

© А.Н. Суворов¹,
А.М. Савичева²,
А.В. Глушанова¹, К.А. Оганян²,
К.Б. Грабовская¹,
О.В. Алайцева¹,
С.Л. Зациорская²,
Д. Ферретти¹, О.Н. Аржанова²

НИИ экспериментальной медицины¹,
Санкт-Петербург;
НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта РАМН²,
Санкт-Петербург

АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ В НА НАЛИЧИЕ ГЕНОВ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АДГЕЗИНОВ, ЛОКАЛИЗОВАННЫХ НА «ОСТРОВАХ ПАТОГЕННОСТИ»

■ В работе осуществлен генетический анализ коллекции штаммов стрептококков группы В (СГВ) на наличие потенциальных генов адгезии и агрегации. Наличие генов, обозначенных как *sspB1* и *sspB2*, в геноме СГВ проверялось посредством ПЦР и ДНК гибридизации. Установлено, что штаммы СГВ существенно отличаются по содержанию и количеству в геноме данных генов, а сами гены гетерогенны. Установлена корреляция содержания генов *sspB1* и *sspB2* в геноме с развитием тяжелых СГВ патологий, сопровождающихся поражением мочевых путей. Корреляции наличия исследуемых генов с определенным серотипом СГВ не было обнаружено.

■ **Ключевые слова:** стрептококки группы В; гены *sspB1* и *sspB2*; ПЦР; ДНК гибридизация

Стрептококки группы В (СГВ), впервые обнаруженные в качестве возбудителей заболеваний крупного рогатого скота, стали рассматриваться в качестве патогенов человека относительно недавно [1, 2]. Однако исследования последних лет показали, что инфекция, вызванная СГВ, является наиболее частой причиной инфекционных заболеваний новорожденных, сопровождающейся такими осложнениями, как сепсис и менингит [6, 11]. В ряде стран мира СГВ вызывают смерть новорожденных чаще, чем другие бактериальные патогены [5]. Все это обуславливает интерес исследователей как к самому возбудителю, так и к путям предотвращения инфекции, вызванной СГВ. Одной из существенных проблем СГВ патологии является высокий процент бессимптомного носительства данного микроба во влагалище у женщин, который, по разным данным, варьирует от 30 до 60 [2]. Обнаружение СГВ в ампуле прямой кишки вообще рассматривается как вариант нормы. Причины, по которым в определенных случаях в организме новорожденных развивается специфический инфекционный процесс, неизвестны. Этим вызван интерес исследователей к изучению микробных факторов, которые способствуют возникновению заболевания. Исторически основным фактором патогенности СГВ считается полисахаридная капсула [7]. Доказана роль капсулы в обеспечении защиты микроба от фагоцитоза. Продемонстрирована также корреляция между принадлежностью СГВ к определенному серотипу по капсульному антигену (чаще всего III) и частотой возникновения инфекционных процессов у новорожденных. Однако наличие капсульного полисахарида определенного типа не может объяснить причин, по которым баланс взаимоотношений паразит–хозяин сдвигается в сторону тяжелой патологии. Изучение белковых факторов патогенности СГВ, таких как бета- и альфа-антигены и С5а-пептидаза, показало, что данные факторы, при всей своей значимости в формировании вирулентного фенотипа микроба не являются определяющими, так как либо содержатся у всех представителей стрептококков группы В (как С5а-пептидаза) [3], либо с их наличием не коррелирует степень тяжести СГВ патологий (как в случае с присутствием в геноме СГВ бета-С-белка) [1].

Проведенные в начале XXI века исследования по полному секвенированию геномов трех штаммов СГВ различных серотипов позволили обнаружить значительное количество ранее неизвестных поверхностных белков стрептококков, потенциально важных для реализации вирулентных свойств микроорганизма [8, 15]. Нео-

жиданностью явилось то, что большинство генов, кодирующих синтез данных белков, локализовались на «островах патогенности» — генетических структурах, которые за счет концевых повторяющихся последовательностей могут либо перемещаться из одного участка генома в другой, либо передаваться другим микроорганизмам.

В настоящей работе приводятся данные исследования клинических штаммов СГВ, на предмет содержания в их геноме двух генов потенциальных адгезинов, расположенных на «островах патогенности» *sspB1* и *sspB2*.

Материалы и методы исследования

В исследовании анализировались клинические штаммы стрептококков группы В, выделенные из влагалища и мочи беременных женщин, различных участков кожи или абортного материала, разных локусов новорожденных детей (носоглотка, конъюнктивы, подмышечные впадины, поверхность кожи вокруг пупка, кал и др.). Всего в работе исследовано 118 штаммов СГВ. Большинство клинических штаммов СГВ, использованных

в работе, были получены из клиники НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, 7 штаммов — из коллекции отдела молекулярной микробиологии НИИ экспериментальной медицины РАМН. 9 штаммов были получены из Пражского института микробиологии (6 инвазивных штаммов и 3 штамма от носителей). Штамм СГВ O9OR использовался в качестве положительного контроля на наличие генов *sspB1* и *sspB2*. Штаммы СГВ выращивались на кровяном агаре на основе среды Todd-Hewitt (ТН), Oxoid, США, после чего выращивались на ТН бульоне. Культивирование микроорганизмов проводилось при 37 °С.

Все проанализированные штаммы СГВ проверялись на наличие группового полисахаридного антигена, а затем серотипировались. Распределение штаммов по наиболее распространенным серотипам СГВ представлено в табл. 1.

Для выделения ДНК штаммы СГВ выращивались в ТН бульоне, после чего ДНК выделялась фенол-хлороформным методом по [12] либо методом экспресс-ПЦР [13]. ДНК праймеры, использованные для анализа штаммов методом по-

Таблица 1

Серотипы штаммов СГВ, использованных в работе

Источник получения штаммов *	Серотип I (а и в)	Серотип II	Серотип III	Серотип V и нетипируемые штаммы
НИИ акушерства и гинекологии 1	5	3	13	1
НИИ акушерства и гинекологии 2	3	1	6	1
НИИ акушерства и гинекологии 3	6	6	9	3
НИИ акушерства и гинекологии 4	12	7	14	12
Институт микробиологии (Прага)	3	1	3	2
НИИЭМ	3	1	2	1
Итого	32	19	47	20

* — Штаммы из НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта получались в разное время и анализировались партиями

Таблица 2

ДНК праймеры, использованные для ПЦР анализа штаммов СГВ

Название праймеров	Последовательность нуклеотидов 5–3	Ожидаемый размер продукта амплификации н.п.*
p420 p1202	ACAGGCCTATGAAACGAATATTAAGGTTACATCACGCAAAG	782
sspB1d sspB1r	GCGAACCAAGAAAAACAACTTATGATTGAGTGACGAGTGGG	643
sspB2-1d sspB2-1r	ACAACACTGATGCACAAGCTGAAGCCATCCTTGTTAGGAACATAA	786
sspB2-2d sspB2-2r	ATTGATGAAGCAGGTCAATCTGTTATCCATCCCCAAAATCAATC	466
sspB2-3d sspB2-3r	CCATTAACAGATTGACCTGCTTCTTATGTTGCTAACAAGGATGGCT	677
metR metD	GCTTAGCTATCGCTCCTGTGATTCCCTGAAACCAAGAGGTCATT	503
traIr traId	AGCGATTCTTCTCCTTCCCGCAGAAAGTCTTGGTCCAGC	255

* — При расчетах размеров ПЦР продуктов указаны данные, соответствующие нуклеотидной последовательности генома штамма NEM 316 [8]

лимеразной цепной реакции, представлены в табл. 2. ПЦР проводилась в аппаратах MJ Research (США) или Perkin Elmer (США) при условиях оптимизированных для каждой пары праймеров.

Результаты ПЦР оценивались после электрофореза в 1,2%-м агарозном геле в ультрафиолетовом освещении. Для документации результатов и обработки изображений пользовались системой видеозахвата UVP, (США) и программой Digi Doc-It.

Для подтверждения результатов ПЦР осуществлялась ДНК гибридизация с зондами, полученными на основе ПЦР продуктов контрольной ДНК СГВ, помеченных дигоксигенином (La Roche, США). Перенос ДНК на фильтры и постановка гибридизации осуществлялась по [12].

Результаты и их обсуждение

Появление электронных банков данных нуклеотидных последовательностей геномов микроорганизмов в последнее десятилетие обеспечило прорыв в понимании строения бактериальных и вирусных геномов. Появились и принципиально новые подходы к изучению механизмов патогенеза инфекционных заболеваний, основанные на знании структуры генома. Однако с появлением огромного массива новых данных о генетических структурах бактерий, принципиальных изменений в понимании ключевых звеньев патогенеза не произошло. Причина данного явления состоит в существовании пропасти между наличием информации в электронных банках данных и доказательствами ее биологической значимости. Данная ситуация вполне применима по отношению к исследованиям патогенеза заболеваний, вызванных стрептококками группы В. В банке данных нуклеотидных последовательностей GenBank в настоящее время присутствует информация о полных нуклеотидных последовательностях штаммов СГВ серотипа III NEM 316 и серотипа V 2603 [8, 15]. Имеется также частичная информация о геноме штамма первого серотипа O9O9. За три года с момента публикации данных секвенирования

концепция основных факторов патогенности СГВ не изменилась. Все так же основным фактором патогенности СГВ считается полисахаридная капсула, а из белковых факторов выделяют С5а-пептидазу, бета-гемолизин, альфа- и бета-С-протеины [10]. При этом данные выводы о факторах патогенности никак не соотносятся с клинко-эпидемиологическими исследованиями, посвященными изучению заболеваний, вызванных различными штаммами СГВ. В частности, широко известно, что наибольшее количество заболеваний новорожденных обусловлено III серотипом СГВ. При этом среди штаммов данного серотипа не обнаруживается бета-С-протеин [10], а С5а-пептидаза идентична таковой в СГВ других серотипов. Все это обуславливает необходимость поиска новых потенциально значимых факторов патогенности, значение которых в формировании эпидемически актуальных штаммов еще не исследовалось. В работе, посвященной секвенированию генома СГВ серотипа V [15], проводилось исследование экспрессии поверхностных белков СГВ. В результате было обнаружено более 300 белков, многие из которых кодируются генами, локализованными на так называемых «островах патогенности».

Задачей настоящего исследования явилось изучение клинических штаммов СГВ на предмет присутствия в геномах двух генов потенциальных адгезинов, условно обозначенных *sspB1* и *sspB2*. Ген *sspB1* был первоначально обнаружен нами в геноме штамма O9OR в результате анализа вычитающей библиотеки генов СГВ [14]. Причиной выбора данного гена и гена *sspB2* для молекулярно-эпидемиологического анализа, а также их обозначения, явился тот факт, что обнаруженные белки СГВ гомологичны белкам SspA, и SspB *S. gordonii* [4]. Позднее было выяснено, что данные белки также гомологичны широкому спектру бактериальных адгезинов и факторов агрегации: SpaP *S. mutans*, SpaA, *S. sobrinus*, поверхностному адгезину A, белкам Asa1 и ASP1 *E. faecalis*, PPaA *S. criteri*, Pas *S. intermedius* и ряду других белков. Учитывая важность процесса адгезии в инициации инфекционного процесса, наличие разнообразных адгезинов может быть критичным для распространения СГВ, которые помимо ампулы прямой кишки и влагалища в ряде случаев способны колонизировать уретру, мочеточник, ротовую полость и конъюнктиву. Другой, не менее важной особенностью адгезинов, гомологичных анализируемым белкам СГВ, является их участие в формировании секреторных путей V типа. Данный тип секреторных путей у ряда микроорганизмов участвует в активном транспорте биологических молекул

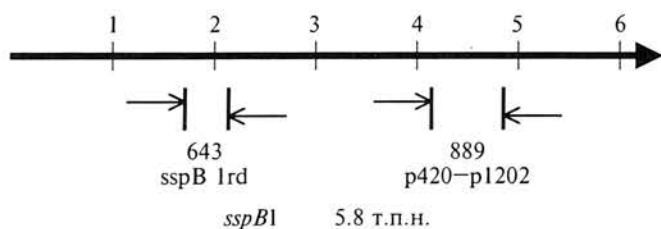


Рис. 1. Схема локализации ДНК праймеров на последовательности генов *sspB1* и *sspB2*

возбудителя (в первую очередь токсинов) в организм хозяина [9]. Анализ нуклеотидной последовательности генома СГВ NEM 316 позволил обнаружить одну копию гена *sspB1* и 3 копии *sspB2*. В геноме штамма серотипа V 2603 обнаруживалась только одна копия гена *sspB2* и отсутствовал *sspB1*. Учитывая возможное наличие гетерогенности отдельных областей генов *sspB1* и *sspB2*, для получения объективной картины ПЦР были использованы 2 пары праймеров, соответствующих гену *sspB1*, и три пары праймеров, соответствующих гену *sspB2* (рис. 1).

Проведенный анализ позволил установить, что из общего количества штаммов СГВ ген *sspB1* был обнаружен в 24 (20,3 %) штаммах из 118, а ген *sspB2* в 61 (51,6 %) штамме. При этом частота обнаружения данных генов мало зависела от серотипа СГВ. Ген *sspB1* с одинаковой частотой (28 %) обнаруживался в штаммах серотипов I и III и несколько реже среди нетипируемых штаммов

и штаммов серотипа II. Наибольшая частота обнаружения гена *sspB2* была отмечена в штаммах серотипа III (58 %), однако, учитывая тот факт, что в ряде случаев микробный материал был выделен из различных участков одного и того же пациента, данные отличия скорее характеризуют тенденцию, чем истинную корреляцию определенного серотипа СГВ с наличием исследуемых генов. Применение группы праймеров в данном исследовании основывалось на предположении, что гены предполагаемых адгезинов характеризуются гетерогенностью. Данное предположение подтвердилось полностью. Так, например, при анализе первой партии штаммов из НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН с обеими парами праймеров на ген *sspB1*, выбранными для анализа, прореагировали лишь 2 штамма из 16 положительных, а со всеми тремя парами праймеров на ген *sspB2* — только 5 из 28. При этом в результате амплификации с праймерами на ген

Таблица 3

Штаммы СГВ из I-й партии штаммов НИИ акушерства и гинекологии, содержащие ген *sspB2*

№	№ в коллекции	Праймеры SspB 2-1	Размер ДНК фрагмента	Праймеры SspB 2-3	Размер ДНК фрагмента	Праймеры SspB 2-2	Размер ДНК фрагмента
1	090R	+	600, 780	+	670	+	460
2	10244-д1	+	600	+	670	+	460
3	7129эн	+	600	+	670	+	460
4	277	+	600	+	670	+	460
5	11471-д1	+	600, 780	+	670	+	460
6	92-эн	+	600	+	670	—	
7	11806	+	780	+	670	—	
8	3540-д2	+	600, 780	+	670	—	
9	10470-д1	+	600, 780	+	600	—	
10	11982	+	780	+	900, 670, 300	—	
11	12583-д1	+	600, 780	+	900, 670, 300	—	
12	10270-д1	—		+	670	+	840
13	11360	—		+	670	+	460
14	3сек	+	600	—		—	
15	238	+	600	—		—	
16	7293	+	600	—		—	
17	273	+	600	—		—	
18	12243-д1	—		—		+	460
19	3751	—		—		+	460
20	4306-до	—		+	900, 700, 300	—	
21	3445-д1	—		+	900, 700, 300	—	
22	123376-д1	—		+	670	—	
23	714-д1	—		+	670	—	
24	7130эн	—		+	600	—	
25	11312-д1	—		+	670	—	
26	7380	—		+	670	—	
27	7294	—		+	670	—	
28	1828	—		+	670	—	

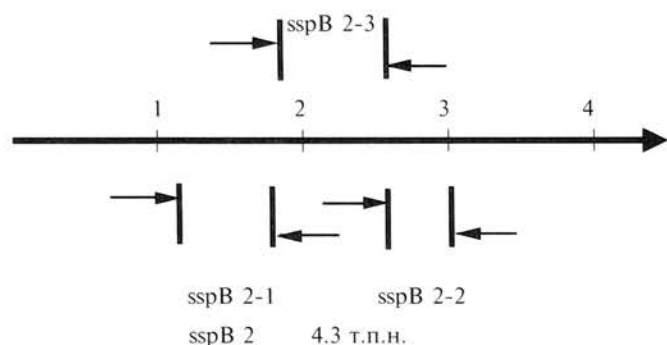


Рис. 2. Гибридикация ДНК зонда, полученного в результате ПЦР с геном *sspB2* (праймеры *SspB2-3rd*) с хромосомами ДНК СГВ различных серотипов после гидролиза хромосомных эндонуклеазой *EcoRI*. ДНК зонд метили дезоксибенинином La Roche, США. Детекцию фрагментов осуществляли при помощи набора Genius, La Roche. Треки 1, 2, 3, 4 соответствуют участкам нанесения хромосомных ДНК II, III, III^R и IV серотипов

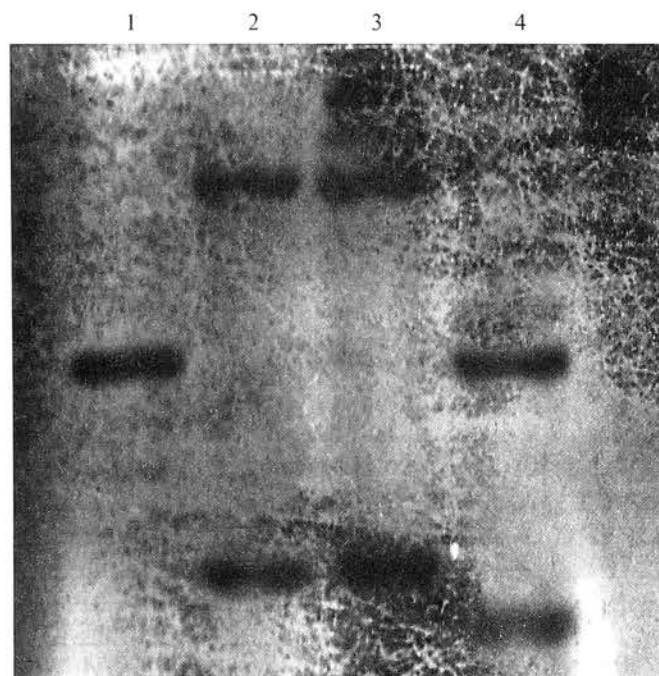


Рис. 3. ДНК гибридикация хромосомной ДНК СГВ различных серотипов, гидролизованной эндонуклеазой *E.coRI* с геном *sspB2*. Номера треков (1, 2, 3, 4) соответствуют нанесенным ДНК СГВ II, III, III^R и IV серотипа. В качестве ДНК зонда использовался ПЦР продукт амплификации ДНК СГВ 090R с праймерами *sspB2-3rd*

sspB2 во многих случаях образовывалось более одного фрагмента ДНК, отражающих присутствие нескольких копий данного гена (табл. 3).

Данное наблюдение также подтвердили и результаты гибридикации, указывающие на наличие нескольких копий данного гена в геноме (рис. 2, 3).

Наиболее интересной частью исследования явилось сопоставление диагноза и места выделения СГВ с частотой присутствия генов в геноме. Оказалось, что из штаммов, выделенных из мочевых путей или мочи, 38 % содержали ген *sspB1* и 63% содержали ген *sspB2*, что существенно превышало частоту выделения штаммов, полученных от носителей. Единственный штамм СГВ, выделенный из фасций (предположительно «некротический фасциит»), содержал в геноме оба исследуемых гена. Аналогичная тенденция наблюдалась и при анализе штаммов, полученных из Чехии. Гены *sspB1* и *sspB2* обнаруживались только в случае инвазивных штаммов, выделенных из крови, и в одном случае при выделении с конъюнктивы.

Полученные результаты анализа клинических штаммов СГВ позволяют сделать предположение о неслучайном характере распределения генов потенциальных адгезинов СГВ *sspB1* и *sspB2*, а также о возможной роли белковых продуктов данных генов в процессе «освоения» условно-патогенным паразитом, к которым относится СГВ, новых экологических ниш в человеческом организме. В этой связи представляется целесообразным более детальное исследование пациентов — носителей СГВ на предмет содержания в геноме данных потенциальных генов патогенности.

Литература

1. Adderson E.E., Takahash S., Wang Y. et al. Subtractive hybridization identifies a novel predicted protein mediating epithelial cell invasion by virulent serotype III group B *Streptococcus agalactiae* // Infect. Immun. — 2003. — Vol. 71. — P. 6857–6863.
2. Bake C.J. and Edwards M.S. Group B streptococcal infection. In Infectious diseases of the fetus and the newborn infant // Remington J.S. and Klein J.O. eds. (Philadelphia: W.B. Saunders Company). — 1995. — P. 980–1054.
3. Chmouyrgina I., Suvorov A.N., Ferrieri P. et al. // Infect. Immun. — 1996. — Vol. 64. — P. 2387–2390.
4. Demuth D.R., Duan Y., Brooks W. et al. Tandem genes encode cell-surface polypeptides SspA and SspB which mediate adhesion of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* to human and bacterial receptors // Mol. Microbiol. — 1996. — Vol. 20. — P. 403–413.
5. Embleton N., Wariyar U., Hey E. et al. Mortality from early onset group B streptococcal infection in the United Kingdom // Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal. Ed. — 1999. — Vol. 80. — P.139–141.
6. Gardam M.A., Low D.E., Saginur R. et al. Group B streptococcal necrotizing fasciitis and streptococcal toxic shock-like syndrome in adults // Arch. Intern. Med. — 1998. — N 24. — Vol. 158. — P. 1704–1708.
7. Gibson R.L., Lee M.K., Soderland C. et al. Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion // Infect. Immun. — 1993. — Vol. 61. — P. 478–485.
8. Glaser, Rusniok C., Buchrieser C. et al. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive

- neonatal disease // *Molec. Microbiol.* — 2002. — Vol. 45. — P. 1499–1514.
9. Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Desvaux M. et al. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2004. — Vol. 68. — P. 692–744.
 10. Kong F., Gowan S., Martin D. et al. Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes: relationship to molecular serotypes // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40. — P. 620–626.
 11. Lukacs S.L., Schoendorf K.C., Schuchat A. et al. Trends in sepsis-related neonatal mortality in the United States, 1985–1998 // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 2004. — Vol. 23. — P. 599–603.
 12. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* — Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: NY, 1982. — P. 1–545.
 13. Suvorov A.N., Sverdlova A., Totolian A.A. et al. // *Med. Microbiol. Lett.* — 1996. — Vol. 4. — P. 341–345.
 14. Suvorov A.N., Ferretti J.J. Construction of a GBS-GAS DNA subtraction library allows discovery of previously unidentified GBS genes and rapid location of unique regions on the GBS chromosome // *J. Basic Microbiol.* — 2004. — Vol. 44. — P. 66–74.
 15. Tettelin H., Massignani V., Cieslewicz M.J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99. — P. 12391–12396.

THE ANALYSIS OF GROUP B STREPTOCOCCAL CLINICAL STRAINS FOR THE PRESENCE OF THE GENES ENCODING FOR POTENTIAL ADHERENCE FACTORS AND LOCALIZED ON THE «PATHOGENICITY ISLANDS»

Suvorov A.N., Savicheva A.M., Glushanova A.V., Oganyan K.A., Grabovskaya K.B., Zatsiorskaya S.L., Alaiceva O.V., Ferretti J., Arjanova O.N.

■ **Summary:** The collection of group B streptococcal clinical strains has been analyzed for the presence of genes encoding for putative adherence and aggregation factors. The presence of the genes designated as *sspB1* and *sspB2* were tested by PCR and DNA hybridization. The genes under study located in GBS genome on “pathogenicity islands” were found to be heterogeneous and could be associated with urological or invasive diseases. No significant correlation between the GBS serotype and *sspB* genes pattern have been discovered.

■ **Key words:** group B streptococci; *sspB1* and *sspB2* genes; PCR; DNA hybridization