

## Detekce superantigenů u izolátů *Streptococcus pyogenes* pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase v NRL pro streptokokové nákazy

*Detection of superantigens in Streptococcus pyogenes isolates using real-time polymerase chain reaction at the NRL for Streptococcal Infections*

Jiří Vlach, Sandra Vohrnová, Jana Kozáková

### Souhrn • Summary

*Streptococcus pyogenes* je patogen způsobující především hnisavé infekce faryngu a kůže, může však vyvolat i systémové infekce, které mohou být doprovázeny streptokokovým syndromem toxického šoku. Významnými faktory virulence produkovanými tímto agens jsou pyrogenní exotoxiny, tzv. superantigeny. Vyvolávají hyperstimulaci imunitního systému s masivní sekrecí prozánětlivých cytokinů, která může vyústit až v poškození tkání a selhání orgánů. Hlavním faktorem virulence *S. pyogenes* je M protein kódovaný genem *emm*, na jehož základě jsou kmeny členěny do *emm* typů.

V Národní referenční laboratoři pro streptokokové nákazy bylo analyzováno celkem 27 klinických izolátů *S. pyogenes* z let 2018–2020, které patřily k 11 různým *emm* typům. Zjišťována byla přítomnost genů kódujících superantigeny – *speA*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *ssa* a *smeZ* – pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR). Napříč analyzovanými kmeny byly identifikovány všechny testované geny kódující superantigeny. Počet superantigenů nesených izoláty se pohyboval mezi 0–6 geny. Jelikož nosičství konkrétních superantigenů je spojeno s *emm* typy, sledování distribuce superantigenů přináší cenná epidemiologická data o subtypech *S. pyogenes* v rámci *emm* typů.

*Streptococcus pyogenes* is a pathogen which causes mainly suppurative infections of the pharynx and skin but may also be involved in systemic infections, possibly accompanied by streptococcal toxic shock syndrome. Important virulence factors produced by this agent are pyrogenic exotoxins, the so-called superantigens. They induce hyperstimulation of the immune system with massive secretion of anti-inflammatory cytokines, which may even result in tissue damage and/or organ failure. The major virulence factor of *S. pyogenes* is M protein encoded by the *emm* gene, used as the basis for *emm* typing.

The National Reference Laboratory for Streptococcal Infections analysed 27 clinical isolates of *S. pyogenes* from 2018–2020 assigned to 11 *emm* types. The real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the genes encoding superantigens – *speA*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *ssa*, and *smeZ*. All the genes listed above were revealed across the study strains. The number of superantigens carried by the study isolates ranged from zero to six. As the carriage of specific superantigens is associated with *emm* types, the monitoring of superantigen distribution provides valuable epidemiological data on *S. pyogenes* subtypes within *emm* types.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2021; 30(6): 188–192

**Klíčová slova:** *Streptococcus pyogenes*, GAS, pyrogenní exotoxin, superantigen, RT-PCR

**Keywords:** *Streptococcus pyogenes*, GAS, pyrogenic exotoxin, superantigen, RT-PCR

### ÚVOD

*Streptococcus pyogenes* (streptokok skupiny A, group A streptococci – GAS) je agens způsobující především hnisavé infekce faryngu a kůže, může však vyvolat i systémové infekce, které mohou být doprovázeny streptokokovým syndromem toxického šoku (STSS) [1]. Typizace GAS je založena na sekvenaci N-koncové části genu *emm* kódujícího M protein. V současnosti se rozlišuje více než 200 tzv. *emm* typů [2].

Významnými faktory virulence produkovanými kmeny GAS jsou tzv. superantigeny (SAG). Jedná se o skupinu vysoce pyrogenních exotoxinů, které dokáží vázat MHC II glykoproteiny na povrchu antigen prezentujících buněk a zároveň receptor T lymfocytů [3]. Tím dochází ke stimulaci imunitního systému běžnými antigeny s následnou masivní sekrecí prozánětlivých cytokinů (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 aj.), což může vyústit až v toxický šok, poškození tkání a selhání orgánů [3, 4]. Předpokládaným cílem produkce SAG je narušení imunitní odpovědi hostitele a potlačení produkce imunoglobulinů [3, 5].

V současnosti je známo 13 SAG. Zkratky většiny genů/proteinů vychází z označení *streptococcal pyrogenic exotoxins* – *spe*, přičemž všechny SAG se vyznačují vysoce konzervovaným sekvenčním motivem. Toho bylo využito při identifikaci některých z nich. Klasickými biochemickými

metodami byly identifikovány SAg *speA*, *speC*, *ssa* (*streptococcal superantigen*) a *smeZ* (*streptococcal mitogenic exotoxin Z*). Pomocí počítačové analýzy genomů byly identifikovány další SAg – *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *speQ* a *speR* [3, 6]. Dlouhou dobu byly mezi SAg řazeny též *speB* a *speF*, jejich toxický efekt však byl způsoben kontaminací jinými SAg a dnes je známo, že *speF* je totožný s DNázou B a *speB* kóduje cysteinovou proteázu [3]. Proteáza SpeB je též faktorem virulence, neboť inaktivuje C3b část komplementu a štěpí imunoglobuliny, podle některých autorů slouží i k regulaci hladin ostatních produkovaných SAg [7, 8, 9].

Geny kódující SAg se v genomu GAS vyskytují převážně ve formě profágů či jiných integrovaných konjugativních elementů, přičemž profágy tvoří cca 10 % genomu GAS a jsou hlavními původci genetické variability tohoto agens [10]. SAg se vyskytují v různých alelických variantách. V roce 2016 bylo známo 6 alel genu *speA*, 3 *speC*, 6 *speG*, 2 *speH*, 2 *speI*, 3 *speJ*, 1 *speK*, 3 *speL*, 4 *speM*, 3 *ssa* a 56 alel *smeZ* [3]. Jako SAg nesené na chromozomu a nikoliv v profázích a jiných mobilních elementech, byly identifikovány geny *speG*, *speJ*, *smeZ* [5]. Některé dvojice SAg jsou nesené na stejném profágu/elementu (*speH* a *speI*, *speL* a *speM*, *speQ* a *speR*), nicméně občas dochází ke ztrátám genů v průběhu

integrace do bakteriálního chromozomu a tedy zachování pouze jednoho SAg [3, 11]. Tomu odpovídá i odlišné zastoupení těchto genů v populaci GAS, např. 5,7 % *speM* a 4,7 % *speL* [12].

## METODIKA

### Kmeny *S. pyogenes*

V první části práce byly analyzovány kmeny klinicky významných *emm* typů *S. pyogenes*, u kterých byla provedena celogenomová sekvenace. Jednalo se o 5 kmenů typů *emm1* a 5 kmenů *emm28* z let 2018 a 2019. V druhé části práce bylo analyzováno 17 invazivních kmenů izolovaných z krve, které patřily k různým *emm* typům. Jednalo se o původce závažných septických stavů v roce 2020, které byly doručeny do Národní referenční laboratoře pro streptokokové nákazy (NRL/STR) z klinických pracovišť a laboratoří. Informace o kmenech jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1). Jako pozitivní kontroly sloužily sbírkové kmeny z České národní sbírky typových kultur (CNCTC) – CNCTC 7155, CNCTC 7208, CNCTC 7227 a kmeny z britské Národní sbírky typových kultur (NCTC) – NCTC 13736, NCTC 13751, NCTC 8320.

Kmeny byly kultivovány na krevním agaru (Oxoid), přes noc při 35–37 °C v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>. Dlouhodobě jsou

Tab. 1: Klinické izoláty GAS vybrané pro detekci superantigenů. První část izolátů z let 2018 a 2019 byla podrobena celogenomové sekvenaci

Kmen	emm typ	pacient		
		věk	pohlaví	klinická prezentace
39/18	<i>emm1</i>	67	M	sepse, srdeční zástava
86/18	<i>emm1</i>	49	Ž	sepse, septický šok
93/18	<i>emm1</i>	64	M	sepse
213/18	<i>emm1</i>	51	M	flegmóna
62/19	<i>emm1</i>	21	Ž	septický šok s multiorgánovým selháním
45/19	<i>emm28</i>	64	M	erysipel, septický šok s kardiopulmonálním selháním
88/19	<i>emm28</i>	60	M	septický šok, úmrtí
95/19	<i>emm28</i>	60	M	sepse
96/19	<i>emm28</i>	60	M	sepse
385/19	<i>emm28</i>	43	M	sepse, flegmóna
125/20	<i>emm1</i>	58	Ž	sepse, erysipel, pneumonie
274/20	<i>emm11</i>	79	M	sepse
59/20	<i>emm28</i>	40	M	sepse, toxický šok
427/20	<i>emm28</i>	89	Ž	sepse
18/20	<i>emm32</i>	48	M	sepse
300/20	<i>emm32</i>	49	M	sepse
48/20	<i>emm60</i>	75	Ž	erysipel, sepse
323/20	<i>emm60</i>	60	M	erysipel, sepse
517/20	<i>emm60</i>	71	M	sepse
521/20	<i>emm60</i>	82	M	sepse
471/20	<i>emm76</i>	91	M	sepse
482/20	<i>emm80</i>	30	Ž	sepse, narkomanie, endokarditida
280/20	blízký <i>emm81</i>	57	Ž	sepse
505/20	<i>emm84</i>	63	Ž	sepse, flegmóna
27/20	<i>emm108</i>	57	M	sepse, flegmóna
304/20	<i>emm169</i>	47	M	sepse
301/20	<i>emm191</i>	72	M	sepse

Tab. 2: Distribuce superantigenových genů u sbírkových referenčních kmenů GAS

Kmen	Genom	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>smeZ</i>	<i>ssa</i>	<i>speB</i>
CNCTC 7155	NCTC 8198	X		X			X				X		X
CNCTC 7208	NCTC 10876		X	X	X						X		X
CNCTC 7227	NCTC 12059		X	X	X	X	X				X		X
NCTC 13736	NCTC 13736			X	X	X			X	X	X	X	X
NCTC 13751	NCTC 13751		X	X				X	X	X	X		X
NCTC 8320	NCTC 8320		X	X					X	X	X		X

X – přítomnost daného genu v genomu kmene

kmeny skladovány v kryozkumavkách KRYOBANKA B (ITEST plus s.r.o.) při -70 °C.

### *emm* typizace

Izolace DNA, amplifikace a sekvenace genu *emm* byla provedena dle protokolu Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) [13]. Určení *emm* typu bylo provedeno pomocí *emm* databáze CDC [14].

### *In silico* analýza

*In silico* polymerázová řetězová reakce (PCR, polymerase chain reaction) byla provedena v programu FastPCR verze 6. 7. V nastavení byly povoleny 3 nekomplementární nukleotidy na 3' konci. Bylo zjišťováno, zda dochází ke tvorbě amplikonů s použitím primerů specifických pro dané SAg, pokud ano, tak s jakou specifitou, a velikost amplikonů. Jako templáty byly použity genomy kmenů *S. pyogenes* získané buď sekvenací v NRL/STR, nebo z webových databází [15, 16]. Celkem bylo analyzováno 10 kmenů sekvenovaných v NRL/STR a 73 genomů z databází.

### PCR v reálném čase

Přítomnost genů pro superantigeny byla detegována pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (RT-PCR) na přístroji Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad), výsledky byly vyhodnocovány v programu Bio-Rad CFX Manager.

Složení reakční směsi bylo následující (jsou uvedeny koncentrace v reakci): 1× iQ™ SYBR® Green Supermix

(Bio-Rad), 0,3 μM primery forward i reverse (Generi Biotech), 4 μl izolované DNA. Byla použita DNA izolovaná pro *emm* typizaci s následným ředěním (k 50 μl DNA bylo přidáno 300 μl TAE pufru [Sigma]). Byly detegovány následující geny (pomocí primerů z uvedené publikace): *speA* [17], *speC* [17], *speG* [17], *speH* [17], *speI* [18], *speJ* [19], *speK* [7], *speL* [11], *speM* [11], *smeZ* [19], *ssa* [17]. Gen *speB* byl použit jako kontrolní pro kmeny, u nichž nebyl zaznamenán žádný ze zjišťovaných exotoxinů [20].

RT-PCR probíhala za následujících podmínek: primární denaturace – 5 min, 95 °C; templátová denaturace – 20 s, 95 °C; nasedání primerů – 1 min, 55–65 °C (*speI*, *smeZ* – 55 °C; *speB* – 59 °C; *speG*, *speJ* – 60 °C; *speA*, *speH*, *speK*, *speM* – 63 °C; *speC*, *speL*, *ssa* – 65 °C); polymerace – 30 s, 72 °C; vše ve 40 cyklech. Vzorky a kontroly byly měřeny v dupletech. Při ověřování funkčnosti metody byly amplikony vizualizovány pomocí agarosové elektroforézy – 1% agarosový gel, TAE pufr, konstantní napětí 90 V, barvení Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

### *In silico* analýza

*In silico* PCR byla použita ke dvěma cílům: 1. otestovat vhodnost vybraných primerů, 2. nalézt vhodné kmeny *S. pyogenes*, které by obsahem genů pokryly celou škálu testovaných SAg. Analýza 73 genomů ukázala funkčnost primerů i rozdílnou distribuci jednotlivých SAg napříč GAS populací, která zhruba odpovídala distribuci popisované v literatuře [21].

Tab. 3: Distribuce superantigenových genů u celogenomově sekvenovaných izolátů GAS

<i>emm</i> typ	kmen	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>smeZ</i>	<i>ssa</i>
<i>emm1</i>	39/18	X		X			X				X*	
	86/18	X		X			X				X	
	93/18	X		X			X				X	
	213/18	X		X			X				X	
	62/19	X		X			X				X	
<i>emm28</i>	45/19		X	X	X	X	X				X	
	88/19		X	X	X	X	X				X	
	95/19		X	X	X	X	X				X	
	96/19		X	X	X	X	X				X	
	385/19		X	X			X*				X	

X – přítomnost daného genu v genomu kmene; \* – gen nebyl detegován v genomu *in silico* analýzou, ale až při RT-PCR

Velikost predikovaných amplikonů se napříč kmeny (resp. genomy) mírně lišila pouze u genu *smeZ*. Pravděpodobně šlo o různé alelické varianty genu, jelikož *smeZ* má nejvíce zaznamenaných alel [3]. Dva různě velké amplikony vznikaly též u genu *speM*, ukázalo se však, že jde o falešnou pozitivitu. Primery navržené na gen *speM* se váží i na gen *speK* vzhledem k jejich blízké příbuznosti [3], nicméně díky odlišné velikosti (612 a 678 párů basí [pb]) bylo možné je rozlišit pomocí gelové elektroforézy. Region *speQR* nebyl detegován s ohledem na přílišnou velikost amplifikované oblasti při RT-PCR a na fakt, že u kmenů, které tento region měly, ale byl během vývoje ztracen, zůstává v genomu C-koncový fragment genu *speR* [6]. Jelikož tento fragment poskytoval amplikon o velikosti cca 480 pb, nebyla RT-PCR detekce tohoto regionu vhodná.

Jako vhodné pozitivní kontroly byly vybrány 3 kmeny z CNCTC, u nichž byly publikovány celogenomové sekvence (pod označením kmene NCTC), další 3 kmeny byly získány z NCTC. Distribuce genů pro SAg je uvedena v tabulce (Tab. 2).

V NRL/STR bylo sekvenováno 5 izolátů *emm1* a 5 izolátů *emm28*. V jednotlivých genomech nebyl záchyt SAg genů zcela konzistentní, avšak každý gen byl zaznamenán několi-krát. Vzhledem k nedostatku popsaných genů v databázích je prozatím skládání genomů GAS poměrně problematické co do vyváženosti pokrytí genomu a přesnosti čtení. Distribuce genů pro SAg je uvedena v tabulce (Tab. 3).

#### PCR v reálném čase

Pro RT-PCR byly hledány vhodné reakční podmínky. Byly vytvořeny 4 protokoly lišící se teplotou nasedání primerů. Primery pro detekci genů *speI* a *smeZ* se však vyznačovaly poměrně nízkou teplotou tání v důsledku velkého obsahu A a T basí. Ač protokol pro tyto geny byl funkční, bylo by pro další práci vhodnější použít jiné primery. Návrh univerzálních primerů pro gen *smeZ* však může být poměrně složitý z důvodu

velkého množství alelických variant. Celkově byla detekce SAg genů funkční.

Pro kontrolní sbírkové kmeny korespondovaly výsledky získané RT-PCR s výsledky *in silico* PCR, s výjimkou detekce genu *speL* u kmenů NCTC 13736 a NCTC 13751 (Tab. 2). Jelikož v sekvenovaném genomu mají tyto kmeny i gen *speM*, pravděpodobně došlo po sekvenaci genomů ke ztrátě genu *speL* v průběhu kultivací a práce s těmito kmeny v Národní sbírce typových kultur. Též se potvrdil vznik dvou amplikonů (správně a falešně pozitivní výsledek vlivem přítomnosti *speK*) při detekci genu *speM*, proto kmen NCTC 13751 nebyl pro tento gen používán jako pozitivní kontrola RT-PCR.

Výsledky RT-PCR dříve sekvenovaných invazivních izolátů typu *emm1* a *emm28* též korespondovaly s *in silico* výsledky s dvěma výjimkami (Tab. 3). Při *in silico* PCR nebyl u izolátu 39/18 zachycen gen *smeZ* a u izolátu 385/19 gen *speJ*, pravděpodobně z výše popsaného důvodu nedokonale pokrytého genomu.

Soubor 17 izolátů GAS, invazivních původců sepsí (Tab. 4), obsahoval 5 kmenů nedisponující ani jedním z testovaných SAg. Jednalo se o kmeny *emm60* a *emm169* a pro ověření kvality DNA byl u všech úspěšně detegován gen *speB*, který se vyskytuje u 99,8 % GAS [5].

#### *emm* typy a distribuce superantigenů

Geny kódující SAg jsou variabilní složkou genomu GAS a zároveň významnými faktory virulence, otázka spojení konkrétních *emm* typů s nosičstvím konkrétních SAg genů je tedy na místě. NRL/STR provedla v letech 2011–2012 studii na 111 izolátech GAS patřícím k 25 různým *emm* typům a identifikovala u nich 37 toxigenních profilů. Spojitost mezi *emm* typy a SAg geny však nebyla statisticky signifikantní [22]. Statisticky významná spojení SAg s *emm* oproti tomu uvedla německá studie sledující invazivní onemocnění GAS v letech 2009–2014 (719 izolátů). V Evropě prevaluující *emm1* byl

Tab. 4: Distribuce superantigenových genů u izolátů GAS z roku 2020

Kmen	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>speG</i>	<i>speH</i>	<i>speI</i>	<i>speJ</i>	<i>speK</i>	<i>speL</i>	<i>speM</i>	<i>smeZ</i>	<i>ssa</i>	<i>speB</i> *	<i>emm</i> typ
125/20	X		X			X				X			<i>emm1</i>
274/20		X	X							X			<i>emm11</i>
59/20		X	X			X				X			<i>emm28</i>
427/20		X	X			X				X			<i>emm28</i>
18/20		X	X							X			<i>emm32</i>
300/20		X	X							X			<i>emm32</i>
48/20												X	<i>emm60</i>
323/20												X	<i>emm60</i>
517/20												X	<i>emm60</i>
521/20												X	<i>emm60</i>
471/20			X			X	X			X	X		<i>emm76</i>
482/20		X	X					X	X	X			<i>emm80</i>
280/20		X	X	X									blízký <i>emm81</i>
505/20			X	X		X							<i>emm84</i>
27/20			X			X				X	X		<i>emm108</i>
304/20												X	<i>emm169</i>
301/20			X							X			<i>emm191</i>

X – přítomnost daného genu v genomu kmene; \* – detekce genu *speB* byla prováděna pouze u izolátů bez jiných SAg

spojen s přítomností genů *speA* (98,7 %), *speG* (98,7 %) a *speJ* (97,4 %), *emm28* s geny *speC* (94,6 %), *speG* (98,2 %), *speJ* (98,2 %) a *speK* (20,7 %) [12]. Tato zjištění korespondovala s našimi výsledky (Tab. 3, Tab. 4) i dřívější studií [22].

Kmeny stejného *emm* typu se vyznačují rozdíly v distribuci SAg v čase i v závislosti na geografickém původu kmene [23]. Typickým příkladem je *emm28*, v této i předchozí práci [22] byly identifikovány celkem 4 odlišné toxigenní profily. Uvádí se, že ačkoliv všechny *emm* typy se vyznačují různými toxigenními profily s odlišnou distribucí SAg genů, tato distribuce není náhodná a každý *emm* typ se vyznačuje dominancí nejméně dvou mobilních SAg genů a dominancí několika toxigenních profilů [20]. Např. všechny kmeny patří k *emm1*, které byly analyzovány v rámci této práce (včetně sbírkového CNCTC 7155), obsahují geny *speA*, *speG*, *speJ* a *smeZ*. V jiných studiích u 2–3 % kmenů *emm1* některý z těchto genů chyběl a v řádu až jednotek procent byla zaznamenána přítomnost genů *speC*, *speH*, *speK*, *speM* a *ssa* [12, 22]. Pro *emm1* by tedy geny *speA*, *speG*, *speJ* a *smeZ* měly být dominantními SAg, obdobně pro *emm28* by to měly být geny *speC*, *speG*, *speJ* a *smeZ* [12, 22].

## ZÁVĚR

Streptokokové pyrogenní exotoxiny fungují jako superantigeny a jsou významnými faktory virulence. Jejich propojení s konkrétními klinickými projevy je však stále nejasné a statisticky se nepodařilo prokázat ani přímou spojitost s invazivitou. Spojitost s *emm* typy však průkazná je a sledování distribuce SAg napříč GAS izoláty tak poskytuje cenná epidemiologická data o subtypech v rámci *emm* typů.

Podpořeno MZ ČR – RVO („Státní zdravotní ústav – SZU, 75010330“).

## LITERATURA

- [1] Ryan KJ, Ray CG *et al.* Sherris Medical Microbiology, Fifth Edition. USA, McGraw-Hill Companies, 2010. ISBN 978-0-07-160402-4.
- [2] Fischetti VA. M protein and other surface proteins on streptococci. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA. *Streptococcus pyogenes: Basic biology to clinical manifestation*. Oklahoma City: University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016.
- [3] Proft T, Fraser JD. Streptococcal superantigens: Biological properties and potential role in disease. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA. *Streptococcus pyogenes: Basic biology to clinical manifestation*. Oklahoma City: University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016.
- [4] Lintges M, Arlt S, Uciechowski P *et al.* A new closed-tube multiplex real-time PCR to detect eleven superantigens of *Streptococcus pyogenes* identifies a strain without superantigen activity. *International Journal of Medical Microbiology*. 2007; 297(6): 471–478.
- [5] Commons RJ, Smeesters R, Proft T *et al.* Streptococcal superantigens: categorization and clinical association. *Trends in Molecular Medicine*. 2014; 20(1): 48–62.
- [6] Reglinski M, Sriskandan S, Turner CE. Identification of two new core chromosome-encoded superantigens in *Streptococcus pyogenes*; *speQ* and *speR*. *Journal of Infection*. 2019; 78: 358–363.
- [7] Banks DJ, Lei B, Musser JM. Prophage induction and expression of prophage-encoded virulence factors in group A *Streptococcus* serotype M3 strain MGAS315. *Infection and Immunity*. 2003; 71(12): 7079–7086.
- [8] Borek AL, Wilemska J, Izdebski R *et al.* A new rapid and cost-effective method for detection of phages, ICEs and virulence factors encoded by *Streptococcus pyogenes*. *Polish Journal of Microbiology*. 2011; 60(3): 187–201.
- [9] Terao Y. The virulence factors and pathogenic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Oral Biosciences*. 2012; 54: 96–100.
- [10] Beres SB, Musser JM. Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome. *PLoS ONE*. 2007; 2(8): e800.
- [11] Igwe EI, Shewmaker PL, Facklam RR *et al.* Identification of superantigen genes *speM*, *ssa*, and *smeZ* in invasive strains of beta-hemolytic group C and G streptococci recovered from humans. *FEMS Microbiology Letters*. 2003; 229: 259–264.
- [12] Imöhl M, Fitzner C, Perniciaro S *et al.* Epidemiology and distribution of 10 superantigens among invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Germany from 2009 to 2014. *PLoS ONE*. 2017; 12(7): e0180757.
- [13] Centers for Disease Control and Prevention. Protocol for *emm* typing [online]. [cit. 2021-06-07]. Dostupné na www: <<https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/emm-typing-protocol.html>>.
- [14] Centers for Disease Control and Prevention. Blast – *emm* & *emm* databases [online]. [cit. 2021-06-07]. Dostupné na www: <<https://www2.cdc.gov/vaccines/biotech/streplblast.asp>>.
- [15] Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 2018, 3(124). Databáze na www: <<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-pyogenes>>.
- [16] Benson DA, Cavanaugh M, Clark K *et al.* GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2013; 41:D36–42. Databáze na www: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>.
- [17] Luca-Harari B, Ekelund K, van der Linden M *et al.* Clinical and epidemiological aspects of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Denmark during 2003 and 2004. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46(1): 79–86.
- [18] Proft T, Arcus VL, Handley V *et al.* Immunological and biochemical characterization of streptococcal pyrogenic exotoxins I and J (SPE-I and SPE-J) from *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Immunology*. 2001; 166: 6711–6719.
- [19] Rivera A, Rebollo M, Miró E *et al.* Superantigen gene profile, *emm* type and antibiotic resistance genes among group A streptococcal isolates from Barcelona, Spain. *Journal of Medical Microbiology*. 2006; 55: 1115–1123.
- [20] Schmitz FJ, Beyer A, Charpentier E *et al.* Toxin-gene profile heterogeneity among endemic invasive European group A streptococcal isolates. *Journal of Infectious Diseases*. 2003; 188: 1578–1586.
- [21] Friães A, Pinto FR, Silva-Costa C *et al.* Superantigen gene complement of *Streptococcus pyogenes* – relationship with other typing methods and short-term stability. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2013; 32: 115–125.
- [22] Alboková J, Lžiřařová D, Kozáková J. Toxigenní profily a *emm* typizace *Streptococcus pyogenes* v České republice v letech 2011 a 2012. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*. 2014; 23(10): 365–368.
- [23] Commons R, Rogers S, Gooding T *et al.* Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with *emm* types. *Journal of Medical Microbiology*. 2008; 57: 1238–1246.

Jiří Vlach, Sandra Vohrnová, Jana Kozáková  
NRL pro streptokokové nákazy