

Výskyt sublinie M1_{UK} mezi invazivními kmeny *Streptococcus pyogenes* typ *emm1* izolovanými od prosince 2022 do května 2023 v České republice

Veselá R.¹, Vohrnová S.^{1,2}, Kozáková J.¹

¹Státní zdravotní ústav, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Národní referenční laboratoř pro streptokokové nákazy
²3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

SOUHRN

Cíle: Od prosince roku 2022 je pozorován v České republice zvýšený výskyt invazivního onemocnění způsobeného *Streptococcus pyogenes* s posunem klinické prezentace a věkové hranice postižených osob. Invazivní onemocnění se projevují ve srovnání s předchozími roky častěji u dětí do 18 let věku a dosud zdravých dospělých středního věku. Zvýšil se počet izolátů *S. pyogenes* získaných z primárně sterilních míst, jako je hemokultura, mozkomíšni mok, pleurální výpotek, kloubní punktát a sekční materiál. Rutinním stanovením typu genu *emm* bylo zjištěno, že převažujícím *emm* typem *S. pyogenes* je *emm1*. V období od ledna 2023 do července 2023 46 % všech izolátů *S. pyogenes* z invazivních onemocnění odpovídalo typu *emm1*. Globálně rozšířená sublinie M1_{UK} je charakterizována ve srovnání s historickými kmeny iGAS typu *emm1* odlišnou expresí sedmi genů, mezi které patří i gen streptokokového pyrogenního toxinu A (*speA*). Cílem studie je stanovit, zda ve větší míře toxigenní sublinie M1_{UK} je spojena se zvýšeným výskytem invazivního onemocnění v České republice.

Metody: Celogenomová sekvenace 41 izolátů *S. pyogenes* izolovaných v České republice v letech 2018 a 2019 a od prosince 2022 do května 2023 od pacientů s invazivním onemocněním byla provedena přístrojem MiSeq (Illumina). Bioinformatická analýza byla provedena volně dostupnými online nástroji Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center.

Výsledky: Na základě dat celogenomové sekvenace 41 izolátů *S. pyogenes* typu *emm1* izolovaných od pacientů s invazivním infekčním onemocněním v období let 2018 a 2019 a od prosince 2022 do května 2023 bylo zjištěno, že mezi invazivními kmeny *S. pyogenes* typu *emm1* převládá od prosince 2022 do května 2023 v České republice sublinie M1_{UK}.

Závěr: Důvod rozšíření sublinie M1_{UK} v České republice na konci roku 2022 a v první polovině roku 2023 není zcela zřejmý, ale může být spojen se sníženou imunitou v souvislosti s omezeným přenosem GAS během lockdownů, zvláště u dětí. Dalším faktorem, který mohl přispět k vysokému výskytu invazivních infekčních onemocnění, je sezonní cirkulace respiračních virů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Streptococcus pyogenes – GAS – outbreak iGAS – celogenomová sekvenace – superantigen – fylogenetická analýza

ABSTRACT

Veselá R., Vohrnová S., Kozáková J.: Prevalence of the M1_{UK} sublineage among *emm1* *Streptococcus pyogenes* invasive strains isolated in the Czech Republic from December 2022 to May 2023

Aims: Since December 2022, an increase in invasive disease caused by *Streptococcus pyogenes* has been observed in the Czech Republic, with a shift in the clinical presentation and age of patients. Unlike in previous years, invasive disease is more common in children and adolescents under 18 years of age and in previously healthy middle-aged adults. An increase has been noticed in the number of *S. pyogenes* isolates from primarily sterile sites such as haemoculture, cerebrospinal fluid, pleural effusion fluid, joint fluid, and postmortem specimens. Routine *emm* gene typing revealed *emm1* to be the predominant *emm* type of *S. pyogenes*. Between January 2023 and July 2023, 46% of all *S. pyogenes* isolates from invasive cases were assigned to the *emm1* type. The globally spread M1_{UK} sublineage is characterized by differences in the expression of seven genes, including the streptococcal pyrogenic toxin A (*speA*) gene, compared to historical *emm1* iGAS strains. The aim of this study is to determine whether the more toxigenic M1_{UK} sublineage is associated with the increase in invasive disease in the Czech Republic.

Methods: Whole genome sequencing of 41 *S. pyogenes* isolates from patients with invasive disease recovered in the Czech Republic in 2018 and 2019 and from December 2022 to May 2023 was performed using the MiSeq instrument (Illumina). Bioinformatics analysis was performed using freely available online tools the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center.

Results: Based on whole genome sequencing data of 41 *emm1* isolates of *S. pyogenes* from patients with invasive infectious disease recovered in 2018 and 2019 and from December 2022 to May 2023, the M1_{UK} sublineage was found to be predominant from December 2022 to May 2023.

Conclusion: The reason for the spread of the M1_{UK} sublineage in the Czech Republic late in 2022 and in the first half of 2023 is not entirely clear, but it may be related to reduced immunity due to limited GAS transmission during lockdowns, especially in children. Another factor that may have contributed to the high incidence of invasive infectious diseases is the seasonal circulation of respiratory viruses.

KEYWORDS

Streptococcus pyogenes – GAS – outbreak iGAS – whole genome sequencing – superantigen – phylogenetic analysis

Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2024; 73(2): 76–83

<https://doi.org/10.61568/emi/11-6306/20240424/137080>

ÚVOD

Streptococcus pyogenes (streptokok skupiny A, Group A Strep, GAS) je agens způsobující především akutní tonzilitidy, akutní otitidy, hnisavé infekce faryngu a infekční onemocnění kůže s klinickým obrazem ve formě impetiga či erysipelu, vyvolává však i systémová infekční onemocnění. Klinické manifestace invazivních onemocnění způsobených *S. pyogenes* zahrnují typicky nekrotizující fasciitidu, bakteriemií, sepsi a sepsi se streptokokovým syndromem toxického šoku. V roce 2023 se vyskytovaly v souvislosti se *S. pyogenes* invazivní onemocnění, jako jsou pneumonie a meningitida, která pro toto agens nejsou typická. V předchozích letech se invazivní onemocnění objevovala zvláště u polymorbidních pacientů, injekčních uživatelů drog a osob bez domova. Vážnost infekčního onemocnění vyvolaného *S. pyogenes* je ovlivněna kombinací řady faktorů, např. celkovým zdravotním stavem a stavem imunity hostitele, předchozím vznikem poranění, genetickými faktory, mírou expozice *S. pyogenes* a specifickou virulencí kmene. Uvádí se, že smrtnost v případech invazivních GAS onemocnění je navzdory okamžité léčbě antibiotiky v rozmezí 10–30 % [1]. Pokud se v populaci objevily nové nebo vzácně se vyskytující kmeny *S. pyogenes*, vždy to vedlo ke zvýšení výskytu GAS onemocnění. Významné změny v genomu, které ovlivňují strukturu a expresi virulentních faktorů, jsou spojovány s globální expanzí invazivních *S. pyogenes* (iGAS) [2]. Genom *S. pyogenes* obsahuje řadu genů virulentních faktorů a vykazuje vysokou genetickou diverzitu. M protein, kódovaný genem *emm*, je hlavní faktor virulence spojovaný s rezistencí bakterie k fagocytóze. Typizace *S. pyogenes* je založeno na sekvenční variabilitě N-koncové části genu *emm*. Nejčastěji zastoupené *emm* typy iGAS jsou *emm1*, *emm28*, *emm89*, *emm3* a *emm12* [3]. Kmeny GAS produkují exotoxiny a specifické superantigeny (SAG), které vyvolávají systémovou zánětlivou odezvu. Superantigeny se váží na molekuly MHC II (major histocompatibility complex class II) na povrchu antigen prezentujících buněk a současně na variabilní oblast β řetězce receptoru T lymfocytů. Tato interakce vede k aktivaci velkého množství T lymfocytů produkujících prozánětlivé cytokiny a k potlačení produkce imunoglobulinů [4]. V současné době je známo 13 SAG. Geny kódující SAG jsou převážně nesené na profázích nebo na jiných mobilních elementech, což umožňuje horizontální přenos

genů mezi bakteriálními rody a druhy. Výjimkou jsou geny *speG*, *speJ* a *smeZ*, které jsou součástí chromozomu bakterie. Zvláštní úlohu má mezi SAG SpeB, multifunkční cysteinová proteáza. Ukazuje se, že SpeB může regulovat funkci ostatních SAG jejich proteolýzou. Proteáza SpeB je také faktor virulence, deaktivuje C3b část komplementu a štěpí imunoglobuliny [5].

Historie výskytu *S. pyogenes* M1_{UK}

Od roku 2014 přibližně do roku 2016 byl v Anglii pozorován zvýšený výskyt spály a invazivních onemocnění vyvolaných *S. pyogenes*. Původcem tohoto zvýšeného výskytu byla identifikována invazivní sublinie *S. pyogenes* typu *emm1* označená M1_{UK} [6]. Tato sublinie byla charakterizována výskytem 27 jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v genomu bakterie a zároveň odlišnou expresí sedmi genů ve srovnání s iGAS typu *emm1* z předchozích let. U sublinie M1_{UK} byla prokázána zvýšená produkce streptokokového pyrogenního exotoxinu A (SpeA) [7], která je zodpovědná za vyšší toxigenitu kmene. V průběhu let došlo ke globálnímu rozšíření této sublinie *S. pyogenes* M1_{UK} [8, 9, 10].

Epidemiologie iGAS v České republice

Invazivní onemocnění vyvolaná *S. pyogenes* v České republice podléhají povinnému hlášení do Informačního systému infekčních nemocí (ISIN), ale není zaveden národní program surveillance. Do Národní referenční laboratoře pro streptokokové nákazy (NRL/STR) jsou z terénních laboratoří zasílány izoláty *S. pyogenes* z invazivních i neinvazivních onemocnění na bázi dobrovolnosti. V NRL/STR je u doručených izolátů *S. pyogenes* prováděna kontrola správné identifikace a typizace genu *emm*. V letech 2018–2022 bylo do NRL/STR doručeno celkem 389 izolátů *S. pyogenes* z invazivních i neinvazivních onemocnění, z toho 307 izolátů bylo z invazivních onemocnění. Nejméně izolátů bylo doručeno v roce 2021, a to 45 izolátů, což může souviset s v té době platnými protiepidemickými opatřeními proti šíření covid-19. Nejvíce izolátů bylo vyšetřeno v roce 2022, celkem 105 izolátů, z toho velká část byla doručena v poslední čtvrtině roku 2022. V letech 2018–2022 bylo do NRL/STR doručeno 38 izolátů *S. pyogenes*, které byly dány do souvislosti s úmrtím pacienta. Nejvíce úmrtí souvisejících s onemocněním *S. pyogenes* bylo zaznamenáno v roce 2022 – celkem 20 úmrtí, z toho 4 úmrtí byla nahlášena v listopadu 2022 a 8 úmrtí v prosinci 2022.

V prosinci 2022 došlo k výraznému nárůstu počtu zasláných izolátů *S. pyogenes* do NRL/STR a k celorepublikovému zvýšení výskytu případů jak neinvazivních, tak invazivních onemocnění vyvolaných *S. pyogenes* a tento trend pokračuje i v roce 2023. Na zvýšení výskytu onemocnění způsobených *S. pyogenes* se pravděpodobně podílelo uvolnění protiepidemických opatření, sezonní cirkulace respiračních virů a v následujícím roce 2023 pravděpodobně též situace snížené dostupnosti penicilinu. NRL/STR oslovila v lednu 2023 mikrobiologické laboratoře v terénu, aby v zájmu zlepšení monitorování situace výskytu iGAS zasílaly do NRL/STR izoláty *S. pyogenes* z invazivních onemocnění.

V období od ledna do července 2023 bylo do NRL/STR doručeno 384 izolátů GAS, z toho 287 izolátů bylo z invazivního onemocnění. Nejvíce izolátů bylo doručeno v dubnu 2023, a to 76 vzorků, z toho 60 bylo z invazivních onemocnění. V NRL/STR bylo v období ledna až července 2023 zaznamenáno celkem 44 úmrtí v souvislosti s onemocněním *S. pyogenes*, nejvíce úmrtí bylo dokumentováno v květnu 2023 – celkem 12 úmrtí. Monitorováním vyskytujících se *emm* typů bylo zjištěno, že převažujícím *emm* typem je *emm1* – od ledna 2023 do července 2023 bylo 46 % všech iGAS typu *emm1*. V předchozích letech 2015–2022 bylo průměrně zaznamenáno 18 % izolátů iGAS *emm1* (nejméně v roce 2021 – 2 %, nejvíce v roce 2016 – 29 %). Dále se zvýšil výskyt typů *emm12*, *emm49* [11].

MATERIÁL A METODY

Kmeny

Do studie byly vybrány kmeny *S. pyogenes* typu *emm1* získané v letech 2018, 2019 a od konce roku 2022 do května roku 2023. Z let 2018 a 2019 bylo vybráno 5 izolátů iGAS. Z období prosinec 2022 až květen 2023 bylo zvoleno 36 kmenů izolovaných od pacientů s anamnézou invazivního onemocnění vyvolaného *S. pyogenes*, případně z náhlých úmrtí. Invazivita onemocnění byla hodnocena na základě udané diagnózy a především na základě materiálu, ze kterého byl *S. pyogenes* získán. Ze studovaného souboru 41 izolátů byl ve 36 případech *S. pyogenes* izolován z hemokultury, v 1 případě z mozkomíšního moku a ve 3 případech z pitevního materiálu. V jednom případě se jedná o izolát z neinvazivního materiálu od pacienta, jehož příbuzný prodělal invazivní onemocnění vyvolané *S. pyogenes*. Věkový průměr pacientů ve studovaném souboru, od nichž byl *S. pyogenes* získán, je 31 let, nejmladšímu pacientovi byly 2 roky, nejstaršímu pacientovi bylo 73 let. Ve 23 případech se jednalo o pacientky ženského pohlaví, 18 případů bylo získáno od pacientů mužského pohlaví. Všechny případy jsou z České republiky až na jeden případ, kdy byl kmen *S. pyogenes* izolován na Slovensku. Autorům studie je známo, že minimálně 17 případů skončilo úmrtím.

Identifikace a typizace genu *emm*

Kmeny iGAS zahrnuté do studie, stejně jako všechny ostatní kmeny *S. pyogenes* doručené do NRL/STR, byly podrobeny rutinní kontrole správné identifikace. Kmeny byly kultivovány přes noc na krevním agaru (CO agar, Oxoid) v atmosféře s 5% CO₂, následně byla hodnocena beta hemolýza. Dále bylo provedeno testování streptokokového skupinového antigenu A latexovou aglutinací pomocí Streptococcal Grouping Kit (Oxoid) a testována reakce v PYR testu (PYR Disc w/ Reagent, Remel), kdy byla zjišťována produkce enzymu pyrrolidonyl arylamidázy. Následovala typizace genu *emm* podle protokolu z CDC (<https://www.cdc.gov/strep-lab/groupa-strep/emm-typing-protocol.html>). Dlouhodobě jsou kmeny skladovány v kryozkumavkách (ITEST KRYOBANKA B, ITEST plus s.r.o.) při -70 °C ve sbírce NRL/STR.

Isolace genomové DNA a celogenomová sekvenace

Izoláty iGAS typu *emm1* z let 2018 a 2019 byly sekvenovány s využitím sekvenátoru MiSeq (Illumina) na pracovišti EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Německo). Izoláty iGAS z roku 2022 a 2023 byly sekvenovány v SZÚ přístrojem MiSeq (Illumina). Genomová DNA vybraných vzorků *S. pyogenes* byla izolována QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) s upraveným protokolem pro gram-pozitivní bakterie. Ke fragmentaci DNA byl použit přístroj Covaris M220 Focused-ultrasonicator. Příprava DNA knihovny byla provedena použitím xGen DNA Library Prep MC Kit (IDT).

Zpracování dat z celogenomové sekvenace

Kvalita získaných sekvenačních dat byla hodnocena programem FastQC. K sestavení genomů z primárních sekvenačních dat byl použit *de novo* assembler Unicycler verze v0.4.8 [12], který je nástrojem volně online dostupného Bacterial and Viral Bioinformatic Center (BV-BRC) <https://www.bv-brc.org> [13]. Unicycler byl v tomto případě schopen skládat krátké ready, přičemž funguje jako SPAdes-optimalizátor (https://www.bv-brc.org/docs/quick_references/services/comprehensive_genome_analysis_service.html). Hloubka pokrytí pro každý izolát byla >50x. Ke zjištění sekvenčního typu ST a přítomnosti genů superantigenů *speA*, *speC*, *speG*, *speH*, *spel*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *smeZ* a *ssa* z celogenomových dat byl použit nástroj Comprehensive Genome Analysis, který je součástí BV-BRC. Typy kmenů *emm1* invazivních GAS získané použitím databáze PubMLST podporované platformou Bacterial Isolate Genome Sequence Database (BiGSdb) [14] byly také ověřeny nástrojem Comprehensive Genome Analysis. Jednonukleotidové polymorfismy byly stanoveny proti cílovému genomu referenčního kmene invazivního *S. pyogenes* MGAS5005 typ *emm1* izolovaného z mozkomíšního moku v Kanadě v roce 1996 [15] použitím nástroje Variation Analysis, který je součástí

BV-BRC a využívá aligner BWA-mem [16] a SNP Caller FreeBayes [17].

Fylogenetická analýza

Phylogenetic Tree Service v BV-BRC byl použit ke konstrukci fylogenetických stromů ze studovaných genomů. Nástroj Codon Tree umožnil náhodně vybrat 1000 single-copy BV-BRC globálních proteinových rodin PGFam [18] a použitím programu RAxML verze 8 [19] byly analyzovány zarovnané proteiny a kódující DNA ze single-copy genů s parametry Max Allowed Deletion 0 a Max Allowed Duplication 0. Do fylogenetické analýzy byly zahrnuty anotované genomy sekvenovaných iGAS kmenů typ *emm1* izolovaných v České republice v letech 2018–2023, 4 kmeny iGAS typ *emm1* izolované v Anglii v roce 2014 charakterizované jako sublinie M1_{UK} [6] a referenční kmen *S. pyogenes* MGAS5005. WGS data uvedených iGAS kmenů izolovaných v Anglii byla získána v databázi European Nucleotide Archive (ENA) <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB17673>.

VÝSLEDKY

Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza anotovaných genomů izolátů iGAS typu *emm1* ukázala vývoj *emm1* typů v období let 2018 a 2019 a od prosince 2022 do května 2023. Stejně jako v mnoha jiných zemích tak i v České republice došlo mezi izoláty iGAS k rozšíření sublinie M1_{UK}. V letech 2018 a 2019 bylo do NRL pro streptokokové nákazy doručeno pouze 21 izolátů iGAS typu *emm1* (tab. 1). Z období 2018 až 2019 bylo sekvenováno 5 kmenů iGAS typu *emm1*, z toho 4 kmeny neodpovídají sublinii M1_{UK}. Tyto kmeny spolu se třemi kmeny z období 2022 až 2023 tvoří oddělený klon od sublinie M1_{UK} (obr. 1).

Detekce vybraných jednonukleotidových polymorfismů v core genomu

Data celogenomové sekvenace byla získána pro 41 iGAS izolátů typu *emm1* získaných v letech 2018, 2019 a od prosince 2022 až do května 2023 (tab. 2). Sublinie M1_{UK}, která je spojována se zvýšeným výskytem spály a invazivních onemocnění v Anglii v letech 2014–2016, je charakterizována 27 SNP v regulačních a metabolických genech (tzv. core genome). Tři non-synonymní mutace byly identifikovány v genu *rofA* [6], který kóduje transkripční regulátor RofA. RofA je považován u některých genotypů za represor produkce streptokokového pyrogenního exotoxinu SpeA. Ze 41 sekvenovaných iGAS izolátů typu *emm1* 32 vykazovalo v genomu uvedených 27 SNP definovaných pro M1_{UK} se třemi mutacemi v genu *rofA*. U dvou dalších izolátů bylo nalezeno pouze 26 z těchto 27 SNP. Chybí non-synonymní SNP v locusu genu M5005_Spy1860. Sublinie M1_{UK} s chybějící jednou mutací byla také publikována [20]. Sedm kmenů iGAS nevykazovalo žádnou z definovaných SNP, z toho čtyři kmeny byly izolovány v letech 2018 a 2019.

Detekce genů superantigenů

U každého sekvenovaného izolátu analýzou genomu (Comprehensive Genome Analysis) BV-BRC byla stanovena přítomnost genů superantigenů *speA*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *smeZ* a *ssa*. U iGAS izolátů převažuje profil genů superantigenů charakteristický pro *S. pyogenes* typ *emm1*. To znamená přítomnost genů streptokokových pyrogenních exotoxinů *speA*, *speG*, *speJ* a streptokokového mitogenního exotoxinu *smeZ* [21]. U dvou ze 41 sekvenovaných izolátů iGAS chybí gen *speA*. U dvou kmenů, který nepatří k sublinii M1_{UK}, byl identifikován gen streptokokového pyrogenního exotoxinu C (*speC*). Gen *speC* byl nalezen i u dvou izolátů odpovídajících přítomností 27 definovaných SNP sublinii M1_{UK}.

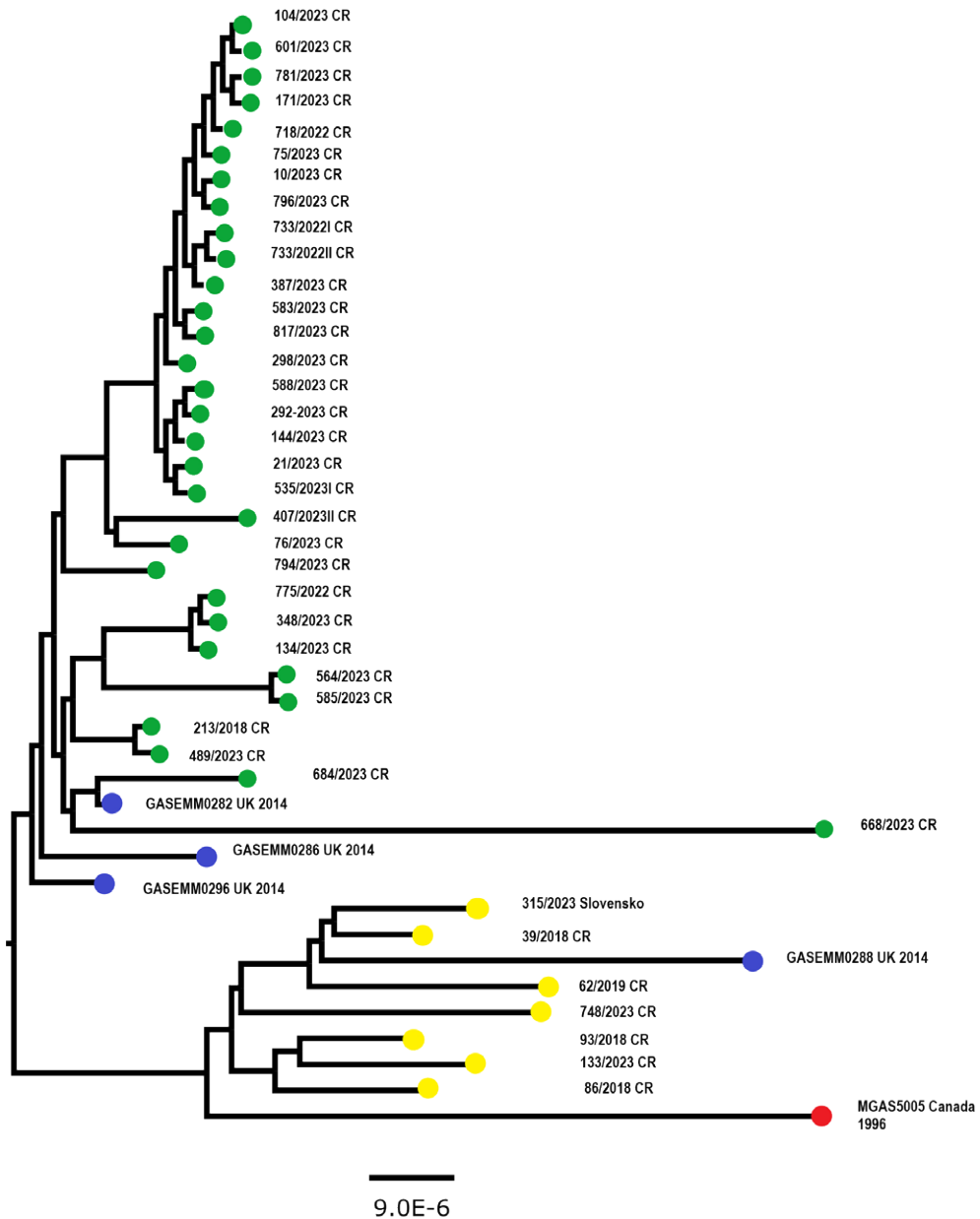
Tabulka 1. Distribuce *S. pyogenes* typ *emm1* mezi iGAS v letech 2015–2023

Table 1. Distribution of *emm1* *S. pyogenes* among iGAS in 2015–2023

Rok	Celkem vzorků <i>S. pyogenes</i>	Vzorky z invazivních onemocnění	Invazivní – děti do 5 let věku	Invazivní – děti 5–18 let věku	Celkem typ <i>emm1</i>	Invazivní typ <i>emm1</i>
2015	53	35	1	0	15	9
2016	84	63	4	1	21	18
2017	58	32	1	2	12	9
2018	84	55	2	4	9	7
2019	78	60	0	1	12	11
2020	77	58	1	2	4	3
2021	45	43	0	0	1	1
2022	105	91	4	8	25	23
2023 (do 4. 8.)*	385	290	19	31	179	134

*vzorky doručené do NRL do 4. 8. 2023; invazivní vzorek – izolát z primárně sterilní lokalizace

*specimens referred to the NRL until 4 August 2023; invasive isolate – isolate from a primarily sterile site



Obr. 1. Fylogenetický vztah mezi vybranými kmeny iGAS typ *emm1* z České republiky izolovanými v letech 2018 až 2023 a kmeny iGAS globálně rozšířené sublinie M1_{UK} izolovanými v UK v roce 2014

Bakteriální fylogenetický strom byl generován Codon Tree pipeline. Využívá aminokyselinové a nukleotidové sekvence z definovaného počtu 1000 BV-BRC globálních proteinových rodin (PGFam), které byly vybrány náhodně. Zeleně jsou značeny kmeny iGAS obsahující SNP definované pro sublinii M1_{UK} izolované v České republice v letech 2018 až 2023. Žlutě jsou značeny kmeny iGAS, které neobsahují žádný z uvedených SNP definovaných pro sublinii M1_{UK} izolované v České republice v letech 2018–2023. Modře jsou značeny kmeny sublinie M1_{UK} izolované v UK v roce 2014. Červeně je značen referenční kmen invazivní *S. pyogenes* MGAS5005 typ *emm1* izolovaný v roce 1996 v Kanadě. Jednotka délky větve udává pravděpodobnost, že daná pozice nukleotidu v genomu bude substituována.

Figure 1. The phylogenetic relationship between selected *emm1* iGAS strains from the Czech Republic isolated in 2018–2023 and iGAS strains of the globally distributed M1_{UK} sublineage isolated in the UK in 2014

The bacterial phylogenetic tree was generated by the Codon Tree pipeline. It uses amino acid and nucleotide sequences from a defined number of 1000 BV-BRC global protein families (PGFam), which were randomly selected. Green indicates iGAS strains containing SNPs defined for the M1_{UK} sublineage isolated in the Czech Republic between 2018 and 2023. Yellow indicates iGAS strains that do not contain any of the SNPs defined for the M1_{UK} sublineage isolated in the Czech Republic between 2018 and 2023. Blue indicates iGAS strains of the M1_{UK} sublineage isolated in the UK in 2014. Red indicates the reference strain *S. pyogenes* MGAS5005 isolated in 1996 in Canada. The branch length unit indicates the probability that a given nucleotide position in the genome will be substituted.

Tabulka 2. Distribuce SNP definovaných pro sublinii M1_{UK} v sekvenovaných iGAS typu *emm1* a zastoupení genů jednotlivých superantigenů

Table 2. Distribution of SNPs defined for the M1_{UK} sublineage in sequenced *emm1*-type iGAS and representation of individual superantigen genes

Rok izolace	Počet sekvenovaných kmenů	Kmeny obsahující 27 SNP	Kmeny obsahující 26 SNP	Kmeny obsahující SNP	Kmeny obsahující <i>speA</i>	Kmeny obsahující <i>speG</i>	Kmeny obsahující <i>speJ</i>	Kmeny obsahující <i>smeZ</i>	Kmeny obsahující <i>speC</i>
2018	4	1	0	3	4	4	4	3	0
2019	1	0	0	1	1	1	1	1	0
2022	6	5	0	1	5	6	6	4	1
2023	30	26	2	2	29	30	30	30	3

DISKUSE

Epidemiologie výskytu iGAS v České republice odráží významný nárůst invazivních onemocnění od prosince roku 2022 a během první poloviny roku 2023. Toto období přichází po dvou letech restrikcí spojených s protiepidemickými opatřeními proti šíření covid-19 v letech 2020 a 2021. Při zavedených protiepidemických opatřeních docházelo jen v omezené míře k mezilidskému přenosu jak respiračních virů, tak i bakterií osidlujících dýchací cesty člověka. Imunita tedy nebyla dostatečně „trénovaná“ pravidelným kontaktem s různými viry a bakteriemi a vznikl tzv. „imunitní dluh“ [22]. Nyní při rozvolnění a zrušení protiepidemických opatření nastává tzv. „rebound“ efekt neboli efekt zpětného rázu, který může být tím silnější, čím déle trvala protiepidemická opatření a čím nižší je tzv. kolektivní imunita [22]. Závažná streptokoková onemocnění na rozdíl od období před pandemií, kdy byli postiženi hlavně polymorbidní pacienti, injekční uživatelé drog a lidé bez domova, se vyskytují nově u dětí a dosud zdravých dospělých středního věku. Věkový průměr pacientů, u kterých se NRL pro streptokokové nákazy podařilo získat izoláty z primárně sterilních míst v období prosinec 2022 až červenec 2023, byl 51,5 let, přičemž průměrný věk v letech 2018–2021 pacientů s iGAS byl 56,7 let. Stejný trend poklesu věkové hranice pacientů s invazivním infekčním onemocněním ve srovnání s předchozími roky byl zaznamenán např. v Dánsku [23]. Dochází také ke změně klinické manifestace. Zvýšil se počet izolátů *S. pyogenes*, které vyvolaly invazivní onemocnění ve formě sepse s rychlou progresí klinického stavu, s toxickým šokem a nekrotizující infekce měkkých tkání s protražovanou odezvou na antibiotickou léčbu a s vyskytující se reinfekcí po vysazení antibiotik. Objevuje se také nárůst případů meningitidy a pneumonie způsobené *S. pyogenes* [24, 25]. Nezanedbatelným faktorem, který může ovlivnit nárůst invazivních onemocnění způsobených *S. pyogenes*, je sezonní vyšší výskyt respiračních virů [26, 27] a viru varicella zoster [25] v zimě 2023 a v České republice pak špatná dostupnost penicilinu [25, 28, 29]. V letech 2014–2016 byl v Anglii zaznamenán neočekávaný nárůst spály a invazivního infekčního onemocnění

způsobeného *S. pyogenes* typu *emm1*. Invazivní izoláty byly podrobeny celogenomové sekvenaci a na základě nálezu 27 specifických mutací v regulačních a metabolických genech byla definována nová linie typu *emm1* nazvaná následně linie M1T1 *S. pyogenes* neboli M1_{UK} [6]. První izolát sublinie M1_{UK} byl izolován v Londýně v roce 2010, přičemž v letech 2009 až 2012 byly v Anglii identifikovány izoláty charakterizované 13 nebo 23 z těchto jedinečných 27 mutací. U sublinie M1_{UK} byly prokázány tři non-synonymní mutace v genu *rofA*, který kóduje transkripční regulátor RofA [30]. RofA potlačuje transkripci genů *speA*, *pel-sagA* a *mga* a v některých genotypech *S. pyogenes* se považuje za represor produkce SpeA [6, 31]. Tento ve zvýšené míře toxigenní kmen byl následně detekován v dalších zemích Evropy, v Kanadě a v USA [8, 9, 10]. V zmíněném roce 2016 byl v ČR zaznamenán zvýšený počet případů invazivních onemocnění vyvolaných *S. pyogenes*. V roce 2017 počty případů invazivních onemocnění klesaly. Data z celogenomové sekvenace izolátů z tohoto období nejsou k dispozici a další došetření nebylo provedeno. Analýzou mutací u čtyř z pěti sekvenovaných invazivních izolátů izolovaných v letech 2018 a 2019 se nepodařilo prokázat přítomnost definovaných SNP charakteristických pro kmeny iGAS patřících k sublinii M1_{UK}, tedy ani mutací v genu *rofA*. V České republice během vzestupu invazivních onemocnění od prosince 2022 a v první polovině roku 2023 dominují iGAS typ *emm1* a převaha *emm1* izolátů patří k sublinii M1_{UK}. U iGAS izolátů převažuje profil genů superantigenů charakteristický pro *S. pyogenes* typ *emm1*. To znamená přítomnost genů streptokokových pyrogenních exotoxinů *speA*, *speG*, *speJ* a streptokokového mitogenního exotoxinu *smeZ*.

U dvou kmenů, které nepatří k sublinii M1_{UK}, se identifikoval gen streptokokového pyrogenního exotoxinu C (*speC*). Tyto kmeny nenesly žádný z 27 SNP definovaných pro sublinii M1_{UK}. U těchto dvou izolátů iGAS bylo provedeno srovnání nalezených mutací s 15 SNP charakteristickými pro invazivní kmeny *S. pyogenes* typ *emm1* sublinie M1DK identifikovaných v Dánsku v období 2022–2023 [32]. U žádného z těchto kmenů nebyla potvrzena shoda ani jedné definované mutace a příslušnost k sublinii M1DK nebyla potvrzena ani

fylogenetickou analýzou (data nejsou uvedena). Gen *speC*, stejně jako gen *speA*, je nesen na fágovi a vyskytuje se v profilu superantigenů charakteristickém pro *S. pyogenes* typu *emm28* a *emm12*, které tvoří další čteně zastoupené *emm* typy iGAS izolované v České republice od prosince 2022 do konce července 2023. Ve studii izolátů iGAS 46 různých *emm* typů v Německu v letech 2009–2014 bylo uvedeno, že u 42,0 % vzorků byl identifikován gen *speC* [3].

ZÁVĚR

Není zřejmé, zda šíření M1_{UK} v České republice na konci roku 2022 a v první polovině roku 2023 je spojeno s kompeticí kmenů cirkulujících v populaci, ale může souviset s restrikcemi spojenými s covidem-19. Snížená imunita v souvislosti s omezeným přenosem GAS během restričních opatření proti šíření covidu-19, zvláště u dětí, může být jedna z příčin expanze jednotlivých linií iGAS. Dalším faktorem, který přispěl k vysokému výskytu invazivních onemocnění způsobených *S. pyogenes*, může být sezonní cirkulace respiračních virů, což zvyšuje riziko vážných iGAS ko-infekcí. Tato studie dále ukázala výhody zavedení metody celogenomové sekvenace do NRL pro streptokokové nákazy, což umožní v budoucnu podrobnou analýzu izolátů z dalších možných outbreaků.

Aktuální data je třeba nahlížet v kontextu neexistující surveillance invazivních onemocnění vyvolaných *S. pyogenes* v České republice.

LITERATURA

- Thompson KM, Sterkel AK, McBride JA, et al. The Shock of Strep: Rapid Deaths Due to Group A Streptococcus. *Acad Forensic Pathol.* 2018;8(1):136–149. doi: 10.23907/2018.010.
- Turner CE, Abbott J, Lamagni T, et al. Emergence of a New Highly Successful Acapsular Group A Streptococcus Clade of Genotype *emm89* in the United Kingdom. *mBio.* 2015;6(4):e00622. doi: 10.1128/mBio.00622–15.
- Imohl M, Fitzner Ch, 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. doi: 10.1371/journal.pone.0180757.
- 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. *Int J Med Microbiol.*, 2007;297(6):471–478. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.03.015.
- Nelson DC, Garbe J, Collin M. Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes* – a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biol Chem.* 2011;392(12):1077–1088. doi: 10.1515/BC.2011.208.
- Lynskey NN, Jauneikaite E, Li HK, et al. Emergence of dominant toxigenic M1T1 *Streptococcus pyogenes* clone during increased scarlet fever activity in England: a population-based molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(11):1209–1218. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30446-3.
- Li HK, Zhi X, Vieira A, et al. Characterization of emergent toxigenic M1_{UK} *Streptococcus pyogenes* and associated sub-lineages. *Microb Genom.*, 2023;9(4):mgen000994. doi: 10.1099/mgen.0.000994.
- Imöhl M, van der Linden M, Reinert RR, et al. Invasive group A streptococcal disease and association with varicella in Germany, 1996–2009. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 2011;62(1):101–109. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00788.x.
- Rümke LW, de Gier B, Vestjens SMT, et al. Dominance of M1_{UK} clade among Dutch M1 *Streptococcus pyogenes*. *Lancet Infectious Diseases*, 2020;20(5):539–540. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30278-4.
- Demczuk W, Martin I, Domingo FR, et al. Identification of *Streptococcus pyogenes* M1_{UK} clone in Canada. *Lancet Infectious Diseases*, 2019;19(12):1284–1285. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30622-X.
- Vohrnová S, Veselá R, Kozáková J, et al. Zvýšený výskyt invazivních onemocnění vyvolaných *Streptococcus pyogenes* od prosince 2022 do srpna 2023 – výsledky *emm* typizace, MLST, testování citlivosti na antibiotika a celogenomové sekvenace. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2023;31(10):377–382.
- Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, et al. Unicycler: resolving bacteria genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology.* 2017;13(6):e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
- Olson RD, Assaf R, Brettin T, et al. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D678–D689. doi: 10.1093/nar/gkac1003.
- Jolley KA, Maiden MCJ. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 2010;11(1). doi: 10.1186/1471-2105-11-595.
- Summy P, Porcella SF, Madrigal AG, et al. Evolutionary origin and emergence of a highly successful clone of serotype M1 group A *Streptococcus* involved multiple horizontal gene transfer events. *J Infect Dis.*, 2005;192(5):771–782. doi: 10.1086/432514.
- Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM, 2013 arXiv:1303.3997
- Li H. Toward better understanding of artifacts in variant calling from high-coverage samples. *Bioinformatics*, 2014;30(20):2843–2851. doi: 10.1093/bioinformatics/btu356.
- Davis JJ, Gerdes S, Olsen GJ, et al. PATtyFams: Protein Families for the Microbial Genomes in the PATRIC Database. *Front Microbiol.*, 2016;7:118. doi: 10.3389/fmicb.2016.00118.
- Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 2014;30(9):1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
- Li Y, Nanduri SA, Van Beneden CA, et al. M1_{UK} lineage in invasive group A streptococcus isolates from the USA. *Lancet Infect Dis.*, 2020;20(5):538–539. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30279-6.
- Veselá R, Vohrnová S, Kozáková J. Detekce superantigenů u izolátů *Streptococcus pyogenes* na základě dat celogenomové sekvenace. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2023; 72(3):191–194.
- Cohen R, Ashman M, Taha MK, et al. Pediatric Infectious Disease Group (GPIP) position paper on the immune debt of the COVID-19 pandemic in childhood, how can we fill the immunity gap? *Infect Dis Now.*, 2021;51(5):418–423. doi: 10.1016/j.idnow.2021.05.004.
- Johannesen TB, Munkstrup C, Edslev SM, et al. Increase in invasive group A streptococcal infections and emergence of novel, rapidly expanding sub-lineage of the virulent *Streptococcus pyogenes* M1 clone, Denmark, 2023. *Euro Surveill.*, 2023;28(26):2300291. doi: 10.2807/1560-7917.
- Štefan M. Invazivní infekce způsobené *Streptococcus pyogenes* s protrahovaným průběhem a rekurencí. Olomouc: Kongres Klinické Mikrobiologie, Infekčních nemocí a Epidemiologie, 6. října 2023.
- Heinige P, Prchlík M, Zaoral M, et al. Upozornění pracovní skupiny sekce intenzivní medicíny při České pediatričké společnosti na opakovaný výskyt velmi závažných invazivních infekcí pyogenními streptokoky v ČR. *Čes-slov Pediat.*, 2023;78(5):281–282.
- de Gier B, Vlamincx BJM, Woudt SHSb, et al. Associations between common respiratory viruses and invasive group A streptococcal infection: A time-series analysis. *Influenza Other Respir Viruses.* 2019;13(5):453–458. doi: 10.1111/irv.12658.
- Research and analysis. Group A streptococcal infections: report on seasonal activity in England, 2022 to 2023 [online]. Dostupné na [www: https://www.gov.uk/government/publications/group-a-streptococcal-infections-activity-during-the-2022-to-2023-season/group-a-streptococcal-infections-second-update-on-seasonal-activity-in-england-2022-to-2023](https://www.gov.uk/government/publications/group-a-streptococcal-infections-activity-during-the-2022-to-2023-season/group-a-streptococcal-infections-second-update-on-seasonal-activity-in-england-2022-to-2023).

27. Blechová Z. Nárůst streptokokových infekcí u dětí včetně závažných manifestací [online]. 2023-05-20. Dostupné na [www: https://infektologie.cz/zprava23-15.htm](https://infektologie.cz/zprava23-15.htm).
28. WHO. Mitigating Shortages of Antibiotics [online]. Dostupné na [www: https://www.who.int/groups/mitigating-shortages-of-antibiotics](https://www.who.int/groups/mitigating-shortages-of-antibiotics).
29. Kreikemeyer B, Beckert S, Braun-Kiewnick A, et al. Group A streptococcal RofA-type global regulators exhibit a strain-specific genomic presence and regulation pattern. *Microbiology (Reading)*, 2002;148(Pt 5):1501–1511. doi: 10.1099/00221287-148-5-1501.
30. Beckert S, Kreikemeyer B, Podbielski A. Group A streptococcal rofA gene is involved in the control of several virulence genes and eukaryotic cell attachment and internalization. *Infect Immun.*, 2001;69(1):534–537. doi: 10.1128/IAI.69.1.534-537.2001.
31. Johannesen TB, Munkstrup C, Edslev SM, et al. Increase in invasive group A streptococcal infections and emergence of novel, rapidly expanding sub-lineage of the virulent *Streptococcus pyogenes* M1 clone, Denmark, 2023. *Euro Surveill*, 2023;28(26):2300291. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.26.2300291.

Autoři děkují mikrobiologickým laboratořím za zaslání izolátů *S. pyogenes* z invazivních onemocnění do NRL/STR.

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

Do redakce došlo dne 31. 10. 2023.

Adresa pro korespondenci:

Ing. Renáta Veselá

Státní zdravotní ústav

Šrobárova 49/48

110 00 Praha 10

e-mail: renata.vesela@szu.cz