

Katarzyna Szczypa<sup>1</sup>, Joanna Wilemska<sup>2</sup>, Waleria Hryniewicz<sup>3</sup>, Izabela Sitkiewicz<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> ALAB Laboratoria, ul Stępińska 22/30, 00-739 Warszawa

<sup>2</sup> Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa

<sup>3</sup> Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków, Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Wpłynęło w marcu 2013 r.

Spis treści: 1. Wstęp. 2. Zakażenia wywołane przez *S. pyogenes*. 3. Nosicielstwo i drogi szerzenia się zakażeń *S. pyogenes*. 4. Ustalanie pokrewieństwa genetycznego pomiędzy szczepami *S. pyogenes*. 5. Oporność *S. pyogenes* na antybiotyki. 6. Profilaktyka zakażeń *S. pyogenes*. 7. Podsumowanie

### Epidemiology of *Streptococcus pyogenes* infections, clonal structure population and antibiotic resistance

**Abstract:** *Streptococcus pyogenes* (GAS) is one of the major human pathogens responsible for infections worldwide. It may cause mild infections of the skin and mucosal surfaces, as well as severe invasive infections. It has been estimated that *S. pyogenes* is responsible for half a million deaths a year, and is considered as one of the most important pathogens.

Many clinical investigations on *S. pyogenes* focus on characterization of pathogenic strains, heterogeneity/homogeneity of the population clonal spread, transfer between patients and tracing sources of antibiotic resistance. Advanced studies on vaccines that prevent GAS infections are in progress.

Contents: 1. Introduction. 2. *S. pyogenes* infections. 3. Carrier state and epidemiology of infections. 4. *S. pyogenes* strains genetic affinity. 5. *S. pyogenes* resistance to antibiotics. 6. The prophylactics of *S. pyogenes* infections. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** *Streptococcus pyogenes*, GAS, oporność na antybiotyki, *erm*, struktura klonalna

**Key words:** *Streptococcus pyogenes*, GAS, antibiotic resistance, *erm*, clonal structure

## 1. Wstęp

*Streptococcus pyogenes* (paciorkowiec  $\beta$ -hemolizujący grupy A, ang. group A *Streptococcus*, GAS) jest Gram-dodatnim, katalazo-ujemnym ziarniakiem, należącym do liczącego ponad 50 gatunków rodzaju *Streptococcus*. Rodzaj ten skupia bakterie, które powodują infekcje szerokiej grupy gospodarzy, począwszy od człowieka po wiele gatunków zwierząt domowych i dzikich. Paciorkowce kolonizują różne tkanki gospodarza stanowiąc tzw. „normalną florę bakteryjną”, są też przyczyną wielu infekcji [30]. *S. pyogenes* jest ścisłym patogenem człowieka, charakteryzuje się zdolnością do całkowitej hemolizy typu  $\beta$  krwinek czerwonych na podłożu stałym i występowaniem na powierzchni komórki grupowego wielocukru A (grupowanie wg Lancefield) [23].

GAS jest odpowiedzialny za szeroki wachlarz zakażeń o różnym stopniu ciężkości. Niektóre z nich, choć występują stosunkowo rzadko mają charakter inwazyjny tzn. rozwijają się w fizjologicznie jałowych miejscach organizmu i, pomimo leczenia, obarczone są wysoką śmiertelnością. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) szacunkowa liczba zgonów w wyniku inwazyjnych infekcji GAS i powikłań po zakażeniach wynosi ponad 500 000 przypadków rocznie, co umiejscawia

*S. pyogenes* pośród dziesięciu najważniejszych patogenów człowieka [15]. Globalny charakter zakażeń, oporność na niektóre klasy antybiotyków czy obecność wysoce zjadliwych klonów wśród szczepów inwazyjnych powoduje, że *S. pyogenes* jest przedmiotem ciągłego zainteresowania lekarzy, mikrobiologów i epidemiologów.

Jednym z głównych celów prowadzonych nad tym drobnoustrojem badań jest śledzenie zmian w patogenności i we wrażliwości na stosowane w terapii zakażeń leki. Podejmowane są również próby badań epidemiologicznych wyjaśniających podłoże genetyczno-populacyjne obserwowanej różnorodności lub klonalności pomiędzy szczepami GAS i związek pomiędzy grupami szczepów o określonych cechach a typami wywołanych zakażeń i ich ciężkością [11].

## 2. Zakażenia wywołane przez *S. pyogenes*

Pomimo ogromnego postępu medycyny i możliwości stosowania ciągle skutecznego wobec *S. pyogenes* antybiotyku – penicyliny (patrz rozdział 5), nadal notuje się na całym świecie wysoką zapadalność na infekcje *S. pyogenes*. Są to przede wszystkim zakażenia pozaszpitalne w większości o charakterze sporadycznym.

\* Autor korespondencyjny: Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków, Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa; e-mail: isitkiewicz@cls.edu.pl

Ich przeważająca liczba to zapalenie gardła i migdałków podniebiennych (angina paciorkowcowa) pojawiające się szczególnie w krajach o klimacie umiarkowanym oraz powierzchowne zapalenia skóry (liszajec) występujące częściej w klimacie ciepłym i wilgotnym. Szacuje się, że globalnie w skali roku GAS jest przyczyną 616 milionów przypadków infekcji gardła a także 111 milionów przypadków infekcji skórnych (głównie liszajca) [15]. Obie postacie zakażeń mają stosunkowo łagodny charakter, ale nieleczone lub leczone nieprawidłowo, mogą prowadzić do wystąpienia powikłań zarówno o charakterze ropnym, jak i nieropnym. W przypadku anginy paciorkowcowej bezpośrednio ropne powikłania po zakażeniu mogą przyjmować postać ropnia około-migdałkowego, zapalenia tkanek około migdałkowych (cellulitis), ropnego zapalenie wyrostka sutkowatego, zapalenia węzłów chłonnych, ucha środkowego, zatok i znacznie rzadziej bakteriemii, zapalenia płuc, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i ropni mózgu [46]. Może także dojść do rozwoju martwiczego zapalenia powięzi (patrz niżej). W przypadku zakażeń skóry najczęstszą, ale łagodną postacią jest liszajec. Natomiast znacznie cięższymi formami infekcji obejmującymi tkankę podskórną i powierzchowne naczynia limfatyczne jest róża (łac. *erysipelas*) a także tzw. cellulitis dotyczący głębszej warstwy podskórnej i tkanki tłuszczowej; nieleczone mogą bezpośrednio prowadzić do ciężkich postaci zakażenia (patrz niżej) prowadzących do zgonu.

W 2–3 tygodniu po przebytych paciorkowcowym zapaleniu gardła, najczęściej u młodych nieleczonych osób, może rozwinąć się ciężkie nieropne powikłanie pod postacią gorączki reumatycznej. Choroba ta charakteryzuje się wielonarządowym procesem zapalnym o podłożu autoimmunologicznym i ujawnia się głównie jako zapalenie mięśnia sercowego oraz zapalenie stawów, które szybko mija; rzadziej jako płasawica, rumień brzeżny. Gorączka reumatyczna jest najczęstszą przyczyną nabytych wad serca. Kolejnym nieropnym powikłaniem może być ostre kłębuszkowe zapalenie nerek, które może poprzedzać nie tylko angina paciorkowcowa, ale również wywoływane przez GAS zakażenia skóry. Jest to choroba również o podłożu immunologicznym, w przebiegu której obserwuje się uszkodzenia kłębuszków nerkowych na skutek odkładania się w nich kompleksów immunologicznych. Obecnie liczba zachorowań na gorączkę reumatyczną i kłębuszkowe zapalenie nerek jest niska w krajach o wysokim statusie ekonomicznym, jednak w krajach rozwijających się stanowi nadal poważny problem [15]. W krajach takich jak Boliwia, Indie, Sudan czy Zambia aż 10% dzieci w wieku szkolnym może cierpieć z powodu popaciorkowcowego zapalenia serca i wynikających z niego wad serca. W Indiach choroba ta odpowiada za połowę schorzeń serowo-naczyniowych będących przyczyną śmierci wielu młodych osób do 40 roku życia [15].

Niektórzy badacze również sugerują związek pomiędzy zaburzeniami autoimmunologicznymi i neuropsychiatrycznymi u dzieci powiązane z zakażeniem GAS i polegające na zaostrzeniu przez zakażenie GAS zaburzeń obsesyjno-kompulsywnych lub tików, tzw. zespół PANDAS [42, 51].

Zakażenia GAS nie ograniczają się jednak tylko do zapalenia gardła i powierzchownych infekcji skóry. Drobnoustroj ten odpowiedzialny jest również za głębokie infekcje zagrażające życiu wymagające natychmiastowej interwencji lekarza. Należą do nich poważne choroby układowe (inwazyjne) takie jak posocznica i paciorkowcowy zespół wstrząsu toksycznego (*streptococcal toxic shock syndrome*, STSS), często jako następstwo martwiczego zapalenia powięzi (*necrotizing fasciitis*, NF) [23, 74, 75].

Częstość zachorowań na ciężkie zakażenia GAS zaczęła wzrastać w drugiej połowie lat 80. XX wieku. W wielu krajach, między innymi w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i Wielkiej Brytanii od wczesnych lat 90-tych gromadzone są dane na temat epidemiologii inwazyjnej choroby paciorkowcowej. Według danych przedstawionych przez Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta), co roku w Stanach Zjednoczonych występuje od 10 do 15 tysięcy zakażeń inwazyjnych GAS, które są przyczyną około 2000 zgonów [65].

W Polsce prowadzony jest rejestr zachorowań wywołanych przez *S. pyogenes* na podstawie zgłoszeń nadsyłanych do Wojewódzkich Stacji Sanitarno-Epidemiologicznych a następnie do Zakładu Epidemiologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny (NIZP-PZH) ([http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2011/index\\_mp.html](http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2011/index_mp.html)). Według rejestru, w Polsce w 2011 r., wystąpiły zaledwie cztery przypadki STSS. Wszystkie pozostałe zakażenia zakwalifikowane jako inwazyjne (3 399 przypadków) to przypadki wystąpienia róży. Raporty dotyczące zakażeń inwazyjnych w Polsce nie świadczą niestety o braku występowania inwazyjnych zakażeń w naszym kraju, a jedynie o braku ich rozpoznawalności przez lekarzy i precyzyjnego systemu raportowania. W ramach działania krajowych ośrodków referencyjnych ds. Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego (KOROUN, [www.koroun.edu.pl](http://www.koroun.edu.pl)) i ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD, [www.korld.edu.pl](http://www.korld.edu.pl)), oraz programów monitorowania inwazyjnych zakażeń (sieć BiNET, [http://www.koroun.edu.pl/binet\\_info01.php](http://www.koroun.edu.pl/binet_info01.php)) corocznie gromadzonych jest kilkadziesiąt izolatów z inwazyjnych zakażeń GAS nadesłanych z terenu całego kraju. Pierwsze dane o molekularnych cechach szczepów wywołujących inwazyjne zakażenia GAS w Polsce są wynikiem pracy tych ośrodków [74].

Uważa się powszechnie, że GAS jest patogenem odpowiedzialnym przede wszystkim za zakażenia pozaszpitalne. Jednak ta bakteria, wprawdzie znacznie rzadziej, jest również odpowiedzialna za zakażenia związane z opieką zdrowotną, w tym szpitalne. Prezentowane

w latach 1965–2004 doniesienia opisują 61 epidemicznych ognisk szpitalnych zakażeń GAS, obejmujących liczbę od 2 do 56 przypadków. Były to głównie zakażenia miejsca operowanego oraz zakażenia okołoporodowe. Szacuje się, że odsetek szpitalnych zakażenia GAS może sięgać nawet 14% [25, 26]. Również w Polsce obserwuje się pojedyncze szpitalne ogniska epidemiczne wywołane przez GAS [70] (Sitkiewicz i Hryniewicz, KORLD, dane niepublikowane).

### 3. Nosicielstwo i drogi szerzenia się zakażeń

#### *S. pyogenes*

GAS jest drobnoustrojem, dla którego człowiek jest jedynym gospodarzem. Pomimo, że nosicielstwo *S. pyogenes* występuje głównie w górnych drogach oddechowych (błona śluzowa gardła) i na skórze człowieka to bakterie te mogą również kolonizować narządy moczopłciowe (pochwę) i okolice odbytu. Stopień nosicielstwa jest zależny od wieku człowieka. Najczęściej nosicielami są dzieci w wieku szkolnym, których odsetek waha się w zakresie od 12 do 23%. Odsetek nosicieli pośród osób dorosłych jest niższy i wynosi około 5% [47]. Zakażenie GAS szerzy się drogą kropelkową lub poprzez bezpośredni kontakt z wydzieliną z błon śluzowych nosogardła osoby chorej lub nosiciela. Przenoszenie drobnoustroju może też odbywać się na drodze kontaktu z zakażoną raną lub zmienioną chorobowo skórą. Okres wylegania choroby jest różny, dla zapalenia gardła i migdałków wynosi 2 do 5 dni, dla zakażeń skóry czas ten jest nieco dłuższy i obejmuje 5–7 dni. W przypadku inwazyjnej postaci zakażenia jest on zróżnicowany, i wynosi średnio 1–3 dni. Występowanie zakażeń GAS ma w większości charakter sporadyczny, aczkolwiek może przyjmować również postać ognisk epidemicznych, gdyż zapalenie gardła i liszajec potrafią rozprzestrzeniać się w dużych skupiskach ludzkich. Szacuje się, że ryzyko przeniesienia zakażenia w kontakcie domowym wynosi ok. 25%. Badania sugerują, że źródłem zakażenia i rozprzestrzeniania się GAS w środowisku domowym mogą być dzieci w wieku szkolnym ze względu na wysoką zachorowalność i nosicielstwo. Ta grupa dzieci często choruje na wirusowe zakażenia górnych dróg oddechowych, a to zwiększa rozsiew *S. pyogenes* i innych gatunków bytujących w nosogardle. Wykazano również, że więcej niż troje dzieci mieszkających w jednym gospodarstwie domowym ułatwia międzypersonalne rozprzestrzenianie się GAS [23, 28]. W środowisku szpitalnym źródła szerzenia się zakażeń GAS są różne. Mogą to być endogenne szczepy własne skolonizowanego pacjenta oraz szczepy egzogenne pochodzące od nosicieli, którymi mogą być inni pacjenci w szpitalu lub pracownicy opieki medycznej. Bardzo rzadko źródłem GAS w szpitalu są przedmioty z otoczenia pacjenta lub sprzęt medyczny [72].

### 4. Ustalanie pokrewieństwa pomiędzy szczepami GAS

Ze względu na poważne konsekwencje zdrowotne i społeczne, jakie niosą za sobą opisywane zakażenia *S. pyogenes*, oprócz rozpoznania czynnika etiologicznego w konkretnym przypadku zachorowania, niezwykle ważne jest prowadzenie ciągłego monitorowania tych infekcji dla celów terapeutycznych i epidemiologicznych.

W dochodzeniu epidemiologicznym do ustalenia pokrewieństwa pomiędzy izolatami należącymi do tego samego gatunku, lub udowodnienia jego braku, wykorzystuje się klasyczne metody mikrobiologiczne oparte na ocenie cech fenotypowych mikroorganizmu oraz nowoczesne metody biologii molekularnej analizujące materiał genetyczny mikroorganizmu. Opis cech danego izolatu powstaje w tzw. procesie typowania. Przydatność systemu typowania oceniana jest na podstawie jego rozdzielczości, łatwości interpretacji wyników, ich powtarzalności, wiarygodności, szybkiego wykonania i kosztów.

W powiązaniu z danymi demograficznymi, klinicznymi i klasyczną analizą epidemiologiczną, typowanie drobnoustrojów umożliwia ustalanie potencjalnych rezerwuarów drobnoustrojów patogennych i możliwości ich rozprzestrzeniania, a w efekcie weryfikację odpowiednich schematów postępowania w przypadku wystąpienia infekcji. Oprócz znaczenia w dochodzeniu epidemiologicznym, typowanie szczepów jest niezwykle istotne w immuno- i chemioprophylaktyce, ma ważny aspekt poznawczy oraz przyczynia się do badania ewolucji bakterii [16].

Określanie cech fenotypowych (np. biochemicznych, antybiotykowrażliwości) nie jest wystarczające a jedynie przydatne na wstępnym etapie typowania drobnoustrojów i musi być wzbogacone molekularnymi technikami typowania.

W typowaniu epidemiologicznym *S. pyogenes* najważniejszą metodą jest określenie typu (dawniej serotypu) białka M. Białko M jest głównym powierzchniowym, zmiennym antygenem *S. pyogenes*, jego warianty odpowiedzialne są za powstawanie różnych serotypów GAS [75]. Wprowadzona w latach 60. XX wieku fenotypowa metoda identyfikacji typów serologicznych białka M oparta jest na reakcji pomiędzy specyficznym, N-końcowym fragmentem białka M a swoistymi przeciwciałami w teście precipitacji [40]. Pomimo długoletniego używania metoda serologiczna ma szereg ograniczeń i była stosowana przez nieliczną grupę laboratoriów referencyjnych. Ograniczenia wynikały głównie z dużej pracochłonności metody i kosztów oznaczenia, np. uzyskanie szerokiego wachlarza wzorcowych surowic odpornościowych, czy związane z tym utrzymywanie zwierząt laboratoryjnych okazało się bardzo drogie.

Aby uniknąć niedoskonałości metody serologicznej, około roku 1995 wprowadzona została metoda molekularna typowania białka M, tzw. typowanie *emm* (*emm typing*). Typowanie *emm* uważane jest dzisiaj za „złoty standard”, gdyż opierając się na sekwencjonowaniu fragmentu DNA wykazuje nawet najmniejsze różnice w budowie białka M. Metoda polega na amplifikacji fragmentu genu *emm* kodującego N-koniec białka M przy użyciu reakcji PCR, a następnie ustaleniu sekwencji 180 nukleotydów kodujących pierwsze 50 aminokwasów dojrzalego białka wraz z 10 aminokwasami sekwencji sygnałowej. Uzyskane sekwencje porównuje się z dostępną na stronie internetowej CDC bazą danych, w której znajduje się ponad 200 typów *emm*. Porównanie z sekwencją referencyjną pozwala na określenie nie tylko typu, ale i allelicznych wariantów określonego typu białka M. Jeśli sekwencja nukleotydowa 5' genu *emm* jednego szczepu jest identyczna w > 95% z sekwencją innego szczepu, to określa się, że szczepy te prezentują te same typy *emm*. Tylko w nielicznych przypadkach typy *emm* określone metodami genetycznymi nie odpowiadają typom serologicznym białka M [6, 31, 32]. Metoda molekularnego typowania *emm* jest zgodna z konwencjonalnym typowaniem serologicznym wg Lancefield, eliminuje jednak ograniczenia związane z ciągłym pojawianiem się nowych wariantów białka M, ograniczoną dostępnością surowicy a także trudnościami w interpretacji wyniku. Jej zaletą jest czułość, prostota wykonania oraz oszczędność czasowa, jedynym zaś ograniczeniem może być dostępność specjalistycznego sprzętu. Dodatkowo, nie wykrywalna na drodze serologicznej zmienność sekwencji *emm* w obrębie typu, może być przesłanką w śledzeniu ognisk epidemii oraz transmisji specyficznych klonów w populacji *S. pyogenes*. W większości przypadków w genomie występuje tylko jeden gen *emm*, choć możliwe jest występowanie do trzech odrębnych genów *emm* i *emm-like*, których aranżacja warunkuje wystąpienie tzw. wzorów *emm* (od A do E) [48].

W związku z rozwojem technik molekularnych, coraz rzadziej używa się również innych, stosowanych przez lata, metod serologicznych takich jak typowanie oparte na różnicach antygenowych białka T lub wykrywanie enzymu OF (*opacity factor*) [42, 54].

Standardową metodą używaną przez wiele laboratoriów referencyjnych do porównywania izolatów bakteryjnych, nie tylko GAS, jest analiza makrorestrykcyjna wraz z rozdziałem fragmentów w zmiennym polu elektrycznym (PFGE). Analizy PFGE są jednak trudne w wykonaniu i niełatwe do porównania pomiędzy różnymi ośrodkami. Metoda ta daje znakomite rezultaty w przypadku analizy niezbyt dużej liczby szczepów pochodzących z lokalnych epidemii. Ze względu na ograniczenia PFGE, od dłuższego czasu poszukiwano metod, które dałyby bardziej jednoznaczne i łatwiejsze w interpretacji wyniki.

Wraz z coraz powszechniejszym wykorzystaniem sekwencjonowania w typowaniu bakterii, coraz częściej stosowaną metodą ustalania pokrewieństwa pomiędzy szczepami GAS jest tzw. Multi Locus Sequence Typing (MLST) [29]. Metoda polega na ustaleniu sekwencji nukleotydowej siedmiu (u innych gatunków ta liczba może być zmienna) alleli konserwowanych genów metabolizmu podstawowego. Każdy znany do tej pory allel ma swój unikatowy numer w bazie danych, na podstawie kodu składającego się z siedmiu liczb odpowiadających numerom alleli ustalany jest tzw. typ sekwencyjny izolatu (*sequence type*, ST). ST izolatów z całego świata mogą być ze sobą porównywane i łączone w grupy podobnych klonów, czyli tzw. kompleksy klonalne (*clonal complex*, CC). Informacja na temat znalezionych do tej pory wariantów genów ST oraz szczepów, u których zostały opisane, zdeponowana jest w internetowej bazie danych pod adresem <http://www.spyogenes.mlst.net>. Obecnie baza danych MLST dla *S. pyogenes* zawiera około 500 typów ST, które zostały wyodrębnione spośród przesłanych kilku tysięcy szczepów [33, 48]. Pomimo wielu zalet metody MLST, jakimi są wysoka czułość i powtarzalność, stosowanie jej jest ograniczone, głównie ze względu na koszt sekwencjonowania.

Aby usprawnić typowanie GAS, zmniejszyć nakłady finansowe i ułatwić analizę ciągle wprowadzane są nowe metody, które powstają dzięki rozwojowi technologii sekwencjonowania i metod PCR. Przykładem takiej nowej metody może być wersja MLST niewymagająca sekwencjonowania, zwana MeltTs. Metoda, podobnie jak sekwencjonowanie DNA wykrywa polimorfizmy w sekwencji DNA, oparta jest jednak na porównaniu krzywych topnienia (*high resolution melting curves*, HRM) dziesięciu krótkich fragmentów o długości od 59 do 119 par zasad powielonych w reakcji PCR. Każdy fragment zawiera polimorficzne miejsca (SNPs), a fragmenty w zależności od liczby par G+C różnią się od siebie temperaturą topnienia DNA. Porównanie liczby par G+C określonych na podstawie temperatury topnienia cząsteczki w 10 fragmentach DNA daje unikalny profil MeltTs. Wadą tej metody może być konieczność posiadania urządzenia zdolnego przeprowadzić analizę krzywych topnienia. Metoda ta jest w ponad 99% zgodna z analizą MLST, a wykryte różnice pomiędzy badanymi szczepami odzwierciedlają strukturę populacji [59].

Oprócz metod bazujących na ustalaniu sekwencji konserwowanych (MLST) lub zmiennych (*emm typing*) genów, do typowania można zastosować metody wykrywające określone konfiguracje genów lub mobilnych elementów genetycznych w badanych szczepach. GAS wytwarza szereg charakterystycznych czynników wirulencji, głównie tzw. superantygenów, których występowanie lub współwystępowanie może świadczyć o pokrewieństwie izolatów [13, 14]. Również obecność zintegrowanych z genomem mobilnych elementów

genetycznych jest cechą diagnostyczną i dwa szczepy o takim samym położeniu elementów w genomie są ze sobą blisko spokrewnione. Na podstawie sekwencji genomowych GAS ustalono 21 stałych miejsc integracji mobilnych czynników genetycznych takich jak fagi lub elementy ICE (*integrative conjugative elements*) w określonych miejscach genomu, których położenie może zostać użyte do projektowania systemów typowania [9]. Przykładem metod typowania opartych o wykrywanie określonych genów lub elementów genetycznych mogą być metody oparte o szereg reakcji multiplex PCR opracowane ostatnio w naszym laboratorium [13, 14].

Na podstawie analizy sekwencji genomowych, nasz zespół opracował również metodę MLVA/MLVF (**M**ulti **L**ocus **V**NTR **A**nalysis/**M**ulti **L**ocus **V**NTR **F**ingerprinting) opartą na analizie sekwencji tandemowo powtórzonych w genomie *S. pyogenes* tzw. VNTR (**V**ariable **N**umber **T**andem **R**epeats) [54, 55]. W szeregu genów GAS występują powtórzenia nukleotydowe o długości od kilkunastu do kilkuset par zasad. W reakcji multiplex PCR namnażane są fragmenty DNA o zróżnicowanej wielkości, która zależy od liczby powtórzeń występujących w danym fragmencie DNA. Im mniej różnic w wielkości produktów PCR zostanie wykrytych, tym bliżej badane szczepy są ze sobą spokrewnione.

Przyszłość metod ustalania pokrewieństwa między izolatami bakteryjnymi i badań nad ewolucją bakterii, na razie niestety ograniczona przez zbyt wysokie koszty, leży w całościowych analizach genomów bakteryjnych. Przykładem wykorzystania do analizy epidemii wywołanych przez *S. pyogenes* technik sekwencjonowania nowej generacji jest analiza kilkuset szczepów serotypu M3 izolowanych z inwazyjnych zakażeń wywołanych GAS [8]. Analiza porównawcza całych genomów pozwoliła nie tylko prześledzić dynamikę rozwoju epidemii w następujących po sobie falach zachorowań, ale również przyczyniła się do wykazania wpływu pojedynczych mutacji w genomie na wirulencję GAS. Przykładem może być pojedyncza mutacja w genie *mtsR* odpowiedzialnym za regulację transportu jonów metali na aktywację głównej proteazy GAS-SpeB [56].

## 5. Oporność *S. pyogenes* na antybiotyki

Podstawowym antybiotykiem stosowanym w leczeniu zakażeń *S. pyogenes* jest penicylina. Jak dotąd wszystkie szczepy GAS są w pełni wrażliwe na ten antybiotyk, a wrażliwość na penicylinę oznacza również wrażliwość na inne antybiotyki beta-laktamowe [45]. Od ponad 70 lat nie uległo zmianie minimalne stężenie penicyliny hamujące wzrost *S. pyogenes* (MIC). Fenomen ciągłej wrażliwości GAS na beta-laktamy tłumaczy się z jednej strony brakiem odpowiednich mechanizmów umożliwiających wnikięcie do komórki bakterii plazmidu niosącego gen beta-laktamazy, jak również słabej zdolności GAS do transformacji [35, 45]. Dodatkowo istnieje hipo-

teza mówiąca o tym, że koszt energetyczny ponoszony przez komórkę bakteryjną GAS w zmniejszeniu powinowactwa PBP do molekuł antybiotyku jest zbyt wysoki, aby mógł ulec utrwaleniu. Wyhodowane bowiem w laboratorium niewrażliwe na penicylinę mutanty *S. pyogenes* produkujące zmienione białka PBP charakteryzowały się obniżoną żywotnością i szybko ginęły [37]. Mimo to istnieje obawa, że wśród paciorkowców grupy A, podobnie jak u wielu ziarenkowców Gram-dodatnich dzielących z nimi tę samą niszę ekologiczną, może pojawić się niewrażliwość na ten antybiotyk [3, 15].

Wydaje się więc niezwykle istotnym, aby stale monitorować wrażliwość *S. pyogenes* zarówno na penicylinę, jak i na antybiotyki innych grup stosowane w leczeniu zakażeń tym drobnoustrojem ([www.antybiotyki.edu.pl](http://www.antybiotyki.edu.pl)).

Należy również podkreślić fakt, że sama penicylina nie jest w pełni skuteczna w przypadku rozwijających się głęboko w tkankach inwazyjnych zakażeń. W takich przypadkach konieczne jest zastosowanie innych terapii antybiotykowych. Od wielu lat antybiotyki makrolidowe stanowią ważną alternatywę dla penicyliny, zwłaszcza w leczeniu zakażeń u osób z nadwrażliwością na penicylinę. Wzrost ich znaczenia wiąże się ze zwiększającym się udziałem w zakażeniach człowieka bakterii atypowych i z wykrytą stosunkowo niedawno unikatową cechą preparatów makrolidowych, tzn. ich działaniem przeciwzapalnym [57]. Antybiotyki makrolidowe nie mogą jednak zastąpić w terapii antybiotyków beta-laktamowych ze względu na coraz częściej pojawiającą się oporność na tę grupę leków. Wśród szczepów opornych na makrolidy często występuje krzyżowa oporność na linkozamidy, mające to samo miejsce i często wspólny mechanizm oporności. Bakterie wykazujące taką krzyżową oporność są izolowane w wielu krajach na świecie, a problem został dostrzeżony w latach 90. XX wieku [21]. W Europie pierwsze paciorkowce grupy A odporne na erytromycynę zanotowano już w roku 1959 w Wielkiej Brytanii [44]. Wzmożone zużycie antybiotyków tej klasy, obserwowane w przeciągu ostatnich dwudziestu lat, spowodowało niekorzystny z perspektywy terapii, drastyczny wzrost oporności wśród GAS. Dane pochodzące z różnych regionów świata, jednogłośnie podnoszą ten problem, szacując odsetek opornych szczepów na poziomie od 2,7% aż do 40% [2, 10, 39, 43, 50, 53, 58, 60, 67, 73, 78]. W Polsce poziom oporności GAS na erytromycynę szacuje się w granicach 12%, z tendencją do systematycznego wzrostu [73]. W badaniach populacyjnych obserwuje się klonalne rozprzestrzenianie określonych serotypów GAS takich jak M4, M28, M75 i M77 wykazujących oporność na antybiotyki makrolidowe [34, 64], (B o r e k, O b s z a ń s k a i S i t k i e w i c z, dane niepublikowane).

Oporność bakterii na makrolidy jest związana trzema podstawowymi mechanizmami: (i) modyfikacją celu działania antybiotyku, (ii) aktywnym jego wypompowaniem z komórki bakteryjnej oraz (iii) modyfikacją

enzymatyczną antybiotyku. Wśród paciorkowców grupy A powszechnym mechanizmem oporności na makrolidy jest modyfikacja celu działania leku, czyli potranskrypcyjna modyfikacja podjednostki 23S rybosomowego RNA. Enzymy modyfikujące RNA są kodowane przez geny *erm* (*erythromycin resistance methylase*) należące do dużej grupy *ermAM* z dwoma występującymi u *S. pyogenes* genami *ermTR/A* i *ermB*. Działanie tych enzymów wpływa hamująco na wiązanie do podjednostki 50S rybosomu nie tylko makrolidów, lecz również linkozamidów (klindamycyny) i streptograminu typu B. W wyniku aktywności produktów genów *erm* występuje wspomniane zjawisko oporności krzyżowej zwane  $MLS_B$  (*macrolides lincosamides streptogramins B*), a ekspresja oporności  $MLS_B$  może mieć charakter indukcyjny ( $iMLS_B$ ) lub konstytutywny ( $cMLS_B$ ). Oporność typu  $MLS_B$  ma poważne konsekwencje terapeutyczne w odniesieniu do zakażeń inwazyjnych wywołanych przez GAS, bowiem uniemożliwia zastosowanie najbardziej skutecznego schematu leczenia tj. penicyliny z klindamycyną.

Paciorkowce grupy A są również w stanie aktywnie usuwać antybiotyki z komórki bakteryjnej (*efflux*). Mechanizm ten jest uwarunkowany obecnością transporterów MSF (*major facilitator superfamily*) kodowanych przez geny *mef*. Aktywność tego mechanizmu warunkuje jedynie oporność na makrolidy 14- i 15-członowe (erytromycyna, klarytromycyna, roksytromycyna i azytromycyna), a wynikający z tego fenotyp oporności określa się, jako oporność typu M.

Oporność na makrolidy w wielu przypadkach koreluje z opornością na tetracykliny – antybiotyki, których bakteriostatyczne działanie polega, podobnie jak w przypadku makrolidów, na hamowaniu biosyntezy białka. Mają one zdolność wiązania się z białkami podjednostki 30S rybosomu, blokując przyłączanie się aminoacylo-tRNA do miejsca akceptorowego A w kompleksie mRNA-rybosom [20]. Antybiotyki te wprowadzono do lecznictwa w latach 50-tych XX wieku, kiedy niewiele było na rynku tego typu leków, więc stanowiły ważną alternatywę dla penicylin. To zaowocowało ich szerokim stosowaniem i to nie tylko w medycynie, ale także w weterynarii, i produkcji roślinnej [38]. Po raz pierwszy szczepy *S. pyogenes* odporne na tetracyklinę pojawiły się niedługo po wprowadzeniu leku w roku 1954 w Wielkiej Brytanii [1]. W latach 70-tych XX wieku w wielu krajach poziom oporności GAS na tetracyklinę był bardzo wysoki i wynosił nawet 80% [52]. W badaniach prowadzonych w Polsce poziom oporności na tetracyklinę wśród izolatów GAS pochodzących z różnych zakażeń był wysoki i wynosił ponad 40%. Od tego czasu obserwowano dramatyczne narastanie oporności na tę grupę antybiotyków, która rozprzestrzeniła się głównie przy udziale mobilnych elementów genetycznych [68].

Oporność na tetracykliny jest związana przede wszystkim z dwoma mechanizmami: aktywnym usuwa-

niem antybiotyku z komórki na zewnątrz do środowiska oraz wytwarzaniem białek chroniących rybosomy (*ribosomal protection proteins*, RPPs). Pierwszy z wymienionych mechanizmów występuje przede wszystkim u bakterii Gram-ujemnych [17, 18]. Drugi rodzaj oporności jest charakterystyczny dla *S. pyogenes* a białka RPPs kodowane są przez geny *tetM* i *tetO* [20].

Zaobserwowano częste współwystępowanie genów oporności na makrolidy i tetracykliny, korelacja najczęściej dotyczy występowania genów *ermB* z *tetM* oraz *ermTR/A* z *tetM* i *tetO*. Zjawisko to wiąże się z występowaniem horyzontalnego transferu wśród szczepów GAS. Zidentyfikowano sekwencje transpozonów zintegrowanych z genomami GAS zawierających wymienione geny oporności [62]. Wykazano również, że w przypadku fenotypu M oraz fenotypu  $iMLS_B$  determinantem oporności na erytromycynę często towarzyszy gen *tetO*, w przeciwieństwie do związanego najczęściej z fenotypem  $cMLS_B$  genu *tetM*. Szczególnie użyteczne jest poszukiwanie kodującego tetracyklinę genu *tetM*, będącego markerem silnie rozprzestrzenionych w genomach bakteryjnych, integracyjnych elementów koniugacyjnych ICE z rodziny Tn916 [61]. W przypadku fenotypu  $cMLS_B$  występowanie wspomnianej funkcjonalnej lub wyciszonej determinanty oporności na tetracyklinę, świadczy właśnie o zaistniałym włączeniu genu *ermB* do pochodnych Tn916 – Tn1545, Tn3703, Tn1116 czy Tn3872 [77]. Innym unikatowym elementem, przenoszącym informację o oporności na tetracyklinę i erytromycynę jest *tetO-mefA*. Powstał on poprzez insercję genu *tetO*, a także transpozonu Tn1207.1 zawierającego gen *mefA*, do profaga włączonego w chromosom bakteryjny [36]. Z kolei oporność na antybiotyki inne niż tetracyklina, jest markerem elementu ICE 10750-RD.2, zawierającego gen *ermA*, flankowany przez geny oporności na tetronazynę i spektynomycynę [9, 77].

W ciągu minionej dekady, intensywnie badano otoczenie genów *mef/erm* oraz mechanizmy ich ekspansji. Scharakteryzowano w ten sposób szereg elementów transpozycyjnych związanych z opornością na erytromycynę, o charakterze profagów, ICE, transpozonów a nawet plazmidów. Często obserwowana różnica w organizacji genetycznej poszczególnych ICEs względem reszty chromosomu, może wskazywać, że przenoszący informację o oporności element wywodzi się od donora niespokrewnionego z GAS [9]. Pozwala to na rozprzestrzenianie się lekooporności nie tylko w obrębie populacji GAS, lecz także pomiędzy przedstawicielami różnych patogennych gatunków z rodzajów *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* a nawet *Clostridium* [4, 77, 79]. Inne gatunki bakteryjne zajmujące typowe dla *S. pyogenes* nisze mogą być jednocześnie rezerwuarami nowych determinantów oporności. Jak do tej pory, w genomach GAS wykazano występowanie szeregu mobilnych elementów genetycznych przenoszących oporność na makrolidy takich jak Tn917, Tn3872,

Tn6002, Tn1116 z *ermB*; ICE10750-RD.2, pRW35 z *ermA*; Tn1207.3,  $\Phi$ 10394.4,  $\Phi$ m46.1, oraz chimeryczny element szczepu M6 (transpozon wbudowany w profaga) niosący *mefA* [4, 77].

O dynamice horyzontalnego transferu genów może również świadczyć izolacja inwazyjnego szczepu *S. pyogenes*, którego indukowana oporność na erytromycynę warunkowana była zlokalizowanym na plazmidzie pRW35 genem *ermT*, typowym dla chromosomu paciorkowców grupy D, izolowanych na Tajwanie i USA [27, 80]. Odkrycie to dobitnie pokazuje, że analizując ekspansję lekooporności GAS nie można wykluczać żadnego rodzaju mobilnych elementów genetycznych uczestniczących w potencjalnym horyzontalnym transferze.

Narastanie oporności na makrolidy i linkozamidy, wśród szczepów GAS nakazuje poszukiwanie alternatywnych terapii, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu zakażeń, zwłaszcza tych o charakterze inwazyjnym. Grupą antybiotyków o aktywności głównie wobec ziarenkowców Gram-dodatnich są oksazolidynony. Ich jedyny przedstawiciel linezolid, jest zalecany w leczeniu ciężkich zakażeń opornymi na metycylinę *S. aureus* czy opornymi na penicylinę *S. pneumoniae*. Antybiotyk ten posiada unikatowy mechanizm działania zaburzający biosyntezę białka bakterii. Blokuje on powstanie kompleksu inicjacyjnego, składającego się z podjednostek 50S i 30S oraz tRNA. W terapii zakażeń *S. pyogenes* istotny jest fakt, iż linezolid hamuje produkcję toksyn pirogennych w podobnym stopniu do klin-damycyny [22].

Innymi antybiotykami stosowanymi w leczeniu zakażeń powodowanych przez ziarenkowce Gram-dodatnie są nowe fluorochinolony (IV generacja), których przedstawicielami są lewofloksacyna i moksifloksacyna. Jest to jedyna grupa chemioterapeutyków, których mechanizm działania polega na hamowaniu syntezy DNA. Punktem uchwytu dla fluorochinolonów są dwa enzymy bakteryjne, regulujące przestrzenne ukształtowanie DNA: gyraza DNA i topoizomeraza IV. Wymienione fluorochinolony, lewofloksacyna i moksifloksacyna znalazły zastosowanie w leczeniu zakażeń układu oddechowego wywołanych przez paciorkowce [3]. W badaniach prowadzonych w Polsce wartości MIC linezolidu i fluorochinolonów dla izolatów GAS zarówno opornych na makrolidy, jak i pochodzących z inwazyjnych infekcji wskazywały na ich wrażliwość na wymienione powyżej chemioterapeutyki [73, 74].

## 6. Profilaktyka zakażeń *S. pyogenes*

Mimo wieloletnich badań ukierunkowanych na opracowanie metod efektywnego zapobiegania zakażeniom powodowanym przez GAS, wciąż brakuje komercyjnie dostępnej szczepionki, mogącej uchronić przed zakażeniem.

Wybór składu i produkcja szczepionki jest procesem złożonym i długoletnim, toteż niezwykle istotną kwestią jest odpowiedni dobór białek o właściwościach immunogennych. W przypadku GAS, od wielu lat promowana jest strategia wykorzystania w tym celu białka M ze względu na ochronne właściwości przeciwciał przeciwko temu białku [12, 24]. Ze względu na istnienie bardzo wielu antygenowo odmiennych białek M proponuje się wykorzystanie w szczepionce najczęściej występujących serotypów *S. pyogenes*, odpowiedzialnymi za zapalenie gardła i migdałków podniebiennych oraz infekcje inwazyjne. W badaniu II fazy szczepionki StreptAvax (ID Biomedical) po roku obserwacji klinicznej oceniono, że szczepionka ta wywołuje swoistą odpowiedź immunologiczną u zdrowych osób dorosłych nie powodując przy tym poważnych objawów niepożądanych [38, 49].

Stworzenie szczepionki wykorzystującej fragmenty białka M jest jednak zadaniem nieco kontrowersyjnym ze względu na dwa główne problemy. Pierwszym problemem jest ciągła ewolucja i powstawanie nowych typów białka M, przeciwko którym szczepionka o ściśle ustalonym składzie będzie nieskuteczna. Ważniejszym jednak problemem jest geograficznie zróżnicowana i nierównomierna dystrybucja szczepów [15]. Oszacowano, że opracowana 26 walentna szczepionka zapewniłaby odporność przeciwko większości chorobotwórczych izolatów w krajach wysoko rozwiniętych (Europa, Ameryka Północna, Australia, Nowa Zelandia, Japonia i Hong Kong), średni poziom odporności w Azji i na Środkowym Wschodzie oraz niski poziom w Afryce i na wyspach Pacyfiku [69]. Różnice w strukturze wariantów w różnych regionach geograficznych wskazują na konieczność produkcji kilku rodzajów szczepionek, które będą przystosowane do użycia na konkretnym kontynencie. Alternatywą może być opracowanie szczepionki zawierającej antygeny o niewielkiej zmienności wspólne dla wszystkich szczepów i powodujące powstawanie przeciwciał ochronnych,

Do czasów poznania sekwencji pierwszego genomu GAS, wybór czynników mogących stanowić potencjalny antygen szczepionkowy odbywał się głównie na drodze analiz serologicznych. Pulę wybranych w taki sposób czynników znacznie wzbogaciły dopiero badania molekularne GAS, analizujące szereg nowopoznanych białek zewnątrzkomórkowych i powierzchniowych lipoprotein [41, 63]. W wyniku systematycznych badań wykryto cząsteczki, których właściwości sugerują ich potencjalne wykorzystanie w składzie szczepionki. Przykładowo, 23 nowo zidentyfikowane białka mogące być potencjalnymi składnikami szczepionki reagują z surowicą osób, które przeszły infekcję GAS – co oznacza, że są wytwarzane podczas infekcji. Białka te znajdują się na powierzchni ściany komórkowej co czyni je bardziej dostępnymi dla przeciwciał i dobrymi celami dla szczepionki [19]

Przykładem badanego białka jako składnika potencjalnej szczepionki przeciwko GAS jest zewnątrzkomórkowa proteaza SpyCEP. Eksperymenty prowadzone na modelach zwierzęcych dają pozytywne efekty, zarówno w przypadku iniekcji domięśniowej, jak i donosowej. Dodatkową zaletą wykorzystania SpyCEP jest fakt, że jego homologi zidentyfikowano również w innych gatunkach paciorkowców, w tym *S. equi* (SeCEP), a także będącego przyczyną zoonoz, *S. iniae* (CepI) [71, 76, 81]. Innymi składnikami szczepionek mogą być np: peptydaza C5a [66], czy konserwatywny peptyd J8 białka M [5]. Ostatnio przy użyciu metod proteomicznych zidentyfikowane kolejne 40 białek, które mogą zostać użyte w konstrukcji szczepionki przeciw GAS. Do silnych immunogenów zakwalifikowano streptolizynę O, białko powierzchniowe (SPy0269 w szczepie SF370), białko zewnątrzkomórkowe (SPy0019 w szczepie SF370) i białko należące do rodziny internalin A (SPy1361 w szczepie SF370) [7].

## 7. Podsumowanie

Narastająca oporność na antybiotyki wśród szczepów *S. pyogenes* uwydatnia konieczność prowadzenia aktywnego monitorowania lekowrażliwości, w oparciu zarówno o metody fenotypowe, jak i genetyczne w celu identyfikacji rezerwuarów opornych drobnoustrojów. Zastosowanie molekularnych technik takich jak MLST, MLVA czy PFGE do ustalania pokrewieństwa między szczepami, badanie występowania genów oporności na różne antybiotyki, ich lokalizacji oraz dróg przenoszenia jest ważnym kierunkiem badań w mikrobiologii.

Wysoka różnorodność i zmienność szczepów GAS wskazuje na możliwość szybkiej selekcji coraz to nowszych klonów o podwyższonej wirulencji. Złożoność procesów wiodących do umiejscowienia genów warunkujących oporność na chemioterapeutyki i dalszej wędrówki tychże genów jest jeszcze jednym dowodem na niezwykłą plastyczność genetyczną *S. pyogenes*.

Od wielu lat podejmowane są próby opracowania swoistej wysoce immunogennej i bezpiecznej szczepionki przeciwko szczepom GAS. Obecnie dużą nadzieję w zwalczaniu rozprzestrzeniania infekcji GAS budzi wykorzystanie, zidentyfikowanych za pomocą tzw. „reverse vaccinology”, nowych cząsteczki białek zewnątrzkomórkowych *S. pyogenes* jako potencjalnych składników szczepionki.

## Piśmiennictwo

- Akiba T., Koyama K., Ishiki Y., Kimura S., Fukushima T.: On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella*. *Jpn. J. Microbiol.* **4**, 219–227 (1960)
- Alos J.I., Aracil B., Oteo J., Gomez-Garcés J.L.: Significant increase in the prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin- and miocamycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes* in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 333–337 (2003)
- Amabile-Cuevas C.F., Hermida-Escobedo C., Vivar R.: Comparative *in vitro* activity of moxifloxacin by E-test against *Streptococcus pyogenes*. *Clin. Infect. Dis.* **32 Suppl. 1**, S30–32 (2001)
- Banks D.J., Porcella S.F., Barbian K.D., Martin J.M., Musser J.M.: Structure and distribution of an unusual chimeric genetic element encoding macrolide resistance in phylogenetically diverse clones of group A *Streptococcus*. *J. Infect. Dis.* **188**, 1898–1908 (2003)
- Batzloff M.R., Hayman W.A., Davies M.R., Zeng M., Pruskakorn S., Brandt E.R., Good M.F.: Protection against group A streptococcus by immunization with J8-diphtheria toxoid: contribution of J8- and diphtheria toxoid-specific antibodies to protection. *J. Infect. Dis.* **187**, 1598–1608 (2003)
- Beall B., Facklam R., Thompson T.: Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 953–958 (1996)
- Bensi G., Mora M., Tuscano G., Biagini M., Chiarot E., Bombaci M., Capo S., Falugi F., Manetti A.G., Donato P., Swennen E., Gallotta M., Garibaldi M., Pinto V., Chiappini N., Musser J.M., Janulczyk R., Mariani M., Scarselli M., Telford J.L., Grifantini R., Norais N., Margarit I., Grandi G.: Multi high-throughput approach for highly selective identification of vaccine candidates: the group A streptococcus case. *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, M111 015693 (2012)
- Beres S.B., Carroll R.K., Shea P.R., Sitkiewicz I., Martinez-Gutierrez J.C., Low D.E., McGeer A., Willey B.M., Green K., Tyrrell G.J., Goldman T.D., Feldgarden M., Birren B.W., Fofanov Y., Boos J., Wheaton W.D., Honisch C., Musser J.M.: Molecular complexity of successive bacterial epidemics deconvoluted by comparative pathogenomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4371–4376 (2010)
- Beres S.B., Musser J.M.: Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome. *PLoS One*, **2**, e800 (2007)
- Bergman M., Huikko S., Pihlajamaki M., Laippala P., Palva E., Huovinen P., Seppala H.: Effect of macrolide consumption on erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Finland in 1997–2001. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 1251–1256 (2004)
- Bessen D.E.: Population biology of the human restricted pathogen, *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Genet. Evol.* **9**, 581–593 (2009)
- Bisno A.L., Rubin E.A., Cleary P.P., Dale J.B.: Prospects for a group A streptococcal vaccine: rationale, feasibility, and obstacles-report of a National Institute of Allergy and Infectious Diseases workshop. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 1150–1156 (2005)
- Borek A.L., Obszanska K., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Detection of *Streptococcus pyogenes* virulence factors by multiplex PCR. *Virulence*, **3**, (2012)
- Borek A.L., Wilemska J., Izdebski R., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: A new rapid and cost-effective method for detection of phages, ICEs and virulence factors encoded by *Streptococcus pyogenes*. *Pol. J. Microbiol.* **60**, 187–201 (2011)
- Carapetis J.R., Steer A.C., Mulholland E.K., Weber M.: The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect. Dis.* **5**, 685–694 (2005)
- Carrico J.A., Silva-Costa C., Melo-Cristino J., Pinto F.R., de Lencastre H., Almeida J.S., Ramirez M.: Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2524–2532 (2006)
- Chopra I., Roberts M.: Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232–260; second page, table of contents (2001)

18. Clermont D., Chesneau O., De Cespedes G., Horaud T.: New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in streptococci and nucleotide sequence of tet(T) isolated from *Streptococcus pyogenes* A498. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 112–116 (1997)
19. Cole J.N., Ramirez R.D., Currie B.J., Cordwell S.J., Djordjevic S.P., Walker M.J.: Surface analyses and immune reactivities of major cell wall-associated proteins of group A streptococcus. *Infect. Immun.* **73**, 3137–3146 (2005)
20. Connell S.R., Tracz D.M., Nierhaus K.H., Taylor D.E.: Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3675–3681 (2003)
21. Cornaglia G., Ligozzi M., Mazzariol A., Valentini M., Orefici G., Fontana R.: Rapid increase of resistance to erythromycin and clindamycin in *Streptococcus pyogenes* in Italy, 1993–1995. The Italian Surveillance Group for Antimicrobial Resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **2**, 339–342 (1996)
22. Coyle E.A., Cha R., Rybak M.J.: Influences of linezolid, penicillin, and clindamycin, alone and in combination, on streptococcal pyrogenic exotoxin A release. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1752–1755 (2003)
23. Cunningham M.W.: Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 470–511 (2000)
24. Dale J.B., Penfound T., Chiang E. Y., Long V., Shulman S.T., Beall B.: Multivalent group A streptococcal vaccine elicits bactericidal antibodies against variant M subtypes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 833–836 (2005)
25. Daneman N., Green K.A., Low D.E., Simor A.E., Willey B., Schwartz B., Toye B., Jessamine P., Tyrrell G.J., Krajden S., Ramage L., Rose D., Schertzberg R., Bragg D., McGeer A.: Surveillance for hospital outbreaks of invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada, 1992 to 2000. *Ann. Intern. Med.* **147**, 234–241 (2007)
26. Davies H.D., McGeer A., Schwartz B., Green K., Cann D., Simor A.E., Low D.E.: Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. Ontario Group A Streptococcal Study Group. *N. Engl. J. Med.* **335**, 547–554 (1996)
27. DiPersio L.P., DiPersio J.R., Frey K.C. i Beach J.A.: Prevalence of the erm(T) gene in clinical isolates of erythromycin-resistant group D *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1567–1569 (2008)
28. Efstratiou A.: Group A streptococci in the 1990s. *J. Antimicrob. Chemother.* **45 Suppl.**, 3–12 (2000)
29. Enright M.C., Spratt B.G., Kalia A., Cross J.H., Bessen D.E.: Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone. *Infect Immun* **69**, 2416–2427 (2001)
30. Facklam R.: What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 613–630 (2002)
31. Facklam R., Beall B., Efstratiou A., Fischetti V., Johnson D., Kaplan E., Kriz P., Lovgren M., Martin D., Schwartz B., Totosian A., Bessen D., Hollingshead S., Rubin F., Scott J., Tyrrell G.: emm typing and validation of provisional M types for group A streptococci. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 247–253 (1999)
32. Facklam R.F., Martin D.R., Lovgren M., Johnson D.R., Efstratiou A., Thompson T.A., Gowan S., Kriz P., Tyrrell G.J., Kaplan E., Beall B.: Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: emm103 to emm124. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 28–38 (2002)
33. Feil E.J., Li B.C., Aanensen D.M., Hanage W.P., Spratt B.G.: eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* **186**, 1518–1530 (2004)
34. Feng L., Lin H., Ma Y., Yang Y., Zheng Y., Fu Z., Yu S., Yao K., Shen X.: Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* from Chinese pediatric patients in association with Tn916 transposons family over a 16-year period. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **67**, 369–375 (2010)
35. Gillespie S.H.: Failure of penicillin in *Streptococcus pyogenes* pharyngeal infection. *Lancet*, **352**, 1954–1956 (1998)
36. Giovanetti E., Brenciani A., Vecchi M., Manzin A., Valdo P.E.: Prophage association of mef(A) elements encoding efflux-mediated erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 445–451 (2005)
37. Horn D.L., Zabriskie J.B., Austrian R., Cleary P.P., Ferretti J.J., Fischetti V.A., Gotschlich E., Kaplan E.L., McCarty M., Opal S.M., Roberts R.B., Tomasz A., Wachtfogel Y.: Why have group A streptococci remained susceptible to penicillin? Report on a symposium. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 1341–1345 (1998)
38. Hu M.C., Walls M.A., Stroop S.D., Reddish M.A., Beall B., Dale J.B.: Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine. *Infect. Immun.* **70**, 2171–2177 (2002)
39. Jacob S.E., Lloyd C.A., Menon T.: cMLS and M phenotypes among *Streptococcus pyogenes* isolates in Chennai. *Indian. J. Med. Microbiol.* **24**, 147–148 (2006)
40. Lancefield R.C.: Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J. Immunol.* **89**, 307–313 (1962)
41. Lei B., Liu M., Chesney G.L., Musser J.M.: Identification of new candidate vaccine antigens made by *Streptococcus pyogenes*: purification and characterization of 16 putative extracellular lipoproteins. *J. Infect. Dis.* **189**, 79–89 (2004)
42. Lewin A.B., Storch E.A., Mutch P.J., Murphy T.K.: Neurocognitive functioning in youth with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcus. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **23**, 391–398 (2011)
43. Littauer P., Caugant D.A., Sangvik M., Hoiby E.A., Sundsfjord A., Simonsen G.S.: Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Norway: population structure and resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1896–1899 (2006)
44. Lowbury E.J., Hurst L.: The sensitivity of staphylococci and other wound bacteria to erythromycin, oleandomycin, and spiramycin. *J. Clin. Pathol.* **12**, 163–169 (1959)
45. Macris M.H., Hartman N., Murray B., Klein R.F., Roberts R.B., Kaplan E.L., Horn D., Zabriskie J.B.: Studies of the continuing susceptibility of group A streptococcal strains to penicillin during eight decades. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**, 377–381 (1998)
46. Martin J.M., Green M.: Group A streptococcus. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **17**, 140–148 (2006)
47. Martin J.M., Green M., Barbadora K.A., Wald E.R.: Group A streptococci among school-aged children: clinical characteristics and the carrier state. *Pediatrics*, **114**, 1212–1219 (2004)
48. McGregor K.F., Spratt B.G., Kalia A., Bennett A., Bilek N., Beall B., Bessen D.E.: Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* representing most known emm types and distinctions among subpopulation genetic structures. *J. Bacteriol.* **186**, 4285–4294 (2004)
49. McNeil S.A., Halperin S.A., Langley J.M., Smith B., Warren A., Sharratt G.P., Baxendale D.M., Reddish M.A., Hu M.C., Stroop S.D., Linden J., Fries L.F., Vink P.E., Dale J.B.: Safety and immunogenicity of 26-valent group A streptococcus vaccine in healthy adult volunteers. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 1114–1122 (2005)
50. Michos A.G., Bakoula C.G., Braoudaki M., Koutouzi F.I., Roma E.S., Pangalis A., Nikolopoulou G., Kirikou E., Syriopoulou V.P.: Macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*: prevalence, resistance determinants, and emm types. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **64**, 295–299 (2009)
51. Murphy T.K., Storch E.A., Lewin A.B., Edge P.J., Goodman W.K.: Clinical factors associated with pediatric autoimmune

- neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections. *J. Pediatr.* **160**, 314–319 (2012)
52. Nakae M., Murai T., Kaneko Y., Mitsuhashi S.: Drug resistance in *Streptococcus pyogenes* isolated in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **12**, 427–428 (1977)
  53. Nielsen H.U., Hammerum A.M., Ekelund K., Bang D., Pallesen L.V., Frimodt-Moller N.: Tetracycline and macrolide co-resistance in *Streptococcus pyogenes*: co-selection as a reason for increase in macrolide-resistant *S. pyogenes*? *Microb. Drug Resist.* **10**, 231–238 (2004)
  54. Obszanska K., Borek A.L., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Multiple locus VNTR fingerprinting (MLVF) of *Streptococcus pyogenes*. *Virulence*, **3**, (2012)
  55. Obszanska K., Borek A. L., Izdebski R., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) of *Streptococcus pyogenes*. *J. Microbiol. Methods.* **87**, 143–149 (2011)
  56. Olsen R.J., Sitkiewicz I., Ayeras A.A., Gonulal V.E., Cantu C., Beres S.B., Green N.M., Lei B., Humbird T., Greaver J., Chang E., Ragasa W.P., Montgomery C.A., Cartwright J., Jr., McGeer A., Low D.E., Whitney A.R., Cagle P.T., Blasdel T.L., DeLeo F.R., Musser J.M.: Decreased necrotizing fasciitis capacity caused by a single nucleotide mutation that alters a multiple gene virulence axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 888–893 (2010)
  57. Pechere J.C.: New perspectives on macrolide antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **18**, Suppl. 1, S93–97 (2001)
  58. Reinert R.R., Luttkien R., Sutcliffe J.A., Tait-Kamradt A., Cil M.Y., Schorn H.M., Bryskier A., Al-Lahham A.: Clonal relatedness of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates in Germany. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **48**, 1369–1373 (2004)
  59. Richardson L.J., Tong S.Y., Towers R.J., Huygens F., McGregor K., Fagan P.K., Currie B.J., Carapetis J.R., Giffard P.M.: Preliminary validation of a novel high-resolution melt-based typing method based on the multilocus sequence typing scheme of *Streptococcus pyogenes*. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1426–1436 (2011)
  60. Richter S.S., Heilmann K.P., Dohrn C.L., Beekmann S.E., Riahi F., Garcia-de-Lomas J., Ferech M., Goossens H., Doern G.V.: Increasing telithromycin resistance among *Streptococcus pyogenes* in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 603–611 (2008)
  61. Roberts A.P., Mullany P.: A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol.* **17**, 251–258 (2009)
  62. Robinson D.A., Sutcliffe J.A., Tewodros W., Manoharan A., Bessen D.E.: Evolution and global dissemination of macrolide-resistant group A streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2903–11 (2006)
  63. Rodriguez-Ortega M.J., Norais N., Bensi G., Liberatori S., Capo S., Mora M., Scarselli M., Doro F., Ferrari G., Garaguso I., Maggi T., Neumann A., Covre A., Telford J.L., Grandi G.: Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nat. Biotechnol.* **24**, 191–197 (2006)
  64. Rubio V., Valdezate S., Alvarez D., Villalon P., Medina M.J., Salcedo C., Saez-Nieto J.A.: Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994–2006). *BMC Microbiol.* **12**, 215 (2012)
  65. Schuchat A., Hilger T., Zell E., Farley M.M., Reingold A., Harrison L., Lefkowitz L., Danila R., Stefonek K., Barrett N., Morse D., Pinner R.: Active bacterial core surveillance of the emerging infections program network. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 92–99 (2001)
  66. Shet A., Kaplan E., Johnson D., Cleary P. P.: Human immunogenicity studies on group A streptococcal C5a peptidase (SCPA) as a potential vaccine against group A streptococcal infections. *Indian. J. Med. Res.* **119**, Suppl., 95–98 (2004)
  67. Silva-Costa C., Ramirez M., Melo-Cristino J.: Rapid inversion of the prevalences of macrolide resistance phenotypes paralleled by a diversification of T and emm types among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2109–2111 (2005)
  68. Skoczynska A., Kadlubowski M., Wasko I., Fiett J., Hryniewicz W.: Resistance patterns of selected respiratory tract pathogens in Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 377–383 (2007)
  69. Steer A.C., Batzloff M.R., Mulholland K., Carapetis J.R.: Group A streptococcal vaccines: facts versus fantasy. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **22**, 544–552 (2009)
  70. Strus M., Drzewiecki A., Chmielarczyk A., Tomusiak A., Romanek P., Kosowski K., Kochan P., van der Linden M., Luttkien R., Heczko P.B.: Microbiological investigation of a hospital outbreak of invasive group A streptococcal disease in Krakow, Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 1442–1447 (2010)
  71. Sumby P., Zhang S., Whitney A.R., Falugi F., Grandi G., Graviss E.A., DeLeo F.R., Musser J.M.: A chemokine-degrading extracellular protease made by group A *Streptococcus* alters pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Infect. Immun.* **76**, 978–985 (2008)
  72. Szczypa K., Hryniewicz W.: Zakażenia *Streptococcus pyogenes* nabyte w szpitalu. *Nowa Klinika*, **16**, 717 (2009)
  73. Szczypa K., Sadowy E., Izdebski R., Hryniewicz W.: A rapid increase in macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* isolated in Poland during 1996–2002. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 828–831 (2004)
  74. Szczypa K., Sadowy E., Izdebski R., Strakova L., Hryniewicz W.: Group A streptococci from invasive-disease episodes in Poland are remarkably divergent at the molecular level. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3975–3979 (2006)
  75. Szczypa K., Wilemska J., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Mechanizmy wirulencji *Streptococcus pyogenes*. *Post. Mikrobiol.* **51**, 3–15 (2012)
  76. Turner C.E., Kurupati P., Wiles S., Edwards R.J., Sriskandan S.: Impact of immunization against SpyCEP during invasive disease with two streptococcal species: *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equi*. *Vaccine*, **27**, 4923–4929 (2009)
  77. Valardo P. E., Montanari M.P., Giovanetti E.: Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 343–353 (2009)
  78. Weiss K., De Azavedo J., Restieri C., Galarneau L.A., Gourdeau M., Harvey P., Paradis J.F., Salim K., Low D.E.: Phenotypic and genotypic characterization of macrolide-resistant group A *Streptococcus* strains in the province of Quebec, Canada. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 345–348 (2001)
  79. Wondrack L., Massa M., Yang B.V., Sutcliffe J.: Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **40**, 992–998 (1996)
  80. Woodbury R.L., Klammer K.A., Xiong Y., Bailiff T., Glennen A., Bartkus J.M., Lynfield R., Van Beneden C., Beall B.W.: Plasmid-borne erm(T) from invasive, macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1140–1143 (2008)
  81. Zinkernagel A.S., Timmer A.M., Pence M.A., Locke J.B., Buchanan J.T., Turner C.E., Mishalian I., Sriskandan S., Hanski E., Nizet V.: The IL-8 protease SpyCEP/ScpC of group A *Streptococcus* promotes resistance to neutrophil killing. *Cell Host Microbe*, **4**, 170–178 (2008)

#### Podziękowania

Artykuł powstał dzięki finansowemu wsparciu z grantu NCN N N401 536140, działalności statutowej NIL (DS.5.82 i DS 5.67), sieci monitorowania pozaszpitalnych zakażeń inwazyjnych BiNet, oraz Narodowemu Programowi Ochrony Antybiotyków (NPOA-Moduł1)