

· 实验室研究 ·

2011 年北京地区儿童病例 A 组链球菌超抗原基因特征研究

彭晓旻 刘爽 杨鹏 李静 张代涛 崔淑娟 吴双胜 刘医萌 王全意

【摘要】目的 分析 2011 年北京市儿童来源 A 组链球菌(GAS)临床分离株 13 种超抗原基因的携带情况及其与病例特征和 *emm* 分型间的关系。**方法** 2011 年 5—7 月在北京市 36 家医院收集儿童来源 GAS 临床分离株 635 株。采用实时荧光 PCR 方法检测菌株超抗原基因 *speA*、*speB*、*speC*、*speF*、*speG*、*speH*、*speI*、*speJ*、*speK*、*speL*、*speM*、*smeZ*、*ssa* 的携带情况,PCR 法扩增 M 蛋白 N 末端基因片段,并对产物测序确定 GAS 的 *emm* 型别。**结果** 13 种超抗原基因的携带率分别为 *speA* (22.4%)、*speB* (100.0%)、*speC* (99.4%)、*speF* (99.7%)、*speG* (99.7%)、*speH* (76.4%)、*speI* (76.2%)、*speJ* (21.7%)、*speK* (0.6%)、*speL* (1.1%)、*speM* (2.2%)、*smeZ* (99.7%)、*ssa* (98.0%),共观察到 26 种超抗原谱。超抗原 *speA*、*speH*、*speI*、*speJ* 在 *emm1* 和 *emm12* 型 GAS 间分布的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。致咽部感染菌株超抗原 *speK* 和 *speL* 的检出率高于致猩红热菌株 ($P < 0.05$);而对 *ssa* 的携带率低于致猩红热菌株 ($P < 0.05$)。**结论** 2011 年北京市儿童来源 GAS 对超抗原基因 *speB*、*speF*、*smeZ*、*speG*、*speC* 和 *ssa* 的携带率较高,*speM*、*speL* 和 *speK* 的携带率较低。GAS 的 *emm* 分型与超抗原基因间存在密切联系。未观察到超抗原基因 *speA* 和 *speC* 在致猩红热和致咽部感染菌株间的分布差异。

【关键词】 A 组链球菌; 超抗原; *emm* 基因分型; 儿童

Study on the distribution of superantigen of group A streptococcus isolated from children in Beijing, 2011 Peng Xiaomin, Liu Shuang, Yang Peng, Li Jing, Zhang Daitao, Cui Shujuan, Wu Shuangsheng, Liu Yimeng, Wang Quanyi. Institute for Infectious Disease and Endemic Disease Control, Beijing Centers for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China

Corresponding author: Wang Quanyi, Email:bjedcxm@126.com

This work was supported by grants from the Science and Technology New Star (No. 2011047) and the National Science and Technology Support Projects of the "Twelfth Five-Year Plan" of China (No. 2012ZX10004215-003-001).

【Abstract】 Objective To analyze the prevalence of super-antigens (SAGs) of group A streptococcus (GAS) isolated from Beijing pediatric patients in 2011, and to explore the relationship between *emm* types, characteristics of patients and SAGs. **Methods** A total of 635 isolates of GAS were collected from children in 36 hospitals in Beijing from May to July, 2011. Thirteen currently known SAG genes were tested by real-time PCR, and *emm* gene was performed by PCR and sequencing of N-terminal gene fragments of M protein. **Results** Prevalence rates of 13 SAG genes *speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *smeZ*, *ssa* were 22.4%, 100.0%, 99.4%, 99.7%, 99.7%, 76.4%, 76.2%, 21.7%, 0.6%, 1.1%, 2.2%, 99.7% and 98.0%, respectively. A total of 26 SAGs profiles were observed according to the SAGs inclusion. There were significant differences in frequencies of *speA*, *speH*, *speI* and *speJ* between *emm1* and *emm12* strains ($P < 0.05$). In isolates from patients with pharyngeal infection, the prevalence rates for *speK* and *speL* were higher while the frequency for *ssa* was lower than that from scarlet fever cases ($P < 0.05$). **Conclusion** The frequencies of *speB*, *speF*, *smeZ*, *speG*, *speC*, and *ssa* were high among strains isolated while *speM*, *speL* and *speK* were relatively low from children in Beijing, 2011. SAG genes appeared to be associated with the *emm* types. In this study, differences of frequency for *speA* and *speC* from strains collected from patients with scarlet fever and pharyngeal infection had not been found.

【Key words】 Group A streptococcus; Superantigen; *emm* typing; Children

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.03.018

基金项目:北京市科技新星计划项目(2011047); 国家“十二五”科技重大专项(2012ZX10004215-003-001)

作者单位: 100013 北京市疾病预防控制中心传染病与地方病控制所

彭晓旻、刘爽同为第一作者

通信作者: 王全意, Email:bjedcxm@126.com

A组链球菌(GAS)又称化脓性链球菌,是引起儿童感染性疾病的重要致病菌。可引起儿童急性咽扁桃体炎、脓疱疮、猩红热,严重者还可引起坏死性筋膜炎、败血症和链球菌感染中毒休克综合征,可继发风湿热和链球菌感染后肾炎^[1]。GAS致病力与链球菌超抗原(SAg)密切相关。GAS的M蛋白可直接或间接选择性阻止或接受携带某种超抗原基因的噬菌体在细菌间水平传播^[2]。不同地区GAS对超抗原携带水平存在差异,菌株导致的疾病谱亦不同。自2011年3月北京市猩红热发病水平较往年出现大幅升高,为了解GAS超抗原携带现状和分布特征,分析其与 emm 型别的相关性,对2011年收集的635株GAS临床分离株进行研究。

材料与与方法

1. 材料:

(1)菌株:635株GAS分离自2011年5—7月北京市36家医院(各区县选择辖区内2家既往猩红热报告病例数较多的医院)儿科门、急诊临床咽拭子样本。

(2)材料与试剂:VITEK-2全自动细菌生化鉴定分析仪及革兰阳性菌GP鉴定卡来自法国生物梅里埃公司;哥伦比亚血琼脂平板、链球菌A~F分群鉴定试剂盒购自英国Oxoid公司;GAS-DNA提取试剂和GAS超抗原实时荧光PCR检测试剂盒均来自上海之江生物科技有限公司; emm 分型用PCR所引物由上海英潍捷基(invitrogen)生物技术有限公司合成;Taq DNA聚合酶、dNTP来自宝生物工程(大连)有限公司。所有试剂均在有效期内使用。

2. 实验方法:

(1)菌株分离及鉴定:咽拭子标本于振荡器上充分振荡15~30 s,采用接种环取1~2环经处理的咽拭子标本,划线接种于脱纤维羊血哥伦比亚血琼脂平板上。在37℃含5%CO₂恒温箱中孵育24 h。观察菌落形态及溶血现象,挑选β溶血的灰白色、透明或不透明、表面光滑、圆形突起的小菌落。采用VITEK-2全自动微生物分析系统进行生化鉴定,对生化符合的菌株用链球菌A~F分群鉴定试剂盒分群鉴定为A群。

(2)DNA提取:采用GAS基因提取试剂盒提取DNA。用无菌接种环挑取经鉴定的GAS菌落若干,直接加入200 μl核酸抽提液,充分混匀,沸水浴10 min,13 000 r/min离心5 min,取上清。操作过程按试剂盒说明书。

(3)超抗原基因检测:采用实时荧光PCR试剂盒检测GAS的13种超抗原基因($speA$ 、 $speB$ 、 $speC$ 、 $speF$ 、 $speG$ 、 $speH$ 、 $speI$ 、 $speJ$ 、 $speK$ 、 $speL$ 、 $speM$ 、 $smeZ$ 、 ssa)。反应体系为40 μl,体系中包括0.4 μl Taq DNA聚合酶和链球菌核酸荧光PCR检测混合液36 μl。PCR条件为94℃预变性2 min,93℃高温变性15 s,55℃低温退火60 s,共40个循环;单点荧光检测在55℃。荧光通道检测选择FAM和VIC/HEX通道。 C_t 值≤38确定为阳性。具体实验方法参见试剂盒说明书。

(4) emm 分型:采用美国疾病预防控制中心(CDC)网站公布的 emm 基因分型引物。引物1:5'-TATT(C/G)GCTTAGAAAATTAA-3',引物2:5'-GCAAGTTCCTCAGCTTGTTT-3'。反应体系为50 μl,包括水37 μl,buffer 5 μl,dNTP 1.5 μl,引物1、2各0.5 μl,Taq DNA聚合酶0.5 μl,5 μl DNA模板。PCR反应条件为95℃预变性5 min,95℃变性20 s,50℃退火45 s,72℃延伸90 s;30个循环后72℃延伸5 min,最终4℃保持。PCR产物纯化及测序委托上海英潍捷基(invitrogen)生物技术有限公司完成。测序结果通过与美国CDC数据库(<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>)比对,实现GAS的 emm 分型。

3. 统计学分析:用EpiData 3.1软件建立数据库,进行数据的双录入和检错。SPSS 16.0软件进行统计学分析。研究对象构成比和超抗原基因携带率采用百分数表示,组间超抗原分布情况比较采用 χ^2 检验和Fisher's确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 菌株相关信息:635株GAS中410株分离自城区医院,225株分离自郊区(县)医院;病例年龄2~16($M=6$)岁,其中369例为<7岁学龄前儿童,266例为学龄儿童;男性394例,女性241例。460株分离自猩红热病例,174株分离自咽部感染病例,1株诊断信息缺失。490株GAS为 $emm12$ 型,110株为 $emm1$ 型,8株为其他 emm 分型($emm4$ 型、22型、89型菌各1株, $emm11$ 型菌2株, $emm75$ 型菌3株)。

2. GAS超抗原基因携带情况:635株GAS中,13种超抗原基因的检出率由高至低分别为 $speB$ (100.0%)、 $speF$ (99.7%)、 $smeZ$ (99.7%)、 $speG$ (99.7%)、 $speC$ (99.4%)、 ssa (98.0%)、 $speH$ (76.4%)、 $speI$ (76.2%)、 $speA$ (22.4%)、 $speJ$ (21.7%)、 $speM$ (2.2%)、

speL(1.1%)、speK(0.6%)。共检测到 26 种超抗原基因谱,分别命名为 profile 1~26。其中主要的 5 种基因谱分别编号为 profile 1~5(表 1)。携带 profile 1 和 profile 2 的菌株占全部菌株的 81.7%,前者携带超抗原 speB、speC、speF、speG、speH、speI、smeZ 和 ssa,后者携带 speA、speB、speC、speF、speG、speJ、smeZ 和 ssa。

3. 不同 emm 分型 GAS 超抗原携带情况: emm1 型 GAS 对 speA 和 speJ 基因的携带率分别为 94.5% 和 91.8%,高于 emm12 型菌株 ($\chi^2=404.93, P=0.000; \chi^2=374.92, P=0.000$)。 emm12 型菌株对 speH、speI 的携带率高于 emm1 型菌株 ($\chi^2=382.62, P=0.000; \chi^2=388.69, P=0.000$)。其他超抗原基因的携带率在不同 emm 分型菌株间差异无统计学意义(表 2)。

4. 不同临床特征(咽部感染、猩红热)病例 GAS 超抗原携带情况:致咽部感染菌株中超抗原 speK 和 speL 的检出率分别为 2.3% 和 2.9%,高于致猩红热菌株 ($P<0.05$);而对 ssa 的携带率为 94.8%,低于致猩红热菌株 ($\chi^2=9.59, P<0.05$)。其他超抗原基因的携带率在不同临床特征 GAS 间分布的差异均无统

计学意义(表 3)。

讨 论

本研究的 GAS 对超抗原基因 speB、speF、speC、speH、speI 和 ssa 携带率较高,而对 speA、speK、speL、speM 和 speJ 携带率较低。有研究认为,超抗原 speG 和 smeZ 由细菌染色体基因编码,检出率较高^[3,4]。本研究两者检出率均为 99.7%,与 Ma 等^[5]研究相似,但高于国外部分研究^[2,6,7]。Proft 等^[8]认为,超抗原 speJ 亦是由染色体编码。但本研究中菌株 speJ 携带率仅为 21.7%,明显低于超抗原 speG 和 smeZ,且低于既往部分研究^[9,10]。实验室技术和 PCR 引物可能是导致超抗原基因检出率存在差异的原因。但也有研究认为引物的差异不能解释 speJ 检出率的差异^[6]。

不同 emm 分型的 GAS 其携带的超抗原基因种类亦存在差异^[11]。本研究中 emm1 型 GAS 主要携带 profile 2,而 emm12 型菌株主要携带 profile 1。由链球菌致热外毒素(streptococcal pyrogenic exotoxin)基因 speA 与 speC 编码的致热外毒素是引起猩红热患者充血性斑疹、杨梅舌、脱皮或脱屑的原因。既往

表 1 GAS 超抗原基因

基因谱	超 抗 原 基 因													猩红热株	咽部感染株	emm1	emm12	菌株总数	构成比 (%)
	speA	speB	speC	speF	speG	speH	speI	speJ	speK	speL	speM	smeZ	ssa						
profile 1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	310	110	2	408	421	66.3
profile 2	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	76	22	92	3	98	15.4
profile 3	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	20	10	1	24	30	4.7
profile 4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	18	12	6	2	18	2.8
profile 5	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	9	4	1	11	13	2.0
profile 6~26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55	8.7
合计	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	635	100.0

注:菌株 emm 分型和临床诊断数据有缺失

表 2 emm1 型和 emm12 型 GAS 超抗原基因携带情况比较

超抗原基因	emm 分型		χ^2 值	P 值
	emm1 (n=110)	emm12 (n=490)		
speA	104(94.5)	30(6.1)	404.93	0.000
speB	110(100.0)	490(100.0)	-	-
speC	108(98.2)	489(99.8)	-	0.088
speF	110(100.0)	489(99.8)	-	1.000
speG	110(100.0)	490(100.0)	-	-
speH	9(8.2)	459(93.7)	382.62	0.000
speI	8(7.3)	459(93.7)	388.69	0.000
speJ	101(91.8)	33(6.7)	374.92	0.000
speK	0(0.0)	0(0.0)	-	-
speL	0(0.0)	3(0.6)	-	1.000
speM	0(0.0)	10(2.0)	1.21	0.272
smeZ	109(99.1)	490(100.0)	-	0.183
ssa	108(98.2)	489(99.8)	-	0.088

注:菌株 emm 分型数据有缺失

表 3 不同临床特征病例的 GAS 超抗原基因携带情况比较

超抗原基因	猩红热 (n=460)	咽部感染 (n=174)	χ^2 值	P 值
speA	103(22.4)	39(22.4)	0.00	0.995
speB	460(100.0)	174(100.0)	-	-
speC	457(99.3)	173(99.4)	-	1.000
speF	459(99.8)	173(99.4)	-	0.474
speG	458(99.6)	174(100.0)	-	1.000
speH	351(76.3)	133(76.4)	0.00	0.972
speI	352(76.5)	131(75.3)	0.11	0.745
speJ	103(22.4)	35(20.1)	0.38	0.535
speK	0(0.0)	4(2.3)	-	0.006
speL	2(0.4)	5(2.9)	4.82	0.028
speM	9(2.0)	5(2.9)	0.16	0.690
smeZ	458(99.6)	174(100.0)	-	1.000
ssa	456(99.1)	165(94.8)	9.59	0.002

注:括号外数据为携带超抗原菌株数,括号内数据为携带率(%);-为未进行 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法

研究多认为,超抗原 *speC* 在 *emm1* 型 GAS 中携带率较低,而 *emm12* 型其携带率较高^[12]。本研究 *emm1* 型菌株 *speC* 基因的携带率为 98.2%,呈增高趋势^[12]。同时,*speC* 基因在 *emm12* 型 GAS 中的检出率为 99.8%,两种型别间 *speC* 分布差异无统计学意义($\chi^2=4.70, P=0.088$)。本研究 *emm1* 型菌株 *speA* 携带率为 94.5%,高于 *emm12* 型菌株携带率 6.1% ($\chi^2=404.92, P=0.000$),与既往研究结果一致^[13]。我国多项研究显示 GAS 对 *speA* 基因携带率呈现降低趋势^[5,12,14]。携带率从 20 世纪 90 年代的 68.4% 降低至 34.1%^[5,14]。本研究 *speA* 基因的携带率为 22.3%,低于上述研究结果。分析我国 *emm1* 型菌株流行强度降低可能是 *speA* 基因检出率下降的原因。研究显示,*emm12* 型 GAS 对 *speH* 与 *speI* 的携带率均为高于 *emm1* 型菌株;但 *speJ* 基因携带率为 6.7%,低于 *emm1* 型菌株。且 GAS 携带 *speI* 与 *speH* 基因有高度的一致性,携带 *speI* 的 484 株 GAS 中,99.4% 的菌株同时携带 *speH*。有研究认为,*speH* 和 *speI* 基因位于同一噬菌体上^[4],但也有研究发现菌株携带 *speH* 和 *speI* 基因没有一致性^[5]。

目前,超抗原与 GAS 感染临床症状间是否存在关系仍有争议。本研究未发现 *speA* 和 *speC* 基因在致猩红热和咽部感染菌株间的分布存在差异,区别于既往研究结果^[13]。超抗原 *speK*、*speL* 和 *speM* 与急性风湿热有密切联系^[15]。本研究发现,以上 3 种超抗原的携带率低于欧美等国报道^[6,16],且与菌株 *emm* 分型密切相关。3 株 *emm75* 型 GAS 均同时携带 *speK*、*speL* 和 *speM* 基因,*emm1* 型菌株均不携带以上 3 种超抗原基因。致猩红热菌株 *ssa* 基因携带率高于致咽部感染菌株 ($P<0.05$)。既往研究显示,菌株携带 *ssa* 基因提示病原体引起的感染为非侵袭性的^[7]。我国菌株 *ssa* 基因携带率呈增高趋势^[5,12,14],推测我国 GAS 引起侵袭性感染发病率较低可能与此有关。

综上所述,在 2011 年北京市儿童猩红热高强度流行背景下,GAS 流行株超抗原基因 *speB*、*speF*、*smeZ*、*speG*、*speC* 和 *ssa* 的携带率较高,*speM*、*speL* 和 *speK* 的携带率较低。超抗原基因 *speA* 的携带率有下降趋势,同时 *emm1* 型菌株对超抗原基因 *speC* 的携带率明显增高,且菌株 *emm* 分型与超抗原基因谱存在密切联系。未发现 *speA* 和 *speC* 基因携带水平在不同临床诊断间的分布存在差异。为进一步了解北京市儿童来源 GAS 的病原学特点,有必要继续对其监测,以了解其变化的趋势。

参 考 文 献

- [1] Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(3):470-511.
- [2] Schmitz FJ, Beyer A, Charpentier E, et al. Toxin-gene profile heterogeneity among endemic invasive European group A streptococcal isolates [J]. J Infect Dis, 2003, 188(10):1578-1586.
- [3] Proft T, Sriskandan S, Yang L, et al. Superantigens and streptococcal toxic shock syndrome [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(10):1211-1218.
- [4] Ferretti JJ, Mcshan WM, Ajdic D, et al. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(8):4658-4663.
- [5] Ma Y, Yang Y, Huang M, et al. Characterization of *emm* types and superantigens of *Streptococcus pyogenes* isolates from children during two sampling periods [J]. Epidemiol Infect, 2009, 137(10):1414-1419.
- [6] Commons R, Rogers S, Gooding T, et al. Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with *emm* types [J]. J Med Microbiol, 2008, 57(Pt 10):1238-1246.
- [7] Darenberg J, Luca-Harari B, Jasir A, et al. Molecular and clinical characteristics of invasive group A streptococcal infection in Sweden [J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(4):450-458.
- [8] Proft T, Webb PD, Handley V, et al. Two novel superantigens found in both group A and group C *Streptococcus* [J]. Infect Immun, 2003, 71(3):1361-1369.
- [9] Rantala S, Vahakuopus S, Siljander T, et al. *Streptococcus pyogenes* bacteraemia, *emm* types and superantigen profiles [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(5):859-865.
- [10] Michaelsen TE, Andreasson IK, Langerud BK, et al. Similar superantigen gene profiles and superantigen activity in norwegian isolates of invasive and non-invasive group A streptococci [J]. Scand J Immunol, 2011, 74(5):423-429.
- [11] Creti R, Gherardi G, Imperi M, et al. Association of group A streptococcal *emm* types with virulence traits and macrolide-resistance genes is independent of the source of isolation [J]. J Med Microbiol, 2005, 54(Pt 10):913-917.
- [12] Jing HB, Ning BA, Hao HJ, et al. Epidemiological analysis of group A streptococci recovered from patients in China [J]. J Med Microbiol, 2006, 55(Pt 8):1101-1107.
- [13] Liang YM, Chang HS, Shen XZ, et al. *emm* typing of *Streptococcus pyogenes* isolated from children with adenopharyngitis [J]. J Clin Pediatr, 2011, 29(4):382-385. (in Chinese)
梁云梅,常贺生,沈叙庄,等.致儿童咽扁桃体炎酿脓链球菌 *emm* 分型 [J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(4):382-385.
- [14] Chang H, Shen X, Huang G, et al. Molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from Chinese children with pharyngitis [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 69(2):117-122.
- [15] Proft T, Moffatt SL, Weller KD, et al. The streptococcal superantigen SMEZ exhibits wide allelic variation, mosaic structure, and significant antigenic variation [J]. J Exp Med, 2000, 191(10):1765-1776.
- [16] Smoot LM, McCormick JK, Smoot JC, et al. Characterization of two novel pyrogenic toxin superantigens made by an acute rheumatic fever clone of *Streptococcus pyogenes* associated with multiple disease outbreaks [J]. Infect Immun, 2002, 70(12):7095-7104.

(收稿日期:2013-10-08)

(本文编辑:张林东)