

山东省2013年致猩红热及无症状携带者A群链球菌分子分型研究

刘贞艳 房明 胡彬 毕振旺 寇增强 任艳艳 陈保立 毕振强

【摘要】目的 描述2013年山东省致猩红热及无症状携带者A群链球菌(GAS)分子分型特征,探讨各分型方法与 emm 型别的关联。**方法** 自猩红热、无症状携带者咽拭分离获得GAS 72株,利用 emm 、多位点序列分型(MLST)、超抗原(SAg)基因($speA$ 、 $speC$ 、 $speG$ 、 $speH$ 、 $speI$ 、 $speJ$ 、 $smeZ$ 、 ssa 、 $speK$ 、 $speM$ 、 $speL$)检测和脉冲场凝胶电泳(PFGE)对其进行分型检测。**结果** 72株GAS中,以 $emm1$ 型(41.67%)和 $emm12$ 型(56.94%)为主;共检出两种ST型别,其中ST28型31株(43.06%),ST36型41株(56.94%);ST28型与 $emm1$ 相关($P<0.05$),而ST36型与 $emm12$ 相关($P<0.05$); $speA$ 、 $speC$ 、 $speG$ 、 $speH$ 、 $speI$ 、 $speJ$ 、 $smeZ$ 、 ssa 的检出率分别为38.89%、95.83%、97.22%、38.89%、54.17%、41.67%、100.00%、100.00%, $speK$ 、 $speM$ 、 $speL$ 未检出; $emm1$ 型菌株倾向于含有 $speA$ 、 $speJ$,不含有 $speH$ 、 $speI$ ($P<0.05$); $emm12$ 恰好相反,倾向于含有 $speH$ 、 $speI$,不含有 $speA$ 、 $speJ$ ($P<0.05$);PFGE共检出20种型别。**结论** 2013年山东省致猩红热和无症状携带者中GAS型别分布较为单一, emm 型别以 $emm1$ 和 $emm12$ 为主;ST型别主要为ST28和ST36,超抗原基因携带以 $speC$ 、 $speG$ 、 $smeZ$ 、 ssa 为主。各分型方法间存在一定关联。

【关键词】 猩红热;链球菌,酿脓;分子分型

Molecular types of group A *Streptococcus* isolated from scarlet fever patients and asymptomatic carriers in Shandong province, 2013

Liu Zhenyan¹, Fang Ming², Hu Bin², Bi Zhenwang², Kou Zengqiang², Ren Yanyan², Chen Baoli², Bi Zhenqiang^{1, 2}. 1 Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Shandong University, Jinan 250012, China; 2 Shandong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shandong Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Institute of Preventive Medicine, Shandong University

Corresponding author: Bi Zhenqiang, Email: bzq63@163.com

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Key Projects of China (No. 2012ZX10004215).

【Abstract】 Objective To describe the molecular characteristics of group A *Streptococcus* (GAS) isolated from patients and asymptomatic carriers of scarlet fever in Shandong province, 2013, and to explore the relationships between emm types and other molecular types. **Methods** 72 strains of GAS were isolated from throat swabs of children with scarlet fever or asymptomatic carriers of GAS. All the strains were typed by emm typing, multilocus sequence typing (MLST), super-antigen (SAg) genes detections and pulsed-field gel electrophoreses (PFGE). **Results** Among the 72 strains, $emm1$ (41.67%) and $emm12$ (56.94%) were the most common emm types. Two ST types were found, including ST28 (43.06%) and ST36 (56.94%). Additionally, $emm1$ was also found correlated to ST28, while $emm12$ was associated with ST36. Eight super-antigen genes were detected, including $smeZ$ (100.00%), ssa (100.00%), $speG$ (97.22%), $speC$ (95.83%), $speL$ (54.17%), $speJ$ (41.67%), $speA$ (38.89%) and $speH$ (38.89%), while $speK$, $speM$, $speL$ were not found (0%). Both $speA$ and $speJ$ genes were detected primarily in $emm1$ strains (all $P<0.05$), while $speH$ and $speI$ genes were not detected in $emm1$ strains (all $P<0.05$). And $emm12$ strains were inclined to harbor $speH$ and $speI$ (all $P<0.05$) but not $speA$ or $speJ$ (all $P<0.05$). Twenty different genotypes were identified by PFGE. **Conclusion** All the emm types of GAS isolated from scarlet fever patients and asymptomatic carriers in Shandong

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.12.013

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10004215)

作者单位: 250012 济南, 山东大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(刘贞艳、毕振强); 山东省疾病预防控制中心 山东省传染病预防控制重点实验室 山东大学预防医学研究院(房明、胡彬、毕振旺、寇增强、任艳艳、陈保立、毕振强)

通信作者: 毕振强, Email: bzq63@163.com

province 2013 were mainly *emm1* and *emm12* and carrying *speC*, *speG* and *smeZ*, *ssa*. ST types mainly existed in ST28 and ST36. In addition, there were correlations between *emm* types and super-antigen genes, ST types, PFGE types.

【Key words】 Scarlet fever; *Streptococcus pyogenes*; Molecular types

A群链球菌(GAS)是一种常见的革兰阳性菌,人类是其唯一自然宿主,人体可正常携带GAS而不致病。GAS感染人体可引起咽峡炎、猩红热、肾小球肾炎等多种疾病。其中猩红热多见于儿童为我国最常见的GAS疾病。目前描述GAS分子分型常采用的方法为*emm*(encoding mature M protein gene)分型、脉冲场凝胶电泳(PFGE)、多位点序列分型(MLST)和超抗原(SAg)基因检测等。本研究利用该4种分型方法对2013年山东省致猩红热及无症状携带者的GAS进行分子分型。

材料与方法

1. 实验菌株:源自2013年1—12月山东省济南、青岛、淄博、潍坊市猩红热和无症状携带者的咽拭子样本。

2. 分离与鉴定:咽拭子标本接种于5%羊血培养基,置37℃含50 ml/L的CO₂培养箱中培养24 h。采用杆菌肽试验(OXOID公司)和链球菌分組诊断试剂(OXOID公司)鉴定可疑菌落。

3. 分型方法:

(1) *emm*:按照美国疾病预防控制中心网站(CDC: <http://www.cdc.gov/streplab/protocol-emm-type.html>)的方法进行菌株DNA提取及PCR扩增,委托华大基因研究中心测序,其结果上传至<http://www.cdc.gov/streplab/strepblast.html>进行序列比对,确定*emm*型别。

(2) MLST:根据MLST网站(<http://spyogenes.mlst.net/>)的方法,对GAS的管家基因(*gki*、*gtr*、*muri*、*mutS*、*recP*、*xpt*、*yiql*)进行PCR扩增,委托华大基因研究中心测序。利用BioNumeric 6.6软件对序列拼接及上传MLST数据库进行比对,确定ST型别。

(3) SAg基因:对*speA*、*speC*、*speG*、*speH*、*speI*、*speJ*、*speK*、*speL*、*speM*、*smeZ*、*ssa*共11种SAg基因进行PCR扩增^[1],*speB*作为阳性对照,毛细管电泳(QIAGEN公司)检测GAS中SAg基因的携带情况。

(4) PFGE:GAS染色体DNA以*sma* I (TaKaRa公司)酶切,H9812以*Xba* I (TaKaRa公司)酶切,根据Tenover等^[2]推荐的标准利用BioNumerics 6.6软件分析PFGE凝胶图谱。

4. 统计学分析:利用SPSS 19.0软件分析数据,

定性资料分析采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 样本概况:440份样本共检出72株GAS(表1)。

表1 2013年山东省4个监测点GAS菌株采样及检出情况

地区	猩红热病例		无症状携带者	
	采样份数	检出株数	采样份数	检出株数
济南	62	34	-	-
青岛	70	27	10	1
淄博	55	5	-	-
潍坊	-	-	243	5
合计	187	66	253	6
检出率(%)	35.39		2.37	

2. *emm*型别:72株GAS中,*emm1*型30株(41.67%),*emm12*型41株(56.94%),*emm227.1*型1株(1.39%),其亚型分布见表2。*emm1*和*emm12*型在性别、年龄(<5岁和6~10岁)及地区(济南、青岛)分布上,差异无统计学意义($P > 0.05$)。6名无症状GAS携带者的*emm*型别均为*emm12*,其中5株为*emm12.0*,1株为*emm12.19*(表2)。

表2 2013年山东省72株GAS的*emm*型别分布

型	亚型	株数	构成比(%)
<i>emm1</i> (n=30)	<i>emm1.0</i>	25	34.72
	<i>emm1.16</i>	1	1.39
	<i>emm1.24</i>	1	1.39
	<i>emm1.58</i>	1	1.39
	<i>emm1.70</i>	1	1.39
	<i>emm1.29</i>	1	1.39
<i>emm12</i> (n=41)	<i>emm12.0</i>	33	45.83
	<i>emm12.1</i>	1	1.39
	<i>emm12.19</i>	4	5.55
	<i>emm12.57</i>	2	2.78
	<i>emm12.69</i>	1	1.39
<i>emm227</i> (n=1)	<i>emm227.1</i>	1	1.39

3. 型别关联分析:

(1) ST与*emm*:共检出ST28型(31株,43.06%)和ST36型(41株,56.94%)两种ST型别。对*emm*与ST型别进行关联性分析,*emm1*与ST28型相关($P < 0.05$),而*emm12*与ST36型相关($P < 0.05$)。

(2) SAg与*emm*:*speA*、*speC*、*speG*、*speH*、*speI*、*speJ*、*smeZ*、*ssa*的检出率分别为38.89%、95.83%、97.22%、

38.89%、54.17%、41.67%、100.00%、100.00%，未检出 *speK*、*speL*、*speM*。72 株 GAS 可分为 13 种 SAg 基因谱，命名为 profile1 ~ profile13 (表 3)。其中 profile1 型和 profile2 型为主要 SAg 基因谱型，分别为 26 株 (36.11%) 和 21 株 (29.17%)。对 *emm1*、*emm12* 与 *speA*、*speH*、*speI*、*speJ* 进行关联性分析，发现 *emm1* 菌株倾向于含有 *speA*、*speJ*，不含 *speH*、*speI* ($P < 0.05$)；*emm12* 恰好相反，倾向于含有 *speH*、*speI*，不含 *speA*、*speJ* ($P < 0.05$)。

(3) PFGE 与 *emm*：对 72 株 GAS 的聚类结果做树形图分析 (图 1)，共得到 A ~ T 20 种凝胶图谱。B、C、D、L 包括 47 株 GAS (65.28%)，为主要的 PFGE 型别。其中 L 包括 22 株 GAS (30.56%)，为山东省 GAS 菌株 PFGE 的优势型别，涉及地区包括济南、青岛、潍坊。结果按 70% 相似性区分，主要分为甲、乙两组 (图 1)。甲组对应的 *emm* 型别除 1 株为 *emm227*，其余均为 *emm1*；乙组对应的 *emm* 型别均为 *emm12*。提示 GAS 的 PFGE 与 *emm* 之间可能存在一定的关联。

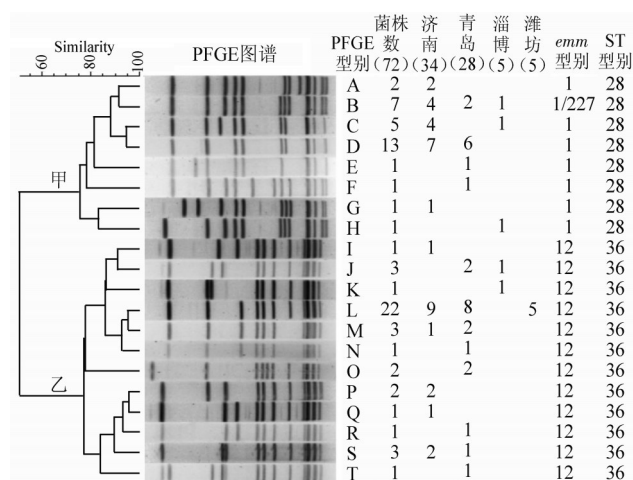


图 1 2013 年山东省 72 株 GAS 的 PFGE 聚类分析

讨 论

目前 (截至 2014-05-08) *emm* 数据库中已发现并命名有 245 种 *emm* 型别，1 200 多种亚型^[3]。一项世界范围内 GAS 的 *emm* 分型的 Meta 分析显示，全球 GAS 主要 *emm* 型别为 *emm1* 和 *emm12*^[4]。但可能由于地理环境、生活习惯、宿主免疫水平等原因，其又表现出一定的地域差异。如印度的 *emm* 型别主要为 *emm11*^[5]；新西兰主要为 *emm1*、*emm89*、*emm12*^[6]；我国北京地区主要型别为 *emm12* 和 *emm1*^[7]。本研究表明，2013 年山东省致猩红热及无症状携带者的 GAS 优势型别也为 *emm1* 和 *emm12*，符合全球及我国的 *emm* 型别分布特点。但同时 *emm* 型别分布较为单一，仅检出 3 种 *emm* 型别 (*emm1*、*emm12* 和 *emm227*)、12 种亚型。其中致猩红热 GAS 中 *emm1* (37.88%) 和 *emm12* (42.42%) 占绝对比例，提示目前致猩红热的 GAS 防制重点应为 *emm12* 和 *emm1*。而 6 株无症状携带者 GAS 的 *emm* 型别均为 *emm12*，由于菌株量少，难以确定无症状携带者中 *emm* 型别分布。

贵州地区一项有关致急性肾小球肾炎 GAS 的 ST 型别为 ST53 和 ST426^[8]，而一项北京和重庆两地的研究则发现 5 种型别 (ST36、46、150、37、38)^[9]。本研究仅发现 2 种 ST 型别 (ST28 和 ST36)，少于国内外其他地区报道。北京和重庆两地研究中，*emm12* 对应的 ST 型别为 ST36^[9]，日本的研究中 92.56% 的 *emm1* 表现为 ST28，97.70% 的 *emm12* 表现为 ST36^[10]，同本研究一致，提示 *emm* 型别与 ST 型别间存在一定的联系。另外，有文献认为在咽部感染的 GAS 中，*emm* 型别与 ST 型别关联性较强，而在皮肤感染的 GAS 中，其关联性较弱^[11]。

表 3 2013 年山东省 72 株 GAS 的 SAg 基因谱分布

谱型	<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>	数量
profile1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	26
profile2	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	21
profile3	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	8
profile4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	5
profile5	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	3
profile6	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	2
profile7	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	1
profile8	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	1
profile9	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	1
profile10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	1
profile11	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	1
profile12	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	1
profile13	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	1

SAg基因的阳性率普遍较高,但 $speK$ 、 $speL$ 、 $speM$ 未有检出,这与2011年我国北京地区的研究结果基本一致,其中 $speA$ 、 $speH$ 、 $speI$ 、 $speJ$ 略有差别^[12]。本研究未检测 $speF$,而在欧洲诸国, $speF$ 的检出率均高达100%^[13-17];在印度 $speF$ 检出率明显较低(59.70%)^[18];我国广东地区 $speF$ 检出率为100%^[19]。另外,本研究 $emm1$ 型菌株大多含有 $speA$ 、 $speJ$,不含 $speH$ 、 $speI$ 。 $emm12$ 恰好相反,倾向于含有 $speH$ 、 $speI$,不含 $speA$ 、 $speJ$ 。这与以往文献报道相一致^[1]。有研究显示 $emm1$ 和 $emm12$ 通常不含有 $speK$ 、 $speL$ 、 $speM$ ^[11],与本文一致。然而,也有文献认为 $emm1$ 和 $emm12$ 中通常不含有 ssa ^[1],与本文相悖。

PFGE作为病原菌分型的“金标准”,在流行病学溯源和传染病监测中有很好作用。本研究中,各地区(除潍坊)均存在多种凝胶图谱,提示猩红热以散发为主;其中以D和L型最为普遍(48.61%),建议在GAS动态监测中注意该PFGE型别的变化。

综上所述,2013年山东省致猩红热和无症状携带者的GAS在分子型别分布上较为单一, emm 型别以 $emm1$ 和 $emm12$ 为主,ST型别仅有ST28和ST36,SAg基因携带率普遍较高(除 $speK$ 、 $speL$ 、 $speM$)。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 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]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [3] ftp://ftp.cdc.gov/pub/infectious_diseases/biotech/tsemm/.
- [4] Steer AC, Law I, Matatolu L, et al. Global *emm* type distribution of group A *Streptococci*: systematic review and implications for vaccine development[J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(10): 611-616.
- [5] Mathur P, Bhardwaj N, Mathur K, et al. Clinical and molecular epidemiology of beta-hemolytic streptococcal infections in India [J]. J Infect Dev Ctries, 2014, 8(3): 297-303.
- [6] Williamson DA, Moreland NJ, Carter P, et al. Molecular epidemiology of group A *Streptococcus* from pharyngeal isolates in Auckland, New Zealand, 2013[J]. NZ Med J, 2014, 127(1388): 55-60.
- [7] Li J, Liu S, Peng XM, et al. Study on types of M protein gene in group A *Streptococcus* isolated from children in Beijing, 2011 [J]. Chin J Prev Med, 2012, 46(12): 1107-1111. (in Chinese)
李静,刘爽,彭晓旻,等. 2011年北京市儿童携带A组链球菌的M蛋白基因分型研究[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(12): 1107-1111.
- [8] Zheng MH, Jiao ZQ, Zhang LJ, et al. Genetic analysis of group A *Streptococcus* isolates recovered during acute glomerulonephritis outbreaks in Guizhou province of China [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 715-720.
- [9] Chang H, Shen X, Fu Z, et al. Antibiotic resistance and molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* isolated from healthy schoolchildren in China [J]. Scand J Infect Dis, 2010, 42(2): 84-89.
- [10] Wajima T, Chiba N, Morozumi M, et al. Prevalence of macrolide resistance among group A *Streptococci* isolated from pharyngotonsillitis [J]. Microb Drug Resist, 2014, 20(5): 431-435.
- [11] Bessen DE, McGregor KF, Whatmore AM. Relationships between *emm* and multilocus sequence types within a global collection of *Streptococcus pyogenes* [J]. BMC Microbiol, 2008, 8(59): 1471-2180.
- [12] Yang P, Peng X, Zhang D, et al. Group A *Streptococcus* strains circulating during scarlet fever epidemic, Beijing, China, 2011 [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(6): 909-915.
- [13] Luca-Harari B, Straut M, Cretoiu S, et al. Molecular characterization of invasive and non-invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Romania [J]. J Med Microbiol, 2008, 57(Pt 11): 1354-1363.
- [14] Szczypa K, Sadowy E, Izdebski R, et al. Group A *Streptococci* from invasive-disease episodes in Poland are remarkably divergent at the molecular level [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(11): 3975-3979.
- [15] 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 [J]. J Med Microbiol, 2006, 55(Pt 8): 1115-1123.
- [16] Bianco S, Alice T, Zucca M, et al. Survey of phenotypic and genetic features of *Streptococcus pyogenes* strains isolated in Northwest Italy [J]. Curr Microbiol, 2006, 52(1): 33-39.
- [17] Descheemaeker P, van Loock F, Hauchecorne M, et al. Molecular characterisation of group A *Streptococci* from invasive and non-invasive disease episodes in Belgium during 1993-1994 [J]. J Med Microbiol, 2000, 49(5): 467-471.
- [18] Balaji K, Thenmozhi R, Prajna L, et al. Comparative analysis of *emm* types, superantigen gene profiles and antibiotic resistance genes among *Streptococcus pyogenes* isolates from ocular infections, pharyngitis and asymptomatic children in south India [J]. Infect Genet Evol, 2013, 19: 105-112.
- [19] Ke BX, Li BS, Tan HL, et al. Etiological characteristics of *Streptococcus pyogenes* isolated from children with Scarlet fever in Guangdong province, China [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2013, 33(5): 360-363. (in Chinese)
柯碧霞,李柏生,谭海玲,等. 广东省猩红热患儿酿脓链球菌病原学特征分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 33(5): 360-363.

(收稿日期:2014-07-28)

(本文编辑:张林东)