължи на епидемичното разпространение на резистентни клонове или на разпространението на генетичните детерминанти на резистентността между изолати с различен генетичен произход. Това разпространение на гените за устойчивост се осъществява вероятно с транспозони, които се открити, както за *mef(A)* така и за *ermB* (Green M. et al. 2006; Banks D. 2003).

Таблица 27. Разпределение на *emm*- типовете според гените определящи макролидната резистентност при *S. pyogenes*

emm- тип	Гени за макролидна резистенстност					
	mefA/E		***ermA***		***ermB***	
	n	%	n	%	n	%
*emm*1.0	8	21	0	0	0	0
*emm*2.0	3	8	0	0	0	0
*emm*3	7	18	0	0	1	6
*emm*4.0	11	29	0	0	0	0
*emm*6	1	3	0	0	0	0
*emm*12	6	8	5	38	1	6
*emm*28.0	1	3	0	0	14	87.5
*emm*77	0	0	5	38	0	0
*emm*89	1	3	3	23	0	0
Общ брой n= 67	**n= 38**	**100**	**n= 13**	**100**	**n= 16**	**100**

11. Мултилокусно секвениране- MLST (multilocus sequence typing)

Молекулярно типизиране с MLST беше изпълнено за 32 репрезентативни щама *S. pyogenes*, които бяха предварително секвенирани чрез *emm*- типизиране. Комбинирането на алелите на седемте локуса осигурява алелен профил или секвенционен тип (ST) (**Фиг. 38**). Чрез този метод бяха секвенирани по 4 щама от най-разпространените в България *emm*- типове, а именно *emm*1, *emm*3, *emm*4, *emm*12, *emm*28, *emm*77, *emm*6, *emm*89. Получените от нас резултати от мултилокусното секвениране сравнени с *emm*- типове са представени в **Табл.28.** Анализът на данните от MLST показа присъствие на 8 секвенционни типа (ST) в изследваните щамове *S. pyogenes* в България. Резултатие получени с MLST на 32 щама показаха пълно съвпадение с тези получени с *emm*-типизиране.

Таблица 28. Резулатите от MLST на 32 репрезентативни щама *S. pyogenes* и тяхната връзка с *emm*- типовете.

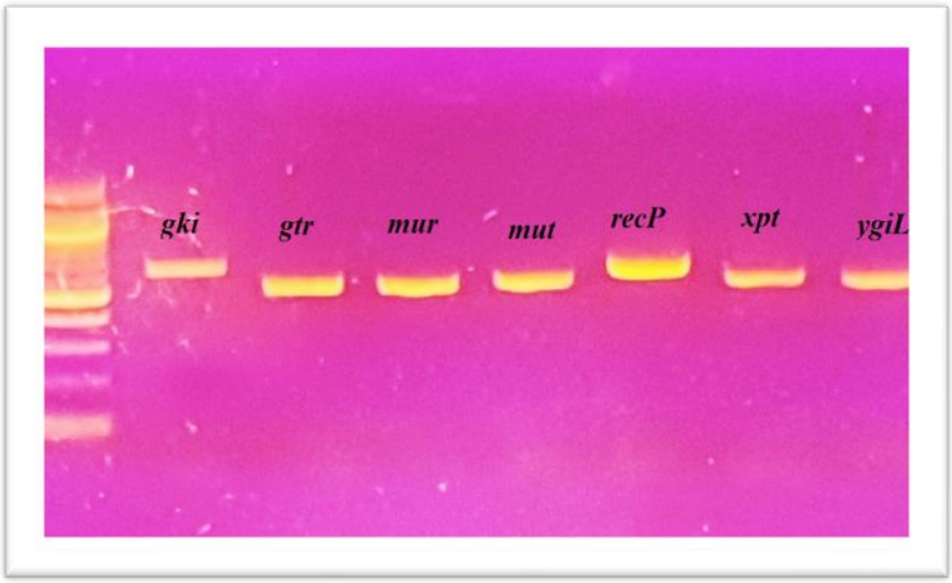
Брой изследвани щамове	*emm*-тип	Gki	Gtr	Mur	Mut	Rec	Xpt	ygiL	ST
4	1.0	4	3	4	4	4	2	4	**ST28**
4	3.1	2	6	8	5	2	3	2	**ST15**
4	4.0	5	11	8	5	15	2	1	**ST39**
4	12.0	5	2	2	6	6	2	2	**ST36**
4	28.0	11	6	14	5	9	17	19	**ST52**
4	77.0	13	6	2	3	23	3	11	**ST63**
4	6.4	5	52	5	5	5	4	3	**ST382**
4	89.0	16	2	8	3	3	13	3	**ST847**

Като беше отбелязано и по-рано, *emm*1 е най-често срещаният *emm*-тип както в България, така и в много други части от света (Luca-Harari B.etal. 2009).В нашето проучване всичките 4 щама от *emm*1 принадлежаха към секвенционен тип ST28. Подобно на нашите резулати, в Испания и Норвегия всички циркулиращи щамове от *emm*1 са от секвенициoнен тип ST28 (Montes M. et al. 2011; Meisal R. et al. 2010). За разлика от нас, в Австралия и Нова Зеландия, щамовете

принадлежащи към *emm*1 са от секвенционен тип ST91, ST92, ST93, ST94 (Enright M. et al. 2001).

Всички тествани щамове от *emm*3 бяха от секвенициoнен тип ST15, както в Норвегия и Испания (Montes M. et al. 2011; Meisal R. et al. 2010), а през 2017г. в Великобритания беше докладвано тревожно нарастване през последните години на стрептококовите инфекции причинени от*emm3*/ST15 (Afshar B. et al. 2017).

Изследванитещамовете от *emm*12 бяха определени като ST36, а от *emm4*-ST39. Тази резултати също показват съответствие с Испанските стрепкокови клонове (Montes M. et al. 2011), но и с тези в Полша и Румъния (Szczyra K. et al. 2006; Luca- Harari B. et al. 2008).



Фиг. 38. Електрофореза на 7-те постоянно присъстващи гена при MLST на *S. pyogenes*

В заключение може да се каже, че клоналното разнообразие на щамовете разпространени в България, съответства в значителна степен на циркулиращите в много от Европейските държави.

В заключение, за първи път в България са извършени комплексни микробиологични, епидемиологични и генетични проучвания върху 445 клинично значими изолата *S. pyogenes.*

Установено е участието на *S. pyogenes* в етиологията на различни мукозни, кожни и инвазивни инфекции в България за 5 годишен период. Разработени са 2 нови и съвременни метода за бърза етиологична диагноза на *S. pyogenes* от клинични материали, директно в проби от пациенти - мулти-плекс PCR и в реално време PCR, които показаха абсолютна специфичност и чувствителност, превъзхождащи в случаите на инвазивни инфекции рутинната посявка и бързия имунохроматографски тест.

Извършени са проучвания върху 21 фактора на вирулентност от групите на токсините, ензимите и суперантигените и е установено, че гените *speB, spyCep, sdaB* и *slo* се срещат в 100% от изследваните от нас щамове *S. pyogenes,* повече от 80% са носители на гените *mac*и *smeZ,* а гените за важните суперантигени като *speA, speF, speL, speM* ($p<0.001$) са по-често срещани в инвазивните български изолати *S. pyogenes*.

Направените от нас проучвания върху антимикробната резистентност на този важен инфкциозен агент, показаха че българските изолати *S. pyogenes* все още остават чувствителни на пенцилини, но се наблюдава тревожна тенденция за нарастване на резистеността към MLS група, до стойности над 30% нечувствителни към макролиди през последните години. Резистентност към тетрациклини се задържа в малко над 10% от изследваните щамове, без тенденция към нарастване.

За първи път в България е извършено мащабно епидемиологично проучване, с помощта на най-актуалните методи за типизиране на този вид, а именно *emm*-типизиране, както и с MLST (мултилокусно секвениране). Установени са най-разпространените *emm*-типове циркулиращи в страната (*emm1,3,4,12,28,89),* преобладаващите клъстери (A-C3, E4, A-C5, A-C4, E1, E6, M6, E3, cladeY) и са открити два нови за света *emm* субтипа-*emm3.132* и

emm3.133. Събраната ценна информация е анализирана в асоциация с доказаните фактори за вирулентност като за първи път се открива пряка зависимост между *emm1* и *emm3* от една страна иналичието на значително по-голям брой гени, кодиращи вирулентност от друга. Прави се задълбочено съпоставяне на нашите резултати с теоретичното потенциално покритие в България на експерименталните 26- и 30-валентни ваксини, съдържаши М-антиген за профилактика на инфекциите, причинени от *S. pyogenes*.

VI. Изводи:

1. Анализирана беше епидемиологията на инфекциите, с доказан причинител *S. pyogenes*, за пет годишен период по пол и възраст като се установява, че най-често е засегната групата в предучилищна, детска възраст, от 3 до 7 г., момичета, което е характерно и за част от европейските държави.

2. Разработените два нови за България молекулярно-генетични метода (мулти-плекс и RT PCR), показаха абсолютна специфичност и чувствителност, за бърза етиологична диагноза на *S. pyogenes,* директно в проби от пациенти, след сравнителното проучване едновременно с бърз имунохроматографски тест и с класическото култивиране, което ги прави особено полезни за доказване на стрептококовата етиология в инвазивни материали.

3. Бяха проучени голям брой важни фактори на вирулентността за първи път в български изолати *S. pyogenes* със съвременни молекулярно-генетични методи. В 100% от изолатите бяха установени *speB, spyCep, sdaB, slo,* кодиращи: две протеази, ДНК-аза В и стрептолизин О. В над 80% от изследваните щамове бяха доказани *mac* и *smeZ.* Гените за суперантигените *speA, speF, speL, speM* ($p<0.001$) бяха по-често установени в инвазивните изолати *S. pyogenes*.

4. Нивото на резистентност сред проучваната колекция от изолати *S. pyogenes* към макролиди в България беше установено в над 30% от изолатите, с тенденция за нарастване във времето. Преобладаващият механизъм на резистентнот при макролид резистентните щамове *S. pyogenes* в 79.2% беше *mef(A)* – самостоятелно (57.1%) или в комбинация с други два гена (22.1%): *erm(A)* и/или *erm(B)*. Втори по честота беше *erm(B*) при 31.4 % от изолатите (самостоятелно в 11,4% и в комбинация с *ermA* – в 20%)

5. Резистентността към тетрациклини се установяваше в 10,3% от изследваните щамове, без тенденция към нарастване и в 85% се доказваше като

вероятна причина *tet(M)*. В 15% беше установявавн *tet (O)* и наличието му показваше корелация с макролидната резистентност.

6. Подходящи за емпирична терапия на инфекции, причинени от *S. pyogenes* остават пеницилините, аминопеницилините, а при тежки инфекции е препоръчителна комбинацията на пеницилинов препарат с клиндамицин, който инхибира отделянето на токсини от пиогенните стрептококои и има по-добра проникваемост, както в тъканите, така и вътреклетъчно. Използването на макролиди трябва да става само след *in vitro* изпитване на чувствителността при сегашното състояние на проблема.

7. При епидемиологичното типизиране на 182 клинични изолати *S. pyogenes* се установиха 15 различни *emm*-типа с преобладаване на типовете *emm1,3,4,12,28,89,* разпределени в 8 различни *emm*-клъстера: A-C3, E4, A-C5, A-C4, E1, E6, M6, E3, cladeY.

7.1. Открити са за първи път в света два нови субтипа - *emm*3.132 и *emm*3.133, депозирани в GenBankNCBI с номерата MG869722 и MG869723.

7.2 Интерес представлява, че 49.9% от установените генотипове (*emm1,3,4*) бяха ревматогенни, 46.7% са известни като нефритогенни и/или ревматогенни, *emm3* се асоциира често с инвазивни инфекции, докато *emm*12 се асоцииира по-често с кожните и мукозните изолати.

8. Експерименталните 26 - и 30 - валентни ваксини срещу *S. pyogenes,* биха имали покритие за над 84% и респ. 100% от *emm*-типовете, доказани в настоящето проучване като циркулиращи в България.

9. Най-разпространения клъстер в нашата страна A-C3, който включва и доминиращят *emm1* тип сред българските изолати *S. pyogenes*, имаше статистически значима положителна връзка със суперантигените *SpeA, speG, speJ*, докато клъстер E4, който е вторият по-честота на разпространение в страната, се асоцииираше сигнификантно със суперантигенът *speC*.

10. Беше установено, че 87.5% от *ermB* положителните щамове, принадлежаха към новия клон за България *emm28*..

11. MLST анализът установи 8 секвенционни типа (ST) в изследваните щамове *S. pyogenes* (ST28, ST15, ST39, ST36, ST52, ST63, ST382, ST847) за първи път при български изолати.

VII. Справка за приносите на дисертационния труд

Приноси с оригинален характер:

1 За първи път в България със съвременни молекулярно-генетични методи е охарактеризиран вирулентния потенциал на колекция от 445 клинични изолати *S. pyogenes*.

2 Проучени са механизмите на резистентност на 140 български макролид резистентни щама *S. pyogenes*. За първи път в изследваните изолати е доказан генът, кодиращ метилази - *erm(B)*, самостоятелно в 11.4% и в комбинация с *mef(A)* при 20% от макролид резистенстните щамове, обуславящ високи нива на резистентност, както към макролиди, така и към линкозамиди.

3 За първи път е извършено в България епидемиологично типизиране на клинични изолати *S. pyogenes* с помощта на молекулярно-генетични методи и определяне на *emm*-клъстери, с което са открити 15 различни *emm*-типа с преобладаване на типовете *emm1,3,4,12,28,89* и 8 различни *emm*-клъстера: A-C3, E4, A-C5, A-C4, E1, E6, M6, E3, cladeY.

4 За първи път в света са установени два нови субтипа - *emm*3.132 и *emm*3.133, депозирани в GenBankNCBI с номерата MG869722 и MG869723. За първи път в български стрептококови изолати са установени преобладаващи нефритогенни и/или ревматогенни типове сред първите най-чести циркулиращи в страната, както и асоциация на *emm3* – клъстер A-C5 с инвазивните инфекции и клъстер A-C4 (*emm*12) с кожните и мукозните изолати.

5 Това е първото проучване, доказващо, че най-разпространеният клъстер в странта A-C3, който включва и доминиращят *emm1*, тип сред българските изолати *S. pyogenes*, има статистически значима положителна връзка със суперантигените *SpeA, speG, speJ*, докато клъстер E4, който е вторият по-честота

на разпространение в страната, се асоцииране сигнификантно със суперантигенът *speC*.

6 За първи път в България се установява *ermB*+ макролид-резистентни щамове от-*emm*28 тип

7 За първи път в България е извършено типизиране чрез MLST на *S. pyogenes* и и са установени 8 секвенционни типа (ST) в изследваните щамове (ST28, ST15, ST39, ST36, ST52, ST63, ST382, ST847).

Приноси с потвърдителен характер:

1. Анализирана е епидемиологията на инфекциите, с доказан причинител *S. pyogenes*, за пет годишен период по пол и възраст като се установява, че най-често е засегната групата в предучилищна, детска възраст, от 3 до 7 г., момичета, което е характерно и за част от европейските държави.

2. Определена е антибиотичната чувствителност при 445 български щама *S. pyogenes,* с фенотипни техники към основни за терапията групи антимикробни средства – пеницилини, макролиди, линкозамиди, тетрациклини. Нивото на резистентност към макролиди е над 30%, а това към тетрациклини е над 10%, което се доближава до това и в други европейски държави.

3. Като преобладаващ генетичен детерминант при малко повече от половината макролид резистентните щамове *S. pyogenes* е установен *mef(A)*.

Приноси с научно - приложен характер:

1. За първи път в България са разработени и внедрени в практиката две нови молекулярно-генетични техники: мултиплекс PCR и Real Time PCR, с абсолютна чувствителност и специфичност, след сравнителното проучване едновременно с бърз имунохроматографски тест и класическото култивиране за доказване на *S. pyogenes* директно в проби от пациенти.

2. Въз основа на резултатите от изследванията на антимикробната чувствителност, от обзора на литературата, както и във връзка с установените механизми на резистентност, са направени препоръки за емпирична терапия на инфекции, причинени от *S. pyogenes*. Аргументирано е, че използването на макролиди трябва да става само след *in vitro* изпитване на чувствителността при сегашното състояние на проблема.

3. Направен е за първи път в нашата страна задълбочен анализ на молекулярната епидемиология на инфекциите, причинени от *S. pyogenes* в контекста на потенциалните възможности на експерименталните 26- и 30-валентни ваксини, съдържащи М-антигени от този микробен вид. Този анализ би бил полезен с цел прогнозиране на ефекта от специфичната имунопрофилактика срещу етиологичния агент.

VIII. Книгопис

1. Българска асоциация на микробиолозите, *http:www.bam-bg.net*

2. Гергова Р, Гергов С, Дикова М, Минчев П, Петрова Г, Переновска П, Митов И, Стратева Т. (2013). Микробиологична характеристика на инфекциите на горните дихателни пътища в детско-юношеска възраст и връзката им с бронхопулмоналните усложнения за периода 1998-2012 г., *Наука Пулмол*., 3, 5-13.

3. Наредба № 15 за имунизациите в Р. България. Издадена от Министерството на здравеопазването, обн. *ДВ.* бр.45 от 31 Май 2005г., посл. изм. и доп. *ДВ*. бр.47 от 28 Май 2013г.

4. Наредба № 21 за реда за регистрация, съобщаване и отчет на заразните болести. Издадена от МЗ,Обн. *ДВ*. бр.62 от 29 Юли 2005г., изм. *ДВ*. бр.52 от 8 Юли 2011г.

5. Наредба № 21 за реда за регистрация, съобщаване и отчет на заразните болести. Издадена от МЗ,Обн. *ДВ*. бр.62 от 29 Юли 2005г., изм. *ДВ.* бр.52 от 8 Юли 2011г.

6. Гергова Р., Минчев П., Дикова М., Гергов С., Джурова Ц., Илиева Т., МитовИ. (2013). Микробен спектър на етиологията на придобитите в обществото респираторни инфекции в детска възраст и резистентност към антимикробни средства, *БМЖ*, 2, 45-54.

7. Сечанова Л, Станчева И, Александрова А, Костянев Т, Митов И. (2015). Динамични промени в бактериологията на супуративния остър среден отит при деца от две до четири години след старта на масовата имунизация с пневмококова конюгирана ваксина, *Педиатрия,* (3):34-38.

8. Стоянова М. (1984). Стрептококови инфекции, МФ, 7-52.

9. Филимонова Ю. (2010). Распространение и молекулярные механизмы резистентности к макролидным антибактериальным препаратам микроорганизмов рода *Streptococcus* в Росийской федерации, автореферат; available online *http://dissercat.com*

10. Халова Б. (2012). Проучване върху причините и факторите, обуславящи разпространението на инфекциозните заболявания в област София-град през периода 1970-2010 г., available online: *http://career.mu-sofia.bg/attachments/article/419/Avtoreferat.pdf*

11. Иванова Т. (2014). Епидемиологични проучвания върху някои форми на остри стрептококови инфекции и ревматичните им усложнения във фаза на елиминация. *Автореферат*, Плевен.

12. Стоилова Й. (2009). Проучване върху динамиката на епидемичните процеси, в резултат от профилактиката на инфекциозните заболявания в България за 30-годишен период (1977-2007г.), *Хабилитационен труд,* Пловдив.

13. Afshar B, Turner C, Lamagni T, Smith K, Al-Shahib A, Underwood A, Sriskandan S. (2017). Enhanced nasopharyngeal infection and shedding associated with an epidemic lineage of emm 3 group A Streptococcus. *Virulence*, *8*(7), 1390-1400.

14. Albertí S, García-Rey C, Domínguez M, Aguilar L, Cercenado E, Gobernado M. Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. (2003). Survey of emm gene sequences from pharyngeal Streptococcus pyogenes isolates collected in Spain and their relationship with erythromycin susceptibility. *Journal of clinical microbiology*, *41*(6), 2385-2390.

15. Albrich W, Monnet D, Harbarth S. (2004). Antibiotic selection pressure and resistance in Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes. *Emerging infectious diseases*,*10*(3), 514.

16. Al-Saadi K, Naji H, Al-Saadi A, Muhammed Ali A. (2015). Detection and Identification of Streptococcus pyogenes from ENT Patients by Different Methods. *J Pharm Biomed Sci*, 5, 480-86.

17. Andreoni F, Zürcher C, Tarnutzer A, Schilcher K, Neff A, Keller N., Zinkernagel A. (2017). Clindamycin affects group A Streptococcus virulence factors and improves clinical outcome. *The Journal of infectious diseases*, *215*(2), 269-277.

18. Ayer V, Tewodros W, Manoharan A, Skariah S, Luo F, Bessen D. (2007). Tetracycline resistance in group A streptococci: emergence on a global scale and influence on multiple-drug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(5), 1865- 1868.

19. Aziz R, Kansal R, Aronow B, Taylor W, Rowe S, Kubal M, Kotb M. (2010). Microevolution of group A streptococci in vivo: capturing regulatory networks engaged in sociomicrobiology, niche adaptation, and hypervirulence. *PloS one*, 5(4): e9798.

20. Aziz R, Kansal R, Aronow B, Taylor W, Rowe S, Kubal M, Kotb M. (2010). Microevolution of group A streptococci in vivo: capturing regulatory networks engaged in sociomicrobiology, niche adaptation, and hypervirulence. *PloS one*, *5*(4), e9798.

21. Aziz R, Kotb M. (2008). Rise and persistence of global M1T1 clone of Streptococcus pyogenes. Emerging infectious diseases, 14(10), 1511.

22. Bae S, Kim, J, Kwon J, Yoon S, Lim C, Lee K , Lee C. (2007). Phenotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolated in Seoul, Korea. *Journal of medical microbiology*, 56(2): 229-235.

23. Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Imperi M, Facinelli B, Giovanetti E, Orefici G. (2006). Therapeutic failures of antibiotics used to treat macrolide-susceptible *Streptococcus pyogenes* infections may be due to biofilm formation. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8): 2721-2727.

24. Banks D, Porcella S, Barbian K, Martin J, Musser J. (2003). Structure and distribution of an unusual chimeric genetic element encoding macrolide resistance in phylogenetically diverse clones of group A Streptococcus. *The Journal of infectious diseases*, *188*(12), 1898-1908.

25. Barnett T, Cole J, Rivera-Hernandez T, Henningham A, Paton J, Nizet V, Walker M. (2015). Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease. *Cellular microbiology*, 17(12): 1721-1741.

26. Baroux N, D'ortenzio E, Amédéo N, Baker C, Ali Alsuwayyid B, Dupont-Rouzeyrol M, Smeesters P. (2014). The *emm*-cluster typing system for group A

Streptococcus identifies epidemiologic similarities across the Pacific region. *Clinical Infectious Diseases*, *59*(7), e84-e92.

27. Beres S, Carroll R, Shea P, Sitkiewicz I, Martinez-Gutierrez J, Low D,Goldman T. 2010 Molecular complexity of successive bacterial epidemics deconvoluted by comparative pathogenomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(9), 4371-4376.

28. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2009). The Firmicutes, second edition –David R. Boone, et al. (edit.), №3, 655.

29. Berman H, Tartof S, Reis J, Reis M, Riley L. (2014). Distribution of superantigens in group A streptococcal isolates from Salvador, Brazil. *BMC infectious diseases*, *14*(1), 294.

30. Bessen D, Carapetis J, Beall B, Katz R, Hibble M, Currie B,Sriprakash K. (2000). Contrasting molecular epidemiology of group A streptococci causing tropical and nontropical infections of the skin and throat. *The Journal of infectious diseases*, *182*(4): 1109-1116.

31. Betriu C, Culebras E, Rodriguez-Avial I, Gomez M, Sanchez B, Picazo J. (2004). In vitro activities of tigecycline against erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and Streptococcus agalactiae: mechanisms of macrolide and tetracycline resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*(1): 323-325.

32. Bianco S, Allice T, Zucca M, Savoia D. (2006). Survey of phenotypic and genetic features of *Streptococcus pyogenes* strains isolated in Northwest Italy. *Current microbiology*, *52*(1), 33.

33. Bingen E, Bidet P, Mihaila-Amrouche L, Doit C, Forcet S, Brahimi N, Cohen R. (2004). Emergence of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in French children.*Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*(9): 3559-3562.

34. Bingen E, Fitoussi F, Doit C, Cohen R, Tanna A, George R, Deforche D. (2000). Resistance to macrolides in Streptococcus pyogenes in France in pediatric patients.*Antimicrobial agents and chemotherapy*, *44*(6), 1453-1457.

35. Bisno A, Brito M, Collins C. (2003). Molecular basis of group A streptococcal virulence. *The Lancet infectious diseases*, *3*(4), 191-200.

36. Bisno A, Gerber M, Kaplan E, Schwartz R (1997). Diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: a practice guideline. Clinical Infectious Diseases, 25(3), 574-583.

37. Bisno A, Stevens D. (1996). Streptococcal infections of skin and soft tissues. *New England Journal of Medicine*, *334*(4), 240-246.

38. Bisno A.(2001). Acute pharyngitis. *New England Journal of Medicine*, *344*(3), 205-211.

39. Boers S, Van der Reijden W, Jansen R. (2012). High-throughput multilocus sequence typing: bringing molecular typing to the next level. *PloS one*, 7(7), e39630.

40. Borek A, Obszańska K, Hryniewicz W, Sitkiewicz I. (2012). Detection of *Streptococcus pyogenes* virulence factors by multiplex PCR. *Virulence*, *3*(6), 529-533.

41. Borek A, Wilemska J, Izdebski R, Hryniewicz W, Sitkiewicz I. (2011). A New Rapid and Cost-E ective Method for Detection of Phages, ICEs and Virulence Factors Encoded by Streptococcus pyogenes. *Polish Journal of Microbiology*, *60*(3), 187-201.

42. Bozdogan B, Appelbaum P, Kelly L, Hoellman D, Tambic-Andrasevic A, Drukalska L, Konkoly-Thege M. (2003). Activity of telithromycin compared with seven other agents against 1039 *Streptococcus pyogenes* pediatric isolates from ten centers in central and eastern Europe. *Clinical microbiology and infection*, *9*(7), 741-745.

43. Bradley S, Gordon J, Baumgartner D, Marasco W, Kauffman C. (1991). Group C streptococcal bacteremia: analysis of 88 cases. *Reviews of infectious diseases*, *13*(2), 270-280.

44. Brenciani A, Bacciaglia A, Vecchi M, Vitali L, Varaldo P, Giovanetti E. (2007). Genetic elements carrying *erm (B*) in *Streptococcus pyogenes* and association with

tet (M) tetracycline resistance gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*(4), 1209-1216.

45. Brenciani A, Bacciaglia A, Vignaroli C, Pugnaloni A, Varaldo P, Giovanetti E. (2010) Φm46. 1, the main *Streptococcus pyogenes* element carrying mef (A) and tet (O) genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*(1): 221-229.

46. Briko N, Filatov N, Zhuravlev M, Lytkina I, Ezhlova E, Brazhnikov A, Malyshev N. (2003). Epidemiological pattern of scarlet fever in recent years. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, (5), 67-72.

47. Brook I. (2013). "Penicillin failure in the treatment of streptococcal pharyngo-tonsillitis." *Current infectious disease reports* 15.3 232-235.

48. Brook I. (2017) Treatment Challenges of Group A Beta-hemolytic Streptococcal Pharyngo-Tonsillitis. *International archives of otorhinolaryngology*, *21*(03): 286-296.

49. Broudy T, Pancholi V, Fischetti V.(2002). The in vitro interaction of Streptococcus pyogenes with human pharyngeal cells induces a phage-encoded extracellular DNase. *Infection and immunity*, *70*(6), 2805-2811.

50. Brouwer S, Barnett T, Rivera-Hernandez T, Rohde M, Walker M. (2016) Streptococcus pyogenes adhesion and colonization. *FEBS letters*, *590*(21): 3739-3757.

51. Burkert T, Watanakunakorn C. (1991). Group G streptococcus septic arthritis and osteomyelitis: report and literature review. *The Journal of rheumatology*, *18*(6), 904-907.

52. BleyC, Van Der LindenM, ReinertR. (2011). mef (A) is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany. International journal of antimicrobial agents, 37(5), 425-431.

53. Camara M, Dieng A, Boye C. (2013). Antibiotic Susceptibility of *Streptococcus pyogenes* Isolated from Respiratory Tract Infections in Dakar, Senegal. *Microbiology Insights*, 6, 71–75.

54. Carapetis J, Steer A, Mulholland E, Weber M. (2005) The global burden of group A streptococcal diseases.*The Lancet infectious diseases*, *5*(11): 685-694.

54. Carroll, K. C. (2002). Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections: controversy and conundrums. *Journal of clinical microbiology*, *40*(9), 3115-3120.

55. CATTOIR V. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance.

56. Cevallos M. (2008). *Streptococcus pyogenes*: A versatile human pathogen. *Mako: NSU Undergraduate Student Journal*,*2*(1): 2.

57. Chan J, Chu Y, Chu M, Cheung T, Lo J. (2009). Epidemiological analysis of *Streptococcus pyogenes* infections in Hong Kong. *Pathology*, *41*(7), 681-686.

58. Chang H, Shen X, Fu Z, Liu L, Shen Y, Liu X, Yang Y. (2010). Antibiotic resistance and molecular analysis of Streptococcus pyogenes isolated from healthy schoolchildren in China. *Scandinavian journal of infectious diseases*, *42*(2): 84-89.

59. Chaussee M, Liu J, Stevens D, Ferretti J.(1996). Genetic and phenotypic diversity among isolates of *Streptococcus pyogenes* from invasive infections. *Journal of Infectious Diseases*, *173*(4), 901-908.

60. Chiang-Ni C, Wu J. (2008) Effects of streptococcal pyrogenic exotoxin B on pathogenesis of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of the Formosan Medical Association*, *107*(9), 677-685.

61. Chiang-Ni C, Zheng P, Wang S, Tsai P, Chuang W, Lin Y, Wu J. (2016) Epidemiology Analysis of *Streptococcus pyogenes* in a Hospital in Southern Taiwan by Use of the Updated emm Cluster Typing System. *Journal of clinical microbiology*, *54*(1), 157-162.

62. Çiftçi E, Dogru U, Guriz H, Aysev A, İnce E. (2003). Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from throat cultures of children with tonsillopharyngitis. *J Ank Med School*, *25*(1), 15-20.

63. Cole J, Barnett T, Nizet V, Walker M. (2011) Molecular insight into invasive group A streptococcal disease.*Nature reviews Microbiology*, *9*(10), 724-736.

64. Commons R, Rogers S, Gooding T, Danchin M, Carapetis J, Robins-Browne R, Curtis N. (2008). Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with emm types. *Journal of medical microbiology*, *57*(10), 1238-1246.

65. Coyle E, Cha R, Rybak M. (2003) Influences of linezolid, penicillin, and clindamycin, alone and in combination, on streptococcal pyrogenic exotoxin a release. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *47*(5), 1752-1755.

66. Coyle, Elizabeth A., Raymond Cha, and Michael J. Rybak. (2003). "Influences of linezolid, penicillin, and clindamycin, alone and in combination, on streptococcal pyrogenic exotoxin a release." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47(5), 1752-1755.

67. Creti R, Imperi M, Baldassarri L, Pataracchia M, Recchia S, Alfarone G, Orefici G. (2007). emm Types, virulence factors, and antibiotic resistance of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Italy: What has changed in 11 years?.*Journal of clinical microbiology*, *45*(7), 2249-2256.

68. Cunningham M.(2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical microbiology reviews*, 13(3), 470-511.

69. Czarkowski M, Kondej B. (2010). Scarlet fever in Poland in 2008. *Przeglad epidemiologiczny*, *64*(2), 185-188.

70. d'Humières C, Cohen R, Levy C, Bidet P, Thollot F, Wollner A, Bingen E. (2012) Decline in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from French children. *International Journal of Medical Microbiology*, 302(7), 300-303.

71. Dale J, Penfound T, Chiang E, Walton W. (2011). New 30-valent M protein-based vaccine evokes cross-opsonic antibodies against non-vaccine serotypes of group A streptococci. *Vaccine*, 29(46), 8175-8178.

72. De Melo M, Figueiredo A, Ferreira-Carvalho B. (2003). Antimicrobial susceptibility patterns and genomic diversity in strains of *Streptococcus pyogenes* isolated in 1978–1997 in different Brazilian cities. *Journal of medical microbiology*,*52*(3): 251-258.

72. DeMuri G, Wald E.(2014). The group A streptococcal carrier state reviewed: still an enigma. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, *3*(4), 336-342.

73. Del Grosso M, Camilli R, Rizzi E, Pietrelli A, De Bellis G, Pantosti A. (2016) ICESpy009, a conjugative genetic element carrying mef (E) in *Streptococcus pyogenes. Antimicrobial agents and chemotherapy*, *60*(7): 3906-3912.

74. Descheemaeker P, Van Loock F, Hauchecorne M, Vandamme P, Goossens H. (2000). Molecular characterization of group A streptococci from invasive and non-invasive disease episodes in Belgium during 1993–1994. *J. Med.Microbiol*, 49, 467-471.

75. Detcheva A, Facklam R, Beall B.(2002). Erythromycin-resistant group A streptococcal isolates recovered in Sofia, Bulgaria, from 1995 to 2001. *Journal of clinical microbiology*, 40(10), 3831-3834.

76. Detcheva A, Setchanova L, Chankova D. Mechanisms of Macrolide Resistance in *Streptococcus pyogenes*. Double-disk Diffusion Test for Identification of Phenotypes of Erythromycin Resistance – Tenth Congress of the Bulgarian microbiologistits with International Participation, Plovdiv, 9-12 October 2002, Program and Abstracts. MM 28, p.144.

77. Dochez A. (1925) Etiology of Scarlet Fever. *Medicine*, 4(3), 251-274.

78. DrlicaK,MalikM. (2003). Fluoroquinolones: action and resistance. *Current topics in medicinal chemistry*, *3*(3), 249-282.

79. du Toit M, Huch M, Cho G, Franz C. (2014). The genus *Streptococcus*. Lactic Acid Bacteria, 457-505.

80. DundarD, SayanM, TamerG. (2010). Macrolide and tetracycline resistance and emm type distribution of *Streptococcus pyogenes* isolates recovered from Turkish patients. *Microbial Drug Resistance*, *16*(4), 279-284.

81. Efstratiou A. (2000). Group A streptococci in the 1990s. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(suppl_1), 3-12.

82. Efstratiou, A.,Lamagni, T. (2017). Epidemiology of *Streptococcus pyogenes*.

83. Enright M, Spratt B, Kalia A, Cross J, Bessen D. (2001) Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone. *Infection and Immunity*, 69(4): 2416-2427.

84. Eriksson A, Eriksson B, Holm S,Norgren M. (1999). Streptococcal DNase B is immunologically identical to superantigen SpeF but involves separate domains. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, *6*(1), 133-136

85. Eriksson B, Andersson J, Holm S,Norgren M. (1999). Invasive group A streptococcal infections: T1M1 isolates expressing pyrogenic exotoxins A and B in combination with selective lack of toxin-neutralizing antibodies are associated with increased risk of streptococcal toxic shock syndrome. *The Journal of infectious diseases*, *180*(2), 410-418.

86. Facinelli B, Spinaci C, Magi G, Giovanetti E, Varaldo P. (2001). Association between erythromycin resistance and ability to enter human respiratory cells in group A streptococci. *The Lancet*, 358(9275), 30-33.

87. FacklamR. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 613-630.

88. Fehleisen F. (1883). Die Aetiologie des Erysipels. Theodor Fischer.

89. Feil E, Li B, Aanensen D, Hanage W, Spratt B. (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of bacteriology*, 186(5), 1518-1530.

90. Fernie-King B, Seilly D, Willers C, Würzner R, Davies A, Lachmann P.(2001). Streptococcal inhibitor of complement (SIC) inhibits the membrane attack complex by preventing uptake of C567 onto cell membranes. *Immunology*, *103*(3), 390-398.

91. FerrettiJ, McShan W, AjdicD, SavicD, Savic G, LyonK, LaiH. (2001). Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(8), 4658-4663.

92. Ferretti J, StevensD, Fischetti V.(2016). Laboratory Diagnosis of Streptococcus pyogenes (group A streptococci)--*Streptococcus pyogenes*: *Basic Biology to Clinical Manifestations*.

93. Fischetti V. (1989). Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clinical microbiology reviews*, 2(3), 285-314.

94. Friães A, Pinto F, Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J. (2012). Group A streptococci clones associated with invasive infections and pharyngitis in Portugal present differences in emm types, superantigen gene content and antimicrobial resistance. *BMC microbiology*, *12*(1), 280.

95. Friães A, Pinto F, Silva-Costa C, Ramirez M,Melo-Cristino J. (2012). Group A streptococci clones associated with invasive infections and pharyngitis in Portugal present differences in emm types, superantigen gene content and antimicrobial resistance. *BMC Microbiology*, *12*(1), 280.

96. Gajić I, Mijač V, Opavski N, Stanojević M, Lazarević I, ŠmitranA, RaninL. (2014). Distribution of macrolide-resistant genes among isolates of macrolideresistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* in Serbia. *Archives of Biological Sciences*, *66*(1), 93-98.

97. Gergova R, Gueorgieva T, Dencheva-Garova M, Krasteva-Panova A, Kalchinov V, Mitov I, Kamenoff J. (2016). Antimicrobial activity of different disinfection methods against biofilms in root canals. *Journal of investigative and clinical dentistry*, 7(3), 254-262

98. Gergova R, Muhtarova A, Mitov I. (2015). Virulence potential of Bulgarian *Streptococcus pyogenes* clinical isolates. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, *68*(8), 1061-1070.

99. Gergova R, Petrova G, GergovS, Minchev P, Mitov I, Strateva T. (2016). Microbiological Features of Upper Respiratory Tract Infections in Bulgarian Children for the Period 1998–2014. *Balkan medical journal*, *33*(6), 675.

100. Gergova R, Slavova M, Boev V, Mourdjeva M, Yotova L,Georgieva-Nikolova R. (2015). Comparative investigation of the feasibility of bacterial biofilms formation on the surface of the hybrid materialUREASIL. Bulgarian *Chemical Communications*, *47*(2), 706-713.

101. Ghoname N, Amer W, El Farargy M.(2014). *speB* Gene as an Early Specific Genetic Marker for Diagnosis of Group A Beta-Hemolytic Streptococcus (GABHS): Considerable virulence factor. *The Egyptian Journal of Medical Microbiology*,*38*(3106), 1-10.

102. GiovanettiE, Brenciani A, Morroni G, Tiberi E, Pasquaroli S, Mingoia M, Varaldo P.(2015). Transduction of the Streptococcus pyogenes bacteriophage Φm46. 1, carrying resistance genes mef (A) and *tet (O*), to other *Streptococcus* species. *Frontiers in microbiology*, *5*, 746.

103. Golińska E, Van der Linden M, Więcek G, Mikołajczyk D, Machul A, Samet A, Strus M. (2016). Virulence factors of *Streptococcus pyogenes* strains from women in peri-labor with invasive infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *35*(5), 747-754.

104. Goodall E.(1926). The Term "Scarlet Fever.". *British Medical Journal*, 1(3397), 261.

105. Gracia M, DíazC, Coronel P, Gimeno M, García-Rodas R, Rodríguez-Cerrato V, Ponte M. (2009). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pyogenes* in Central, Eastern, and Baltic European Countries, 2005 to 2006: the cefditoren surveillance program. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *64*(1), 52-56.

106. Green N, ZhangS, Porcella S, Nagiec M, Barbian K, Beres S, MusserJ. (2005). Genome sequence of a serotype M28 strain of group A Streptococcus: potential

new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. *The Journal of infectious diseases*, *192*(5), 760-770.

107. Green M, Beall B, Marcon M, AllenC, Bradley J, Dashefsky B, Martin J. (2006). Multicentre surveillance of the prevalence and molecular epidemiology of macrolide resistance among pharyngeal isolates of group A streptococci in the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,*57*(6), 1240-1243.

108. Hadjirin N, Harrison E, Holmes M, Paterson G.(2014). Conjugative transfer frequencies of mef A-containing Tn1207.3 to macrolide- susceptible *Streptococcus pyogenes* belonging to different emm types. Letters in applied microbiology, 58(4), 299-302

109. Hall-Stoodley L, Costerton J, Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 95.

110. HammerumA, Nielsen H, Agerso Y, Ekelund K,Frimodt-Moller N. (2004). Detection of tet (M), tet (O) and tet (S) in tetracycline/minocycline-resistant *Streptococcus pyogenes* bacteraemia isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *53*(1), 118-119.

111. HasegawaT, Minami M, Okamoto A, Tatsuno I, Isaka M,Ohta M. (2010). Characterization of a virulence-associated and cell-wall-located DNase of *Streptococcus pyogenes*.*Microbiology*, *156*(1), 184-190.

112. Hauser A, Stevens D, Kaplan E, Schlievert P. (1991). Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from *Streptococcus pyogenes* isolates associated with toxic shock-like syndrome. *Journal of clinical microbiology*, *29*(8), 1562-1567.

113. Hollm-Delgado M, Allard R,PilonP. (2005). Invasive Group A Streptococcal Infections, Clinical Manifestations and Their Predictors, Montreal, 1995–2002. *Emerging infectious diseases*, *11*(1), 77.

114. HytoÈnen J, HaatajaS, Gerlach D, Podbielski A,Finne J. (2001). The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface

molecule with strepadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. *Molecular microbiology, 39(2), 512-519.*

115. Ikebe T, Hirasawa K, Suzuki R, Ohya H, Isobe J, TanakaD, Endoh M. (2007). Distribution of emm genotypes among group A streptococcus isolates from patients with severe invasive streptococcal infections in Japan, 2001–2005.*Epidemiology & Infection*, *135*(7), 1227-1229.

116. ImöhlM, Reinert R, Ocklenburg C, Van Der Linden M. (2010). Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Germany during 2003–2007. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *58*(3), 389-396.

117. Imöhl M, van der Linden M. (2015). Antimicrobial Susceptibility of Invasive *Streptococcus pyogenes* Isolates in Germany during 2003-2013. *PloS One*, 10(9), e0137313.

118. Jasir A, Tanna A, Noorani A, Mirsalehian A, Efstratiou A, Schalen C. (2000). High rate of tetracycline resistance in*Streptococcus pyogenes* in Iran: an epidemiological study.*Journal of clinical microbiology*, *38*(6), 2103-2107.

119. Johansson L, Thulin P, Low D, Norrby-Teglund A. (2010). Getting under the skin: the immunopathogenesis of *Streptococcus pyogenes* deep tissue infections. *Clinical Infectious Diseases*, *51*(1), 58-65.

120. Johnson D, Wotton J, Shet A, Kaplan E. (2002). A comparison of group A streptococci from invasive and uncomplicated infections: are virulent clones responsible for serious streptococcal infections?. *Journal of Infectious Diseases*, *185*(11), 1586-1595.

121. Kanoh S, Rubin B. (2010). Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immune-modulatory medications. *Clinical microbiology reviews*, *23*(3), 590-615.

122. Kaplan E. (1996). Recent epidemiology of group A streptococcal infections in North America and abroad: an overview. *Pediatrics*, *97*(6), 945-948.

123. Kaplan, E. L. (1997). Recent evaluation of antimicrobial resistance in β-hemolytic streptococci. *Clinical infectious diseases*, *24* (Supplement_1), S89-S92.

124. KasperK, Zeppa J, Wakabayashi A, XuS, Mazzuca D, Welch I, HaeryfarS.(2014). Bacterial superantigens promote acute nasopharyngeal infection by *Streptococcus pyogenes* in a human MHC class II-dependent manner. *PLoS Pathogens*, 10(5), e1004155.

125. Kawamura Y, Fujiwara H, Mishima N, Tanaka Y, Tanimoto A, Ikawa S, Ezaki T. (2003). First *Streptococcus agalactiae* isolates highly resistant to quinolones, with point mutations in gyrA and parC. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *47*(11), 3605-3609.

126. Kim S, Lee N. (2005). Asymptomatic infection by *Streptococcus pyogenes* in schoolchildren and diagnostic usefulness of antideoxyribonuclease B. *Journal of Korean medical science*, *20*(6), 938-940.

127. Kirvan C, Swedo S, Heuser J, Cunningham MW. (2003). Mimicry and autoantibody-mediated neuronal cell signaling in Sydenham chorea. *Nature Medicine.* 9:914–920.

128. Kittang B, Bruun T, Langeland N, Mylvaganam H, Glambek M, Skrede S. (2011). Invasive group A, C and G streptococcal disease in western Norway: virulence gene profiles, clinical features and outcomes. *Clinical Microbiology and Infection*, *17*(3), 358-364.

129. Köhler W. (2007). The present state of species within the genera Streptococcus and Enterococcus. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 297(3), 133.

130. KoutouziF, Tsakris A, Chatzichristou P, Koutouzis E, Daikos G, KirikouE, Michos A. (2015). *Streptococcus pyogenes* emm types and clusters during a 7-year period (2007 to 2013) in pharyngeal and nonpharyngeal pediatric isolates. *Journal of clinical microbiology*, *53*(7).

131. Lamagni T, Darenberg J, Luca-Harari B, Siljander T, EfstratiouA, Henriques-Normark B,Koliou M. (2008). Epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *Journal of clinical microbiology*, *46*(7), 2359-2367.

132. Lamagni T, Efstratiou A, Vuopio-Varkila J, Jasir A, Schalen C. (2005). The epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* associated disease in Europe. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles. European communicable disease bulletin*, *10*(9), 9-10.

133. Leclercq R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases*, *34*(4), 482-492.

134. Lee G, Wessels, M. (2006). Changing epidemiology of acute rheumatic fever in the United States.

135. Lei B, DeLeo, F, Hoe N, Graham M, Mackie S, Cole R,ScottJ. (2001). Evasion of human innate and acquired immunity by a bacterial homolog of CD11b that inhibits opsonophagocytosis. *Nature medicine*, *7*(12), 1298

136. Lembke C, Podbielski A, Hidalgo-Grass C, Jonas L, Hanski E, Kreikemeyer B. (2006). Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Applied and environmental microbiology*, *72*(4), 2864-2875.

137. Lin J, Chang L, Lai C, Huang Y, Chen W, Yang C, Chen Y. (2015). High prevalence of fluoroquinolone-nonsusceptible *Streptococcus pyogenes* emm12 in Taiwan. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *83*(2), 187-192.

138. LintgesM, van der Linden M, Hilgers R, Arlt S, Al-Lahham A, Reinert R, Rink L. (2010). Superantigen genes are more important than the emm type for the invasiveness of group A Streptococcus infection. *The Journal of infectious diseases*, *202*(1), 20-28.

139. Lipsky B, Berendt A, Cornia P, Pile J, Peters E, Armstrong D, Pinzur M. S. (2012). Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the

diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clinical infectious diseases*, *54*(12), e132-e173

140. Littauer P, Caugant D, Sangvik M, Høiby E, Sundsfjord A, Simonsen G. Norwegian Macrolide Study Group. (2006). Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Norway: population structure and resistance determinants.

141. Luca-Harari B, Darenberg J, Neal S, Siljander T, Strakova L, Tanna A, van der LindenM. (2009). Clinical and microbiological characteristics of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *Journal of clinical microbiology*,*47*(4), 1155-1165.

142. Luca-Harari B, Straut M, Cretoiu S, Surdeanu M, Ungureanu V, van der Linden M,Jasir A. (2008). Molecular characterization of invasive and non-invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Romania. *Journal of medical microbiology*, 57(11), 1354-1363

143. Lynskey N, Lawrenson R, Sriskandan S. (2011). New understandings in *Streptococcus pyogenes*. *Current opinion in infectious diseases*, *24*(3), 196-202.

144. Mahon C, Lehman D, Mansuelis G. (2007).Textbook of Diagnostic microbiology, Third edition, 382-409.

145. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Chapelle S, Mallentjer C, Weyler J, Goossens H. (2005). Clonal spread of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes*.*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *55*(3), 320-325.

146. Malhotra-Kumar S, Wang S, Lammens C, Chapelle S, Goossens H. (2003). Bacitracin-resistant clone of *Streptococcus pyogenes* isolated from pharyngitis patients in Belgium. *Journal of clinical microbiology*, *41*(11), 5282-5284.

147. Malhotra-KumarS, LammensC, Piessens J,Goossens H. (2005). Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci.*Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*(11), 4798-4800.

148. Markowitz M, GerberM, Kaplan E. (1993). Treatment of streptococcal pharyngotonsillitis: reports of penicillin's demise are premature. *The Journal of pediatrics*, *123*(5), 679-685.

149. MarosevicD, Kaevska M, Jaglic Z. (2017). Resistance to the tetracyclines and macrolide-lincosamide-streptogramin group of antibiotics and its genetic linkage–a review. *Ann Agric Environ Med*, *24*(2), 338-344.

150. Martin J, Green M, Barbadora K, Wald E. (2004). Group A streptococci among school-aged children: clinical characteristics and the carrier state. *Pediatrics*, *114*(5), 1212-1219.

151. Martin J. (2016)."The *Streptococcus pyogenes* carrier state."

152. MathurP, BhardwajN, Mathur K, BeheraB, Gupta G, Kapil A, MisraM. (2014). Clinical and molecular epidemiology of beta-hemolytic streptococcal infections in India.*The Journal of Infection in Developing Countries*, *8*(03), 297-303.

153. MatsumotoM, SakaeK, Hashikawa S, Torii K, Hasegawa T, Horii T, Suzuki R. (2005). Close correlation of streptococcal DNase B (sdaB) alleles with emm genotypes in *Streptococcus pyogenes*. *Microbiology and immunology*, *49*(10), 925-929.

154. McCormick J, Pragman A, Stolpa J, Leung D, Schlievert P.(2001). Functional characterization of streptococcal pyrogenic exotoxin J, a novel superantigen. *Infection and immunity*, 69(3), 1381-1388.

155. McGregorK, Bilek N, Bennett A, Kalia A, Beall B, Carapetis J, Bessen D. (2004). Group A streptococci from a remote community have novel multilocus genotypes but share emm types and housekeeping alleles with isolates from worldwide sources. *The Journal of infectious diseases*, 717-723.

156. McMillanD, Drèze P, Vu T, Bessen D, Guglielmini J, Steer A, Smeesters P. (2013). Updated model of group A Streptococcus M proteins based on a comprehensive worldwide study. *Clinical Microbiology and Infection*, *19*(5), E222-E229.

157. Meisal R, Andreasson I, HøibyE, Aaberge I, Michaelsen T, Caugant D. (2010). *Streptococcus pyogenes* isolates causing severe infections in Norway in 2006 to 2007: emm types, multilocus sequence types, and superantigen profiles. *Journal of clinical microbiology*, *48*(3), 842-851.

158. Metzgar D, McDonough E, Hansen C, Blaesing C, Baynes D, Hawksworth A, Russell K.(2010). Local changes in rates of groupA Streptococcus disease and antibiotic resistance are associated with geographically widespread strain turnover events. *Virulence*, *1*(4), 247-253.

159. Metzgar D, Zampolli A. (2011). The M protein of group A Streptococcus is a key virulence factor and a clinically relevant strain identification marker. *Virulence*, *2*(5), 402-412.

160. MichosA, Koutouzi F, Tsakris A, Chatzichristou P, Koutouzis E, DaikosG, Syriopoulou V. (2016). Molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* macrolide resistance of paediatric isolates during a 7 year period (2007–13). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71*(8), 2113-2117.

161. Mihaila-Amrouche L, Bouvet A, Loubinoux J. (2004). Clonal spread of emm type 28 isolates of *Streptococcus pyogenes* that are multiresistant to antibiotics. *Journal of clinical microbiology*,*42*(8), 3844-3846.

162. MisiakosE, BagiasG, Patapis P, Sotiropoulos D, Kanavidis P, Machairas A. (2014). Current concepts in the management of necrotizing fasciitis. *Frontiers in surgery*, *1*, 36.

163. Mitchell T. (2003). The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nature reviews*. Microbiology, 1(3), 219.

164. MolaeeN, Abtahi H,Mosayebi G. (2013). Expression of recombinant streptokinase from Streptococcus pyogenes and its reaction with infected human and murine sera. *Iranian journal of basic medical sciences*, *16*(9), 985.

165. Montes M, Ardanuy C, Tamayo E, Domènech A, Liñares J,Pérez-Trallero E. (2011). Epidemiological and molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* isolates causing invasive disease in Spain (1998–2009): comparison with non-invasive isolates. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30(10), 1295.

166. MorefieldG, TouheyG, Lu F, Dunham A,HogenEsch H. (2014). Development of a recombinant fusion protein vaccine formulation to protect against Streptococcus pyogenes. *Vaccine*,*32*(30), 3810-3815.

167. Musser J, Hauser A, KimM, Schlievert P, Nelson K, Selander R. (1991). *Streptococcus pyogenes* causing toxic-shock-like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(7), 2668-2672.

168. MusserJ, Shelburne S. (2009). A decade of molecular pathogenomic analysis of group A Streptococcus. *The Journal of clinical investigation*, *119*(9), 2455-2463.

169. Nagai K, Appelbaum P, Davies T, Kelly L, Hoellman D, Andrasevic A. MiciulevicieneJ. (2002). Susceptibility to telithromycin in 1,011 *Streptococcus pyogenes* isolates from 10 central and Eastern European countries. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *46*(2), 546-549.

170. Nakae M, Murai T, Kaneko Y,Mitsuhashi S. (1977). Drug resistance in *Streptococcus pyogenes* isolated in Japan (1974–1975). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *12*(3), 427-428.

171. NeemanR, KellerN, Barzilai A, Korenman Z, Sela S. (1998). Prevalence of internalisation-associated gene, prtF1, among persisting group-A streptococcus strains isolated from asymptomatic carriers. *The Lancet*, *352*(9145), 1974-1977.

172. Nelson D, Garbe J, Collin M. (2011). Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes*–a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins.*Biological chemistry*, *392*(12), 1077-1088.

173. Nir-Paz R, Block C, Shasha D, Korenman Z, Gorodnitzky Z, Jaffe J, Moses A. (2006). Macrolide, lincosamide and tetracycline susceptibility and emm characterisation of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates in Israel. *International journal of antimicrobial agents*, *28*(4), 313-319.

174. NomizuM, Pietrzynski G, Kato T, LachanceP, Menard R, Ziomek E. (2001). Substrate specificity of the streptococcal cysteine protease. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 44551-44556.

175. O'GradyK, Kelpie L, Andrews R, Curtis N, Nolan T, Selvaraj G, Carapetis J. (2007). The epidemiology of invasive group A streptococcal disease in Victoria, Australia. *Medical journal of Australia*, *186*(11), 565-569.

176. Oliver J, Wadu E, Pierse N, Moreland N, Williamson D, Baker M.(2018). Group A Streptococcus pharyngitis and pharyngeal carriage: A meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, *12*(3), e0006335.

177. Olivieri R, Morandi M, Zanchi A, Tordini G, Pozzi G, De Luca A, MontagnaniF. (2015). Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* over 14 years in an area of central Italy. *Journal of medical microbiology*, *64*(10), 1186-1195.

178. O'loughlinR, Roberson A, Cieslak P, Lynfield R, Gershman K, CraigA, BeallB. (2007). The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000–2004. *Clinical Infectious Diseases*, *45*(7), 853-862.

179. Opavski N, Gajic I, Borek A, Obszańska K, Stanojevic M, Lazarevic I, Mijac V. (2015). Molecular characterization of macrolide resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from pharyngitis patients in Serbia. *Infection, Genetics and Evolution*, *33*, 246-252.

180. O'Seaghdha M, Wessels M. (2013). Streptolysin O and its co-toxin NAD-glycohydrolase protect group A Streptococcus from Xenophagic killing. *PLoS Pathogens*, 9(6), e1003394.

181. Palmieri C, Vecchi M, Littauer P, Sundsfjord A, Varaldo P, Facinelli B. (2006). Clonal spread of macrolide-and tetracycline-resistant [erm (A) tet (O)] emm77 Streptococcus pyogenes isolates in Italy and Norway. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *50*(12), 4229-4230.

182. Parsons P, Wiener-Kronish J, Stapleton R, Berra L (Eds.). (2018). *Critical Care Secrets E-Book*. Elsevier Health Sciences.

183. Passali D, Lauriello M, Passali G, Passali F, Bellussi L. (2007). Group A streptococcus and its antibiotic resistance. *Acta otorhinolaryngologica Italica*, *27*(1), 27.

184. Patterson M. J. (1996). *Streptococcus.*

185. Paveenkittiporn W, Nozawa T, Dejsirilert S, Nakagawa I, Hamada S. (2016). Prevalent emm types and superantigen gene patterns of group A Streptococcus in Thailand. *Epidemiology & Infection*, *144*(4), 864-869.

186. Perez-Trallero E, Garcia C, Orden B, Marimon J, Montes M. (2004). Dissemination of emm28 erythromycin-, clindamycin-and bacitracin-resistant Streptococcus pyogenes in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *23*(2), 123-126.

187. Pesola A, Sihvonen R, Lindholm L, Patari-Sampo A. (2015). Clindamycin resistant emm33 *Streptococcus pyogenes* emerged among invasive infections in Helsinki metropolitan area, Finland, 2012 to 2013. *Eurosurveillance.*

188. PichicheroM, Casey J. (2007). Systematic review of factors contributing to penicillin treatment failure in *Streptococcus pyogenes* pharyngitis. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 137(6), 851-857.

189. PiresR, Rolo D, Gama-Norton L, Morais A, Lito L, Salgado M, Santos-SanchesI. (2005). Group A streptococci from carriage and disease in Portugal: evolution of antimicrobial resistance and T antigenic types during 2000–2002.*Microbial Drug Resistance*, *11*(4), 360-370.

190. Podbielski A, ZargesI, Flosdorff A, Weber-Heynemann J. (1996). Molecular characterization of a major serotype M49 group A streptococcal DNase gene (sdaD). *Infection and immunity*, *64*(12), 5349-5356.

191. ProftT, Fraser J. (2003). Bacterial superantigens. *Clinical & Experimental Immunology*, *133*(3), 299-306.

192. Proft T,Fraser J. (2016). Streptococcal Superantigens: Biological properties and potential role in disease.

193. Proft T, Webb P, Handley V, Fraser J. (2003). Two novel superantigens found in both group A and group C Streptococcus. *Infection and immunity*, 71(3), 1361-1369.

194. PumarolaF, Mares J, Losada I, Minguella I, Moraga F, Tarrago D, Cenoz S. (2013). Microbiology of bacteria causing recurrent acute otitis media (AOM) and AOM treatment failure in young children in Spain: shifting pathogens in the post-pneumococcal conjugate vaccination era. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, *77*(8), 1231-1236.

195. Quinn R. (1982). Epidemiology of group A streptococcal infections--their changing frequency and severity. *The Yale journal of biology and medicine*, *55*(3-4), 265.

196. Quinn, R. W. (1982). Streptococcal infections. In *Bacterial Infections of Humans* (pp. 525-552). Springer, Boston, MA.

197. Rajan S. (2012). Skin and soft-tissue infections: classifying and treating a spectrum. *Cleveland Clinic journal of medicine*, *79*(1), 57.

198. RantalaS, Vähäkuopus S, SiljanderT, Vuopio J, HuhtalaH, Vuento R,Syrjänen J. (2012). *Streptococcus pyogenes* bacteraemia, emm types and superantigen profiles. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(5), 859-865.

199. Reinert R, Lütticken R, Al-Lahham A. (2004). High-level flourquinolone resistance in a clinical Streptococcus pyogenes isolate in Germany. *Clinical microbiology and infection*, *10*(7), 659-662.

200. ReinertR, Lütticken R, Bryskier A, Al-Lahham A. (2003). Macrolide-resistant Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes in the pediatric population in Germany during 2000-2001. *Antimicrobial agents and chemotherapy*,*47*(2), 489-493.

201. RichterS, Diekema D, Heilmann K, Almer L, Shortridge V, ZeitlerR, Doern G. (2003). Fluoroquinolone resistance in Streptococcus pyogenes. *Clinical infectious diseases*, 36(3), 380-383.

202. RichterS, Heilmann K, Dohrn C, Beekmann S, Riahi F, Garcia-de-Lomas J, Doern G.(2008). Increasing telithromycin resistance among *Streptococcus pyogenes* in Europe. *Journal of antimicrobial chemotherapy*,*61*(3), 603-611.

203. Rivera A, Rebollo M, Miro E, Mateo M, Navarro F, Gurguí M, Coll P. (2006). Superantigen gene profile, emm type and antibiotic resistance genes among group A streptococcal isolates from Barcelona, Spain. *Journal of medical microbiology*, *55*(8), 1115-1123.

204. Rivera-Hernandez T, Pandey M, Henningham A, Cole J, Choudhury B, Cork A, Good M. (2016). Differing efficacies of lead group A Streptococcal vaccine candidates and full-length m protein in cutaneous and invasive disease models. *MBio*, *7*(3), e00618-16.

205. Roberts A, Connolly K, Kirse D, Evans A, Poehling K, Peters T, Reid S. (2012). Detection of group A Streptococcus in tonsils from pediatric patients reveals high rate of asymptomatic streptococcal carriage. *BMC pediatrics*, *12*(1), 3.

206. Rodriguez-Iturbe B,Haas M. (2016). Post-streptococcal glomerulonephritis.

207. Rodriguez-Iturbe B, Musser J.(2008). The current state of poststreptococcal glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, *19*(10), 1855-1864.

208. Rosenbach A.(1884). *Mikro-organismen bei den Wund-infections-krankheiten des Menschen*. JF Bergmann.

209. Rubio-López V, Valdezate S, Álvarez D, Villalón P, MedinaM, Salcedo C,Sáez-Nieto, J.(2012). Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994–2006).*BMC microbiology*, *12*(1), 215.

210. Sakai T, Taniyama D, Takahashi S, Nakamura M, Takahashi T. (2017). Pleural empyema and streptococcal toxic shock syndrome due to Streptococcus pyogenes in a healthy Spanish traveler in Japan. *IDCases*, *9*, 85-88.

211. Salata R, Lerner P, Shlaes D, GopalakrishnaK, Wolinsky E. (1989). Infections due to Lancefield group C streptococci. *Medicine*, *68*(4), 225-239.

212. Sanderson-SmithM, De Oliveira D, Guglielmini J, McMillanD, Vu T, HolienJ, Curtis N. (2014). A systematic and functional classification of Streptococcus *pyogenes* that serves as a new tool for molecular typing and vaccine development. *The Journal of infectious diseases*, *210*(8), 1325-1338.

213. SawaiJ, Hasegawa T, Kamimura T, Okamoto A, Ohmori D, Nosaka N, Ohta M. (2007). Growth phase-dependent effect of clindamycin on production of exoproteins by *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*(2), 461-467.

214. Schaar V, Uddbäck I, Nordström T, Riesbeck K. (2013). Group A streptococci are protected from amoxicillin-mediated killing by vesicles containing β-lactamase derived from Haemophilus influenzae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,*69*(1), 117-120.

215. Schrager H, Rheinwald J,Wessels M. (1996). Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection. *The Journal of clinical investigation*, *98*(9), 1954-1958.

216. Schwartz B, Facklam R, Breiman R. (1990). Changing epidemiology of group A streptococcal infection in the USA. *The Lancet*, *336*(8724), 1167-1171.

217. Segal N, Givon-Lavi N, Leibovitz E, Yagupsky P, Leiberman A, Dagan R. Acute otitis media caused by *Streptococcus pyogenes* in children, *Clinical infectious diseases,* 2005, 41 (1): 35-41.

218. SeppäläH, Nissinen A, Järvinen H, Huovinen S, Henriksson T, Herva E, Kontiainen S. (1992). Resistance to erythromycin in group A streptococci. *New England Journal of Medicine*, *326*(5), 292-297.

219. Setchanova L, Alexandrova A, Mitov I, Nashev D, Kantardjiev T, Group for Microbiological Surveillance of Pneumococci. (2012). Serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Bulgaria before the introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Journal of Chemotherapy*, *24*(1), 12-17.

220. Setchanova L, Kostyanev T, Alexandrova A, Mitov I, Nashev D, Kantardjiev T. (2013). Microbiological characterization of *Streptococcus pneumoniae* and non-typeable *Haemophilus influenzae* isolates as primary causes of acute otitis media in Bulgarian children before the introduction of conjugate vaccines. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, *12*(1), 6.

221. Setchanova L, Kostyanev T, Markovska R, Miloshev G, Mitov I. (2013). Serotypes, antimicrobial susceptibility, and beta-lactam resistance mechanisms of clinical *Haemophilus influenzae* isolates from Bulgaria in a pre-vaccination period.*Scandinavian journal of infectious diseases*, *45*(2), 81-87.

222. Shaikh N, Leonard E, Martin J. (2010). Prevalence of streptococcal pharyngitis and streptococcal carriage in children: a meta-analysis. *Pediatrics*, peds-2009.

223. Shet A, Kaplan E. (2002). Clinical use and interpretation of group A streptococcal antibody tests: a practical approach for the pediatrician or primary care physician. *The Pediatric infectious disease journal*, *21*(5), 420-426.

224. Shulman S, Bisno A, Clegg H, Gerber M, Kaplan E, Lee G, Van Beneden C. (2012). Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A

streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*,*55*(10), e86-e102.

225. Shulman S, Stollerman G, Beall B, Dale J, Tanz R. (2006). Temporal changes in streptococcal M protein types and the near-disappearance of acute rheumatic fever in the United States. *Clinical infectious diseases*, *42*(4), 441-447.

226. Shulman S., Tanz R, Dale J, Steer A, Smeesters P.(2014). Added value of the emm-cluster typing system to analyze group A Streptococcus epidemiology in high-income settings. *Clinical infectious diseases*, *59*(11), 1651-1652.

227. Siljander T, Lyytikäinen O, Vähäkuopus S, Snellman M, Jalava J, Vuopio J. (2010). Epidemiology, outcome and emm types of invasive group A streptococcal infections in Finland.*European journal of clinical microbiology & infectious diseases*,*29*(10), 1229-1235.

228. Silva-Costa C, Carriço J, RamirezM, Melo-Cristino J. (2014). Scarlet fever is caused by a limited number of Streptococcus pyogenes lineages and is associated with the exotoxin genes ssa, speA and speC. *The Pediatric infectious disease journal*, *33*(3), 306-310.

229. Silva-CostaC, Friães A, Ramirez M, Melo-Cristino J. (2015). Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*: prevalence and treatment strategies. *Expert review of anti-infective therapy*,*13*(5), 615-628.

230. Sitkiewicz I, Hryniewicz W.(2010). Pyogenic streptococci--danger of re-emerging pathogens.*Pol J Microbiol*, *59*(4), 219-26.

231. Slinger R, GoldfarbD, Rajakumar D, MoldovanI, Barrowman N, TamR, Chan F. (2011). Rapid PCR detection of group A streptococcus from flocked throat swabs: a retrospective clinical study. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, *10*(1), 33.

232. Smeesters P, LahoD, Beall B, Steer A,Van BenedenC. (2017). Seasonal, geographic, and temporal trends of emm clusters associated with invasive group A

streptococcal infections in US multistate surveillance. *Clinical Infectious Diseases*, *64*(5), 694-695.

233. Smoot J, Korgenski E, Daly J, VeasyL, Musser J. (2002). Molecular analysis of group A Streptococcus type emm18 isolates temporally associated with acute rheumatic fever outbreaks in Salt Lake City, Utah. *Journal of clinical microbiology*, *40*(5), 1805-1810.

234. Smoot L, McCormickJ, Smoot J, Hoe N, Strickland I, Cole R, Hill H. (2002). Characterization of two novel pyrogenic toxin superantigens made by an acute rheumatic fever clone of *Streptococcus pyogenes* associated with multiple disease outbreaks. *Infection and immunity*, *70*(12), 7095-7104.

235. SowerbyL, Hussain Z, Husein M. (2013). The epidemiology, antibiotic resistance and post-discharge course of peritonsillar abscesses in London, Ontario. *Journal of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, *42*(1), 5.

236. Soyletir G, AltinkanatG, Gur D, Altun B, Tunger A, Aydemir S, Gorur H. (2016). Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2011–13 in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71*(suppl_1), i71-i83.

237. Sriskandan S, Unnikrishnan M, Krausz T,Cohen, J. (1999). Molecular analysis of the role of streptococcal pyrogenec exotoxin A(SPEA) in invasive soft-tissue infection resulting from *Streptococcus pyogenes. Molecular microbiology*, 33(4), 778-790

238. Stathi A, PapaparaskevasJ, Zachariadou L, Pangalis A, LegakisN, Tseleni-Kotsovili A, Tassios P. (2008). Prevalence of emm types 1 and 12 from invasive Streptococcus pyogenes disease in Greece—results of enhanced surveillance.*Clinical Microbiology and Infection*, *14*(8), 808-812.

239. Steer A, Carapetis J, Dale J, Fraser J, Good M, Guilherme L, Smeesters P. (2016). Status of research and development of vaccines for *Streptococcus pyogenes*. *Vaccine*, 34(26), 2953-2958.

240. Steer A, LawI, Matatolu L, Beall B, Carapetis J.(2009). Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *The Lancet infectious diseases*, *9*(10), 611-616.

241. Stevens D, Bisno A, Chambers, Everett E, Dellinger P, Goldstein E, Wade J. (2005). Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *Clinical Infectious Diseases*, *41*(10), 1373-1406.

242. Stevens D, Bryant A. (2016). Impetigo, erysipelas and cellulitis.

243. Stevens D, TannerM, Winship J, Swarts R, Ries K, SchlievertP, Kaplan E. (1989). Severe group A streptococcal infections associated with a toxic shock-like syndrome and scarlet fever toxin A. *New England journal of medicine*, *321*(1), 1-7.

244. StevensD. (2000). Streptococcal toxic shock syndrome associated with necrotizing fasciitis. *Annual review of medicine*, 51(1), 271-288

245. Stevens D.(1995). Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerging infectious diseases*, 1(3), 69.

246. *Streptococcus:* Cell Death and Inflammation PLOS Pathogens 2014;10: e1004266. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004266.

247. Sumby P, Barbian K, Gardner D, Whitney A, Welty D, Long R, DeLeo F. (2005). Extracellular deoxyribonuclease made by group A Streptococcus assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(5), 1679-1684.

248. Sumby P, Barbian K, Gardner D, Whitney A, Welty D, LongR,DeLeo F. (2005). Extracellular deoxyribonuclease made by group A Streptococcus assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(5), 1679-1684.

249. Syrogiannopoulos G, Grivea I, Tait-Kamradt A, Katopodis G, BeratisG, Sutcliffe J, Davies T. (2001). Identification of an erm (A) Erythromycin Resistance

Methylase Gene in *Streptococcus pneumoniae*Isolated in Greece. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *45*(1), 342-344.

250. Szczypa K, Sadowy E, Izdebski R,Hryniewicz W. (2004). A rapid increase in macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* isolated in Poland during 1996–2002.*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *54*(4), 828-831.

251. Szczypa K, SadowyE, Izdebski R, Strakova L, Hryniewicz W. (2006). Group A streptococci from invasive-disease episodes in Poland are remarkably divergent at the molecular level. *Journal of clinical microbiology*, *44*(11), 3975-3979.

252. Takahashi T, Arai K, Lee D, Koh E, Yoshida H, Yano H, Kim S. (2016). Epidemiological study of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* from Korea and Japan by emm genotyping and multilocus sequence typing.*Annals of laboratory medicine*, *36*(1), 9-14.

253. Tamayo E, Montes M, García-Medina G, García-Arenzana J,Pérez-Trallero E. (2010). Spread of a highly mucoid *Streptococcus pyogenes* emm 3/ST15 clone. *BMC infectious diseases*, *10*(1), 233.

254. Terao Y. (2012). The virulence factors and pathogenic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Oral Biosciences*, *54*(2), 96-100.

255. Thipperudraswamy T, Halesh L, Vijetha S, Premalatha D. (2017). Antibiotic resistance pattern of *Streptococcus pyogenes* isolated from clinical samples with special reference to quinolone resistance. *Indian Journal of Microbiology Research*, 4(1), 104-109.

256. Timmer A, TimmerJ, Pence M, Hsu L, Ghochani M, Frey T, Nizet V. (2008). Streptolysin O promotes group A Streptococcus immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*.

257. Tsatsaronis J, Walker M,Sanderson-Smith M. (2014). Host responses to group a streptococcus: cell death and inflammation. *PLoS pathogens*, *10*(8), e1004266.

258. Tse H, Bao J, Davies M, Maamary P, Tsoi H, Tong A, Chen J. (2012). Molecular characterization of the 2011 Hong Kong scarlet fever outbreak. *The Journal of infectious diseases*, 206(3), 341-351.

259. Turner C, Kurupati P, Wiles S, Edwards R, Sriskandan S. (2009). Impact of immunization against SpyCEP during invasive disease with two streptococcal species: *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equi. Vaccine,* 27(36), 4923-4929.

260. TurnerC, Pyzio M, Song B, Lamagni T, Meltzer M, ChowJ, Sriskandan S. (2016). Scarlet fever upsurge in England and molecular-genetic analysis in North-West London, 2014. *Emerging infectious diseases*, 22(6), 1075.

261. TylerS, Johnson W, Huang J, Ashton F, Wang G, Low D, Rozee K. (1992). Streptococcal erythrogenic toxin genes: detection by polymerase chain reaction and association with disease in strains isolated in Canada from 1940 to 1991. *Journal of clinical microbiology*,*30*(12), 3127-3131.

262. Uchiyama S, Andreoni F, Zürcher C, Schilcher K, Ender M, Madon J, Zinkernagel A. (2013). Coiled-coil irregularities of the M1 protein structure promote M1–fibrinogen interaction and influence group A Streptococcus host cell interactions and virulence. *Journal of Molecular Medicine*, 91(7), 861-869.

263. Upton A, Lowe C, Stewart J, Taylor S, Lennon D. (2014). In vitro comparison of four rapid antigen tests for group A streptococcus detection NZMJ, *Journal of the New Zealand Medical Association*, 127:1398.

264. Usha H. (2010). Biofilm in endodontics: New understanding to an old problem. International Journal of Contemporary Dentistry, 1(3).

265. VenturiniC, Cheryl-lynn Y, Gillen C, Ben-Zakour N, MaamaryP, Nizet V, WalkerM. (2013). Acquisition of the Sda1-encoding bacteriophage does not enhance virulence of the M1 *Streptococcus pyogenes* strain SF370. *Infection and immunity*, IAI-00192.

266. Villaseñor-Sierra A, Katahira E, Jaramillo-Valdivia A, de los Angeles Barajas-GarcíaM, BryantA, Morfín-Otero R, StevensD. (2012). Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains isolated from invasive and non-invasive infections from Mexico and the USA during 1999–2010. *International journal of infectious diseases*, *16*(3), e178-e181.

267. Vlaminckx B, Mascini E, Schellekens J, Schouls L, Paauw A, Fluit A, Schmitz F. (2003). Site-specific manifestations of invasive group A streptococcal disease: type distribution and corresponding patterns of virulence determinants. *Journal of clinical microbiology*, *41*(11), 4941-4949.

268. von Pawel-Rammingen U, Johansson B, Bjorck L. (2002). IdeS, a novel streptococcal cysteine proreinase with unique specificity for immunoglobulin G. The *EMBO journal*, 21(7), 1607-1615.

269. von Pawel-Rammingen, Björck L. (2003). IdeS and SpeB: immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Streptococcus pyogenes*. *Current opinion in microbiology*, *6*(1), 50-55

270. Voyich J, Musser J, DeLeo F. (2004). *Streptococcus pyogenes* and human neutrophils: a paradigm for evasion of innate host defense by bacterial pathogens. *Microbes and infection*, *6*(12), 1117-1123.

271. Wahl R, Lütticken R, Stanzel S, Van Der Linden M,Reinert R. (2007). Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Germany, 1996–2002: results from a voluntary laboratory surveillance system. *Clinical Microbiology and Infection*, *13*(12), 1173-1178.

272. Wajima T, Morozumi M, Chiba N, Shouji M, Iwata S, SakataH, UbukataK. (2013). Associations of macrolide and fluoroquinolone resistance with molecular typing in *Streptococcus pyogenes* from invasive infections, 2010–2012. *International journal of antimicrobial agents*, 42(5), 447-449.

273. Walker M, Barnett T, McArthur J, Cole J, Gillen C, Henningham A, Nizet V. (2014). Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A Streptococcus. *Clinical microbiology reviews*, 27(2), 264-301.

274. Weist K, Högberg L. (2014). ECDC publishes 2013 surveillance data on antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in Europe. *Eurosurveillance*, *19*(46), 20962.

275. Weist K, Muller A., Monnet D, Heuer D. (2012) ECDC Surveillance report Surveillance of antimicrobial consumptionin Europe2012

276. Whiley R, Hardie J. (2009) Genus I. Streptococcus. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes , Vol. 3 (De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH & Whitman WB, eds), pp. 655–711. *Springer*, New York, NY.

277. Wierzbowski A, Hoban D, Hisanaga T, DeCorby M, Zhanel G. (2005). The use of macrolides in treatment of upper respiratory tract infections. *Current infectious disease reports,* 7(3), 175-184.

278. Williamson D, Smeesters P, Steer A, Steemson J, Ng A, Proft T,MorelandN.(2015). M-protein analysis of *Streptococcus pyogenes* isolates associated with acute rheumatic fever in New Zealand. *Journal of clinical microbiology*, *53*(11), 3618-3620.

279. Wong C, Chang H, Pasupathy S, KhinL, Tan J, LowC. (2003). Necrotizing fasciitis: clinical presentation, microbiology, and determinants of mortality. JBJS, 85(8), 1454-1460.

280. Wong S, Yuen K.(2018). The Comeback of Scarlet Fever. *EBioMedicine*, *28*, 7-8.

281. Wong S,YuenK. (2012). *Streptococcus pyogenes* and re-emergence of scarlet fever as a public health problem. *Emerging microbes & infections*, 1(7), e2.

282. Yang P, Peng X, ZhangD, Wu S, Liu Y, Cui S, Li J. (2013). Characteristics of group A Streptococcus strains circulating during scarlet fever epidemic, Beijing, China, 2011. *Emerging infectious diseases*, 19(6), 909.

283. YouY, Davies M, Protani M, McIntyre L, Walker M, Zhang J. (2018). Scarlet Fever Epidemic in China Caused by *Streptococcus pyogenes* Serotype M12: Epidemiologic and Molecular Analysis. *EBioMedicine*.

284. Zampaloni C, Cappelletti P, Prenna M, Vitali L, Ripa S. (2003). emm gene distribution among erythromycin-resistant and-susceptible Italian isolates of Streptococcus pyogenes.*Journal of clinical microbiology*, *41*(3), 1307-1310.

285. Zeppa J, Kasper K, MohorovicI, MazzucaD, Haeryfar S, McCormickJ. (2017). Nasopharyngeal infection by *Streptococcus pyogenes* requires superantigen-responsive Vβ-specific T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(38), 10226-10231.

286. Zingaretti C, Falugi F, Nardi-Dei V, Pietrocola G, Mariani M, Liberatori, S, GrandiG. (2010). *Streptococcus pyogenes* SpyCEP: a chemokine-inactivating protease with unique structural and biochemical features. *The FASEB Journal*, *24*(8), 2839-2848.

287. Zinkernagel A, Timmer A, Pence M, Locke J, Buchanan J, Turner C, Nizet V. (2008). The IL-8 protease SpyCEP/ScpC of group A Streptococcus promotes resistance to neutrophil killing. *Cell host & microbe*, *4*(2), 1

IX. Оригинални статии и активност във връзка с дисертацията

Реални публикации във връзка с дисертацията

1. Muhtarova A, Gergova R, Mitov IG. (2017) Distribution of macrolide resistance mechanisms in Bulgarian clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* during the years of 2013-2016. Journal of Global Antimicrobial Resistance (JGAR) 10; 238 - 242. **(IF_{2017} –2.022)**

2. Muhtarova A, Gergova R, Setchanova L, Mitov I. (2017) Distribution of Super-Antigens and Toxins in Bulgarian Invasive and Non-Invasive Clinical Isolates *Streptococcus pyogenes* Acta Microb. Bulgar. 33; 4 151-156.

3. Мухтарова А, А. Стайкова, Б. Борисова, Д. Димитрова, Р. Гергова (2016) Нова проблематична резистентност в бълагрски изолати *Streptococcuspyogenes***.** Юбилейна Научна Конференция за преподаватели, студенти и специализанти по здравни грижи с международно участие „10 години специалност „Медицински лаборант" в медицински Колеж-Стара Загора"20-21 октомври, Ст. Загора, Сборник с Доклади, 38-41 стр.

4. Мухтарова А, Гергова Р, Гергов С**,** Митов И. (2017) Съвременни методи за директно откриване на *Streptococcus pyogenes* в пациентски проби. Здраве и наука 1(025), 44-48.

5. Мухтарова А, Р. Гергова**,** И. Митов. (2018) Бета-хемолитични стрептококи - тяхната актуална роля и антибиотична резистентност. Медицински преглед, 54, 3, 24-29.

Участия в научни форуми

1. Gergova R., **Muhtarova A**, Mitov I., (2015). Toxic potential of a leading pathogenic agent - *Streptococcus pyogenes*.Poster,13 National Congress of Microbiology and Infections, BAM, 16-18 april, pp. 72, Sofia, Bulgaria– **постер**

2. Гергова Р., **Мухтарова А.,** Г. Петрова, А. Илиев, С. Гергов,Н. Улевинов, И. Митов, (2016)Сравнение на три лабораторни методи за откриване на*Streptococcus pyogenes* в клинични проби. 14 Национален Конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ. **София,** 12-14 май. Сборник научни трудове, стр.38. – **постер**

3. Мухтарова А, А. Стайкова, Б. Борисова, Д. Димитрова, Р. Гергова (2016) Нова проблематична резистентност в бълагрски изолати *Streptococcuspyogenes***.** Юбилейна Научна Конференция за преподаватели, студенти и специализанти по здравни грижи с международно участие „10 години специалност „Медицински лаборант" в медицински Колеж-Стара Загора"20-21 октомври, **Ст. Загора,** Сборник с Доклади, 38-41 стр. – **доклад**

4. Мухтарова А, Р. Гергова, И.Митов (2017) Проучване механизмите на макролидна резистентност в български клинични изолати *Streptococcuspyogenes* с помощта на съвременни молекулярно-генетични методи. „Молекулярната биология - нови хоризонти". Втори Докторантски симпозиум. 6 – 7 април, София, БАН, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев". – **доклад**

5. Гергова Р., **А. Мухтарова**, И. Митов, (2017)Арсенал от антибиотична резистентност и вирулентност на*Streptoccocuspyogenes*. 15 Конгреспо Микробиология и Инфекции на БАМ,18-20май, София, България – **доклад**

6. Гергова Р., Петрова Г., **Мухтарова А,** С. Гергов,И. Митов. (2017)Бърза диагностиката на*Streptococcus pyogenes* с RTPCRв проби от болни с тонзилофарингит, скарлатина и перитонзиларен абсцес. XVIII–та Национална

Конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, Слънчев Бряг, 19-21 май. – **постер**

7. Gergova R., **Muhtarova A.**, Markovska R., Mihova K., Kaneva R., Setchanova L., Mitov I. (2017). Distribution of *emm* genotypes in bulgarian clinical significant isolates *Streptococcus pyogenes*. A pylot study. 10th Balkan Congress of Microbiology November 16th – 18th, , Sofia, Bulgaria- **poster**

8. Muhtarova A., Gergova R., Setchanova L., Mitov I. (2017) Distribution of super-antigenes and toxins in Bulgarian invasive and non-invasive clinical isolates *Streptococcus pyogenes*. 10th Balkan Congress of Microbiology November 16th – 18th, Sofia, Bulgaria- **poster**

9. Tsitou V., Gergova R., **Muhtarova A.**, Gergova I., Mitov I. (2017). The toxic potential of Bulgarian clinical isolates *Staphylococcus aureus* determined by multiplex PCR. 10th Balkan Congress of Microbiology November 16th – 18th, Sofia, Bulgaria- **poster**

10. Гергова Р.,**Мухтарова А.**, Петрова Г., Марковска Р., Михова К., Кънева Р., Митов И..(2018) Промяна в етиологията на бактериалния тонзилофарингит - повишена вирулентност на стрептококи група С и G – XIX-та Национална Конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, Слънчев Бряг, 18-20 май – **постер**

Участия в проекти

1. **Договор №7/2015** на МУ-София, СМН: Клинични, микробиологични и генетични проучвания върху един от най-значимите причинители на респираторни инфекции в детска възраст *Streptococcus pyogenes* **Участник в екипа**
2. **Договор 2-Д/2016** на МУ-София, СМН: Алгоритъм за установяване на новопоявила се резистентност към макролиди при *Streptococcus pyogenes* в български клинични изолати **Водещ изследовател**
3. **Договор №3-С/2016** на МУ-София, СМН: Молекулярно-генетичен анализ на вирулентността, резистентността и епидемиологията на български клинично значими изолати *Streptococcus pyogenes* **Участник в екипа**
4. **Договор №Д-139/2017** на МУ-София, СМН: Епидемиологично типиране на щамове *Streptococcus pyogenes*, изолирани от болни с различни инфекции **Водещ изследовател**
5. **Договор №Д-56/2017** на МУ-София, СМН: Проучване токсигенността и макролидната резистентност при клинично значими пиогенни коки *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus* **Участник в екипа**
6. **Договор №Д-59/2018** на МУ-София, СМН: Микробиологично и генетични проучвания върху антибиотичната резистентност при *Streptococcus pyogenes* и други бета-хемолитични стрептококи **Участник в екипа**