

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Васильева Василиса Андреевна

Генотипические и фенотипические характеристики штаммов *Streptococcus agalactiae*, выделенных у беременных женщин и новорожденных детей

Выпускная квалификационная работа бакалавра

по направлению подготовки 020400

основная образовательная программа бакалавриата «Биология»

профиль «Клеточная и молекулярная биология»

Работа выполнена в НИИ
акушерства, гинекологии и
репродуктологии им. Д. О. Отта,
лаб. микробиологии

Научные руководители:

ст. преподаватель каф. микробиологии СПбГУ **Коженкова Елена Васильевна**

ст. научный сотрудник лаб. микробиологии НИИ АГиР им. Отта **Шалепо Кира Валентиновна**

Санкт-Петербург

2019

Оглавление

Список сокращений	3
Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	5
1.1. Систематическое положение и биологические свойства <i>Streptococcus agalactiae</i> .	5
1.2. Факторы вирулентности СГВ	8
1.3. Серотипы, сиквенс-типы и клональные комплексы СГВ	11
1.4. Клиническая значимость СГВ-инфекций	13
1.5. Профилактика СГВ-инфекции	15
Глава 2. Материалы и методы	18
2.1. Штаммы <i>S. agalactiae</i> и условия их культивирования	18
2.2. Подготовка культуры для определения чувствительности к антибиотикам.....	20
2.3. Определение чувствительности к антибиотикам.....	20
2.4. Выделение ДНК.....	21
2.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	22
2.6. Линейный электрофорез в агарозном геле	25
2.7. Статистическая обработка данных	25
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	26
3.1. Резистентность к антибиотикам	26
3.2. Распределение генных локусов, кодирующих фимбрии СГВ	30
3.3. Распределение типов капсульных полисахаридов.....	34
3.4. Комбинации факторов вирулентности.....	36
Выводы	38
Список литературы.....	39

Список сокращений

СГВ – стрептококки группы В

CPS – (сокр. англ. capsular polysaccharide) капсульный полисахарид

ЛТК – липотейхоевые и тейхоевые кислоты

MLST – (сокр. англ. multilocus sequence typing) мультилокусное сиквенс-типирование

ST – (сокр. англ. sequence type) сиквенс-тип

СС – (сокр. англ. clonal complex) клональный комплекс

MALDI-TOF – тандемный времяпролетный масс-спектрометр с матричной лазерной десорбцией/ионизацией

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Введение

Streptococcus agalactiae (стрептококки группы В, СГВ) являются основной причиной неонатального сепсиса и менингита, а также вызывают инфекции у беременных женщин, новорожденных детей, пожилых людей и людей с ослабленным иммунитетом [1, 2]. В качестве профилактики неонатальной инфекции, вызванной стрептококками группы В, с 1990-х годов и по сегодняшний день используют интранатальное внутривенное введение антибиотиков инфицированным женщинам [3]. Несмотря на то, что этот метод профилактики показал свою эффективность, со временем его использование перестало приводить к снижению заболеваемости [4]. Кроме того, если СГВ остается полностью чувствительным к пенициллину и ампициллину (препараты первой линии для антибиотикопрофилактики), то антибиотикорезистентность к некоторым альтернативным препаратам, используемым при аллергии на пенициллин (макролидам и клиндамицину), неуклонно растет. Для получения более эффективного метода профилактики начались разработки профилактических вакцин на основе капсульного полисахарида (capsular polysaccharide, CPS), белков фимбрий и других факторов вирулентности СГВ [5]. Эту задачу осложняет широкое разнообразие каждого типа мишени для вакцины, а также то, что распределение разных типов факторов вирулентности СГВ отличается в разных странах и может изменяться со временем.

Трудности разработки эффективных мер профилактики СГВ-инфекций связаны как с гетерогенностью и динамичностью генетического состава популяций СГВ, так и с отсутствием актуальных эпидемиологических данных для многих стран/регионов мира, включая Российскую Федерацию. Целью данного исследования стало изучение клинически значимых характеристик штаммов *S. agalactiae*, выделенных от беременных женщин и новорожденных детей в Санкт-Петербурге. Для достижения этой цели были поставлены задачи:

- 1) Выявление резистентности к антибиотикам, применяемым при СГВ-инфекциях (пенициллин, клиндамицин, эритромицин и ванкомицин);
- 2) Оценка распределения генов факторов вирулентности (фимбрий и капсульного полисахарида) среди клинических изолятов *S. agalactiae*;
- 3) Оценка изменчивости этих показателей в течение последних 8 лет посредством сравнения штаммов СГВ, выделенных в периоды 2010-2011 и 2017-2018 гг.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Систематическое положение и биологические свойства

Streptococcus agalactiae

Streptococcus agalactiae относится к филе XIII *Firmicutes*, классу “*Bacilli*”, порядку “*Lactobacillales*” и семейству *Streptococcaceae*. К роду *Streptococcus* относится 56 видов. [6].

Существует несколько подходов к классификации представителей рода *Streptococcus*, созданных для упрощения их идентификации внутри рода. Первая попытка дифференцировать стрептококки была предпринята Шоттмюллером в 1903 году [7], он предложил классификацию на основе способности стрептококков к гемолизу при росте на среде с бараньими эритроцитами. Позднее Браун [8], руководствуясь этим признаком, выделил три группы стрептококков: альфа-гемолитические, бета-гемолитические и гамма-стрептококки. Альфа-гемолитические стрептококки образуют вокруг колоний на кровяном агаре зеленоватое кольцо неполного гемолиза, гамма-стрептококки не проявляют гемолитической активности, а бета-гемолитики образуют прозрачное кольцо полного гемолиза, диаметр которого в 2-4 раза больше диаметра колонии и варьирует у разных видов. Однако существует и специфический β -гемолиз, свойственный только *S. agalactiae*, в результате которого формируется очень узкое кольцо лизиса эритроцитов (рис.1).



Рисунок 1. Культура *Streptococcus agalactiae* на кровяном агаре.

В 1932 году Ребекка Ленсфилд (Lansfield) [9] предложила метод серологической дифференциации гемолитических стрептококков (α и β) на основе реакции преципитации С-субстанции – рамнозосодержащего полисахарида клеточной стенки. В соответствии с этим методом стрептококки были разделены на 20 групп, которые обозначены заглавными буквами латинского алфавита от А до Н и от L до V. В большинстве Ленсфилдских групп оказалось несколько видов стрептококков, однако группа В включает только *S. agalactiae*, поэтому понятие «стрептококки группы В» или СГВ стало синонимом названия этого вида и широко используется в современной литературе.

Наконец, в 1937 году Шерман [10] разделил стрептококков на четыре группы: пиогенные (β -гемолитические стрептококки групп А, В, С, F, G), зеленыящие (не проявляют β -гемолиз), молочные и энтерококки. Для этого он применял тесты на ферментацию и устойчивость, оценивая наличие или отсутствие роста при таких условиях как: температура 10°C и 45°C; 6,5% содержания соли в среде; значения рН среды 9,6; 40% содержание желчи; рост в молоке с 0,1% содержанием метиленового синего и прогревание при 60°C в течение 30 минут.

Впервые *S. agalactiae* был описан, как возбудитель бычьего мастита еще в 1896 году (Lehmann и Neumann), однако интерес к нему появился лишь после 70-х годов XX века, когда резко участились случаи заболеваний, вызванных СГВ, среди людей. Иногда СГВ встречаются в составе микробиома других млекопитающих – грызунов, верблюдов, а также хладнокровных животных – рыб и лягушек [11].

S. agalactiae имеют сферические или овоидные клетки от 0,6 до 1,2 мкм в диаметре, агрегированные в длинные цепочки. Клетки неподвижны и не формируют эндоспор. Стрептококки являются каталазоотрицательными хемоорганогетеротрофами с ферментативным метаболизмом, при котором углеводы сбраживаются преимущественно с образованием молочной кислоты без выделения газа. Для идентификации *S. agalactiae* используют их способность к синтезу САМР фактора (порообразующий гемолизин) [12], который связывается с мембраной эритроцитов, измененной сфингомиелиной *Staphylococcus aureus*, что приводит к усилению лизиса эритроцитов, однако САМР-тест не является полностью специфичным, поскольку САМР фактор был обнаружен также у стрептококков групп С, F и G [12]. СГВ быстро растут на кровяном агаре и, хотя большинство штаммов проявляют специфический β -гемолиз, существуют также α -гемолитические и негемолитические штаммы. [6]. СГВ гибнут при высоких

температурах, воздействии УФ-облучения и многих антисептиков, но длительное время сохраняют жизнеспособность после высушивания [13].

Интерес представляют поверхностные клеточные структуры *S. agalactiae*, которые позволяют им с одной стороны бессимптомно колонизировать хозяина на протяжении долгого времени, а с другой – быстро переключаться на инвазивный путь развития. Кроме свойственных грамположительным бактериям клеточной мембраны и толстого слоя пептидогликана, оболочка СГВ имеет групповой полисахарид, гиалуроновую капсулу, поверхностные белки, липотейхоевые и тейхоевые кислоты (ЛТК).

ЛТК представлены полимером d-аланина и полиглицерофосфата, они ковалентно связаны с клеточной мембраной и пронизывают клеточную стенку и капсулу. Групповой полисахарид, на основе которого были сформированы Лендсфилдские группы стрептококков, состоит из остатка рамнозы, галактозы, N-ацетилглюкозамина и глюцитыла. Они формируют четыре разных олигосахаридных комплекса, связанных между собой фосфодиэстерными связями, формируя разветвленную структуру и подерживая ригидность клеточной стенки [14]. Поверхностные белки, представленные в большом разнообразии, обеспечивают адгезию клетки к внеклеточному матриксу и клеткам хозяина, защиту от фагоцитоза, взаимодействуют с белками крови и другими бактериями. Поверхностные фибриллярные белки связываются с клеточной стенкой С-терминальным концом с помощью сортаз, распознающих аминокислотный LPXTG мотив, а их N-конец находится снаружи [15].

S. agalactiae имеет максимальный размер генома среди секвенированных стрептококковых геномов - 2,21 Мбр [6] и подвержен многочисленным рекомбинационным событиям [16]. Геном СГВ делят на кор-геном и суб-геном. Кором называют ту часть, которая встречается у всех штаммов, чьи геномы были полностью секвенированы, она занимает 72-89 % генома СГВ, а суб-геном специфичен только для нескольких или одного конкретного штамма, в нем содержатся гены, определяющие такие свойства, как устойчивость к антибиотикам, синтез токсинов, адгезинов и др. [17].

1.2. Факторы вирулентности СГВ

S. agalactiae имеет множество факторов вирулентности, среди которых выделяют молекулы клеточной адгезии, которые делятся две группы. Первая группа – белки адгезии к внеклеточному матриксу, к ним относят фибриноген-связывающие белки (сокр. англ. fibrinogen-binding proteins, Fbs), ламинин-связывающий белок (сокр. англ. laminin-binding protein, Lmb), С5а-пептидазу СГВ (сокр. англ. group B streptococcal С5а peptidase, ScpB) и стрептококковый фибронектин-связывающий белок А (сокр. англ. streptococcal fibronectin-binding protein A, SfbA) [18]. Вторая группа молекул клеточной адгезии – белки адгезии к клетке хозяина. К ним относятся иммуногенный бактериальный адгезин (сокр. англ. immunogenic bacterial adhesin, BibA) и гипервирулентный адгезин (сокр. англ. hypervirulent adhesin, HvgA) [18].

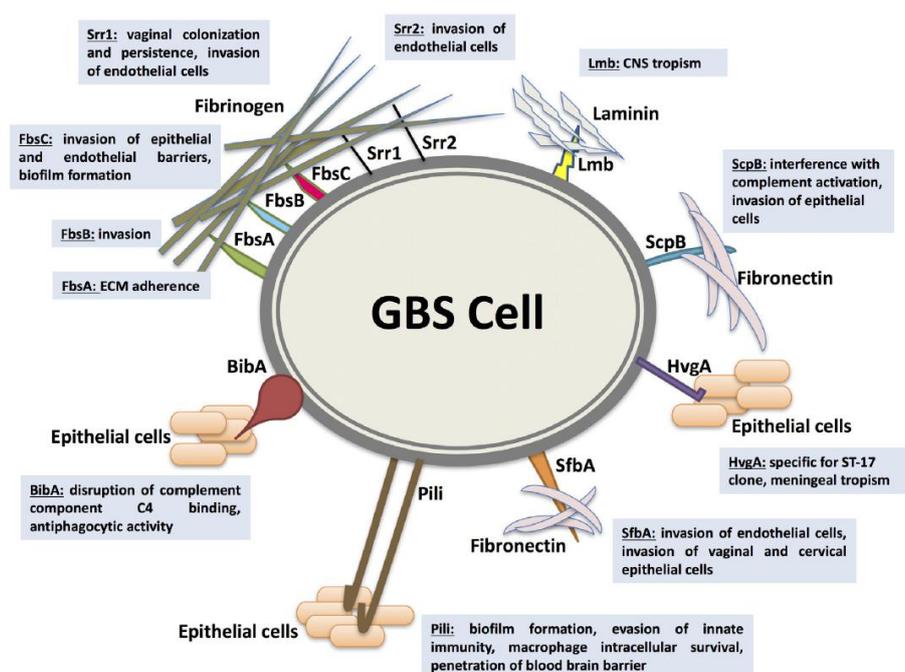


Рисунок 2. Основные адгезины, способствующие взаимодействию *Streptococcus agalactiae* с клетками хозяина (по Shabayek и Spellerberg 2018).

К наиболее важным факторам вирулентности относят капсульный полисахарид (CPS) и белки, образующие фимбрии [19]. Изучению CPS посвящено множество работ, так как он является первой структурой, с которой сталкивается иммунная система хозяина, а соответственно, обладает высокими иммуногенными свойствами и вариабельностью. На основе типов капсульных полисахаридов выделяют серотипы СГВ.

Долгое время рассматривали 9 серотипов: Ia, Ib, II – VIII, но относительно недавно был выделен десятый – IX, представителей которого прежде относили к типу Ib [20].

У всех серотипов в составе капсульного полисахарида встречаются глюкоза (Glc_p), галактоза (Gal_p) и N-ацетилнейраминная кислота (NeurNAc). Однако встречаются и серотип-специфические мономеры: N-ацетилглюкозамин (Glc_pNAc) был обнаружен в составе капсулы всех серотипов, кроме VI и VIII, а рамноза содержится только в капсуле серотипа VIII.

Существует 2 основных мотива повторяющейся полисахаридной единицы (polysaccharide repeat unit, PRU), которые выявляются в составе CPS. Первый мотив представляет собой дисахарид β-D-Galp-(1-4)-β-D-Glcp и встречается у всех серотипов. Вторым мотивом – варибельный трисахарид β-D-NeurNAc-(2a3)-β-D-Galp-(1-4) [или (1-3)]-β-D-GlcpNAc (или β-D-Glcp). На рисунке 4 представлены структуры PRU девяти серотипов СГВ. Первый мотив схематично обозначен как круг, состоящий из синей и красной частей, второй – как такой же круг с сиреневым квадратом. На данной схеме наглядно показаны PRU разных серотипов, их сходства и различия, а также отражено, что серотип Ib, возможно, является комбинацией серотипов Ia и VI [21]. Синтез PRU обеспечивается гликозилтрансферазами и полимеразми (Cps белками).

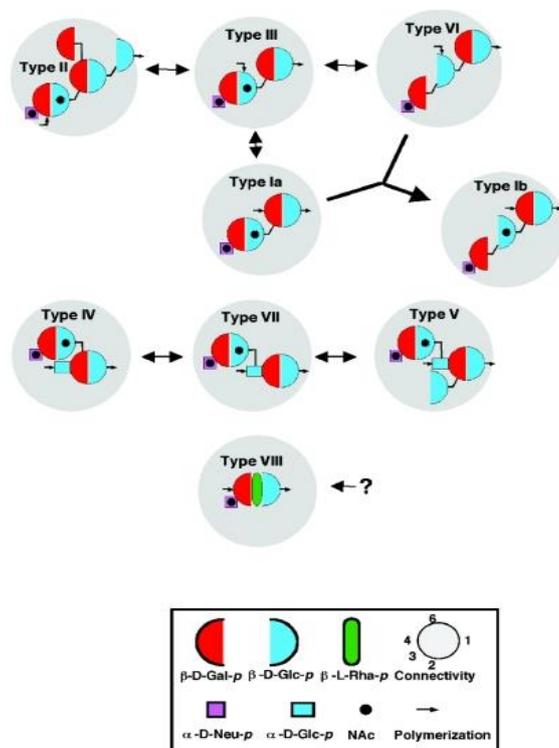


Рисунок 3. Структуры повторяющихся полисахаридных единиц 9 серотипов СГВ (по Cieslewicz *et al.*, 2005).

У всех серотипов СГВ гены серотип-специфичных гликозилаз и полимераз находятся в капсульном локусе (*cps*), включающем гены *cpsA-cpsL*, продукты которых необходимы на разных этапах синтеза капсульных полисахаридов. Капсульный локус фланкирован с одной стороны генами ферментов, которые синтезируют и активируют сиаловую кислоту; с другой стороны – генами, которые, предположительно, кодируют белки экспорта полисахарида [21].

Второй важный фактор вирулентности СГВ – фимбрии. Они позволяют СГВ избегать фагоцитоза и способствуют адгезии бактериальных клеток к эпителиальным клеткам в организме хозяина [22]. Фимбрии грамположительных бактерий долго не удавалось обнаружить, что связано с их структурой: они очень тонкие и короткие по сравнению с фимбриями грамотрицательных бактерий. Фимбрии СГВ были открыты лишь в 2005 году [23], их опероны находятся в геномных островках (*pilus islands*, PIs): PI-1 и PI-2, каждый из которых имеет две аллели: а и b [24, 25] (рис. 4). Одну из аллелей локуса PI-2 имеют все штаммы СГВ, этот островок находится в основной части их генома. PI-1 же может сочетаться с PI-2, а может отсутствовать, так как кодируется в составе профага [24]. PI кодируют три типа структурных белков: основной белок (*backbone protein*, BP), формирующий нить фимбрии и два вспомогательных белка (*ancillary proteins*, AP) – AP1 и AP2, которые располагаются на конце и в основании фимбрии соответственно. Наиболее важные из этих белков – BP и AP1, поскольку именно они индуцируют синтез антител в организме хозяина [26]. Сборку фимбрий грамположительных бактерий катализируют сортазы класса С, которые кодируются в одном опероне с BP и AP. Сортазы С распознают сигнальный аминокислотный мотив каждого типа белков и ковалентно связывают субъединицы структурных белков, а сортазы А заякоривают основание фимбрии в пептидогликане [27].

На сегодняшний день можно выделить шесть потенциально возможных типов фимбрий СГВ: PI-2a или PI-2b по отдельности, PI-1a + PI-2a, PI-1b + PI-2a, PI-1a + PI-2b и PI-1b + PI-2b. Аллель PI-1b была открыта лишь в 2017 году, поэтому данных о частоте встречаемости генотипов PI-1b + PI-2a и PI-1b + PI-2b пока нет, но, вероятно, она не велика [25]. Распространение остальных генотипов варьирует в разных регионах и странах. В Европе наиболее распространенными типами являются PI-1a + PI-2a и PI-1a + PI-2b, чуть менее

распространен тип PI-2a и достаточно редко встречается PI-2b [28, 29]. В то же время в Южной Африке и Китае самые распространенные типы фимбрий PI-1a + PI-2b и PI-2a соответственно [30, 31]. К сожалению, данные о распространении типов фимбрий СГВ, циркулирующих в России, на данный момент отсутствуют.

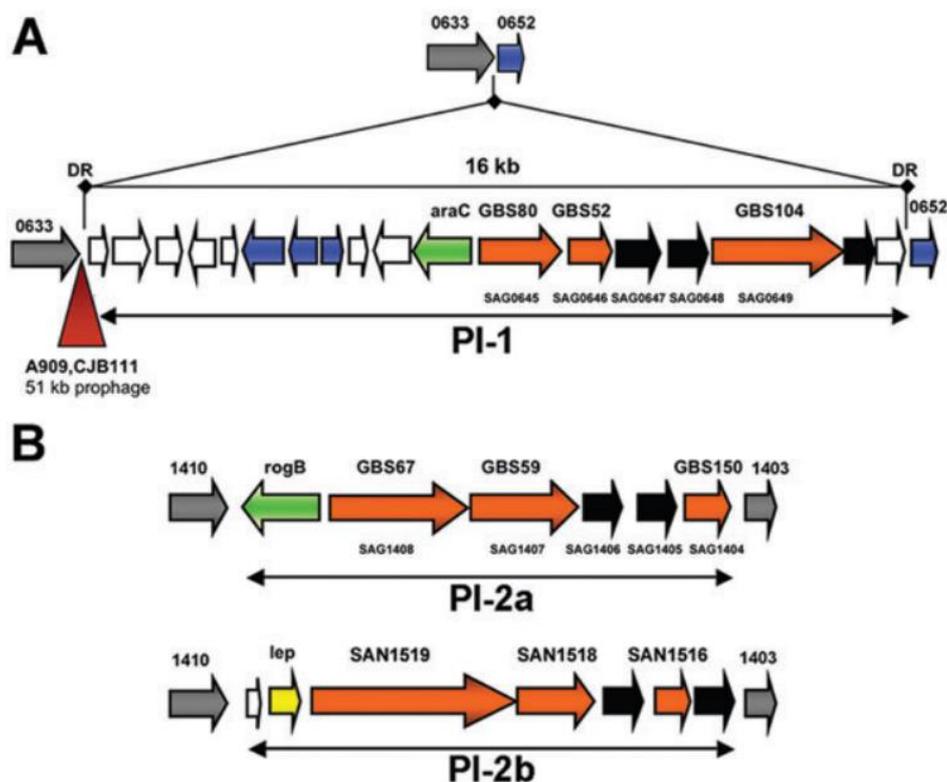


Рисунок 4. Генетическая организация локусов, кодирующих белки фимбрий *S. agalactiae* (по Rosini et. al., 2006)

А – Локус 1

В – Локус 2

Значения цветов: оранжевый – гены ВР (GBS80, GBS67 и SAN1519) и АР (остальные); зеленый – регуляторы транскрипции; черный – сортазы; серый – консервативные фланкирующие гены; желтый – сигнальная пептидаза; синий – мобильные элементы. Тип PI-1b был открыт позже и отличается от PI-1 только геном основного белка (ВР).

1.3. Серотипы, сиквенс-типы и клональные комплексы СГВ

На основе строения CPS выделяют 10 серотипов *S. agalactiae*: Ia, Ib, II-IX [20]. По данным последнего мета-анализа наиболее распространенными являются

серотипы Ia, Ib, II, III и V, на их долю приходится 98% от всех изученных штаммов в мире, выделенных от беременных женщин [32] (рис. 5). Впрочем, в некоторых регионах их распространенность может быть гораздо ниже. Например, в Южной Корее в 2018 году на долю этих серотипов пришлось лишь 66% клинических изолятов. В то же время серотип III связан с 25% случаев инвазивной инфекции [32].

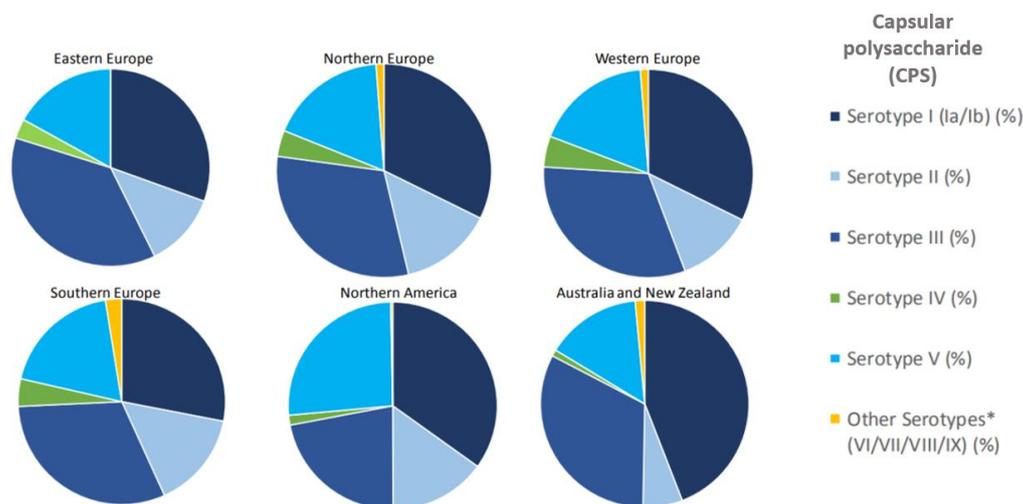


Рисунок 5. Распространение серотипов СГВ в разных регионах (по Russell et al., 2017)

Показана ключевая роль серотипа Ia в возникновении ранней инфекции у новорожденных [33]. Распространение серотипов со временем может постепенно изменяться: второй по распространенности причиной СГВ-инвазии после серотипа III в 2010-х годах являлся серотип Ia (22,9 %), однако в 2000-х годах это был серотип V [34].

В 2003 году Джонсом с соавторами был разработан метод мультилокусного-сиквенс типирования (MLST) СГВ, который позволяет выделять сиквенс-типы (sequence type, ST), отражающие набор аллелей семи «генов домашнего хозяйства» (алкогольдегидрогеназы, фенилаланил-тРНК-синтетазы, ABC-подобного транспортера аминокислот, глутаминсинтетазы, сериндегидратазы, глюкозакиназы и транскетолазы) [35]. В этой же работе были выявлены 4 основных ST, которые встречались у 66% изолятов: ST1, ST17, ST19 и ST23, включающие серотипы I-V. ST17 на тот момент включал только серотип III и был охарактеризован как высоковирулентный клон, поскольку большая часть представителей ST17 – штаммы, вызывающие неонатальные заболевания и связанные с возникновением неонатального менингита, их отличительной особенностью также является наличие гена *gbs2018-C* (ген гипервирулентного адгезина HvgA) [36, 37]. Позднее ST были сгруппированы в клональные комплексы (clonal complex, CC),

которые включают в себя ST, имеющие по меньшей мере 6 одинаковых аллелей из 7 [38]. Среди CC СГВ человека выделяется 6 основных: CC1, CC10, CC17, CC19, CC23 и CC26 [39, 40].

Метод MLST позволил зафиксировать несколько переключений популяций СГВ с одного серотипа на другой. В зоне капсульного локуса СГВ находится наибольшее количество сайтов рекомбинации, позволяющих бактериям обмениваться генетическими фрагментами разного размера [41]. В исследовании во Франции был выявлен 321 изолят, принадлежащий к CC17 – клональному комплексу, в который входит лишь серотип III, однако после CPS-типирования среди них было выявлено 3 штамма серотипа IV. В результате секвенирования было обнаружено, что в хромосомах этих штаммов весь оперон *cps* (35,5 kb) серотипа III был заменён на соответствующий оперон серотипа IV, а фланкирующие его области остались идентичными серотипу III. Интересно, что 3 переключившихся штамма были абсолютно идентичны, что говорит о возможности получения целой популяции переключившихся штаммов в результате единичной рекомбинации [42]. Это переключение было подтверждено в Ирландии [29], а позднее аналогичное событие было зафиксировано в Канаде [43]. С помощью индукции было показано, что для переключения между серотипами Ia и III достаточно рекомбинации лишь одного гена *cpsH*, который различает эти серотипы [44]. Позднее было также зафиксировано переключение между серотипами III и V, в результате которого штамм серотипа III получил капсульный локус серотипа V. Возможно, подобные переключения могли закрепиться в результате селекции при накоплении антител к наиболее распространённому серотипу III. Кроме того, были показаны рекомбинационные события в парах II-IV, V-Ib и V-II [45].

На сегодняшний день в России практически полностью отсутствуют актуальные эпидемиологические данные относительно распространенности тех или иных серотипов, ST и CC.

1.4. Клиническая значимость СГВ-инфекций

СГВ-инфекции относятся к наиболее значимым в акушерстве, поскольку могут приводить к тяжелой патологии среди беременных женщин, родильниц и новорожденных детей [1]. Кроме того, СГВ вызывают заболевания у небеременных взрослых (пиелонефрит, цистит, артрит, офтальмит и др.), осложняют онкопатологии,

иммунодефициты и сахарный диабет. Наконец, СГВ наносят существенный ущерб фермам, вызывая мастит у домашних коров [14].

Первое описание СГВ-колонизации урогенитальных путей беременных женщин было опубликовано Ребеккой Ленсфилд в 1934 году [46], а в 1938 году появился первый отчет о случаях перинатальной СГВ-инфекции у беременных женщин [47]. С 1970-х СГВ стали основной причиной неонатального сепсиса и менингита [48]. Клинические проявления СГВ-инфекций среди беременных женщин включают инфекции мочеполовых путей, хориоамнионит, эндометрит, раневые инфекции после операций кесарева сечения или эпизотомии, а также повышенный риск преждевременных родов и мертворождения и послеродовый сепсис [1, 49, 50]. Инфицирование новорожденных детей происходит либо интранатально, когда СГВ попадают из влагалища в амниотическую жидкость, либо во время прохождения ребенка через родовые пути матери. Вследствие этого СГВ могут колонизировать слизистые, легкие и кишечник младенца. Среди неонатальных СГВ-инфекций выделяют раннюю, развивающуюся в первые 6 дней жизни, и позднюю, которая начинается с седьмого дня жизни и может продолжаться до трех месяцев. Ранняя инфекция у новорожденных может проявляться как сепсис, пневмония и реже как менингит, который свойственен поздней инфекции [51]. Пути передачи и развития перинатальной СГВ-инфекции отражены на рисунке 6.

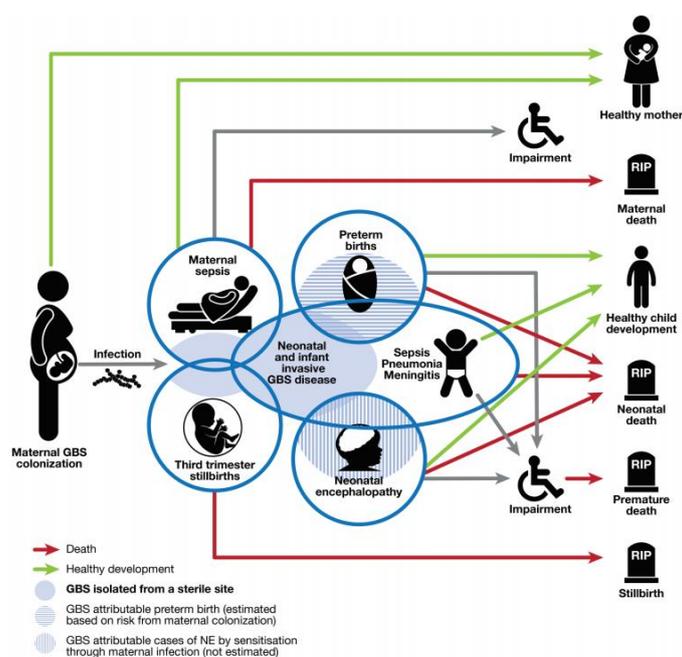


Рисунок 6. Схема развития перинатальной СГВ-инфекции (по Lawn et al., 2017)

По данным мета-анализа 2017 года СГВ-носительство среди беременных женщин по миру составляет 18%, однако, вероятнее всего, эта цифра занижена из-за недостатка или неадекватности данных во многих странах [32]. Данные о заболеваемости СГВ-инфекциями среди беременных женщин и новорожденных детей в России очень скудны, так как систематическое выявление колонизированных стрептококком В женщин (скрининг) не проводится, а также нет статистики по этиологии сепсиса новорожденных.

В отсутствие какой-либо профилактики ранняя инфекция наблюдается у 1-2% младенцев, рожденных от СГВ-колонизированных женщин [52]. Заболеваемость в среднем составляет 0,53 случая на 1000 живорожденных детей, а смертность среди заболевших – 9,6%, при этом показатели заболеваемости и смертности для ранних инфекций в два раза превышают таковые для поздних [4].

1.5. Профилактика СГВ-инфекции

В качестве профилактики ранней неонатальной СГВ-инфекции с 1990-х годов и по сегодняшний день используют интранатальное внутривенное введение антибиотиков колонизированным СГВ женщинам [3, 48]. СГВ полностью чувствительны к пенициллину, который остается антибиотиком выбора для профилактики и лечения неонатальных СГВ-инфекций. Также была показана эффективность ампициллина, однако пенициллин имеет более узкий спектр антимикробной активности и оказывает более слабый эффект на кишечные бактерии [53, 54]. При соблюдении рекомендуемых доз и введении пенициллина или ампициллина за 4 часа до родов быстро достигается необходимая концентрация антибиотика в амниотической жидкости и крови плода, что эффективно предотвращает вертикальную передачу и развитие ранней СГВ-инфекции [54, 55]. Альтернативными препаратами, рекомендованными в случае аллергии на пенициллин, долгое время являлись эритромицин и клиндамицин. Однако современные рекомендации исключают использование эритромицина по причине возросшего уровня резистентности к нему у СГВ. Резистентность стрептококков к макролидам и линкозамидам может быть конститутивной и индуцибельной. В обоих случаях стрептококки синтезируют метилтрансферазы, которые модифицируют мишень действия антибиотика – 23s рРНК [56]. При конститутивной устойчивости фермент синтезируется постоянно. При индуцибельном типе устойчивости в отсутствие индуктора мРНК метилтрансферазы блокирует шпилька. Синтез метилтрансферазы становится возможным только после

связывания мРНК с индуктором, которое приводит к изменению конформации мРНК. Различные антибиотики обладают различной индуцирующей активностью, которая определяется структурой ингибирующей шпильки на мРНК [57]. При выявлении индуцибельной устойчивости *S. agalactiae* к клиндамицину рекомендуется применять эритромицин. Если же выделенный штамм демонстрирует конститутивную или индуцибельную устойчивость к клиндамицину, разрешено применение ванкомицина, хотя его использование рекомендуется только в качестве последнего средства. Стоит отметить, что клинические испытания эффективности трех вышеперечисленных антибиотиков не проводились.

Заболеваемость СГВ-инфекцией в странах/регионах, использующих описанный выше метод антибиотикопрофилактики, снижалась приблизительно в 3,3 раза по сравнению со странами/регионами, в которых профилактика не проводилась. Однако со временем показатель неонатальной заболеваемости перестал снижаться [51] и даже стал увеличиваться [34]. Таким образом, остается актуальным поиск новых форм профилактики СГВ-инфекций. В 2014 году Всемирная организация здравоохранения созвала первое совещание на тему поиска мишени для профилактических вакцин против стрептококков группы В, на котором вакцины на основе капсульного полисахарида, обуславливающего серотип микроорганизма, были выбраны в качестве наиболее перспективного решения проблемы [58]. Недавнее клиническое испытание (фаза 1b/2) трехвалентной вакцины на основе полисахаридов трех типов (Ia, Ib и III) продемонстрировало ее высокие иммуногенные свойства [59], однако различия в распространении серотипов стрептококков группы В в различных географических областях [4, 32, 45] требуют пересмотра состава такой вакцины для конкретных регионов. В настоящий момент ведутся разработки пятивалентной вакцины, которая охватывала бы серотипы I-V [60, 61]. Задачу также осложняет доля бескапсульных штаммов СГВ, которая достигает 10% в некоторых популяциях [62]. В связи с несовершенством капсульных полисахаридов, как мишеней для создания вакцин, актуален мониторинг изменения и распространения генотипов СГВ в поисках консервативных мишеней. В качестве них рассматриваются различные факторы вирулентности, например, перспективной мишенью являются иммуногенные белки фимбрий. По данным Brochet с соавторами [41] Р1 находятся в высококонсервативном участке генома СГВ («R1» участок), не подверженном рекомбинации, из чего можно предположить, что переключение с одного типа фимбрий на другой – маловероятное событие. В то же время в экспериментах на мышах была показана иммуногенность

вакцин на основе белков фимбрий [63, 64]. Также иммуногенность с тем или иным успехом была показана в доклинических испытаниях вакцин на основе Fbs [65], ScpB [66–68] и VibA [69]. Групповой полисахарид не рассматривается в качестве кандидата в основу вакцины, поскольку его иммуногенные свойства слишком слабые, а у высококапсулированных штаммов и вовсе отсутствуют [70].

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Штаммы *S. agalactiae* и условия их культивирования

Используемая в работе коллекция штаммов *S. agalactiae* была получена при анализе клинического материала беременных женщин и новорожденных детей, находившихся в стационаре НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта. Для выделения штаммов использовали мочу, отделяемое влагалища или цервикального канала беременных женщин, а также меконий, отделяемое задней стенки глотки или поверхности ушной раковины новорожденных. Анализ на СГВ-носительство новорожденных детей проводился только в случае положительного статуса матери. Всего было изучено 270 штаммов *S. agalactiae*, которые были получены в два разных периода времени (Табл. 1). Первый период охватывает 2010 и 2011 год, в эту выборку попал 141 штамм, из которых 99 были выделены от беременных женщин и 42 от новорожденных детей. Второй период – 2017 и 2018 год, за это время было собрано 129 штаммов, из которых от беременных женщин было получено 122 изолята, а от новорожденных детей – 17.

Таблица 1. Количество изолятов *S. agalactiae*, полученных от разных пациентов в разные периоды времени

Источник	2010-2011 г.	2017-2018 г.
Беременные женщины	99	112
Новорожденные дети	42	17
Всего	141	129

Клинический материал сеяли параллельно на селективный колумбийский кровяной агар и в селективный питательный бульон, содержащие колистин сульфат, налидиксовую и оксолиновую кислоту, которые подавляют конкурирующую микробиоту. После этого образцы инкубировали сутки при температуре 36⁰ С и 5% концентрации CO₂. Если на твердой питательной среде удавалось получить колонии,

соответствующие морфологии СГВ, они выделялись в чистую культуру, а затем подвергались CAMP-тесту и MALDI-TOF-масс-спектрометрии (Bruker's microflex). Если же на твердой питательной среде СГВ-подобных культур не обнаруживалось, а питательный бульон мутнел, то из бульона делались высевы на колумбийский кровяной агар с последующим анализом морфологии, CAMP-тестом и MALDI-TOF-анализом. После подтверждения принадлежности изолята к виду *S. agalactiae* отбирали 1 колонию, вносили ее в 1,5 мл сахарного бульона, а затем замораживали и хранили при температуре -80⁰ С.

Таблица 2. Состав питательных сред, используемых в работе

Питательная среда (производитель)	Состав	Концентрация, г/литр
Колумбийский кровяной агар (Sredoff)	Пептон	20
	Агар-агар	10
	Хлорид натрия	5
	Баранья кровь	5
	Триптический перевар говяжьего сердца	3
	Кукурузный крахмал	1
	Колистин сульфат	0,01
	Налидиксовая кислота	0,015
Селективный питательный бульон: Todd-Hewitt Broth + Streptococcus selective supplement (Oxoid)	Триптон	20
	Обезжиренный мясной бульон	10
	Глюкоза	2
	Бикарбонат натрия	2
	Хлорид натрия	2
	Динаитрий фосфат	0,4
	Колистин сульфат	0,01
	Оксолиновая кислота	0,005
Кровяной агар: Mueller-Hinton (Oxoid)	Обезжиренный говяжий бульон	300
	Гидролизат казеина	17,5
	Агар-агар	17
	Лошадиная кровь	5
	Крахмал	1,5

Сахарный бульон (Sredoff)	Триптоза	10
	Глюкоза	5
	Хлорид натрия	5
	Мясной экстракт	3

2.2. Подготовка культуры для определения чувствительности к антибиотикам

Культуры извлекались из морозильной камеры и после полной разморозки высевались на колумбийский кровяной агар, после чего инкубировались в течение суток при температуре 36⁰ С и 5% концентрации CO₂ (Sanyo CO₂ Incubator). После этого культуру пересевали и снова инкубировали сутки при тех же условиях для восстановления ее фенотипических свойств после стресса. В случае возникновения сомнений относительно принадлежности пересеваемой колонии к виду *S. agalactiae*, использовали MALDI-TOF-масс-спектрометрию.

2.3. Определение чувствительности к антибиотикам

Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом в соответствии с рекомендациями EUCAST (European committee on antimicrobial susceptibility testing, http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/).

Для этого суточную культуру СГВ отбирали стерильной микробиологической петлей с плотной питательной среды и ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе до плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланда, что приблизительно соответствует 1-2*10⁸ КОЕ/мл для *Escherichia coli*. Для измерения плотности суспензии использовали нефелометр CrystalSpec (Becton Dickinson). Не позднее, чем через 15 минут после приготовления суспензии, в нее погружали тупфер (стерильный ватный тампон), после чего на чашку с кровяным агаром Мюллера-Хинтона штриховыми движениями равномерно наносили инокулюм в трех направлениях таким образом, чтобы штрихи плотно прилегали друг к другу и между ними не оставалось свободного пространства. Не позднее, чем через 15 минут после инокуляции, на чашки наносили диски с антибиотиками (Oxoid™ Cefaclor Antimicrobial Susceptibility Disks) так, чтобы между дисками с клиндамицином и эритромицином было 12 мм. В течение 15 минут после

этого чашки ставили в CO₂ инкубатор при температуре 36⁰C и 5% концентрации CO₂. Через сутки измеряли диаметр зоны задержки роста, штамм считался конститутивно резистентным, если диаметр был равен или меньше пограничных значений, указанных в рекомендациях EUCAST (Табл. 3). Индуцибельная резистентность к клиндамицину выявлялась, если зона задержки роста вокруг диска с клиндамицином имела форму латинской буквы D, обращенной в сторону диска с эритромицином ровной стороной (Рис. 9). В соответствии с рекомендациями EUCAST, если D-феномен выявляется, штамм следует считать резистентным к клиндамицину.

Таблица 3. Содержание в диске и размеры зон задержки роста для антибиотиков, используемых в работе

Антибиотик	Содержание в диске	Пограничные значения зоны задержки роста, мм
Пенициллин-G	1 ЕД	18
Эритромицин	15 мкг	18
Клиндамицин	2 мкг	17
Ванкомицин	5 мкг	13

2.4. Выделение ДНК

Чистые культуры *S. agalactiae* полностью размораживались, после чего ДНК выделяли сорбционным методом при помощи комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала фирмы «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (ИнтерЛабСервис, КАТ. # 102-22). Выделение производилось по рекомендованному производителем протоколу:

- 1) В стерильные пробирки вносили по 20 мкл сорбента, 300 мкл лизирующего раствора и 100 мкл культуры СГВ. Полученный раствор перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 5 минут при температуре 65⁰C. Затем раствор снова перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 2 минуты, после чего осаждали связавшийся с ДНК сорбент центрифугированием при 10 тыс. об. /мин. В течение 30 секунд.
- 2) Надосадочную жидкость удаляли с помощью вакуумного насоса, добавляли к осадку 1 мл отмывочного раствора, перемешивали и снова осаждали раствор центрифугированием при тех же условиях, после чего удаляли надосадочную жидкость.

- 3) Далее осадок высушивали в термостате при 65⁰С в течение 10 минут, после этого добавляли 100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК, перемешивали раствор и инкубировали в течение 5 минут при температуре 65⁰С.
- 4) Чтобы отделить сорбент от полученного раствора ДНК, раствор центрифугировали при 12 тыс. об. /мин. В течение 1 минуты. Полученные пробы хранили в морозильной камере при температуре -20⁰С.

2.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР использовали для двух целей – определение CPS-генотипа и PI-генотипа. В обоих случаях использовали набор «Tersus plus PCR kit» (Евроген, КАТ. # РК121). Из набора использовали реагенты, перечисленные в табл. 4, а к ним добавляли каплю минерального масла в каждую реакционную пробирку, чтобы предотвратить испарение компонентов реакции. Термоциклирование проводили с помощью амплификатора «Терцик» (ДНК-Технология). Последовательности олигонуклеотидных праймеров, используемых в ПЦР, указаны в табл. 5 и 7, условия ПЦР – в табл. 6 и 8.

Таблица 4. Состав реакционной смеси для ПЦР

Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
Стерильная вода для ПЦР	12
5X Tersus Red буфер	5
50X смесь dNTP	0,5
50X Tersus полимераза	0,5
PCR-праймер прямой, 10мкМ	1
PCR-праймер обратный, 10мкМ	1
ДНК-матрица	5
Общий объем реакции	25

Таблица 5. Характеристики олигонуклеотидных праймеров и ампликонов, используемых при PI-генотипировании СГВ

Название праймера	Ген	Последовательность олигонуклеотидов	Размер ампликона, п. о.	Размер праймера, п. о.
PI1a-UP	<i>gbs80</i>	GGTCGTCGATGCTCTGGATTC	881	21
PI1a-DN		GTTGCCCAGTAACAGCTTCTCC		22
PI1b-UP		CTGGTAAAGTTTCAGAAACGC	429	21
PI1b-DN		TCTCTGTGCGCAACTGTATAATC		22
PI2a-UP	<i>gbs67</i>	STATGACACTAATGGTAGAAC	575	21
PI2a-DN		CACCTGCAATAGACATCATAG		21
PI2b-UP	<i>san_1519</i>	ACACGACTATGCCTCCTCATG	721	21
PI2b-DN		TCTCCTACTGGAATAATGACAG		22
PI1_all-UP	<i>sal_0710</i> ;	ACSTATGTTGCTGATCGGCTGAAAATG	684	28
PI1_all-DN	<i>sal_0709</i>	TACGGACACTTTCTAGTGCSTTTGGATC		28

Таблица 6. Условия проведения ПЦР при PI-генотипировании СГВ

Реакция	Условия реакции
1. Мультиплексная ПЦР к типам PI-1a, PI-2a и PI-2b	<u>30 циклов:</u> 95°C – 1 мин. 52°C – 1 мин. 72°C – 1 мин. <u>1 цикл:</u> 72°C – 10 мин.
2. Контроль отсутствия PI-1 локуса	<u>30 циклов:</u> 95°C – 1 мин. 60°C – 1 мин. 72°C – 1 мин. <u>1 цикл:</u> 72°C – 10 мин.
3. ПЦР к типу PI-1b	<u>1 цикл:</u> 95°C – 2 мин. <u>30 циклов:</u> 95°C – 30 сек. 50°C – 30 сек. 72°C – 45 сек.

<u>1 цикл:</u> 72°C – 5 мин.

Таблица 7. Характеристики олигонуклеотидных праймеров и ампликонов, используемых при CPS-генотипировании СГВ

Название праймера	Ген	Последовательность олигонуклеотидов	Размер ампликона, п. о.	Размер праймера, п. о.
Ia-F	<i>cps1aH</i>	GGTCAGACTGGATTAATGGTATGC	521 и 1826	24
Ia-R		GTAGAAATAGCCTATATACGTTGAATGC		28
Ib-F	<i>cps1bJ</i>	TAAACGAGAATGGAATATCACAAACC	770	26
Ib-R	<i>cps1bK</i>	GAATTAACCTCAATCCCTAAACAATATCG		29
II-F	<i>cps2K</i>	GCTTCAGTAAGTATTGTAAGACGATAG	397	27
II-R		TTCTCTAGGAAATCAAATAATTCTATAGGG		30
III-F	<i>cps1a/2/3I</i>	TCCGТАCTACAACAGACTCATCC	1826	23
III-R		AGTAACCGTCCATACATTCTATAAGC		26
IV-F	<i>cps4N</i>	GGTGGTAATCCTAAGAGTGAACCTGT	578	25
IV-R		CCTCCCAATTTTCGTCCATAATGGT		25
V-F	<i>cps5O</i>	GAGGCCAATCAGTTGCACGTAA	701	22
V-R		AACCTTCTCCTTCACACTAATCCT		24
VI-F	<i>cps6I</i>	GGACTTGAGATGGCAGAAGGTGAA	487	24
VI-R		CTGTCCGACTATCCTGATGAATCTC		25
cpsI-Ia-6-7F	<i>cpsG</i>	GAATTGATAACTTTTGTGGATTGCGATGA	272 и 179	29
cpsI-7 R	<i>cpsI</i>	TGTCGCTTCCACACTGAGTGTTGA		24
VIII-F	<i>cps8J</i>	AGGTCAACCACTATATAGCGA	282	21
VIII-R		TCTTCAAATCCGCTGACTT		20
cpsI-7-9 F	<i>cpsG</i>	CTGTAATTGGAGGAATGTGGATCG	272 и 229	24
cpsI-9 R	<i>cpsI</i>	AATCATCTTCATAATTTATCTCCCATTT		27

Таблица 8. Условия проведения ПЦР при CPS-генотипировании СГВ

Реакция	Условия реакции
1. ПЦР к типам I-VI и VIII	<u>1 цикл:</u> 95 °С – 5 мин. <u>35 циклов:</u> 95 °С – 1 мин. 55 °С – 1 мин. 72 °С – 2 мин. <u>1 цикл:</u> 72 С – 10 минут
2. ПЦР к типам VII и IX	<u>1 цикл:</u> 95 °С – 5 мин. <u>15 циклов:</u> 95 °С – 1 мин. 54 °С – 1 мин. 72 °С – 2 мин. <u>25 циклов:</u> 95 °С – 1 мин. 56 °С – 1 мин. 72 °С – 2 min <u>1 цикл:</u> 72 °С – 10 мин.

2.6. Линейный электрофорез в агарозном геле

Для разделения полученных ампликонов использовали 2% агарозный гель: к 200 мл буфера TAE с бромистым этидием добавляли 2 г агарозы, раствор доводили до кипения в микроволновой печи, после чего заливали гель в специальные формы и давали ему остыть. Далее погружали гель в электрофоретическую камеру, заполненную буфером TAE и вносили образцы, содержащие глицерин и бромфеноловый синий. Для установления молекулярного размера ампликонов в одну лунку каждого ряда вносили маркер молекулярного веса «Маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder» (Евроген, КАТ. # NL002). Для визуализации результатов гель фотографировали под ультрафиолетовым светом с помощью гель-документирующей системы Infinity Jourmat.

2.7. Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных использовали критерий хи-квадрат и доверительный интервал, которые рассчитывали с помощью программного обеспечения Analyse-it for Microsoft Excel 5.11.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Резистентность к антибиотикам

Результаты определения чувствительности клинических изолятов к антибиотикам приведены в табл. 9. На рис. 7-11 представлены типичные результаты проведённых опытов. Все 270 изученных штаммов *S. agalactiae* демонстрировали чувствительность к пенициллину и ванкомицину, зоны задержки роста превышали 18 и 13 мм соответственно (рис. 7). В то же время был зафиксирован высокий показатель резистентности к макролидам и линкозамидам (рис. 8-11): доля штаммов, резистентных к эритромицину, составила 15% в первый период времени и 32% - во второй. Подобные показатели резистентности мы получили и к клиндамицину: 16% в первый период времени и 32% – во второй, из которых 4% и 10% соответственно пришлось на индуцибельную устойчивость (рис. 9).



Рисунок 7. Чувствительность к пенициллину (P), ванкомицину (VA), эритромицину (E) и клиндамицину (DA): зоны задержки роста 26, 16, 29 и 27 мм соответственно

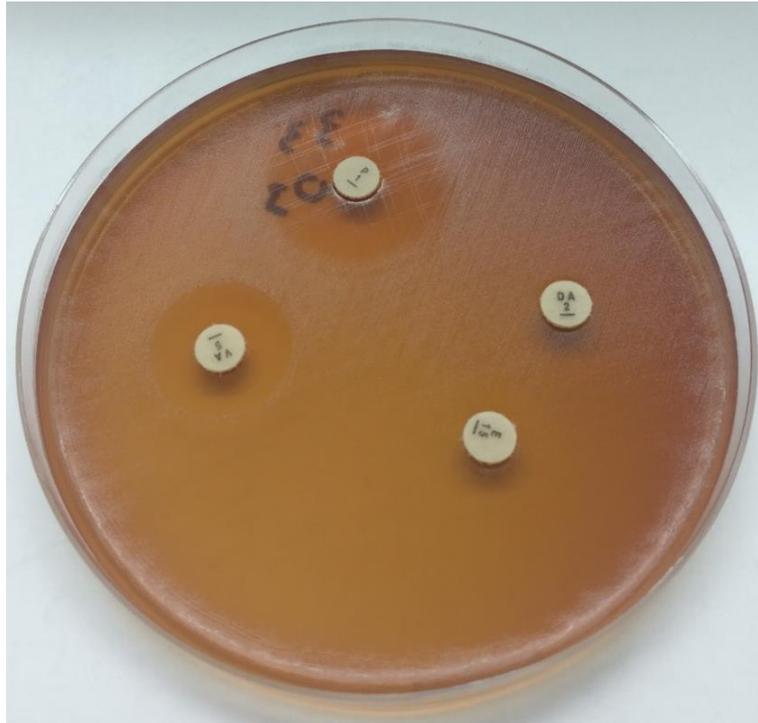


Рисунок 8. Резистентность к клиндамицину (DA) и эритромицину (E) – рост вокруг двух дисков справа отсутствует

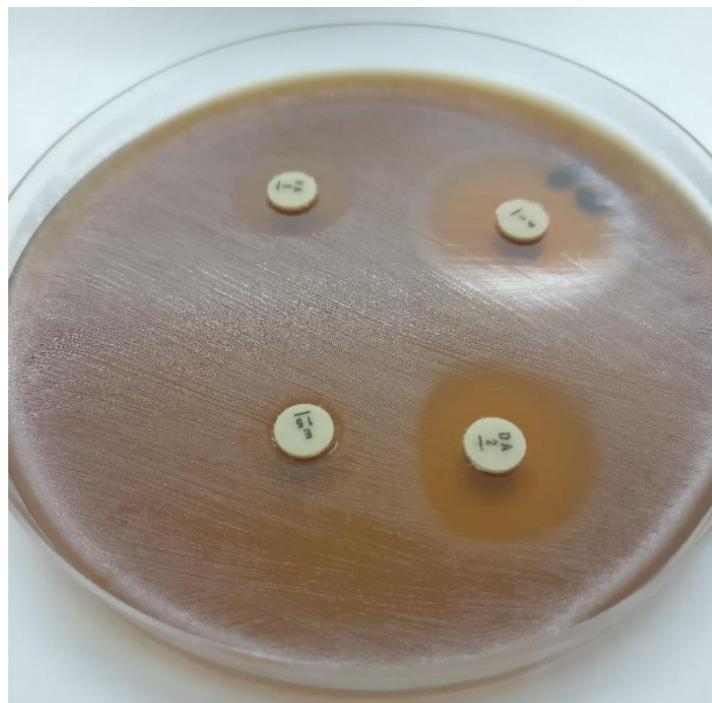


Рисунок 9. D-эффект: индуцибельная резистентность к клиндамицину (DA).

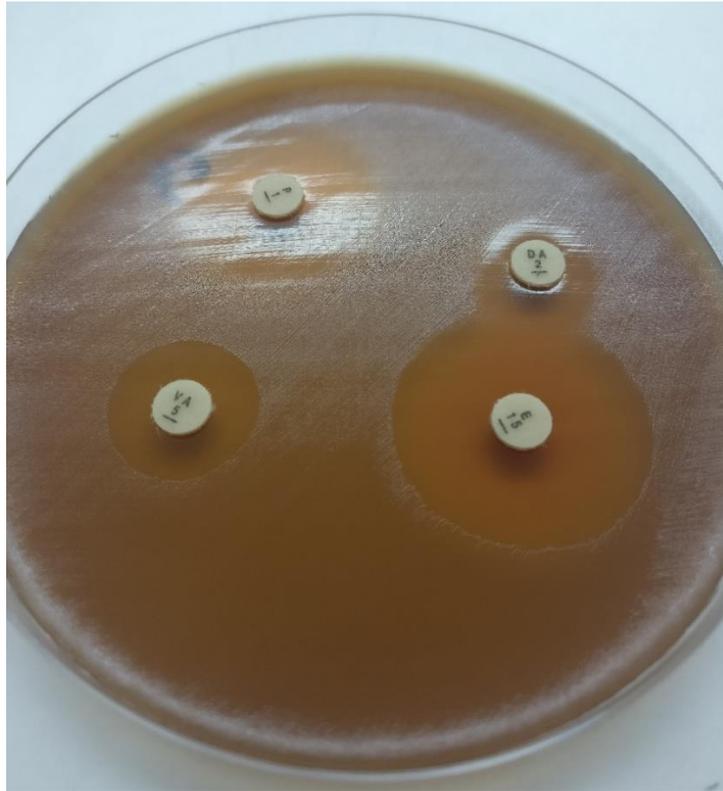


Рисунок 10. Конститутивная резистентность к клиндамицину (DA), зона задержки роста 13 мм

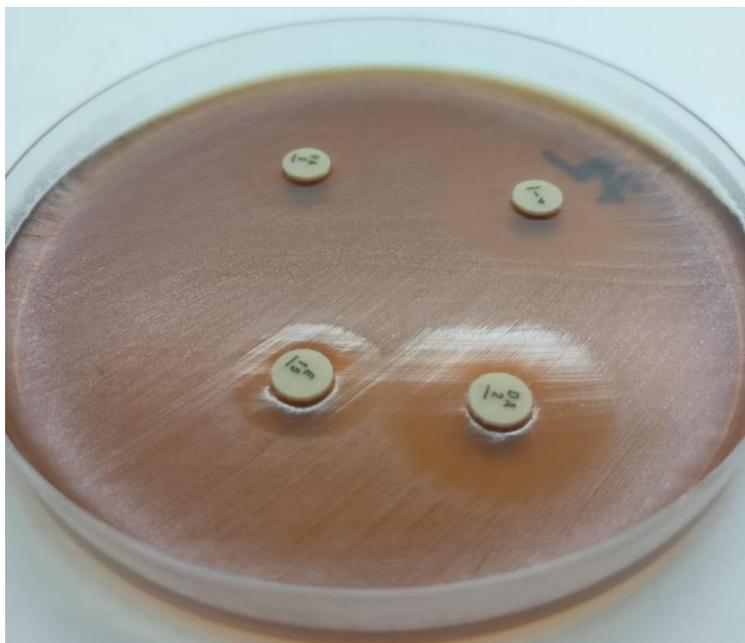


Рисунок 11. Резистентность к эритромицину (E), зона задержки роста 14 мм

Таблица 9. Число устойчивых к эритромицину и клиндамицину штаммов *S.agalactiae*, изолированных в разные периоды времени

Резистентность	2010-2011		2017-2018		Значение p
	количество	% [95% ДИ]	количество	% [95% ДИ]	
К эритромицину	21	14,9 [10,0-21,7]	41	31,8 [24,4-40,2]	0,001
Конститутивная к клиндамицину	16	11,3 [7,1-17,6]	28	21,7 [15,5-29,6]	0,021
Индуцибельная к клиндамицину	6	4,3 [2,0-9,0]	13	10,1 [6,0-16,5]	0,062
К клиндамицину, включая индуцибельную	22	15,6 [10,5-22,5]	41	31,8 [24,4-40,2]	0,002

Наши данные демонстрируют, что европейские рекомендации антибиотикопрофилактики СГВ-инфекций [3] применимы и для Санкт-Петербурга, однако в случае аллергии у пациента на пенициллин, совершенно необходимо проводить тест на чувствительность к клиндамицину, в том числе на индуцибельную. Вероятно, при отсутствии возможности его проведения, имеет смысл сразу применять ванкомицин, поскольку по нашим данным устойчивость СГВ к клиндамицину на сегодняшний день приближается к уровню их устойчивости к эритромицину (в связи с которой эритромицин в настоящее время не рекомендуется в качестве профилактики СГВ-инфекций).

Статистически достоверное повышение показателей резистентности к эритромицину и клиндамицину ($p < 0,005$) за время между двумя изученными периодами, вероятно, связано с бесконтрольным приемом антибиотиков. Это в очередной раз указывает на необходимость поиска альтернативы методу антибиотикопрофилактики СГВ-инфекций, которая к тому же может приводить к селекции других бактерий, приобретающих резистентность к пенициллину и ванкомицину. В то же время, с точки зрения экономики и здравоохранения, оптимальная схема профилактики представляет собой сочетание вакцинопрофилактики (при условии, что ее эффективность будет превышать 90%) и антибиотикопрофилактики лишь для непривитых женщин [71].

3.2. Распределение генных локусов, кодирующих фимбрии СГВ

Для определения типа фимбрий использовали метод, разработанный Martins с соавторами в 2010 году и дополненный Teatero с соавторами в 2017 [25, 72]. Используемый метод предполагает постановку ПЦР в трех реакциях. Первая реакция мультиплексная – она содержит смесь трех пар праймеров генам локусов PI-1a, PI-2a и PI-2b, ампликоны которых отличаются по размеру.

Вторая реакция содержит пару праймеров к двум генам, фланкирующим профаг, в составе которого находится локус PI-1. Эта реакция необходима в качестве контроля в том случае, когда реакция на PI-1a отрицательна: если эти два гена отжигаются, значит между ними действительно нет профага, несущего гены PI-1. Эти две реакции мы стандартно применяли для всех штаммов. Типичные результаты первых двух реакций представлены на рис. 12 и 13.

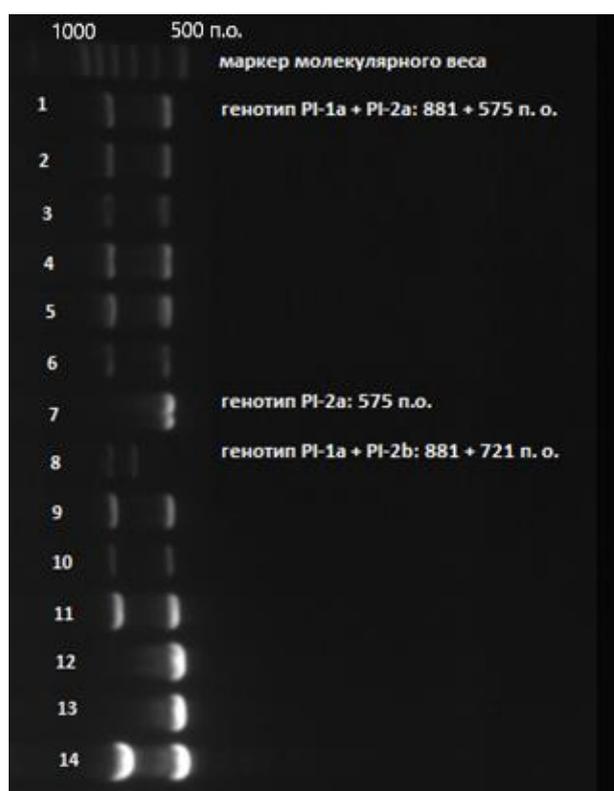


Рисунок 12. Электрофореграмма продуктов мультиплексной ПЦР к генам локусов PI-1a (881 п. о.), PI-2a (575 п. о.) и PI-2b (721 п. о.). В качестве ДНК-матрицы использовали ДНК четырнадцати штаммов *S. agalactiae*, выделенных в 2010-2011 гг.

На дорожках 1-6, 9-11 и 14 выявляются амплифицированные гены локусов PI-1a и PI-2a одновременно.

На дорожках 7, 12 и 13 – амплифицированные гены локуса PI-2a.

На дорожке 8 – амплифицированные гены локуса PI-1b.

В том случае, если реакция на PI-1a отрицательна, но вторая реакция не подтверждает отсутствие локуса PI-1, мы ставили третью реакцию, предложенную Teatero (рис. 14). Она включает в себя пару праймеров к одному из генов локуса PI-1b и протекает при других условиях. Если же реакция на PI-1b была отрицательной, штамм считался PI-1-положительным, поскольку локус PI-1 является горячей точкой для интеграции мобильных элементов [73, 74], которые не позволяют выявить гены локуса PI-1 во второй реакции.

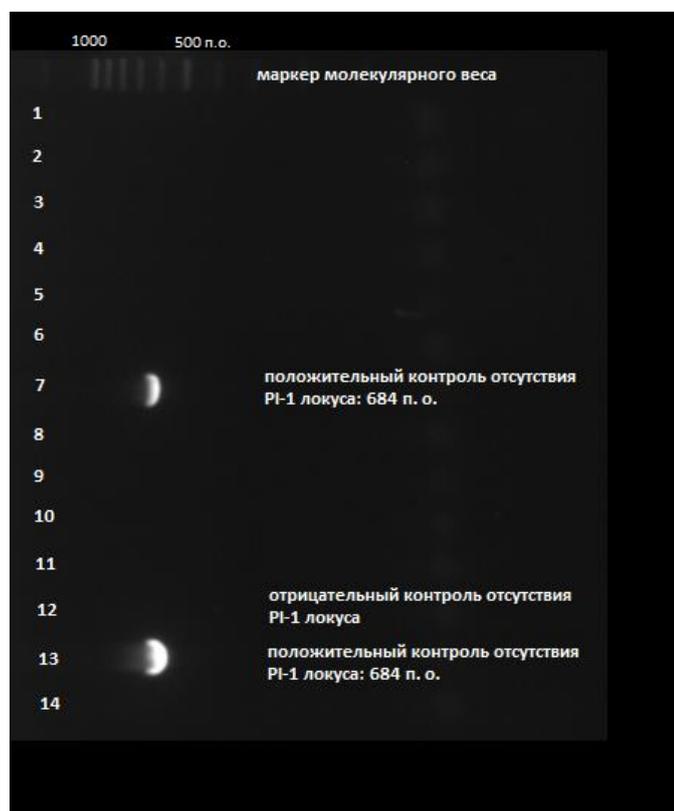


Рисунок 13. Электрофореграмма продуктов ПЦР к генам, фланкирующим профаг, в составе которого находится локус PI-1. В качестве ДНК-матрицы использовали ДНК тех же четырнадцати штаммов *S. agalactiae* и в том же порядке, что и на рисунке 12.

На дорожках 7 и 13 выявляется ампликон двух генов, фланкирующие профаг, который содержит locus PI-1 (684 п. о.). Изоляты *S. agalactiae* 7 и 13 будут отнесены к генотипу PI-2a, поскольку его наличие показала первая ПЦР, а вторая подтвердила отсутствие локуса PI-1.

На дорожке 12 ампликон размером 684 п. о. не выявляется несмотря на то, что в первой ПЦР 12 образец был PI-1-отрицательным. Такой образец будет протестирован на наличие локуса PI-1b.

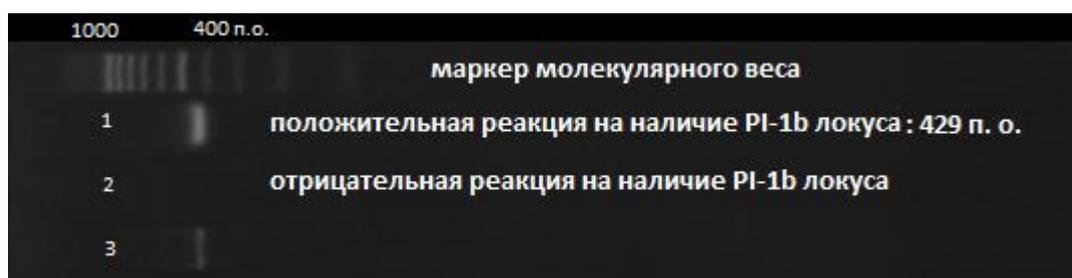


Рисунок 14. Электрофореграмма продуктов ПЦР к генам локуса PI-1b (429 п. о.), в качестве ДНК-матрицы использовали ДНК трех штаммов *S. agalactiae*, выделенных в 2010-2011 гг. и не прошедших контроль отсутствия PI-1 локуса.

На дорожках 1 и 3 выявляется ампликон гена локуса PI-1b.

На дорожке 2 ампликон размером 429 п. о. не выявляется, такой образец будет считаться PI-1a положительным.

Таблица 10. Распределение PI-генотипов *Streptococcus agalactiae*

Генотипы PI	2010-2011		2017-2018		Значение p
	Число штаммов	% [95% ДИ]	Число штаммов	% [95% ДИ]	
PI-1a + PI-2a	76	53,9 [45,7-61,9]	77	59,7 [51,1-67,8]	0,338
PI-2a	43	30,5 [23,5-38,5]	33	25,6 [18,8-33,7]	0,370
PI-1a + PI-2b	20	14,2 [9,4-20,9]	11	8,5 [4,8-14,6]	0,145
PI-2b	1	0,7 [0,1-3,9]	4	3,1 [1,2-7,7]	0,196
PI-1b + PI-2a	1	0,7 [0,1-3,9]	2	1,6 [0,4-5,5]	0,608
PI-1b + PI-2b	0	0	2	1,6 [0,4-5,5]	0,227

Результаты исследования распределения типов фимбрий СГВ приведены в табл. 10 и на рис. 15. Исследование показало, что 54% штаммов, изолированных в 2010-2011 гг. и 60% штаммов, изолированных в 2017-2018 гг., относятся к PI-1a + PI-2a генотипу, этот тип является также самым распространенным в Европе. Возможно, такая распространенность факультативного PI-1a локуса связана с тем, что он играет особую роль при колонизации человека, в то время как у большинства штаммов, колонизирующих крупный рогатый скот, он отсутствует [75]. Самым распространенным локусом оказался PI-2a, что согласуется с результатами, полученными европейскими исследователями. В отличие от локуса PI-2b, он кодирует регулятор транскрипции семейства RogB [22], в связи с чем существует возможное объяснение его распространенности: экспрессия PI-2a может регулироваться так, что фимбрии этого типа появляются на поверхности бактерий только временно, что позволяет избежать селективного давления иммунной системы хозяина [63]. Генотип PI-2b был одним из самых редких, что также согласуется с данными исследований, проведенных в Европе. Распространенность генотипов, включающих недавно описанный локус PI-1b, как и ожидалось, оказалась крайне низкой. Частота встречаемости разных PI-генотипов оставалась стабильной во времени, что является существенным преимуществом мишени для создания профилактической вакцины.

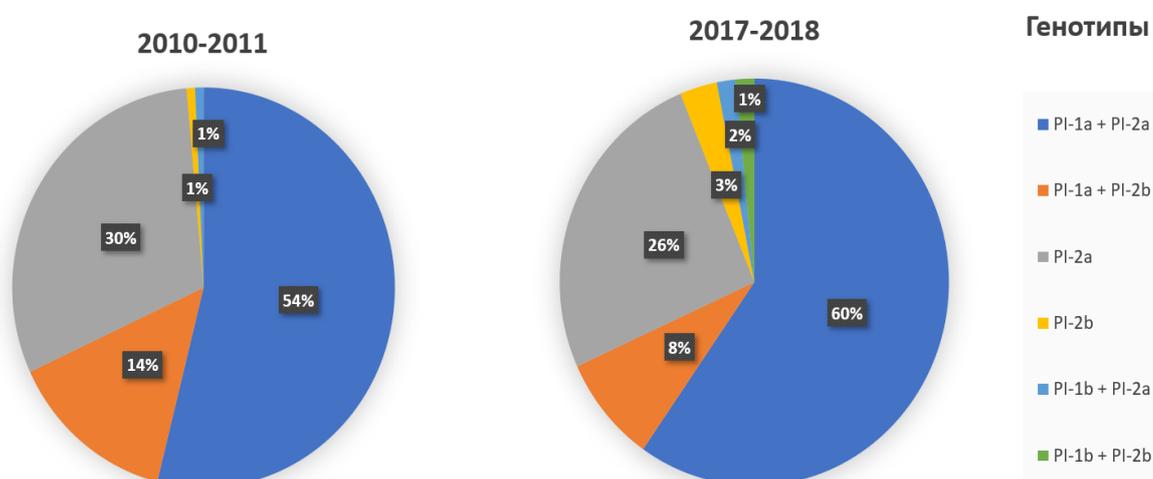


Рисунок 15. Диаграммы распределения PI-генотипов *Streptococcus agalactiae*

3.3. Распределение типов капсульных полисахаридов

Для определения типов CPS использовали метод, разработанный Yao с соавторами [76], который оптимальным образом сочетает в себе два ранее предложенных метода [77, 78]. Этот метод предполагает использование трех мультиплексных ПЦР. Первая позволяет выявить гены типов I-IV, вторая – типы V, VI и VIII, а третья – VII и IX. Однако мы использовали предложенные праймеры по отдельности, поскольку в нашей работе мультиплексная реакция не позволяла различить серотипы. Праймеры к типу Ia давали лишь один ампликон размером 521 п. о. вместо двух (1826 и 521 п. о.). Основной проблемой стало то, что праймеры к типу III дают ампликон размером 1826 п. о. как с ДНК типа Ia, так и с ДНК типа III. При этом праймеры к типу Ia не реагируют с ДНК типа III [77]. По этой причине мы всегда тестировали типы Ia и III параллельно: если конкретный образец давал положительную реакцию с обоими типами праймеров, мы относили его к типу Ia. К типу III образец относили в том случае, если он реагировал только с праймерами к этому типу (рис. 16).

Сначала штаммы тестировали на самые распространенные типы CPS – Ia, III и V, затем только те штаммы, что дали отрицательный результат, мы проверяли на менее распространенные типы Ib, II и IV, а оставшиеся – на VI, VII, VIII и IX. Каждый образец мог иметь только один тип CPS, поскольку каждый штамм в нашей коллекции был представлен лишь одной колонией.

Результаты типирования CPS приведены в табл. 11 и на рис. 17. Основными типами CPS были Ia, III и V, к ним относится 88% штаммов, выделенных в 2010-2011 гг. и 82,1% штаммов, изолированных в 2017-2018 гг. Пятью основными типами (I-V), которые рассматриваются в качестве мишени для создания пентавалентной вакцины, представлено 99,3% штаммов в 2010-2011 гг. и 97,7% – в 2017-2018 гг., эти цифры соответствуют данным последнего и самого крупного мета-анализа мирового распространения серотипов среди перинатальных штаммов СГВ [32]. Однако на долю генотипа Ib, продукт которого входит в состав клинически-испытываемой трехвалентной вакцины, пришлось меньше 1% в первый период и лишь 5% – во второй. В то же время генотип V, продукт которого не входит в состав трехвалентной вакцины, вместе с генотипом III был доминирующим в 2017-2018 г., когда его гены были выявлены у 24% изолятов. Ни один

из изученных штаммов не относился к генотипу VIII, а генотип VI был выявлен лишь во втором периоде.

Интересно, что между двумя изученными периодами произошел существенный сдвиг распространения генотипов III ($p=0,005$) и V ($p=0,010$). Частота встречаемости генотипа III уменьшилась с 41% до 25%, а распространенность генотипа V, напротив, возросла с 12% до 24%. Мы не располагаем причинами этого изменения, однако можем предположить, что в результате селективного давления иммунной системы человека на самый распространенный серотип III, в популяции СГВ могло закрепиться переключение с одного типа капсулы на другой. Такого типа переключение, как результат гомологичной рекомбинации, было зафиксировано в Канаде в 2017 году. Так или иначе, возможность такого изменения распространенности CPS показывает нам, что широкое применение вакцины на основе CPS может привести к дополнительному иммуногенному давлению и, как следствие, к расширению распространенности невакцинных типов CPS.

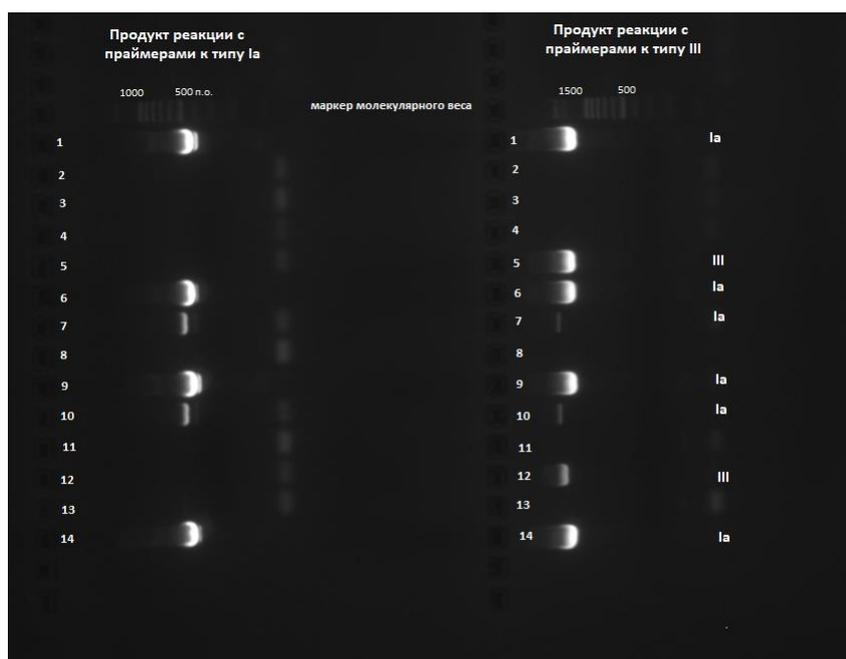


Рисунок 16. Электрофореграмма продуктов ПЦР к генам серотипа Ia (слева) и III (справа). В качестве ДНК-матрицы использовалась ДНК четырнадцати штаммов *S. agalactiae*, выделенных в 2010-2011 гг.

Слева: на дорожках 1, 6, 7, 9, 10 и 14 выявляется продукт гена серотипа Ia.

Справа: на дорожках 1, 6, 7, 9, 10 и 14 также выявляется продукт гена серотипа Ia
на дорожках 5 и 12 выявляется продукт гена серотипа III.

Таблица 11. Распределение CPS-генотипов *Streptococcus agalactiae*

Генотипы CPS	2010-2011		2017-2018		Значение p
	Число штаммов	% [95% ДИ]	Число штаммов	% [95% ДИ]	
Ia	49	34,8 [27,4-42,9]	43	33,3 [25,8-41,8]	0,806
Ib	1	0,7 [0,1-3,9]	6	4,7 [2,1-9,8]	0,056
II	12	8,5 [4,9-14,3]	10	7,8 [4,3-13,7]	0,820
III	58	41,1 [33,4-49,4]	32	24,8 [18,2-32,9]	0,005
IV	3	2,1 [0,7-6,1]	4	3,1 [1,2-7,7]	0,713
V	17	12,1 [7,7-18,5]	31	24,0 [17,5-32,1]	0,010
VI	0	0	1	0,8 [0,1-4,3]	0,478
VII	1	0,7 [0,1-3,9]	1	0,8 [0,1-4,3]	1,000
VIII	0	0	0	0	
IX	0	0	1	0,8 [0,1-4,3]	0,478

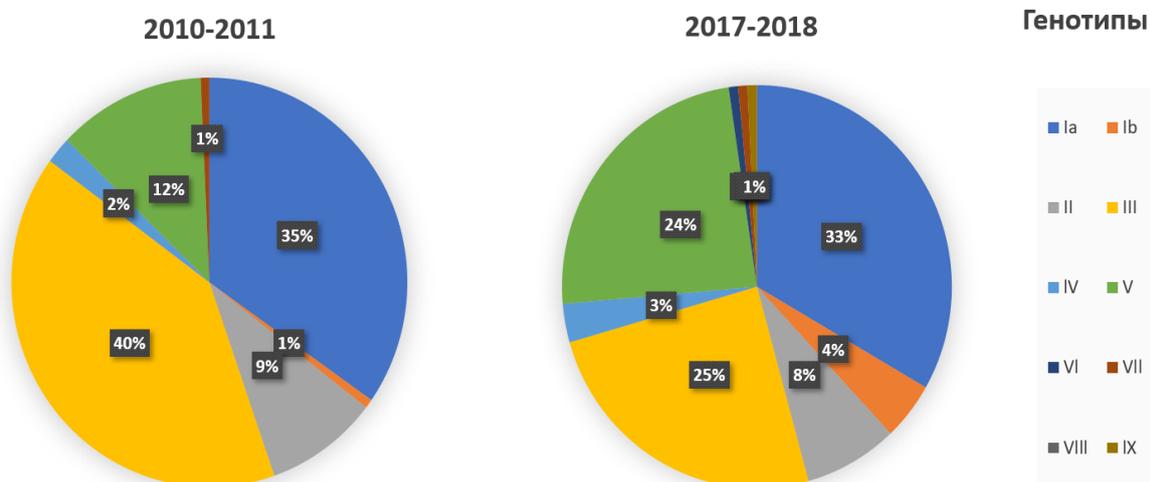


Рисунок 17. Диаграммы распределения CPS-генотипов *S. agalactiae*

3.4. Комбинации факторов вирулентности

Основные выявленные комбинации изученных факторов вирулентности представлены на рисунке 18, самыми распространёнными были 3 комбинации:

- PI-2a и Ia;
- PI-1a + PI-2a и III;
- PI-1a + PI-2a и V.

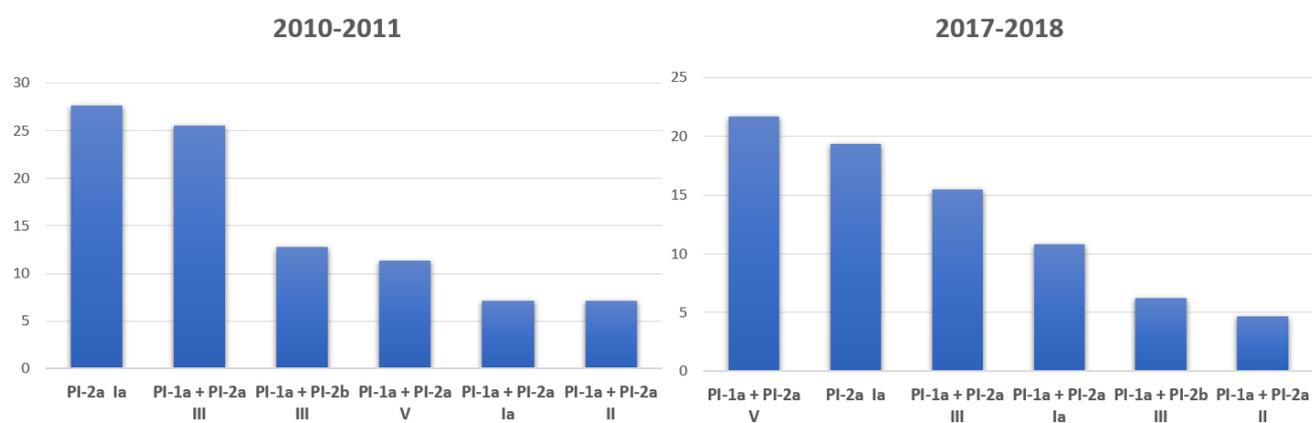


Рисунок 18. Основные комбинации PI- и CPS- генотипов, выявленные в ходе исследования

Выводы

- 1) Чувствительность всех изученных штаммов *S. agalactiae* к пенициллину и ванкомицину позволяет применять европейские рекомендации антибиотикопрофилактики СГВ-инфекций в Санкт-Петербурге.
- 2) Увеличение доли резистентных к клиндамицину штаммов среди стрептококков, изолированных в 2017-2018 годах, требует проверки клинических изолятов на устойчивость к этому антибиотику перед его применением.
- 3) Отсутствие смены доминирующих PI-генотипов *S. agalactiae* свидетельствует о перспективности белков фимбрий как мишени для создания вакцин.
- 4) Подавляющее большинство изученных штаммов *S. agalactiae* относились к пяти вакцинным CPS-генотипам.

Список литературы

1. Baker C.J. The spectrum of perinatal group B streptococcal disease // *Vaccine*. Elsevier Ltd, 2013. Vol. 31, № S4. P. D3–D6.
2. Phares C.R. et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. // *J. Am. Med. Assoc.* 2008. Vol. 299, № 17. P. 2056–2065.
3. Renzo G.C. Di et al. Intrapartum GBS screening and antibiotic prophylaxis : a European consensus conference // *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014. Vol. 27. P. 1–17.
4. Edmond K.M. et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: Systematic review and meta-analysis // *Lancet*. Elsevier Ltd, 2012. Vol. 379, № 9815. P. 547–556.
5. Chen V.L., Avci F.Y., Kasper D.L. A Maternal Vaccine against Group B Streptococcus: Past, Present, and Future. 2013. Vol. 28, № 31(04).
6. Whiley R.A. et al. *Rosenbach* 1884, 22. 2015.
7. Shottmuller H. Die Artunterscheidung der für den menschen Pathogen Streptokokken durch Blutagar. // *Munch. Med. Wochenschr.* 1903. № 50. P. 849–853.
8. Brown J.H. The use of blood agar for the study of streptococci. Monograph 9. The Rockefeller Institute for Medical Research. New York, N.Y., 1919.
9. Lancefield B.R.C. A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND (From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research). 1932. Vol. 1919, № 1. P. 571–595.
10. Sherman J.M. The streptococci // *Bacteriol. Rev.* 1937. Vol. 1, № 1. P. 3–97.
11. Elliott J.A., Facklam R.R., Richter C.B. Nonhemolytic Group B., 1990. Vol. 28, № 3. P. 628–630.
12. Christie R., Atkins N.E., Munch-Peterson E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci // *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1944. Vol. 22. P. 197–200.
13. Smith, JP Durfee, KK Marymont J.J. A review of laboratory methods for identification of group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*). // *Am. J. Med. Technol.* 1979. Vol. 45, № 3. P. 199–204.
14. Тотолян А.А., Суворов А.Н., Дмитриев А.В. Стрептококки группы В в патологии человека. “Человек,” 2009.
15. Fischetti V.A., Pancholi V., Schneewind O. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci // *Mol. Microbiol.* 1990. Vol. 4, № 9. P. 1603–1605.
16. Glaser P. et al. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. 2002. Vol. 45. P. 1499–1513.
17. Tettelin H. et al. Complete Genome Sequence of a Virulent Isolate of *Streptococcus*

- pneumoniae. 2014. Vol. 498, № 2001.
18. Shabayek S., Spellerberg B. Group B streptococcal colonization, molecular characteristics, and epidemiology // *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9, № MAR. P. 1–14.
 19. Nizet V., Rubens C.E. Pathogenic mechanisms and virulence factors of group B streptococci // *Gram-Positive Pathog.* 2006. P. 152–168.
 20. Slotved H.C. et al. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype // *J. Clin. Microbiol.* 2007. Vol. 45, № 9. P. 2929–2936.
 21. Cieslewicz M.J. et al. Structural and Genetic Diversity of Group B *Streptococcus* Capsular Polysaccharides. 2005. Vol. 73, № 5. P. 3096–3103.
 22. Jiang S. et al. Regulation and Function of Pilus Island 1 in Group B *Streptococcus*. 2012. P. 2479–2490.
 23. Lauer P. et al. Genome analysis reveals pili in Group B *Streptococcus*. 2005. № July. P. 95420.
 24. Rosini R. et al. Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae* // *Mol. Microbiol.* 2006. Vol. 61, № 1. P. 126–141.
 25. Teatero S. et al. Genetic evidence for a novel variant of the pilus Island 1 backbone protein in group B *Streptococcus* // *J. Med. Microbiol.* 2017. Vol. 66, № 10. P. 1409–1415.
 26. Dramsi S. et al. Assembly and role of pili in group B streptococci // *Mol. Microbiol.* 2006. Vol. 60, № 6. P. 1401–1413.
 27. Pansegrau W., Bagnoli F. Pilus Assembly in Gram-Positive Bacteria. 2015.
 28. Martins E.R. et al. Distribution of pilus islands in *Streptococcus agalactiae* that cause human infections: Insights into evolution and implication for vaccine development // *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. Vol. 20, № 2. P. 313–316.
 29. Meehan M., Cunney R., Cafferkey M. Molecular epidemiology of group B streptococci in Ireland reveals a diverse population with evidence of capsular switching // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014. Vol. 33, № 7. P. 1155–1162.
 30. Lu B. et al. Distribution of pilus islands and alpha-like protein genes of group B *Streptococcus* colonized in pregnant women in Beijing, China // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015. Vol. 34, № 6. P. 1173–1179.
 31. Madzivhandila M. et al. Distribution of pilus islands of group B streptococcus associated with maternal colonization and invasive disease in South Africa // *J. Med. Microbiol.* 2013. Vol. 62, № PART 2. P. 249–253.
 32. Russell N.J. et al. Maternal Colonization With Group B *Streptococcus* and Serotype Distribution Worldwide : Systematic Review and. 2017. Vol. 65, № Suppl 2.
 33. Martins E.R. et al. Analysis of group B streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness // *J.*

- Clin. Microbiol. 2007. Vol. 45, № 10. P. 3224–3229.
34. Alhazmi A., Hurteau D., Tyrrell G.J. Epidemiology of invasive group b streptococcal disease in Alberta, Canada, from 2003 to 2013 // J. Clin. Microbiol. 2016. Vol. 54, № 7. P. 1774–1781.
 35. Jones N. et al. Multilocus Sequence Typing System for Group B Streptococcus // J. Clin. Microbiol. 2003. Vol. 41, № 6. P. 2530–2536.
 36. Davies H.D. et al. Multilocus Sequence Typing of Serotype III Group B Streptococcus and Correlation with Pathogenic Potential // J. Infect. Dis. 2004. Vol. 189, № 6. P. 1097–1102.
 37. Bohnsack J.F. et al. Population structure of invasive and colonizing strains of Streptococcus agalactiae from neonates of six U.S. academic centers from 1995 to 1999 // J. Clin. Microbiol. 2008. Vol. 46, № 4. P. 1285–1291.
 38. Luan S. et al. Multilocus Sequence Typing of Swedish Invasive Group B Streptococcus Isolates Indicates a Neonatally Associated Genetic Lineage and Capsule Switching Multilocus Sequence Typing of Swedish Invasive Group B Streptococcus Isolates Indicates a Neonatally Asso. 2005. Vol. 43, № 8. P. 3727–3733.
 39. Skov Sørensen U.B. et al. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones // MBio. 2010. Vol. 1, № 3. P. 1–9.
 40. Da Cunha V. et al. Streptococcus agalactiae clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline // Nat. Commun. 2014. Vol. 5. P. 1–12.
 41. Brochet M. et al. Shaping a bacterial genome by large chromosomal replacements, the evolutionary history of Streptococcus agalactiae // Proc. Natl. Acad. Sci. 2008. Vol. 105, № 41. P. 15961–15966.
 42. Bellais S. et al. Capsular switching in group B streptococcus CC17 hypervirulent clone: A future challenge for polysaccharide vaccine development // J. Infect. Dis. 2012. Vol. 206, № 11. P. 1745–1752.
 43. Teatero S. et al. Characterization of invasive group B Streptococcus strains from the greater Toronto area, Canada // J. Clin. Microbiol. 2014. Vol. 52, № 5. P. 1441–1447.
 44. Chaffin D.O. et al. The Serotype of Type Ia and III Group B Streptococci Is Determined by the Polymerase Gene within the Polycistronic Capsule Operon The Serotype of Type Ia and III Group B Streptococci Is Determined by the Polymerase Gene within the Polycistronic Capsule Op // J. Bacteriol. 2000. Vol. 182, № 16. P. 4466–4477.
 45. Teatero S. et al. Serotype distribution, population structure, and antimicrobial resistance of group b streptococcus strains recovered from colonized pregnant women // J. Clin. Microbiol. 2017. Vol. 55, № 2. P. 412–422.
 46. Lancefield B.Y.R.C., Hare R. THE SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF PATHOGENIC AND NON-PATHOGENIC STRAINS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI FROM PARTURIENT WOMEN * (From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research , New York , and the Bernhard Baron Memorial Research Laborato. 1934.

47. Fry R.M. Fatal Infections by Haemolytic Streptococcus Group B. // *Lancet*. 1938. Vol. 1. P. 199–201.
48. Schuchat a. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. // *Clin. Microbiol. Rev.* 1998. Vol. 11, № 3. P. 497–513.
49. Schuchat a. Group B streptococcus. // *Lancet*. 1999. Vol. 353, № 9146. P. 51–56.
50. Schrag S.J. et al. Group B Streptococcal Disease in the Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis // *N. Engl. J. Med.* 2000. Vol. 342, № 1. P. 15–20.
51. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease // *Mmwr*. 2010. Vol. 59, № No. RR-10. P. 1–32.
52. Russell N.J. et al. Risk of Early-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease with Maternal Colonization Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses // *Clin. Infect. Dis.* 2017. Vol. 65, № Suppl 2. P. S152–S159.
53. Boyer K.M., Gotoff S.P. Strategies for chemoprophylaxis of GBS early-onset infections // *Antibiot Chemother.* 1985. Vol. 35. P. 267–280.
54. Boyer K.M., Gotoff S.P. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis // *N Engl J Med.* 1986. Vol. 314. P. 1665–1669.
55. Bloom S.L. et al. Ampicillin for neonatal group B streptococcal prophylaxis: how rapidly can bactericidal concentrations be achieved? // *Am J Obs. Gynecol.* 1996. Vol. 175. P. 974–976.
56. Weisblum B. Erythromycin Resistance by Ribosome Modification. 1995. Vol. 39, № 3. P. 577–585.
57. Zhong P. et al. Methylation in MLS-Resistant *Streptococcus pneumoniae* by Macrolides and Ketolides Induction of Ribosome. 1999. Vol. 5, № 3.
58. Giersing B.K. et al. Report from the World Health Organization’s Product Development for Vaccines Advisory Committee (PDVAC) meeting, Geneva, 7-9th Sep 2015 // *Vaccine*. 2016. Vol. 34, № 26. P. 2865–2869.
59. Madhi S.A. et al. Antibody Kinetics and Response to Routine Vaccinations in Infants Born to Women Who Received an Investigational Trivalent Group B Streptococcus Polysaccharide CRM197-Conjugate Vaccine during Pregnancy // *Clin. Infect. Dis.* 2017. Vol. 65, № 11. P. 1897–1904.
60. Kobayashi M. et al. Group B Streptococcus vaccine development : present status and future considerations , with emphasis on perspectives for low and middle income countries [version 1 ; referees : 2 approved] Referee Status : 2016. № 0.
61. Kobayashi M. et al. WHO consultation on group B Streptococcus vaccine development : Report from a meeting held on 27 – 28 April 2016 // *Vaccine*. The Author(s), 2016. № April.
62. Fabbrini M. et al. The Protective Value of Maternal Group B Streptococcus Antibodies: Quantitative and Functional Analysis of Naturally Acquired Responses to

- Capsular Polysaccharides and Pilus Proteins in European Maternal Sera // *Clin. Infect. Dis.* 2016. Vol. 63, № 6. P. 746–753.
63. Margarit I. et al. Preventing Bacterial Infections with Pilus-Based Vaccines: the Group B Streptococcus Paradigm // *J. Infect. Dis.* 2009. Vol. 199, № 1. P. 108–115.
 64. Nuccitelli A. et al. Structure-based approach to rationally design a chimeric protein for an effective vaccine against Group B Streptococcus infections. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108, № 25. P. 10278–10283.
 65. Lin S.M. et al. Vaccination with a latch peptide provides serotype-independent protection against group B streptococcus infection in mice // *J. Infect. Dis.* 2018. Vol. 217, № 1. P. 93–102.
 66. Santillan D.A., Andracki M.E., Hunter S.K. Protective immunization in mice against group B streptococci using encapsulated C5a peptidase // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008. Vol. 198, № 1. P. 1–6.
 67. Суворов, А. Н. Грабовская, К. Б. Леонтьева, Г. Ф. Мерингова, Л. Ф. Королева, И. Н. Дуплик, Н. В. Тотолян А.А. Рекомбинантные фрагменты консервативных белков стрептококков группы В как основа специфической вакцины // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2010. № 2. P. 44–50.
 68. Santillan D.A. et al. Efficacy of polymeric encapsulated C5a peptidase-based group B streptococcus vaccines in a murine model // *Am. J. Obstet. Gynecol. Elsevier Inc.*, 2011. Vol. 205, № 3. P. 249.e1-249.e8.
 69. Lamy M.C. et al. Rapid detection of the “highly virulent” group B streptococcus ST-17 clone // *Microbes Infect.* 2006. Vol. 8, № 7. P. 1714–1722.
 70. Margues, M. B. Kasper, D. L. Shroff A. et al. Functional activity of antibodies to the group B polysaccharide of group B streptococci elicited by a polysaccharide-protein conjugate vaccine . Functional Activity of Antibodies to the Group B Polysaccharide of Group B Streptococci Elicited by Polysaccha. 1994. Vol. 62, № 5. P. 1593–1599.
 71. Kim S. et al. Cost-effectiveness of a potential group B streptococcal vaccine for pregnant women in the United States // *Vaccine. Elsevier Ltd*, 2017. P. 1–10.
 72. Martins E.R., Melo-Cristino J., Ramirez M. Evidence for rare capsular switching in *Streptococcus agalactiae* // *J. Bacteriol.* 2010. Vol. 192, № 5. P. 1361–1369.
 73. Brochet M., Couve E., Glaser P. Integrative Conjugative Elements and Related Elements Are Major Contributors to the Genome Diversity of *Streptococcus agalactiae* □ §. 2008. Vol. 190, № 20. P. 6913–6917.
 74. Teatero S. et al. Clonal Complex 17 Group B Streptococcus strains causing invasive disease in neonates and adults originate from the same genetic pool. 2016. № December 2015. P. 1–9.
 75. Springman A.C. et al. Pilus distribution among lineages of Group B Streptococcus: An evolutionary and clinical perspective // *BMC Microbiol.* 2014. Vol. 14, № 1. P. 1–11.
 76. Yao K. et al. Capsular gene typing of streptococcus agalactiae compared to serotyping by latex agglutination // *J. Clin. Microbiol.* 2013. Vol. 51, № 2. P. 503–507.

77. Poyart C. et al. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci // *J. Clin. Microbiol.* 2007. Vol. 45, № 6. P. 1985–1988.
78. Imperi M. et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae* // *J. Microbiol. Methods.* 2010. Vol. 80, № 2. P. 212–214.