



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА МИКРОБИОЛОГИЯ**

АДИЛЕ АКИФОВА МУХТАРОВА

**МИКРОБИОЛОГИЧНИ И ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ
ВЪРХУ КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ
*STREPTOCOCCUS PYOGENES***

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за

присъждане на научна и образователна степен „доктор”

**4. Природни науки, математика и информатика
Професионално направление 4.3. Биологически науки
Докторска програма: МИКРОБИОЛОГИЯ**

Научен ръководител: доц. д-р Райна Цветанова Гергова, дм

София 2018 г.

Дисертационният труд е представен на заседание на разширен катедрен съвет на Катедра по медицинска микробиология към Медицински факултет, Медицински университет - София на 11.09.2018 г. и е насочен за защита пред Научно жури.

Дисертацията съдържа 188 страници, 28 таблици и 38 фигури. Библиографията включва 287 заглавия, от които 12 на кирилица и 275 на латиница.

Експерименталната работа е извършена в Катедрата по медицинска микробиология, Медицински факултет на Медицински университет - София.

Защитата на дисертационният труд ще се състои на 03.12.2018. от 13.00 часа в Първа аудитория на Медико-биологичния комплекс на МУ София, МФ, ул. „Здраве” №2, на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в Канцеларията на Катедра по медицинска микробиология и са публикувани на сайта на МУ София.



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА МИКРОБИОЛОГИЯ**

АДИЛЕ АКИФОВА МУХТАРОВА

**МИКРОБИОЛОГИЧНИ И ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ
КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ
*STREPTOCOCCUS PYOGENES***

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за
присъждане на научна и образователна степен „доктор”**
4. Природни науки, математика и информатика
Професионално направление 4.3. Биологически науки
Докторска програма: МИКРОБИОЛОГИЯ

Научен ръководител: доц. д-р Райна Цветанова Гергова

Научно жури:

1. Проф. д-р Лена Петрова Сечанова, дм
2. Доц. д-р Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм
3. Проф. Тодор Веселов Кантарджиев. дмн
4. Проф. д-р Грозданка Томова Лазарова, дм
5. Доц. д-р Иван Николаев Иванов, дм

София, 2018

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

CDC	Center for disease control and prevention
ECDC	European center for disease control and prevention
<i>erm(A)</i>	ген кодиращ метилаза, отговорен за резистентността към MLS
<i>erm(B)</i>	ген, кодиращ метилаза, отговорен за резистентността към MLS
GAS	стрептококи от група А, <i>Streptococcus pyogenes</i>
GCS	стрептококи от група С
GGG	стрептококи от група G
<i>mef(A)</i>	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 шок 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

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 (абсцидиращи процеси, менингит, сепсис, токсичен шок синдром, некротизиращ 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 абсцидиращи 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 артрит, псориазис, болест на Кавасаки 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 страни по света, не са достатъчно проучени, независимо че има изследвания върху променящата се етиология на респираторните инфекции (Сечанова Л. и съавт. 2015; Gergova R. et al. 2016; Segal N. et al. 2005; Luca-Naragi V. et al. 2009). Нови микробиологични, молекулярно-генетични и епидемиологични изследвания анализират и разкриват стрептококовото разнообразие чрез методите на типизиране, основани на M 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 селектиране на резистентност към тези важни групи антимикробни средства, които при деца са единствена алтернатива на пеницилиновата терапия при алергия и първоначално неуспешно 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 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. 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, RT-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 суперантигените
- 6) Да се типизират колекциониранияте изолати чрез определяне на *emt*-генотиповете и съответните им MLST типове, както и анализирани на връзката между установените клонове, гените на резистентност и клиничната диагноза.

III. 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 някои 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 етиологията и чувствителността към антимикуробни 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 симптоматични 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, синусит, мекотъканни инфекции, некротизиращ фасциит, сепсис, токсичен шоков синдром, менингит, пневмония.

2. Контролни щамове и проучени микроорганизми

Бяха използвани 5 референтни щамове *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.

3. Микроскопско изследване

Микроскопското изследване беше извършвано с помощта на рутинна процедура за оцветяване по Грам (модификация по Atkins) с оцветителен набор на Merck.

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 за изолиране на стрептококовия агент бяха направени на Колумбия агар с 5% овнешка кръв (BBL, Germany) и обогатяване в бульон на Тод (BBL, Germany). Пробите бяха култивирани едно денонощие при 36°C, с 5-10% CO₂. За определяне на серогрупата по Lancefield използвахме антигенен тест PathoDextra Strep Grouping Kit Thermo Scientific (Oxoid, UK).

4.3. Бърз имунохроматографски тест за директно откриване на GAS в клинични проби (StrepA Antigen Rapid Test, Ultimed Products, Deutschland).

5. Определене на антимикробна чувствителност с фенотипни методи

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

5.2. Определяне на МИК

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 микроорганизъм. За целта е използван DNAsorb-AMnucleic acid extraction kit (AmpliSens) като екстракцията е осъществена според протокола и указанията на производителя.

6.2. Полимеразна-верижна реакция (PCR)

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

6.4. Мултиплекс PCR за идентифициране на GAS в клинични проби

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: *sdс*, *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 O). Всички гени бяха разделени на 6 отделни микса като всяка смес беше използвана за мултиплекс PCR.

6.6. Полимеразо-верижна реакция (PCR) за откриване на гени за резистентност към MLS група антибиотици. Изпълнена е мултиплекс PCR със следните гени за резистентност: *mef(A)*, *erm(A)*, *erm(B)*.

6.7. PCR за откриване на гени за резистентност към тетрациклини. Изпълнена е мултиплекс PCR със следните гени за резистентност: *tet(O)*, *tet(M)*.

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

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

8. Мултилокусно секвениране, MLST (multilocus sequence 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. et al 2012; Feil E et al 2004).

Бактериалните щамове *S. pyogenes*, принадлежащи към 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 амплификации за седемте консервативни локуса при *S. pyogenes*.

9. Статистически анализ и интерпретиране на резултатите

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 $P < 0.05$.

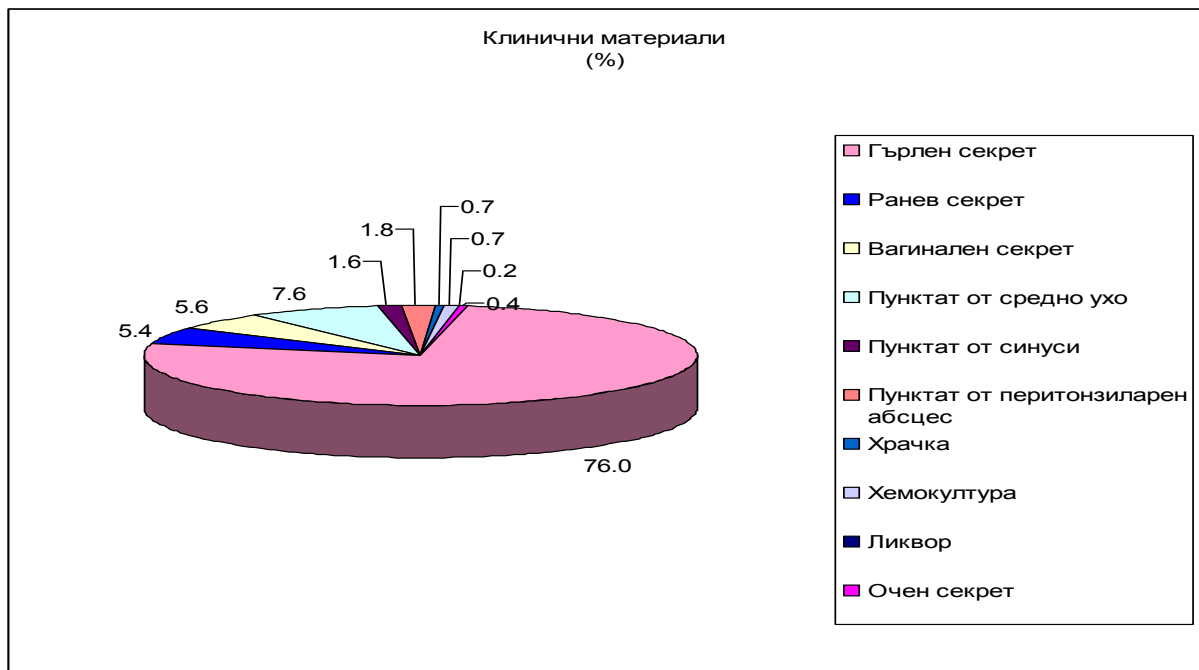
IV. Резултати и обсъждане

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

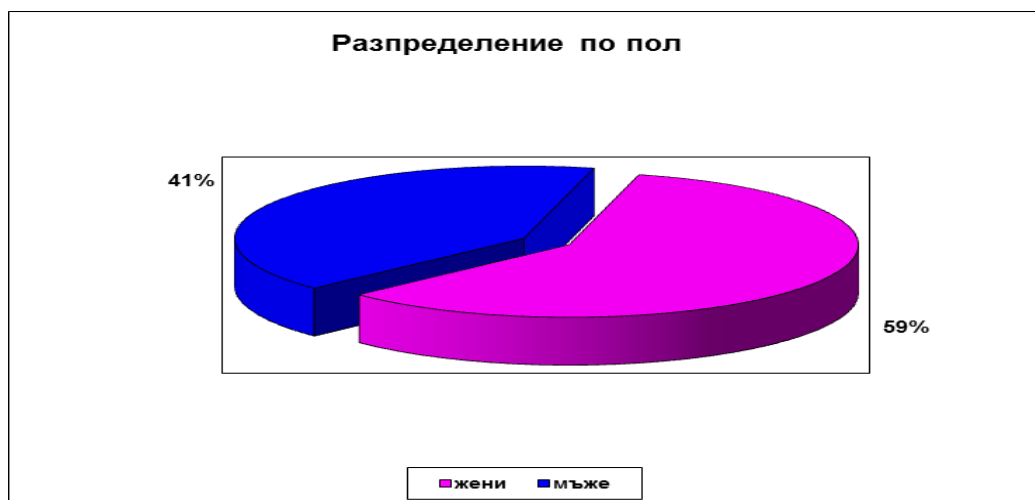
В проучването бяха включени 445 щамове *S. pyogenes*, изолирани през периода 2013-2017г. от гърлени секрети, рани, вагинални секрети, пунктати от перитонзиларен абсцес, пунктати от средно ухо, пунктати от синуси, хрчка, хемокултура, ликвор, чието разпределение е представено на **фиг.1**. Болните, чиито данни са използвани 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. 2**.

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). Щамовете *S. pyogenes* бяха изолирани от всички възрастови групи: от 0 до 86г. Разпределението на пациентите със стрептококови изолати по възраст е

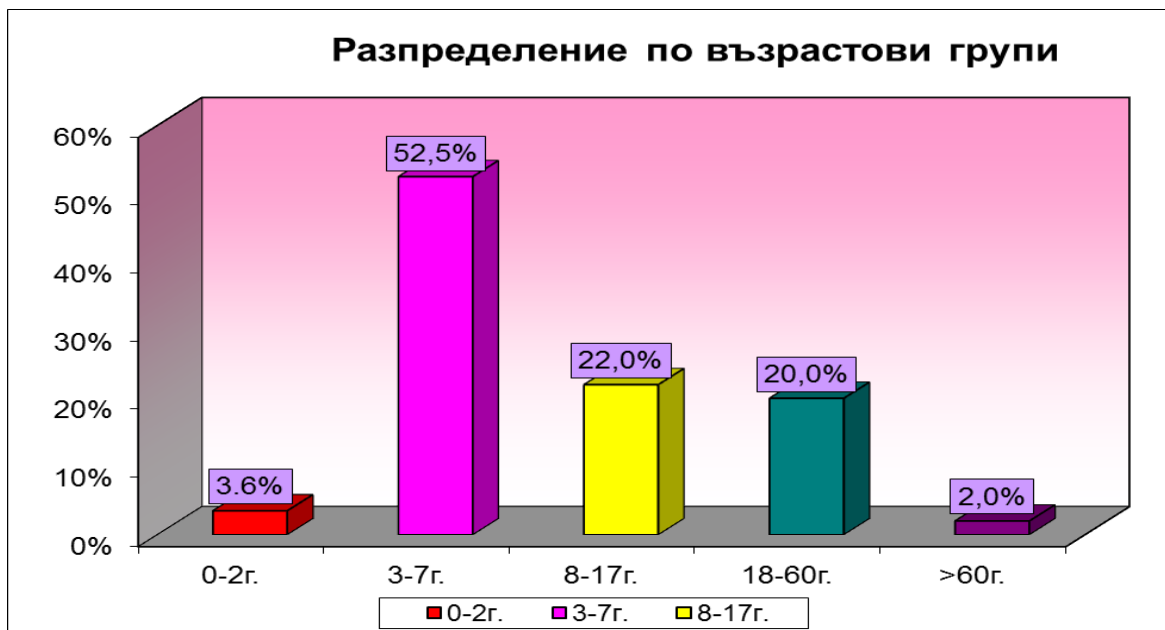
представено на **фиг. 3**. Най- голям беше делът на пациентите от 3 до 7 г. (52.5%, n= 233). Приблизително еднакво количество щамове са изолирани от болни във възрастовите групи 8-17г. (22%, n= 98) и 18-60г. (20%, n= 89). Значително по-малък е делът на изследваните със стрептококови инфекции деца от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



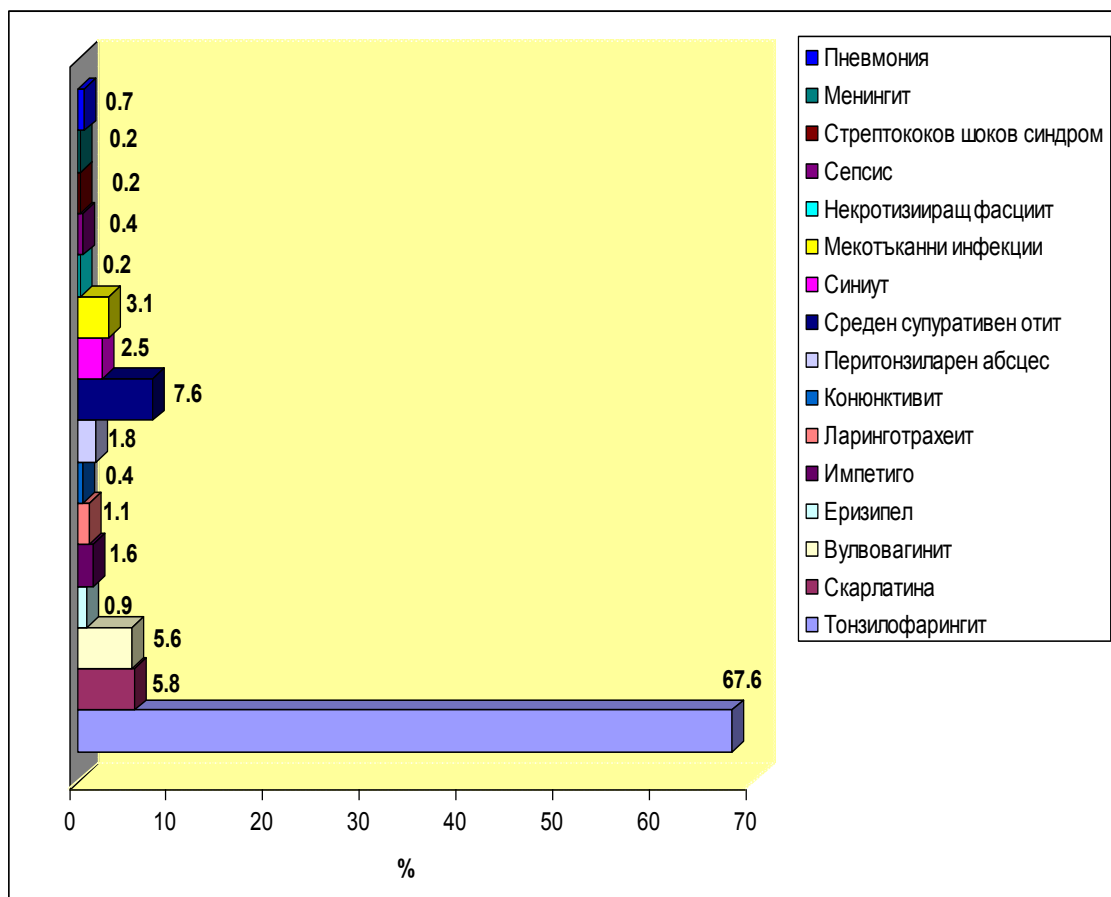
Фиг. 1. Разпределението на щамовете *S. pyogenes* според вида на материала



Фиг. 2. Разпределение на пациентите с изолати *S. pyogenes* по пол.



Фиг.3. Разпределение на пациентите с изолати *S. pyogenes* по възрастови групи



Фиг. 4. Разпределение на пациентите с изолати *S. pyogenes* според клиничните диагнози

Разпределението на пациентите според клиничната диагноза на пациентите е представено на **фиг. 4**. 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). 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 дялът 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 XIX век 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). 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).

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 посевка
- ❖ Бърз имунохроматографски 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 показва положителен резултат при 135 от тестваните проби (130 - тонзилофарингит, 5 перитонзиларен абсцес). 10 от пробите взети от пациенти с тонзилофарингит показаха отрицателни резултати с бързият имунохроматографски тест. При конвенционална посевка тези проби показаха бактериален растеж в микробно число < 1000 cfu/ml след обогатяване в бульон на Тод. Един пунктат от перитонзиларен абсцес показва фалшиво положителен резултат при тестване с RICT, тъй като при конвенционална посевка тази проба показва растеж на *S. anginosus*, а разработените от нас генетични методи бяха отрицателни при този пациент.

Положителен бърз имунохроматографски тест е илюстриран на **фиг. 5**.

Разработените в проучването молекулярно-генетичните методи (**Real-time PCR и мултиплекс PCR**) показаха положителни резултати при 159 (n=148 тонзилофарингити, 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 ДНК-аза – *sdaB* (Gergova R. et al. 2015; Shulman S. et al. 2012; Sumbly 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 в беше доказана с 28 ДНК от различни видове Грам-позитивни бактерии (18): *Streptococcus sagalactiae* – 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 diphtheriae*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. minutissimum*, *Erysipelothrix risiopathiae*, *Actinomyces newii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovi*; Грам-негативни бактерии (9): *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Kingella kingae*, *Eikenella corrodens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona saeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и най-честият клиничен изолат от кандидатите *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. 1**). Молекулярно-генетичните техники бяха положителни и в проби с изключително малък брой жизнеспособни – под 1000 cfu/ml и с несигурна виталност на бактериалните

клетки, което потвърждава изключителната чувствителност на новоразработените методи.

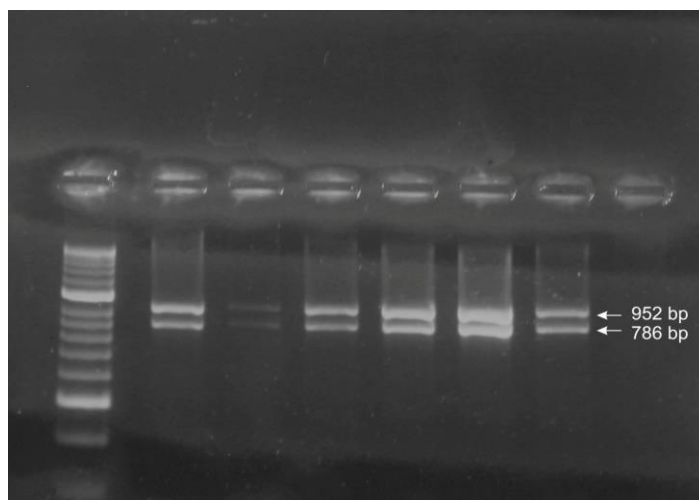
Таблица 1. Резултати от едновременното изследване на 167 клинични проби по 4 метода за диагностика на *S. pyogenes*.

Диагноза на пациента	Брой (+) проби с рутинна посявка No (% ±Δ)	Брой (+) проби с RICT No (% ±Δ)	Брой (+) проби сRT-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)

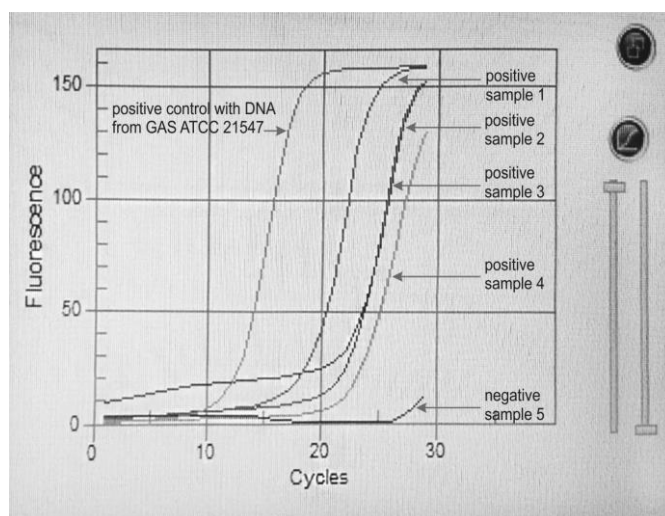
Някои от резултатите получени чрез мултиплекс PCR са представени на **фиг. 6**, а тези real-time PCR – на **фиг. 7**.



Фиг. 5. Положителен RICT на *S. pyogenes*



Фиг. 6. Мултиплекс PCR – агароза гел електрофореза. Ампликоните: *speB* – 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. 7. RT PCR. Установяване на таргатната 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.

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.

3. 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* (стрептококов инхибитор на комплемента) и *slo* (ген за стрептолизин О) и *smeZ* (митогенен екзотоксин Z) – общо 21 гена. Наличието на гените *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. 2**.

Настоящото проучване показва, че гените *speB*, *spyCep*, *sdaB* и *slo* се срещат в 100% от изследваните от нас щамове *S. pyogenes* (**табл. 2**)

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 повърхност на *S. pyogenes* (Nelson D. et al. 2011; NytoÈnen J. et al. 2001).

Таблица 2. 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
ДНКazi											
<i>sdc</i>	65.5										
<i>sdaB</i>	100										
<i>sdaD</i>	55.4										
<i>spd3</i>	51.8										
Токсини											
<i>speA</i>	31.5	32.08	25-40	11	55	42	31	35	67	22.1	7.5-40
<i>speC</i>	28.6	51.46	24-60	64	45	43	42	50	76	99.4	24-30
<i>speF</i>	63.5										
<i>speG</i>	49.7	86.88	13-99	90	100	100	100	90	78	99.7	84
<i>speH</i>	4.3	17.08	1-88	20	30	36	26	19	40	76.2	28.5
<i>speI</i>	25.2	15.21	0-88		17	62	16	17		76.0	15
<i>speJ</i>	66.8	32.71	0-71	24		14	100	51		21.5	30
<i>speK</i>	28.7	24.58	85-87		42	0	15	9		0.6	
<i>speL</i>	27.6	9.17	85-92		1	0	5	8		1.1	27
<i>speM</i>	29.0	9.17	83-91		44	5		8		2.2	25
<i>ssa</i>	28.7	35.42	14-31		28	8	32	22	40	97.7	16.5
<i>smeZ</i>	80.2	96.04	38-50		100	99	92	95		97.7	89
<i>slo</i>	100										
Протеази											
<i>spe B</i>	100						100			100	80-97
<i>spy CEP</i>	100										
<i>mac</i>	82.4										
<i>sic</i>	35.8										

^bFriães et al. (2012); ^cEkelund et al. (2005); Luca-Harari et al. (2008); Lintges et al (2010)^dDarenberg et al. (2007); ^eMcMilan et al. (2006)

^fBerman et al. (2014); ^gProfit et al. (2003)^hCommons et al (2008); ⁱIkebe et al (2002); Dhanda et al (2011)^jPengYang 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 (Hytonen 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.. 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).

Следващият ген, който се установяваше при всички тествани от нас щамове *S. pyogenes* беше *slo* (табл. 2). Експресията на ген *slo* води до биосинтеза на стреполизин О, който е токсин, принадлежащ към семейството на цитолизините. Установено е, че стреполизин 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).

Суперантигените са голямо семейство термостабилни екзотоксини, мощни митогени, които имат способността да стимулират прекомерна пролиферация на Т-лимфоцитите 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 представляват фактори за вируленост, 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. 2). 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. 2). Суперантигените при *S. pyogenes* са един от основните рискови фактори за развитието на инвазивни стрептококови заболявания (Zeppa J. et al. 2017).

Ние доказахме, че 66.8% от българските щамове *S. pyogenes* са *speJ*⁺ честота 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 *fspeL* / М 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. 2).

Получените от нас резултати, за честотата на разпространение на гените *speA*, *ssa*, бяха сходни с тези, които са докладвани в Португалия, Нова Зеландия и Австралия (табл. 2)

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

4. 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 неинвазивни изолати и изолати от стерилни области на човешкото тяло които могат да бъдат разгледани на **табл. 3**. 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 абцеси (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. 9**).

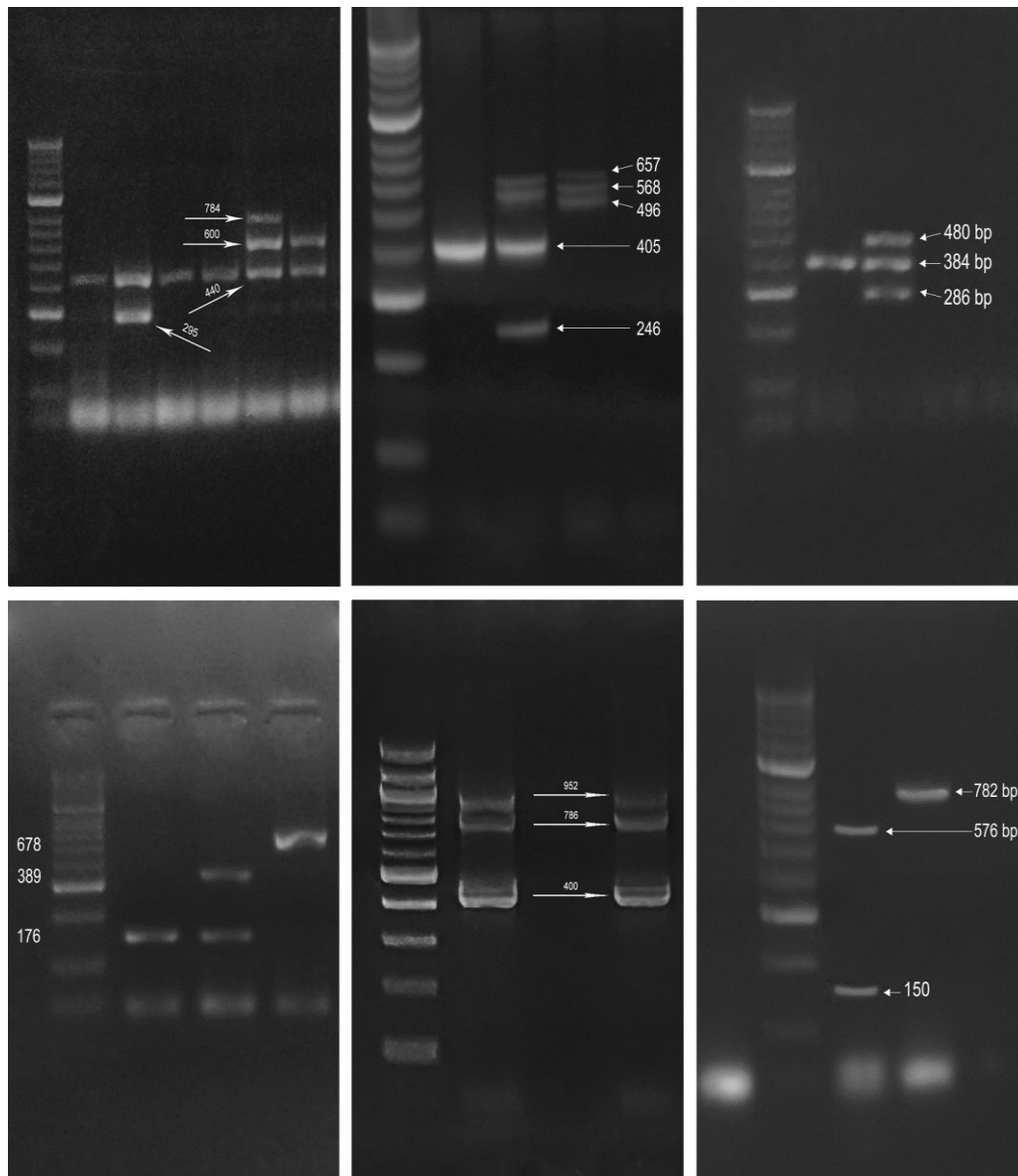
Всички изследвани щамове, от инвазивни и от неинвазивни инфекции, бяха положителни за гените *speB*, *spyCep*, *slo*, *sdaB* (**табл. 3**).

Значението на някои от суперантигените при инвазивните 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).

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; Sumbly 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 тонзилофарингит и скарлатина, които са и най-честите стрептококови заболявания и да доведе до по-чести техни усложнения с абсцедиращ характер или с аутоимунен механизъм.



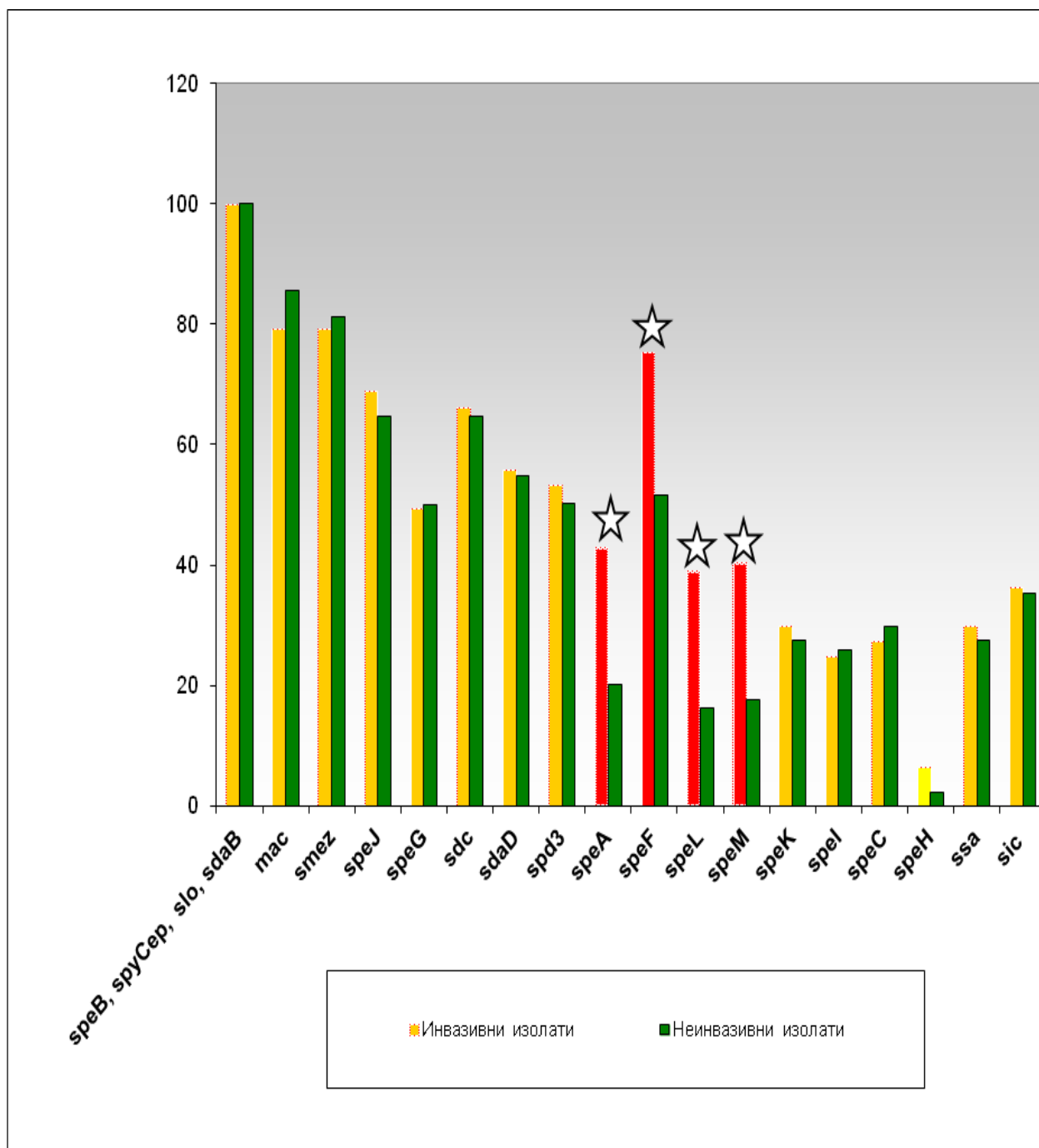
Фиг. 8. Гел-електрофореза ампликони от гени на *S. pyogenes*, кодиращи ДНК-ази, суперантигени и екзотоксини. (Миксове 1, 2, 3, 4, 5, 6)

Таблица 3. 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	%	
<i>speB, spyCep, slo, sdaB</i>	77	100	368	100	1.000
<i>Mac</i>	61	79	315	86	0.7085
<i>smeZ</i>	61	79	299	81	0.9252
<i>speJ</i>	53	69	238	65	0.7674
<i>speG</i>	38	49	184	50	1.0000
<i>Sdc</i>	51	66	238	65	0.9209
<i>sdaD</i>	43	56	202	55	1.0000
<i>spd3</i>	41	53	185	50	0.8302
<i>speA</i>	33	43	74	20	0.0028
<i>speF</i>	58	75	190	52	0.0001
<i>speL</i>	30	39	60	16	0.0013
<i>speM</i>	31	40	65	18	0.0017
<i>speK</i>	23	30	101	27	0.7897
<i>speI</i>	19	25	95	26	1.000
<i>SpeC</i>	21	27	110	30	0.7924
<i>speH</i>	5	6	8	2	0.0639
<i>Ssa</i>	23	30	101	27	0.7897
<i>Sic</i>	28	36	130	35	0.9032

Забележка:

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



Фиг. 9. 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

5. 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.

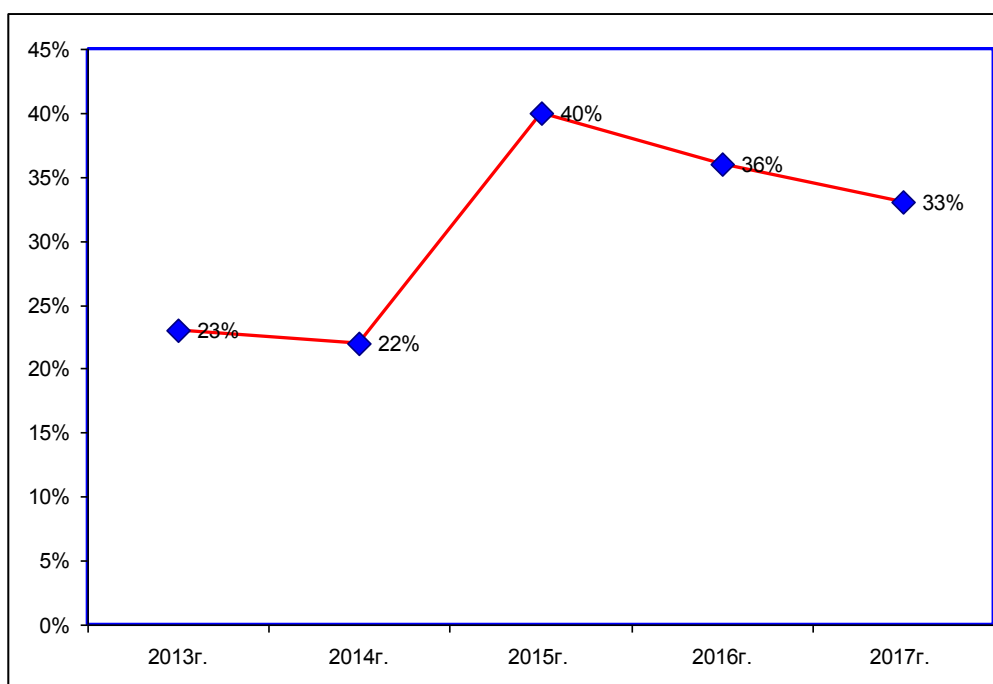
6. Определяне на чувствителност към MLS група антибиотици чрез фенотипни и генотипни методи при щамове *S. pyogenes* изолирани през периода 2013-2017г.

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 показва, 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. 4**. Степента за резистентност на *S. pyogenes* към MLSгрупа антибиотици беше вариабилна и показваше тенденция за нарастване през годините (**фиг.10**).

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 E- 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 M-фенотип, 21 щама показаха индуцибелен MLSB фенотип и 39 щама- конститутивен MLSB фенотип (**табл. 5**)



Фиг. 10. Разпространение на макролид - резистентните щамове *S. pyogenes* през 5 годишен период (2013-2017г.).

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. 5**.

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 щам притежаваха поне един от трите генетични детерминанта (**табл. 4**).

Настоящият дисертационен труд показва, 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. 4)

Корелацията между макролид-резистентният фенотип, МИК към еритромицин, кларитромицин, азитромицин, клиндамицин и генетичните детерминанти обуславящи тези резистентност са показани на табл. 5.

Всички щамове, които показваха М-фенотип, бяха положителни за гена *mef(A)* (n=80), показано на табл. 5. Генът *mef(A)* кодира протеини с функция на „ефлуксни помпи“, които обуславят 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 показва 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 показва 100% чувствителност при всички щамове, за които бе доказан ефлукс механизъм.

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

Подобни флукуации в честота на разпространение на макролидната резистентност 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 (Basseti 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 в увеличаването на макролидната резистентност 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).

Таблица 4. Честота на разпространение на генетичните детерминанти, обуславящи макролидна резистентност при 140 макролид-резистентни *S. pneumoniae*, изолирани през периода 2013-2017г.

Гени за резистентност	Година					през 5-те години n (%)
	2013 n (%)	2014 n (%)	2015 n (%)	2016 n (%)	2017 n (%)	
<i>mef(A)</i>	6 (49)	14 (67)	22 (55)	17 (63)	21(55)	80 (57.1)
<i>erm(A)</i>	3 (21)	1 (5)	2 (5)	3 (11)	4(11)	13 (9.3)
<i>erm(B)</i>	1 (7)	2 (10)	4 (10)	1 (4)	8(21)	16 (11.4)
<i>mef(A) &erm(A)</i>	1 (7)	1 (5)	0 (0.00)	1 (4)	0 (0.00)	3 (2.1)
<i>mef(A)&erm(B)</i>	3 (21)	3 (14)	12 (30)	5 (19)	5(13)	28 (20)
Общ брой на резистентните 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

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

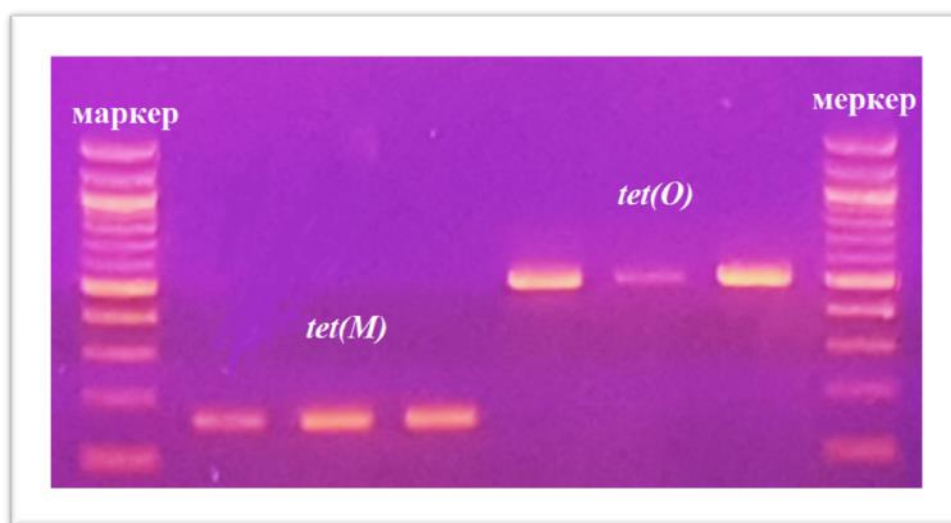
Фенотип Брой щамове	MIC (mg/L) Erythromycin	MIC (mg/L) Azithromycin	MIC (mg/L) Clarythromycin	MIC (mg/L) Clindamycin	<i>mef(A)</i> (% ± SD)	<i>erm(A)</i> (% ± SD)	<i>erm(B)</i> (% ± SD)	<i>mef(A) & erm(A)</i> (% ± SD)	<i>mef(A) & erm(B)</i> (% ± SD)
М-фенотип n=80	1 - 32	1 – 32	0.75 - 16	0.125 - 0.25	80	0	0	0	0
Индубицелен 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)

7. 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 изследваните 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 съответните гени за резистентност. От всичките тетрациклин резистентни щамове 85% (n=39) бяха *tet(M)* положителни и 15% (n=7) *tet(O)* положителни (**фиг.11**).

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).



Фиг. 11. 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 резистентност 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 семейството на Tn916 - *tet (M)* (Brenciani et al. 2007).

В настоящото проучване генът *tet(M)* беше преобладаваща генетична детерминанта 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.

Таблица 6. Разпределение на генетичните детерминанти при тетрациклин-резистентните щамове и връзка с чувствителността им към MLS група антибиотици.

Гени определящи резистентност към тетрациклин	<i>Tet (M)</i> n(%)	<i>Tet(O)</i> n(%)	Общо n(%)
МИК	39(85)	7(15)	46(100)
Брой на щамове, които са резистентни към тетрациклин и макролиди едновременно	>256	>256	
	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 тетрациклини в през периода 2008-2012г (Weist K. et al. 2012).

8. Препоръки за терапия при лечение на стрептококови заболявания

Според нашето проучване, както и на много други автори по цял свят, *S. pyogenes* остава чувствителен 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, пеницилините все още остават първи избор при лечение на стрептококовите заболявания и могат да бъдат използвани за емпирична терапия. Антимикробното средство е предпочитано 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 аминопеницилинов 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 има по-добро перорално усвояване и 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.

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 некротизиращ 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. et al. 2005; Stevens D. & Bryant A. 2016; Parson P. et al. 2018). Използването на клиндамицин, 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).

9. 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 В. et al. 1996. Ние извършихме *emm*-типизиране на представителна извадка от 182 щамове *S. pyogenes* изолирани през 2013- 2017г. от материали с различни клинични диагнози: тонзилофарингит, скарлатина, вулвовагинит, импетиго, еризипел, перитонзиларен абсцес, среден супуративен отит, синусит, сепсис, токсик шок синдром, некротизиращ фасциит, пневмония, менингит. Получените от нас резултати за разпределението на *emm*-типозите на българските изолати *S. pyogenes* според клиничните диагнози е показано на **табл. 7**.

Сред изследваните от нас щамове бяха открити 15 различни *emm*-типа и 27 *emm*-подтипа. Два от субтипозите бяха уникални - *emm3.132* и *emm3.133*. Те за първи път се установяват в света при нашето проучване и техните секвенции бяха депозирани в GenBank NCBI със сл. номера MG869722 и MG869723.

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

Преобладаващите *emm*-типозе в България бяха основно 7: *emm1* заедно с подтипозите *emm1.0*, *emm1.33*, *emm1.6* - 24.7%; *emm3* заедно с *emm3.1*, *emm3.32*, *emm3.93* и намерените от нас нови субтипозе *emm3.132* и *emm3.133*- 19.2%; *emm4* и *emm4.14* - 11%, *emm12* със субтипозе *emm12.00*, *emm12.37*, *emm12.49*, *emm12.5*, *emm12.59* - 11%; *emm28*, *emm2* - 6.0%, *emm89* – 5.5% (**фиг.12**). Останалите генотипозе се срещат в под 5 процента. На **фиг. 12** може да се види, че най-често срещаният *emm*-генотип сред българските щамове *S. pyogenes* беше *emm1* (24.7%). Тип *emm3*, заедно със субтипозите *emm3.1*, *emm3.32*, *emm3.93* и намерените от нас нови субтипозе *emm3.132* и *emm3.133*, съставляваше общо

19.2% от *emm*- типове циркулиращи в страната и беше вторият по честота на разпространение (**фиг.12**).

Много автори съобщават, че *emm1* и *emm3* имат най-висок потенциал на вирулентност и се изолират предимно при инвазивни стрептококови инфекции (Luca-Narari B et al. 2009; Ferretti J. et al. 2001; Tamayo E. et al. 2010). Ние доказахме, че преобладаващата част от българските щамове *S. pyogenes* изолирани пред последните 5 години принадлежат към *emm1* и *emm3*, 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 типове бяха *emm4* и *emm12* (11%) (**фиг.12**).

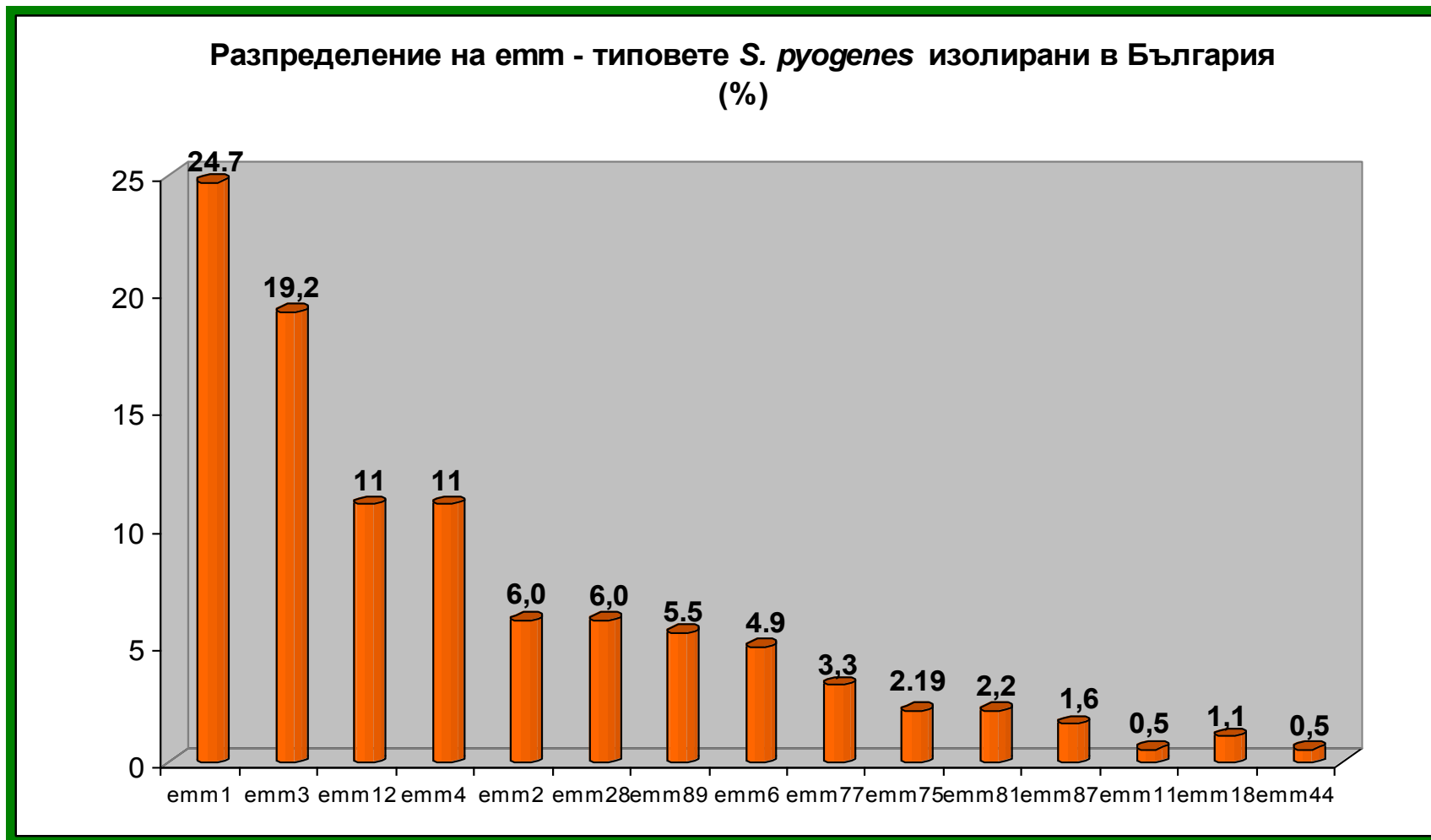
Генотиповете *emm3* и *emm12* показаха най-висока степен на полиморфизъм с подтиповете: *emm3.0*, *emm3.1*, *emm3.132*, *emm3.133*, *emm3.32*, *emm3.93* и *emm12.00*, *emm12.37*, *emm12.49*, *emm12.5*, *emm12.59* (**табл.7**) Според нашето проучване типове, срещани с честота на разпространение <10% в страната бяха: *emm2*, *emm28*, *emm89*, *emm6.4*, *emm77*, *emm75*, *emm81*, *emm87*, *emm11*, *emm18.32*, *emm44* (**фиг.12**).

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 същия серотип.

Таблица 7. Разпределениена *emm*-типовете и *emm*-кльстерите на 182 щама *S. pyogenes*, изолирани от български пациенти с различни заболявания през периода 2013-2017г.

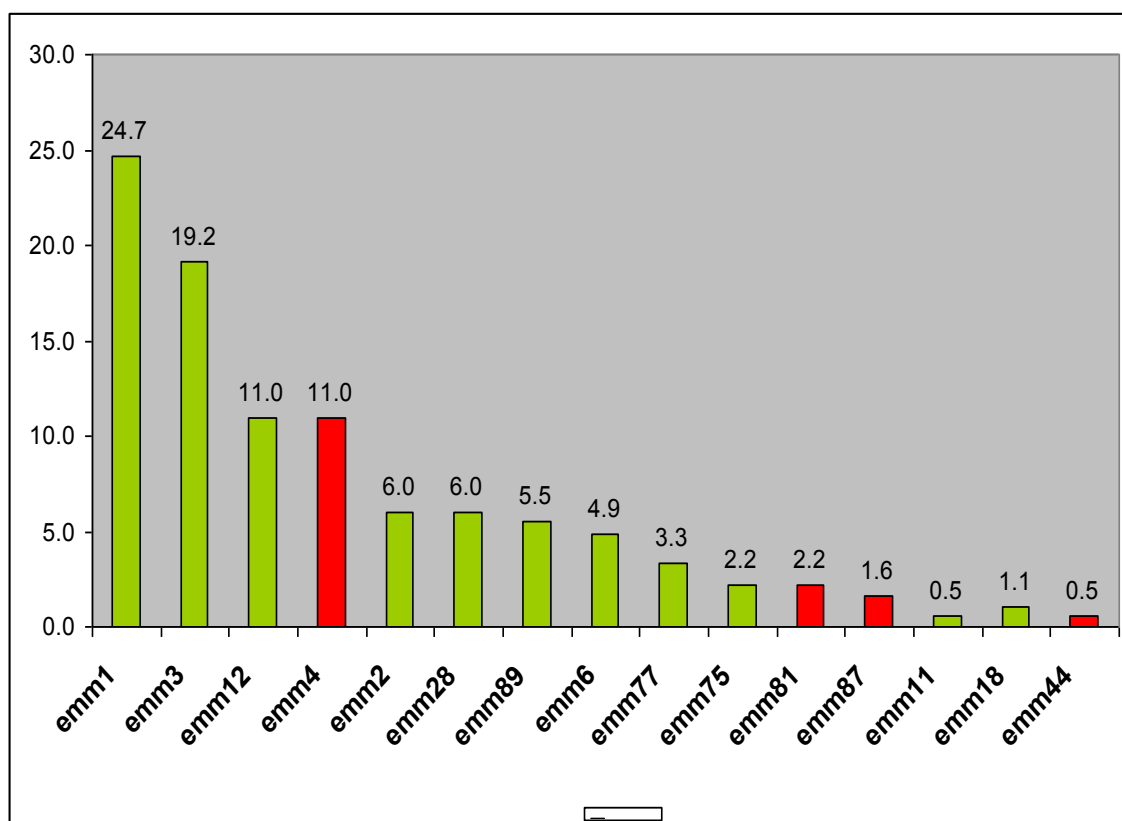
		Изолати от мукозни и кожни инфекции (n=122)						Изолати от дисеминирани инвазивни инфекции (n=60)					Общ брой
<i>emm</i> cluster	<i>emm</i> - типове	Ерзипел ^a и импедиго ^b	Скарлатина	Тонзило- фарингит	Вулво- вагинит	Пери- тонзиларен абсцес	Среден отит	Синуит	Мекотъканн и инфекции	Некортизиращ фасциит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



Фиг. 12. 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 експерименталната 26-валентната ваксина срещу *S. pyogenes* включва 84.4% от *emm*-типовете, доказани в настоящия труд, че са циркулиращи в България (фиг. 13). Следователно тя би имала добро, но не пълно покритие в страната.



Фиг. 13. 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)

Данните за покритието на 26- валентната ваксина в страните от Европа са по-оскъдни. Едно от проучванията показва, че тя би покрила 69% от шамовете изолирани в Кипър, Чехия, Дания, Финландия, Франция, Германия, Гърция, Италия, Румъния, Швеция, Великобритания (Luca-Narari V. 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 предизвиква 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-валентна ваксина покрива повечето М-типове, които не се включени в 26-валентната, като: М4, М29, М73, М58, М44, М78, М118, М82, М83, М81, М87, и М49. Серотиповете, които се съдържат в 26-валентната, 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 бил протективна срещу всички стрептококови *emm*-типове, доказани в настоящото 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 усложнения.

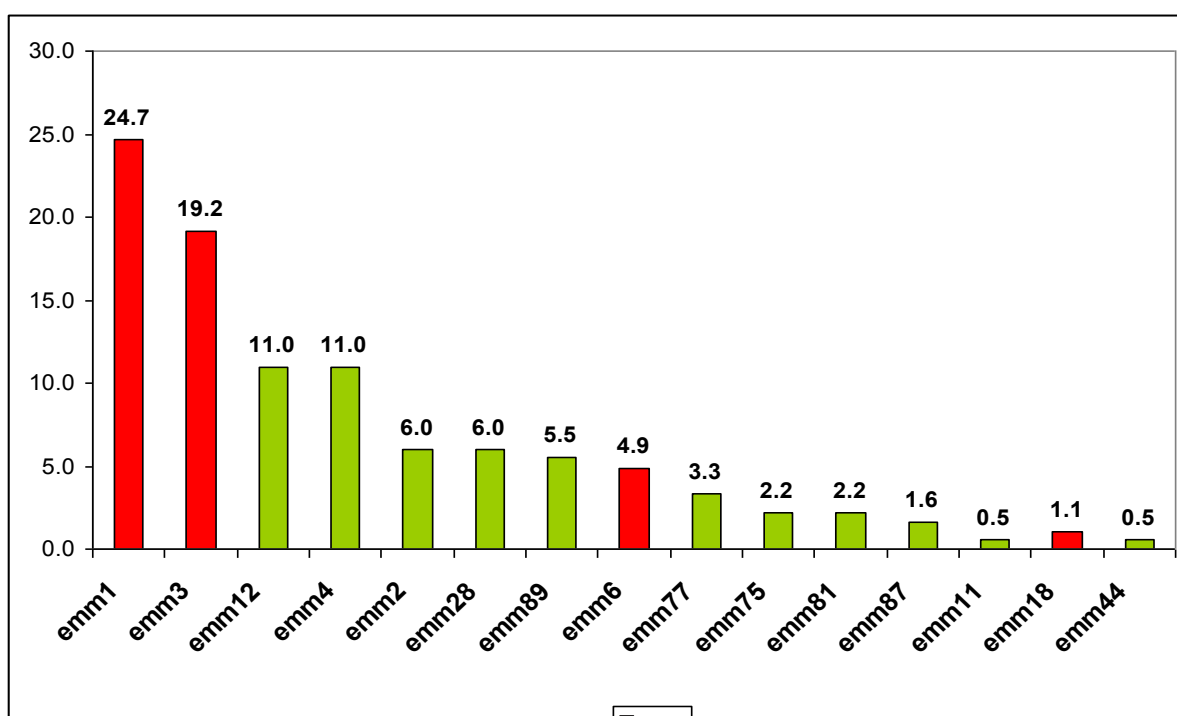
9.3. Асоциация между установите М-типове в страната и възможните късни автоимунни усложнения

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 Кавзаки, 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).

Настоящият дисертационен труд показва, че 49.9% от разпространените при нас *emm*-типове са ревматогенни и носят потенциален риск от развитие на това автоимунно усложнение (фиг. 14), 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 ревматогенни само 16.3% от изолатите (Koutouzi F. Et al. 2015).

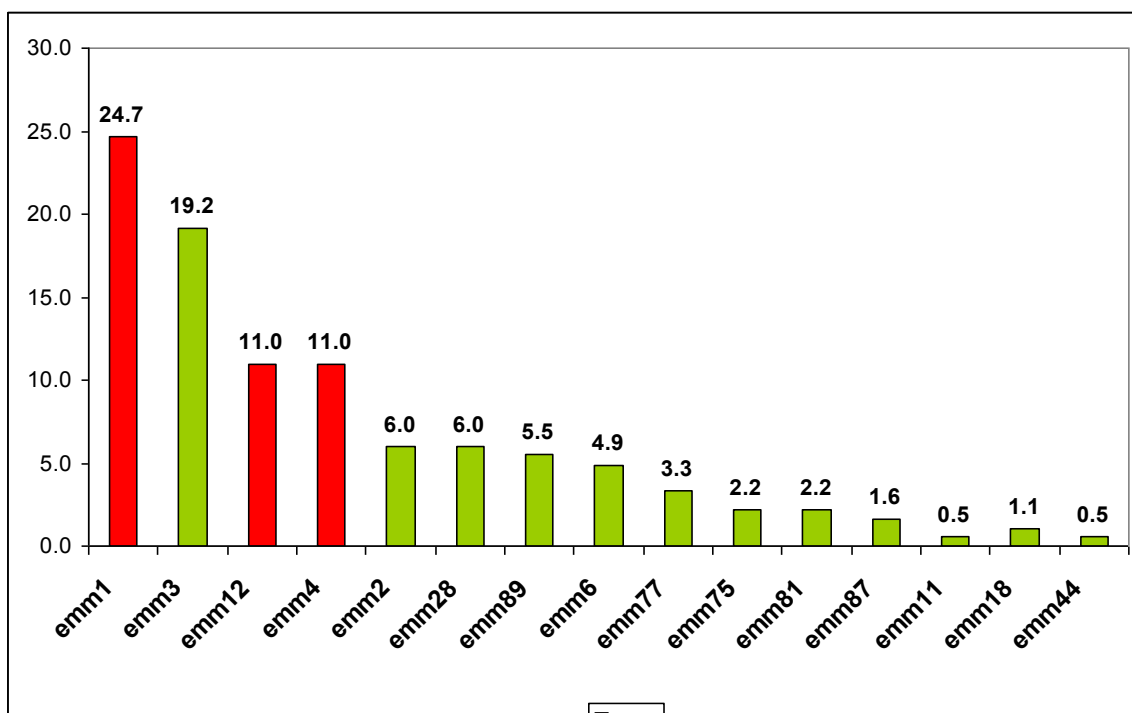


Фиг. 14. Разпространение на *emm*-типовете при *S. pyogenes* и диференциация между ревматогенни и неревматогенни генотипове (■ -ревматогенни; ■ -неревматогенни).

На **фиг. 15** 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

настоящото 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. 15. 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 *emm*-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 възпрепятства 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.

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

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

10.1. Честота на разпространение на установените кълъстери в страната

В настоящият дисертационен труд новата кълъстерна система за типизиране беше приложена към 182 изолата *S. pyogenes*. Нашите резултати показваха, че българските изолати принадлежат към 8 различни *emt*- кълъстера: А-С3 (n=45, 24.7%), Е4 (n=38, 20.9%), А-С5 (n=35, 19.2%), следвани от А-С4 (n=20, 11%), Е1 (n=20, 11%), Е6 (n=9, 4.9%), М6 (n=9, 4.9%), Е3 (n=4, 2.2%), cladeY (n=2, 1.1%) (**табл. 8**).

Настоящото проучване е първото в страната, в което се прилага „новата *emt*- кълъстерна система” за типизиране на *S. pyogenes* и едно от малкото в Европа до момента. Подобен епидемиологичен анализ е направен единствено в Гърция, където са установени 13 кълъстера, от които преобладаващи са: Е4, А-С3, А-С4, Е1 (Koutouzi F. et al. 2015).

При сравняване на българските кълъстери с тези в съседна Гърция и страните от Северна Америка, може да се види известно пропокриване на преобладаващите кълъстери, но е интересен фактът, че кълъстер А-С5, който е един от преобладаващите при нас (19.2%), в Гърция и Северна Америка се среща

много по-рядко, към него принадлежат само 7-9 % от щамовете (Koutouzi F. et al. 2015; Shulman S. et al. 2014). В страните от Тихиокеанският регион преобладаващите клъстери (D4, E3, E2, E6) (Baroux N. et al. 2014) не показват почти никакво сходство с тези получени в България, Гърция и Северна Америка

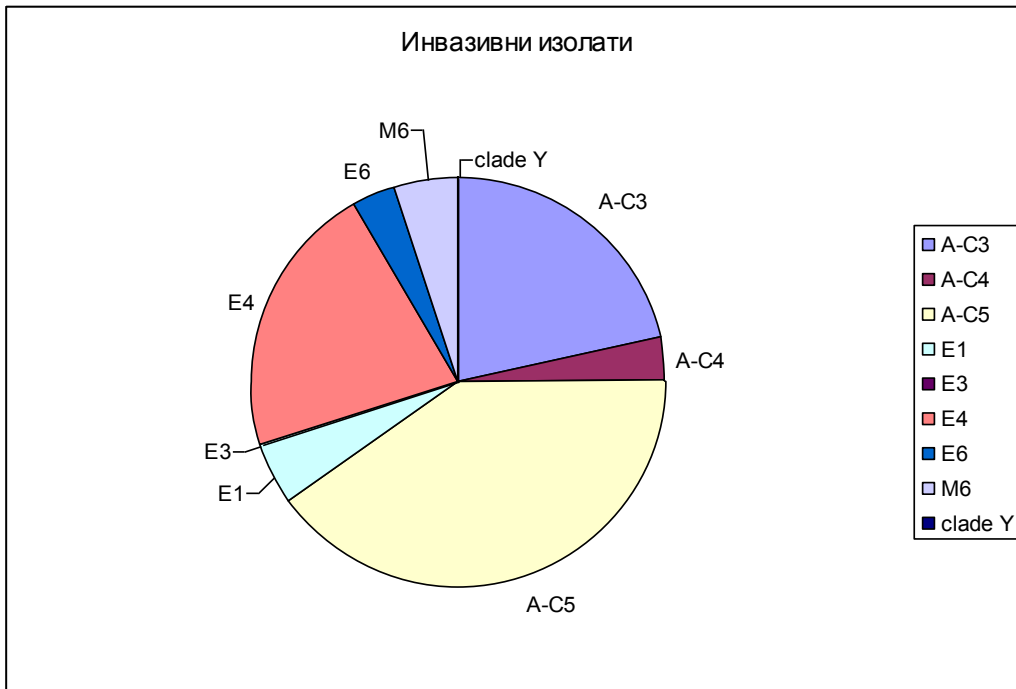
10.2. Честота на разпространение на преобладаващите клъстери при кожно-мукозни и инвазивни изолати *S. pyogenes*

В настоящото проучване също беше направен 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. 8 (фиг. 16)**

След извършване на подходяща статистическа обработка на получените от нас резултати беше установено, че клъстер А-С4 (*emm12*) се асоциира значително с кожните и мукозните изолати ($p < 0.05$), а клъстер А-С5 (*emm3*) се свързваше сигнификантно с инвазивни изолати.



a)



б)

Фиг. 16. Разпределение на клъстерите включващи *emt*- типове
 а) при кожно-мукозни изолати (n=122)
 б) Инвазивни изолати (n=60)

Таблица 8. Клъстерна система за епидемиологично охарактеризиране на щамове *S. pyogenes*, разделени на 2 групи.

<i>emm</i> клъстер/ <i>emm</i> - тип	Група I. Кожни и мукозни изолати n=122 (%)	Група II. Инвазивни изолати n=60 (%)	Общ брой n (%)	P
A-C3/ <i>emm</i> 1	32 (26.2)	13 (21.7)	45 (24.7)	0.5852
A-C4/ <i>emm</i> 12	18 (14.8)	2 (3.3)	20 (11.0)	<u>0.0224</u>
A-C5/ <i>emm</i> 3	11 (9.0)	24 (40,0)	35 (19.2)	<u>0.0001</u>
E1/ <i>emm</i> 4	17 (13.9)	3 (5.0)	20 (11.0)	0.0810
E3/ <i>emm</i> 44,87	4 (3.3)	0 (0.0)	4 (2.2)	0.3040
E4/ <i>emm</i> 2,28,77,89	25 (20.5)	13 (21.7)	38 (20.9)	0.8484
E6/ <i>emm</i> 11,75,81	7 (5.7)	2 (3.3)	9 (4.9)	0.7199
M6/ <i>emm</i> 6	6 (4.9)	3 (5.0)	9 (4.9)	1.0000
Clade Y/ <i>emm</i> 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. Анализирание 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 честотата на срещане на 21 фактора на вирулентност при *S. pyogenes* са представени в **табл. 9**.

Беше извършена статическа обработка на данните анализиращи връзката между преобладаващите в страната клъстери и суперантигените (**табл. 10**).

В настоящото проучване беше установено, че клъстер А-С3 се асоциира значително по- често със суперантигените *SpeA*, *speG*, *speJ*, докато клъстер Е4 се свързваше по-често със суперантигена *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 резултати са получени от Descheemaeker et al. 2000, които показват, че повечето изолати с *emm1* (А-С3) 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*.

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: *emm1*, *emm2*, *emm3*, *emm4*, *emm6*, *emm12*, *emm28*, *emm89* (**табл. 9**)

Тези данни показват, че причината в увеличаващата се макролидна резистентност в региона вероятно не се дължи на разпространение на определен клон, носител на *mef(A)*.

Настоящият дисертационен труд показва, че почти 87.5% (n=14/16) *ermB*⁺ щамове в страната принадлежат към единствен клон - *emm28.0* (табл. 11).

Единственото и последно прочуване за разпространението на *emm*-типозете сред макролид резистентните щамове *S. pyogenes* в България, за периода 1995- 2005г., показва, че щамозете като цяло са хетерогенни, без преобладаване на определен клон. Това проучване не установява *emm28*, сред макролид резистентните щамове в България (Decheva A. et al. 2006). Това ни показва, че този клон вероятно е внесен в страната от съседни Европейски страни, където през този период се докладва нараствена на макролидната резистентност свързана с мултирезистентен клон *emm28*. Първото съобщение за връзката между *ermB* и *emm28*, е направено в Белгия, през 2003г., където се установява, че 14 от 16-те изолирани макролид и бацитрацин - резистентни щамове *S. pyogenes*, са носители на *ermB* и принадлежат към *emm28* (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 *emm28* (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 - *emm28* (Mihaila-Amrouche L. et al. 2004), за който се счита че е основната причина за увеличаването на макролидната резистентност в региона (Bingen E. et al. 2004).

Табл. 11 показва, разпределението на *emm*-типозете 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 детерминанта по честота на разпространение сред макролид резистентните *S. pyogenes*. В настоящото проучване бяха типирани общо 13 *ermA*⁺ щамове, от които 5/13 (38%) принадлежаха към *emm12*, отново 5/13 щамове (38%) принадлежаха към *emm77* и 3/13 към *emm89*.

Въпреки хетерогенността, която се откриваше при *ermA*⁺ щамове, може да се каже, че типозете *emm12* и *emm77* бяха преобладаващи. Подобни

резултати са съобщавани и в Германия, където всички *ermA*⁺ били от тип *emm77*, а всички *ermB*⁺ от *emm28* (Reinert R. et al. 2003). Вероятната връзка между клон *emm77* 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 открили, както за *mefA* така и за *ermB* (Green M. et al. 2006; Banks D. 2003).

Таблица 9. Честота на разпространение на факторите за вирулентност при установените в проучваното *ett*- кълъстери

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

Таблица 10. Разпространение на суперантигените при преобладаващите в страната *emm*-кълъстери.

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

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

Таблица 11. Разпределение на *emm*- типове според гените определящи макролидната резистентност при *S. pyogenes*

<i>emm</i> - тип	Гени за макролидна резистентност					
	<i>mefA/E</i>		<i>ermA</i>		<i>ermB</i>	
	n	%	n	%	n	%
<i>emm1.0</i>	8	21	0	0	0	0
<i>emm2.0</i>	3	8	0	0	0	0
<i>emm3</i>	7	18	0	0	1	6
<i>emm4.0</i>	11	29	0	0	0	0
<i>emm6</i>	1	3	0	0	0	0
<i>emm12</i>	6	8	5	38	1	6
<i>emm28.0</i>	1	3	0	0	14	87.5
<i>emm77</i>	0	0	5	38	0	0
<i>emm89</i>	1	3	3	23	0	0
Общ брой	n= 38	100	n= 13	100	n= 16	100
	n= 67					

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. 17). Чрез този метод бяха секвенирани по 4 щама от най-разпространените в България *emm*- типове, а именно *emm1*, *emm3*, *emm4*, *emm12*, *emm28*, *emm77*, *emm6*, *emm89*. Получените от нас резултати от мултилокусното секвениране сравнени с *emm*- типове са представени в **табл.12**. Анализът на данните от MLST показва присъствие на 8 секвенционни типа (ST) в

изследваните щамове *S. pyogenes* в България. Резултатите получени с MLST на 32 щамове показваха пълно съвпадение с тези получени с *emm*-типизиране.

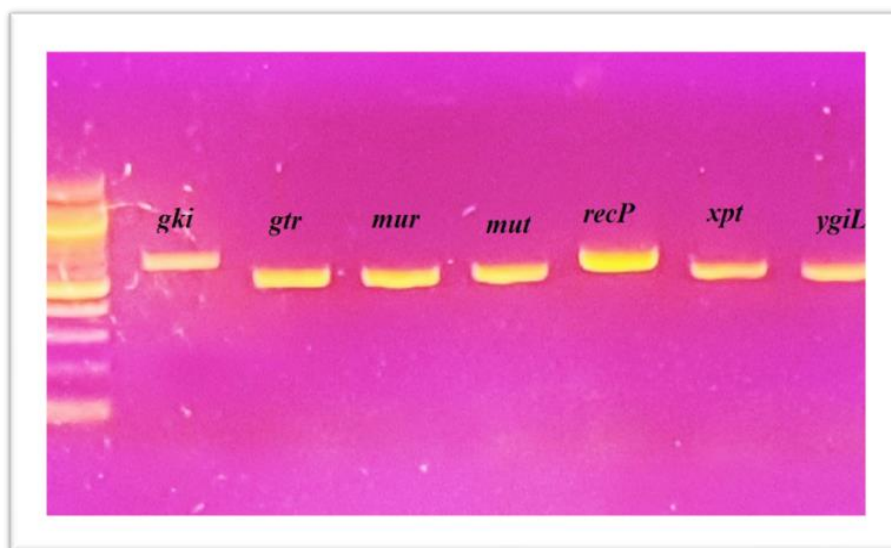
Таблица 12. Резултатите от MLST на 32 репрезентативни щамове *S. pyogenes* и тяхната връзка с *emm*-типозите.

Брой изследвани щамове	<i>emm</i> -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, *emm1* е най-често срещаният *emm*-тип както в България, така и в много други части от света (Luca-Narari B.etal. 2009). В нашето проучване всичките 4 щамове от *emm1* принадлежат към секвенционен тип ST28. Подобно на нашите резултати, в Испания и Норвегия всички циркулиращи щамове от *emm1* са от секвенционен тип ST28 (Montes M. et al. 2011; Meisal R. et al. 2010). За разлика от нас, в Австралия и Нова Зеландия, щамове принадлежащи към *emm1* са от секвенционен тип ST91, ST92, ST93, ST94 (Enright M. et al. 2001).

Всички тествани щамове от *emm3* бяха от секвенционен 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).

Изследваните щамове от *emm12* бяха определени като ST36, а от *emm4*-ST39. Тези резултати също показват съответствие с Испанските стрептококови клонове (Montes M. et al. 2011), но и с тези в Полша и Румъния (Szczyra K. et al. 2006; Luca-Narari B. et al. 2008).



Фиг. 17. 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 голям брой (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.

Извършени са проучвания върху 21 фактора на вирулентност от групите на токсините, ензимите и суперантигените и е установено, че гените *speB*, *speCep*, *sdaB* и *slo* се срещат в 100% от изследваните от нас щамове *S. pyogenes*, повече от 80% са носители на гените *таци 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 инфекциозен агент, показаха че българските изолати *S. pyogenes* все още остават чувствителни на пенцилини, но се наблюдава тревожна тенденция за нарастване на резистентността към MLS група, до стойности над 30% нечувствителни към макролиди през последните години. Резистентността 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 *emt*-типизиране, както и с MLST (мутилокусно секвениране). Установени са най-разпространените *emt*-типове циркулиращи в страната (*emt1,3,4,12,28,89*), преобладаващите клъстери (A-C3, E4, A-C5, A-C4, E1, E6, M6, E3, cladeY) и са открити два нови за света *emt* субтипа-*emt3.132* и *emt3.133*. 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 и наличието 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, съдържащи М-антиген за профилактика на инфекциите, причинени от *S. pyogenes*.

V. 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 докзване 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 резистентност при макролид резистентните щамове *S. pyogenes* в 79.2% беше *mefA* – самостоятелно (57.1%) или в комбинация с други два гена (22.1%): *ermA* и/или *ermB*. Втори по честота беше *ermB* 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 установяван *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 стрептококи 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*-кълъстера: А-С3, Е4, А-С5, А-С4, Е1, Е6, М6, Е3, cladeY.

7.1. Открити са за първи път в света два нови субтипа - *emm3.132* и *emm3.133*, депозирани в GenBankNCBI с номерата MG869722 и MG869723.

7.2 Интерес представлява, че 49.9% от установените генотипове (*emm1,3,6*) бяха ревматогенни, 46.7% са известни като нефритогенни и/или

ревматогенни, *emm3* се асоциира често с инвазивни инфекции, докато *emm12* се асоциира 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 А-С3, който включва и доминиращият *emm1* тип сред българските изолати *S. pyogenes*, имаше статистически значима положителна връзка със суперантигените *SpeA*, *speG*, *speJ*, докато клъстер Е4, който е вторият по-честота на разпространение в страната, се асоциираше сигнификантно със суперантигена *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.

VI. 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 щамове *S. pyogenes*. За първи път в изследваните изолати е доказан генът, кодиращ метилази - *ermB*, самостоятелно в 11.4% и в комбинация с *mefA* при 20% от макролид резистентните 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*-кльстери, с което са открити 15 различни *emm*-типа с преобладаване на типовете *emm1,3,4,12,28,89* и 8 различни *emm*-кльстера: А-С3, Е4, А-С5, А-С4, Е1, Е6, М6, Е3, cladeY.

4 За първи път в света са установени два нови субтипа - *emm3.132* и *emm3.133*, 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 А-С5 с инвазивните инфекции и клъстер А-С4 (*emm12*) с кожните и мукозните изолати.

5 Това е първото проучване, доказващо, че най-разпространеният клъстер в страната А-С3, който включва и доминиращият *emm1*, тип сред българските изолати *S. pyogenes*, има статистически значима положителна връзка със суперантигените *SpeA*, *speG*, *speJ*, докато клъстер Е4, който е вторият по честота на разпространение в страната се асоциираше сигнификантно със суперантигенът *speC*.

6 За първи път в България се установява *ermB*⁺ макролид-резистентни щамове от-*emm28* тип.

7 За първи път в България е извършено типизиране чрез MLST на *S. pyogenes* 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. pyogenese* 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.

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. (IF₂₀₁₇–2.022)

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 български изолати *Streptococcus pyogenes*. 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., **А. Мухтарова**, 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 български изолати *Streptococcus pyogenes*. 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 *Streptococcus pyogenes* 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 *Streptococcus pyogenes*. 15 Конгрес по Микробиология и Инфекции на БАМ, 18-20 май, София, България – **доклад**

6. Гергова Р., Петрова Г., **Мухтарова А.**, С. Гергов, И. Митов. (2017) Бърза диагностиката на *Streptococcus pyogenes* с RTPCR в 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 типирание 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**

Summary

During the period of five years (2013-2017) we have investigated the incidence and the etiological role of *Streptococcus pyogenes* in patients from different age groups with infections exposing various clinical manifestations. Two new molecular-genetic methods for fast direct detection of streptococcal etiology in the samples from patients were developed.

A total 445 non-duplicate clinical strains *S. pyogenes* isolated from patients with invasive and noninvasive infections were studied to evaluate the distribution of genetic elements, encoding 21 virulence factors and resistance to macrolides and tetracyclines, and to establish the circulation of different *emm* and sequence types (ST) in Bulgarian streptococcal isolates. All tested strains were showed that the presence of *speB*, *spyCep*, *sdaB*, *slo* and *speA*, *speF*, *speL*, *speM* ($p < 0.001$) were significantly more common in invasive isolates.

During the 5-year study period, the frequency of macrolide resistance in *S. pyogenes* was over 30%. The macrolide-resistance genotypes distribution was as follows: *mef(A)* at 51.1% alone and 22% in combination with *erm(B)*/or *erm(A)*, *erm(B)* at 11.4% alone and 20% in combination with *mef(A)*, and resp. *erm(A)* at 9.3% and 2% in combination with *mef(A)*. A total of 10.3% were tetracycline resistant and harbored ribosomal protection genes: *tet(M)* at 85%, *tet(O)* resp. 15%.

After the *emm*-genotyping by PCR and following sequencing 15 different *emm* types including 27 sub-types were identified. Two new subtypes for the world *emm3.132* and *emm3.133* were established (GenBank NCBI MG869722 and MG869723). The most prevalent *emm* types were *emm1* (24.7%), *emm3* (19.2%), *emm12*(11%) and *emm4* (11%). The *emm* types identified belong to 8 *emm*-clusters: A-C3, E4, A-C5, A-C4, E1, E6, M6, E3, cladeY. Cluster A-C3 was statistically significant associated with the genes for super-antigenes *SpeA*, *speG*, *speJ*, while cluster E4 with *speC*. The rheumatogenic *emm* types were comprised 49.9% and resp.

the nephritogenic ones 46.7% of characterized isolates. The predominant (87.5%) of *erm(B)* + strains were belonged to *emm28*. We were established by MLST 8 sequence types (ST28, ST15, ST39, ST36, ST52, ST63, ST382, ST847) in the studied *S. pyogenes* isolates.

The new proposed 26-valent and 30-valent anti-GAS vaccines can protect against 84.4% and resp. 100% of *emm* types that were detected in our survey.