

# A 组链球菌基因分型方法最新进展及应用

郑明寰 张建中

【关键词】 A 组链球菌；酿脓链球菌；基因分型

A review on the advancement and application of group A *Streptococcus* genotyping ZHENG Ming-huan, ZHANG Jianzhong. Department of Diagnosis, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Key words】 Group A *Streptococcus*; *Streptococcus pyogenes*; Genotyping

A 组链球菌 (group A *Streptococcus*, GAS) 或酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 能引起多种疾病, 包括猩红热、毒素休克样综合征、风湿热、咽炎及急性肾小球肾炎等。随着抗生素的广泛使用, 在发达国家和地区 GAS 引起的重症感染其发病率曾明显下降, 但 20 世纪 80 年代中后期, 欧美各国也包括发展中国家相继报道风湿热的局部暴发以及侵袭性感染的发病率显著上升, 使得 GAS 感染再次受到高度重视<sup>[1]</sup>。在我国, 猩红热、急性风湿热以及急性肾小球肾炎等 GAS 疾病的流行及暴发仍不容忽视, 近年来每年均有猩红热和急性肾小球肾炎暴发的报道<sup>[2-7]</sup>, 而且我国依然是受风湿热危害严重的国家之一, 根据 1992-1995 年全国调查显示, 其发病率为 20.05/10 万, 是美国的 40 倍<sup>[8]</sup>, 因此 GAS 疾病对我国公共卫生所造成的危害较为严重。

血清 M 蛋白分型、T 蛋白分型及混浊因子 (opacity factor, OF) 蛋白分型作为 GAS 传统的分型方法, 曾经在 GAS 疾病的流行病学研究以及对疾病的防治与控制发挥了重要作用。但分型血清不易获得, 血清分型方法具有操作繁琐、血清效价容易降低、分辨率低等缺点, 再加上 GAS 疾病新的流行趋势迫使研究者们使用分子生物学的方法开展 GAS 的流行病学研究<sup>[1]</sup>。

基因分型近年来发展并趋于成熟, 具有快速、简便、分辨率高等特点, 已成功应用于 GAS 分型, 其中较为常用的有 M 蛋白基因 (*emm*) 序列分型、血清混浊因子 (serum opacity factor, *sof*) 基因序列分型、脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 及多位点序列分型 (multi locus sequence typing, MLST) 等, 且在疫情处理中发挥重要作用。但此类分型方法在我国尚未普遍采用, 针对当前的疾病控制需求, 本文就 GAS 常用的几种分型方法进行简要综述。

1. *emm* 分型: *emm* 分型方法是目前最常规的 GAS 分型方法, 其标准化方法可从美国疾病预防控制中心 (CDC) 相关

网站下载 ([http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol\\_emm-type.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emm-type.htm))。*emm* 基因编码 M 蛋白, 其 5 端为可变区, 3 端为保守区。目前 GAS 的 M 血清型有 95 种之多, 而这种高多样性正是由 *emm* 基因 5 端的可变区序列所造成。因此, *emm* 分型的原理是使用通用引物, 通过 PCR 扩增及测序获得 *emm* 基因的 5 端可变区序列, 将序列上传至相关数据库 ([http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/infotech\\_hp.html](http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/infotech_hp.html)), 进行 *emm* 基因序列的比较分析, 确定 *emm* 型及亚型。目前 *emm* 分型数据库里已有 124 个 *emm* 型及 704 个 *emm* 亚型, 另外还包括 42 个序列型 (sequence type, st) 及 236 个 st 亚型, st 型指的是鉴定出的尚未经过参比实验室验证的新 *emm* 基因型。各国 GAS 分子流行病学研究结果表明, 世界范围内流行的大部分 GAS 菌株的 *emm* 基因型已鉴定完毕, 主要分布在 *emm*1~*emm*124 型之间<sup>[9]</sup>, GAS 在不同国家的分布情况不尽相同, 存在一定的地理性差异<sup>[10-13]</sup>。

由于 *emm* 型与 M 型之间的高度一致性以及高分辨率<sup>[14,15]</sup>, *emm* 分型已替代 M 分型成为 GAS 分型的金标准方法<sup>[1]</sup>, 应用于许多国家或地区的链球菌疾病监测。欧洲链球菌监测项目 (Strep-EURO) 的结果表明, 欧洲的侵袭性链球菌中, *emm*1、*emm*12、*emm*3 和 *emm*4 等四型占有菌株的 50%<sup>[16]</sup>, 在美国 *emm*1、*emm*28、*emm*12、*emm*3 和 *emm*11 占有侵袭性链球菌的 49.6%<sup>[12]</sup>, 而在中国 *emm*1 和 *emm*12 占侵袭性链球菌和非侵袭性链球菌的 60.0% 和 51.3%<sup>[10]</sup>。通过 *emm* 分型, 可以掌握国家或地区 GAS 疾病的流行病学资料, 了解 GAS 流行趋势或找出新的流行株, 有利于调整链球菌疾病预防策略, 也有助于 GAS 疫苗的研究和开发。*emm* 型在局部地区能代表菌株的克隆型 (群)<sup>[17]</sup>, 但是分离自不同地区、国家或年代的同一 *emm* 型菌株间可能存在基因背景的差异<sup>[18,19]</sup>, 因此应采用多种分型方法结合应用于 GAS 的流行病学研究。

2. *sof* 分型: 与 *emm* 分型类似, *sof* 分型其原型是血清 OF 分型。约有 50% 的 GAS 表达 SOF 蛋白, 该蛋白可以介导高密度脂蛋白的凝集, 从而使马血清变得不透明, 称为 OF 反应, 据此 GAS 分为两大类, 即 OF 阳性和阴性菌株<sup>[20]</sup>。SOF 蛋白具有 M 型特异性, OF 阳性菌株其相应的抗血清只能阻止同一 M 血清型菌株的 OF 反应<sup>[21]</sup>。因此, 血清 OF 型与另一种血清分型方法 (T 分型) 共同作为 M 分型的基础, 这两种方法均只有 20 多种血清型, 可以初步判断 M 型, 从而简化 M 分型的操作步骤。

随后的研究表明, SOF 蛋白的氨基端 80% 的序列属于高变区, 而 5 端的 189~258 个密码子序列可以准确预测菌株

作者单位: 102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

的 OF 血清型,所以 *sof* 基因分型的方法是用一对通用引物扩增 *sof* 基因的 5 端区域,由于基因的高度变异性,不同菌株 PCR 产物大小不一致,在 580~750 bp 之间,然后用测序引物进行单向测序获得序列,通过 NCBI 的 Blast 进行序列分析,确定菌株的 *sof* 分型<sup>[20]</sup>。分子流行病学研究发现,编码 M 蛋白的 *emm* 基因和 *sof* 基因可以在不同菌株间转移,但是 OF 阳性和阴性菌株间似乎很难发生这种水平转移,根据 *emm* 基因序列绘出的进化树显示 GAS 分成两大类,既 OF 阳性和阴性菌株<sup>[9]</sup>,说明 *emm* 基因与 *sof* 基因之间存在某种内在的联系。

*sof* 基因分型的分辨率略高于 OF 血清型,通过该分型不仅可以判断菌株的 OF 阳性或阴性,而且还能进一步了解菌株的基因背景。根据文献报道,具有相同 *emm* 型和 *sof* 型的 GAS 菌株其 PFGE 图谱很相近,而 *emm* 型相同但 *sof* 型不一致的菌株其 PFGE 图谱则完全不同,说明 *emm* 型和 *sof* 型分别代表不同的 GAS 菌株基因背景<sup>[20]</sup>,因此在流行病学研究中,*sof* 基因分型可作为 *emm* 分型一个很好的补充。

3. PFGE:PFGE 是目前菌株分型中比较常用的一种方法。PFGE 具有其他分型方法无法具有的独特优势,它可分离数 kb 到上千 kb 的 DNA 片段,从而在染色体水平上研究细菌的基因背景。PFGE 可以确定细菌的克隆型<sup>[22]</sup>,而且操作时间较短,一次试验需要 2~3 d 的时间,能帮助迅速确定暴发菌株和传染源,在疫情的预警、预测及应对中发挥至关重要的作用<sup>[23]</sup>。

目前很多菌种都已建立相关的 PFGE 分型方法,而且部分食源性疾病相关菌种的标准化程序可直接从 PulseNet 网站下载 (<http://www.cdc.gov/pulsenet>)。酿脓链球菌的 PFGE 分型可按照 PulseNet 发布的单核细胞增生李斯特菌的操作程序<sup>[24]</sup>,内切酶使用 *Sma*I,但文献报道部分 GAS 对 *Sma*I 不敏感,对这部分菌株需要使用内切酶 *Sgr*AI<sup>[18]</sup>,也有文献使用内切酶 *Cfr*9I,可以把分辨力提高至 100%<sup>[25]</sup>。

PFGE 与 *emm* 型间存在高度相关性,以及 PFGE 的分辨率要大于 *emm* 分型<sup>[18]</sup>,因此 PFGE 作为亚型分型方法广泛应用于 GAS 流行病学研究中。Malhotra-Kumar 等<sup>[26]</sup>对 152 株氟喹诺酮耐药菌株进行 *emm* 分型和 PFGE 分析,共分出 9 种 *emm* 型和 15 种 PFGE 型,通过 PFGE 图谱分析,确定 5 个克隆群,其中分别属于 *emm*6 型和 *emm*75 型的两个克隆群是在当地流行的主要耐药菌株。Kao 等<sup>[27]</sup>应用 *emm* 分型和 PFGE 法对台湾中部分离到的 21 株侵袭性链球菌和 49 株非侵袭性链球菌进行分析,共鉴定出 19 种 *emm* 型和 51 种 PFGE 型,但在两种菌间 PFGE 型的构成没有显著差异。另外 PFGE 的高分辨率和快速的特点,使其在链球菌暴发疫情的研究中发挥重要作用。Phillips 等<sup>[28]</sup>对一起脓皮病暴发疫情进行流行病学研究时,从 7 例患者中均分离出 M59 型菌株,其 PFGE 图谱完全一致,但暴发菌株的 PFGE 图谱则不同于 M59 型标准菌株及散发菌株的图谱。

虽然 PFGE 在分辨率、操作时间和成本上与基于测序的

*emm* 分型方法相比更具有优势,但无法替代 *emm* 分型方法,因为只有 *emm* 分型才能反映 M 血清型特异性,在与 GAS 疾病的关联上 *emm* 分型方法所提供的信息要比 PFGE 丰富。

4. MLST:多位点序列分型不仅可以应用于分子流行病学研究,还可以用来研究微生物的遗传种群结构<sup>[17]</sup>。GAS 的 MLST 方法是分别通过扩增 GAS 的 7 个管家基因的内部片段并测序,通过序列比对和不同等位基因的排列组合来确定序列型(ST)。研究表明 MLST 的分辨率高于 *emm* 型,而且两种分型方法间存在稳定的相关关系,Enright 等<sup>[17]</sup>对代表 78 种 *emm* 型的 212 株 GAS 进行 MLST 分析,共分出 100 个 ST 型,而且同一 *emm* 型中,大部分菌株具有 5 个或以上相同的等位基因,说明具有相近的基因背景。Carrico 等<sup>[25]</sup>对不同的 GAS 分型方法进行了比较,发现 MLST 与 PFGE 间存在高度相关性,而且均能很好的预测 *emm* 型,同一 ST 型或 PFGE 型的菌株具有相同 *emm* 型的可能性为 95%,但与此相反,*emm* 型对菌株的 MLST 和 PFGE 型的预测能力则大大减弱,特别是对 MLST 的预测能力仅为 66%,表明 MLST 和 PFGE 对菌株克隆的定义要比 *emm* 分型更为准确,充分显示这两种方法在 GAS 流行病学研究中的重要性。

MLST 的分型原理决定了它所反映的基因信息要比 PFGE 更为保守和准确,更具有可比性,目前 GAS 的 MLST 数据库包含约 1000 个不同来源菌株及其背景资料,而且 GAS 的 MLST 标准化方法和数据库均可通过网络共享 (<http://spygenes.mlst.net/misc/info.asp>)。但是 MLST 需要对 7 个管家基因的内部片段进行测序,因此它的实验成本显著高于 PFGE 等其他分型方法,而且较为耗时,所以在流行病学研究中,可从每个 PFGE 型中选出部分菌株进行 MLST 分型<sup>[25]</sup>。

综上所述,目前国际上比较常用的 GAS 基因分型方法已有很多种,已完全替代传统而繁琐的 GAS 血清学分型方法,成为当前 GAS 流行病学研究中主要的研究工具。但是我国对 GAS 的流行病学研究工作日前开展的并不是很多,尚缺乏对 GAS 流行的系统了解,尚不具备预测 GAS 疾病在我国流行趋势的能力。但相信通过结合应用上述不同的基因分型方法,开展 GAS 分子流行病学研究,会对我国 GAS 疾病的预防控制工作具有不可忽视的促进作用。

## 参 考 文 献

- [1] Efstratiou A. Group A streptococci in the 1990s. *J Antimicrob Chemother*, 2000, 45 Suppl: S3-12.
- [2] 吴艳,于洁,单庆祥,等. 中小学猩红热暴发流行调查. *中国生物工程学报*, 2005, 4(2): 96-97.
- [3] 袁鲜艳,师茂林. 一起猩红热暴发疫情的流行病学调查. *地方病通报*, 2007, 22(1): 64.
- [4] 姜桂芳,元国平,刘庆平. 宁波市一起成人食源性猩红热暴发疫情调查. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(2): 183.
- [5] 林宝宗. 某小学急性肾小球肾炎暴发的流行病学调查. *中国学校卫生*, 2001, 22(3): 253.
- [6] 夏际夫,舒仁平,金海,等. 一起急性肾小球肾炎小规模流行的

- 调查. 中国学校卫生, 2001, 22(6):537.
- [7] 代吉亚, 李灵辉, 钟豪杰, 等. 某小学一起群体性急性肾炎发病的病因分析. 华南预防医学, 2005, 31(5):33-38.
- [8] 黄震东, 饶栩栩, 岑润超, 等. 我国中小学生学习风湿热流行状况的调查. 中华心血管病杂志, 1998, 26(2):94-97.
- [9] Sakota V, Fry AM, Lietman TM, et al. Genetically diverse group A streptococci from children in far-western Nepal share high genetic relatedness with isolates from other countries. J Clin Microbiol, 2006, 44(6):2160-2166.
- [10] Jing HB, Ning BA, Hao HJ, et al. Epidemiological analysis of group A streptococci recovered from patients in China. J Med Microbiol, 2006, 55(Pt 8):1101-1107.
- [11] Tanaka D, Gyobu Y, Kodama H, et al. *emm* typing of group A *Streptococcus* clinical isolates: identification of dominant types for throat and skin isolates. Microbiol Immunol, 2002, 46(7):419-423.
- [12] O'Brien KL, Beall B, Barrett NL, et al. Epidemiology of invasive group A *Streptococcus* disease in the United States, 1995 - 1999. Clin Infect Dis, 2002, 35(3):268-276.
- [13] Ho PL, Johnson DR, Yue AW, et al. Epidemiologic analysis of invasive and noninvasive group A streptococcal isolates in Hong Kong. J Clin Microbiol, 2003, 41(3):937-942.
- [14] Beall B, Facklam R, Thompson T. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. J Clin Microbiol, 1996, 34(4):953-958.
- [15] Facklam R, Beall B, Efstratiou A, et al. *emm* typing and validation of provisional M types for group A streptococci. Emerg Infect Dis, 1999, 5(2):247-253.
- [16] Creti R, Imperi M, Baldassarri L, et al. *emm* types, virulence factors, and antibiotic resistance of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Italy: what has changed in 11 years? J Clin Microbiol, 2007, 45(7):2249-2256.
- [17] Enright MC, Spratt BG, Kalia A, et al. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone. Infect Immun, 2001, 69(4):2416-2427.
- [18] Chiou CS, Liao TL, Wang TH, et al. Epidemiology and molecular characterization of *Streptococcus pyogenes* recovered from scarlet fever patients in central Taiwan from 1996 to 1999. J Clin Microbiol, 2004, 42(9):3998-4006.
- [19] McGregor KF, Bilek N, Bennett A, et al. Group A streptococci from a remote community have novel multilocus genotypes but share *emm* types and housekeeping alleles with isolates from worldwide sources. J Infect Dis, 2004, 189(4):717-723.
- [20] Beall B, Gherardi G, Lovgren M, et al. *emm* and *sof* gene sequence variation in relation to serological typing of opacity-factor-positive group A streptococci. Microbiology, 2000, 146 ( Pt 5): 1195-1209.
- [21] Maxted WR, Widdowson JP, Fraser CA, et al. The use of the serum opacity reaction in the typing of group A streptococci. J Med Microbiol, 1973, 6(1):83-90.
- [22] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol, 1995, 33(9):2233-2239.
- [23] Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, et al. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerg Infect Dis, 2001, 7(3):382-389.
- [24] Graves LM, Swaminathan B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. Int J Food Microbiol, 2001, 65(1-2):55-62.
- [25] Carrico JA, Silva-Costa C, Melo-Cristino J, et al. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. J Clin Microbiol, 2006, 44(7):2524-2532.
- [26] Malhotra-Kumar S, Lammens C, Chapelle S, et al. Clonal spread of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes*. J Antimicrob Chemother, 2005, 55(3):320-325.
- [27] Kao CH, Chen PY, Huang FL, et al. Clinical and genetic analysis of invasive and non-invasive group A streptococcal infections in central Taiwan. J Microbiol Immunol Infect, 2005, 38(2):105-111.
- [28] Phillips G, Efstratiou A, Tanna A, et al. An outbreak of skin sepsis in abattoir workers caused by an 'unusual' strain of *Streptococcus pyogenes*. J Med Microbiol, 2000, 49(4):371-374.

(收稿日期:2007-11-22)

(本文编辑:尹廉)

## · 消息 ·

## 北京热带医学研究所将举办“食源性寄生虫病及其诊断技术与治疗”学习班的通知

为促进食源性寄生虫病诊断技术与治疗的学术交流,北京热带医学研究所将于2008年10月17-19日在北京市京东宾馆举办国家级继续医学教育项目——“食源性寄生虫病及其诊断技术与治疗”学习班。本学习班将邀请国内相关知名专家作有关食源性寄生虫病专题报告,介绍食源性寄生虫病基础与临床研究进展、相关新理论和先进的诊疗技术,并探讨交流各种常见食源性寄生虫病的诊断技术和治疗经验。学习班期满将授予国家继续教育I类学分6分。本次学习班将为各位专家、学者提供一个良好的交流机会。诚挚地欢迎您的到来!

会议时间:2008年10月17-19日;会议地点:北京市京东宾馆;报名联系方式:地址:100050北京市宣武区永安路95号北京热带医学研究所,联系人:谷俊朝,电话:010-63025849,传真:010-63139265,Email:reyansuo2008@sohu.com