

# 2011 年北京市朝阳区儿童 A 组溶血性链球菌的 *emm* 基因分型及耐药性分析

王海滨, 温雯, 王恒伟, 李崇, 韩庆华, 张玉松, 赵剑虹, 郝民, 王晨, 宋衍燕, 张晓曦, 罗凤基

**摘要:** **目的** 了解 2011 年北京市朝阳区儿童感染 A 组溶血性链球菌 (GAS) 的 *emm* 基因分型及对红霉素和克林霉素的耐药情况及耐药基因谱的特点。**方法** 从猩红热或咽峡炎及扁桃体炎儿童患者的咽拭子培养分离获得 71 株 GAS, 应用 PCR 扩增 *emm* 基因及红霉素耐药基因 *mefA*、*ermA*、*ermB* 和转座子基因 *Tn916*; 采用 E-test 法进行药敏试验并分析耐药情况。**结果** 北京市朝阳区儿童感染 GAS 的 *emm12.0* 基因型占 87.4%, 其次为 *emm1.0* 型 (9.8%)、*emm22.0* 型 (1.4%)、*emm75.0* 型 (1.4%); GAS 对红霉素和克林霉素的耐药率为 100% 和 95.8%, 两种药物的交叉耐药率为 95.8%; 耐药基因 *ermA*、*ermB*、*mefA* 和转座子基因 *Tn916* 的携带率分别为 5.6%、90.1%、4.2% 和 90.1%。**结论** 北京市朝阳区 2011 年儿童感染 GAS 的主要流行株为 *emm12.0* 型, 对红霉素普遍具有较高的耐药率且与克林霉素之间存在显著的交叉耐药; *ermB* 基因是决定本地区 2011 年儿童感染 GAS 对红霉素耐药的重要基因; 而 *Tn916* 转座子基因在 GAS 菌株间耐药基因扩散中起重要作用。

**关键词:** 链球菌; *emm* 分型; 红霉素; 耐药基因; *Tn916*

中图分类号: R378.1+2

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2012)06-0424-04

**Study on *emm* genotyping and drug-resistance of group A *Streptococcus pyogenes* isolated from children in Chaoyang, Beijing, 2011** WANG Hai-bin, WEN Wen, WANG Heng-wei, LI Chong, HAN Qing-hua, ZHANG Yu-song, ZHAO Jian-hong, HAO Min, WANG Chen, SONG Yan-yan, ZHANG Xiao-xi, LUO Feng-ji. Chaoyang District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China

**Corresponding author:** LUO Feng-ji, Email: luofengji@yahoo.com.cn

**Abstract:** **Objective** To understand the genotypes of *emm* gene and the drug-resistance of group A *Streptococcus pyogenes* (GAS) in Chaoyang district, Beijing. **Methods** Seventy one GAS strains were isolated from the throat swabs taken from hospitalized children. Polymerase chain reaction (PCR) was conducted to amplify and *emm* gene and the erythrocin resistance related genes: *mefA*, *ermA*, *ermB* and *Tn916* gene. The strains' drug susceptibilities to erythromycin and clindamycin were detected with E-test. **Results** The GAS strains with *emm12.0* gene accounted for the highest proportion (87.4%), followed by the strains with *emm1.0* gene (9.8%), the strains with *emm22.0* gene (1.4%) and strains with *emm75.0* gene (1.4%). All of the GAS strains were erythromycin resistant, 95.8% were clindamycin resistant and 95.8% were cross resistant to both antibiotics. The carriage rates of *ermA*, *ermB*, *mefA* and *Tn916* genes were 5.6%, 90.1%, 4.2% and 90.1% respectively. **Conclusion** The most common genotype of GAS strains isolated from the sick children in Chaoyang was *emm12.0*. The drug resistant rates to erythromycin and clindamycin were high. The *ermB* gene was the most important erythromycin resistance determinant, while the *Tn916* gene was the important determinant of the drug resistance spread in GAS.

**Key words:** *Streptococcus pyogenes*; *emm* genotyping; erythrocin; drug resistance gene; *Tn916*

A 组溶血性链球菌 (group A *Streptococcus*, GAS) 是引起儿童感染性疾病的重要致病菌, 冬春季是该菌感染的高发季节。 *emm* 基因编码 GAS 的 M 蛋白, 编码其 N 端的核苷酸序列有高度变异性, 但具

有型特异性。目前已经发现了超过 170 个 *emm* 基因型, *emm* 基因型与 GAS 的致病性及 GAS 多价疫苗构建密切相关。临床治疗 GAS 感染首选青霉素类药物, 而红霉素是对青霉素过敏的 GAS 感染患者首选替代药物, 克林霉素亦为青霉素过敏患者的替代抗生素。近年来随着抗生素的滥用及乱用, 耐红霉素和克林霉素的 GAS 已成为临床治疗所面对的严重问题。研究证实 *ermA*、*ermB* 和 *mefA* 等耐药基因与 GAS 的大环内酯类耐药密切相关, 而结合型转座子 *Tn916* 与耐药基因转移和传播有关。北京市朝

作者单位: 北京市朝阳区疾病预防控制中心, 北京 朝阳 100021

作者简介: 王海滨, 男, 北京市人, 医师, 主要从事病原微生物工作;

温雯, 女, 北京市人, 医师, 主要从事流行病学工作

通信作者: 罗凤基, Tel: 010-67773666, Email: luofengji@yahoo.com.cn

王海滨、温雯同为第一作者

收稿日期: 2012-01-05

阳区 2011 年的猩红热报告病例是往年同期的数倍,本研究旨在了解 2011 年 5-7 月的猩红热流行期间,北京市朝阳区儿童感染 GAS 的主要 *emm* 基因型及耐药情况和耐药基因谱的特点,描述本地区 GAS 的分子流行病学特征,为本地区 GAS 感染疾病的经验用药及防治提供依据,为查找猩红热再次流行原因提供数据。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 样本来自 2011 年 5 月 12 日至 2011 年 7 月 11 日在北京市朝阳区内各哨点医院诊断为猩红热、咽峡炎及扁桃腺炎的儿童患者,共计采样 330 份咽拭子标本,分离到 GAS 菌株 71 株。

### 1.2 方法

1.2.1 细菌分离培养及鉴定 将咽拭子标本接种于哥伦比亚血平板(购自 BD 公司),置于 37 °C, 5%~10% 的 CO<sub>2</sub> 温箱培养 24~36 h;挑取有透明溶血环的圆形单菌落,进行纯培养。革兰染色为 G<sup>+</sup> 链球菌,氧化酶和触酶实验结果为阳性,Vitek32 全自动微生物系统生化分析仪最终鉴定为 GAS。

表 1 PCR 引物序列及反应条件  
Table 1 Primer sequences and conditions for PCR

引物名称	引物序列(5'~3')	片段大小 (bp)	反应条件
<i>emmF</i>	TAT TGG CTT AGA AAA TTA A	1000	94 °C 1 min, 1 个循环; 94 °C 15 s, 46.5 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 72 °C, 10 min。
<i>emmR</i>	GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT		
<i>emm-seq</i>	TAT TCG CTT AGA AAA TTA AAA ACA GA		
<i>ermAF</i>	AGG TTA TAA TGA AAC AGA AA	208	
<i>ermAR</i>	GCA TGA CAT AAA CCT TCA TC		
<i>ermBF</i>	GAA AAG GTA CTA AAC CAA ATA	617	94 °C 1 min, 1 个循环; 94 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 72 °C, 10 min。
<i>ermBR</i>	AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT T		
<i>mefAF</i>	ACT ATC ATT AAT CAC TAG TG		
<i>mefAR</i>	TTC TTC TGG TAC TAA AAG TG	347	
<i>Tn916F</i>	CAT CAC ACG CTA AAG AAT GG	452	
<i>Tn916R</i>	GGC TTC TTC AAC CAT AGG AA		

1.2.4 GAS 耐药基因 *ermA*、*ermB* 和 *mefA* 及转座子基因 *Tn916* 检测 引物合成参见表 1<sup>[1]</sup>。25 μl 反应体系配制: 2.5 μl 10 × buffer (Mg<sup>2+</sup> plus)、0.5 μl dNTP (10 mmol/L)、0.5 μl 上游引物、0.5 μl 下游引物、0.25 μl Taq (3U/μl) 和 21 μl 双蒸水。将 PCR 产物进行毛细管电泳,观察条带大小是否与预测阳性片段大小一致(表 1)。

1.2.5 GAS 的红霉素和克林霉素的药物敏感性试验(E-test 法) 红霉素和克林霉素的 E-test 试纸条为瑞典 AB BIODISK 公司产品。药物敏感试验按照 E-test 试验说明书操作。结果判断参考 CLSI 标准(M100-S21-CLSI)。质控菌株肺炎链球菌

1.2.2 GAS 基因组 DNA 提取 参照美国疾病预防控制中心(CDC)网站(www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol\_emm-type.htm)推荐方法进行:取一环 GAS 混悬于 300 μl 生理盐水,70 °C 水浴 15 min;离心后弃上清,加入 50 μl TE (pH 8.0)、10 μl 变溶菌素(3000 U/ml)、2 μl 玻璃质酸酶(30 mg/ml),混匀后 37 °C 水浴 30 min;100 °C 煮沸 10 min,离心取上清即为基因组 DNA。

1.2.3 GAS 的 *emm* 分型 *emm* 分型区检测引物(*emmF* 和 *emmR*)与 *emm* 分型区测序引物(*emm-seq*)的合成(表 1)及 PCR 反应体系的配置参照美国 CDC 网站推荐。100 μl 反应体系配制: 10 μl 10 × buffer (Mg<sup>2+</sup> plus)、2.0 μl dNTP (10 mmol/L)、2.0 μl *emmF*、2.0 μl *emmR*、0.5 μl Taq (3 U/μl) 和 82 μl 双蒸水。使用测序引物 *emm-seq* 将 PCR 产物进行正向单次测序,测序结果上传至 *emm* 分型数据库(<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>)进行比对。在一个 *emm* 基因序列中,如果前 180 个碱基中超过 95% 与参照基因一致,则认定为同一 *emm* 分型。

ATCC49619 购自美国 ATCC 公司。

## 2 结果

2.1 北京市朝阳区儿童感染 GAS 的 *emm* 分型情况 共检出 *emm12.0* 型 62 株(87.4%)、*emm1.0* 型 7 株(9.8%)、*emm22.0* 型 1 株(1.4%)、*emm75.0* 型 1 株(1.4%)。在 *emm12* 型菌株中检出 3 株 *emm12.19* 亚型和 1 株 *emm12.12* 亚型,见表 2。

2.2 北京市朝阳区儿童感染 GAS 的耐药基因 *ermA*、*ermB* 和 *mefA* 及转座子基因 *Tn916* 携带情况 *ermA* 的携带率为 5.6% (4/71), *ermB* 为 90.1% (64/71), *mefA* 为 4.2% (3/71), *Tn916* 为 90.1% (64/71)。本

研究中的 71 株 GAS 都携带了红霉素耐药基因,且每株 GAS 只携带一种耐药基因(表 2)。

### 2.3 北京市朝阳区儿童感染 GAS 的药物敏感性结果

71 株 GAS 中,对红霉素耐药的为 71 株,耐药率达 100% (71/71);对克林霉素耐药的为 68 株,耐药率为 95.8% (68/71);两者的交叉耐药率为 95.8% (表 2)。

表 2 71 株 GAS 的 *emm* 分型、药敏实验结果及耐药基因检测结果  
Table 2 Results of *emm* genotyping, drug susceptibility test and drug resistant gene detection of 71 strains of GAS

<i>emm</i> 型别	药敏实验		基因检测				<i>emm</i> 型别	药敏实验		基因检测			
	E	C	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>mefA</i>	<i>Tn916</i>		E	C	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>mefA</i>	<i>Tn916</i>
12.0	R	R	-	+	-	+	12.19	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	S	-	-	+	-	12.0	R	R	-	+	-	+
1.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
22.0	R	R	-	+	-	+	1.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.19	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	S	-	-	+	-	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	-	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	1.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	-	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
1.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
1.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	+	-	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	+	-	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	+	-	-	+
75.0	R	R	-	+	-	-	12.0	R	R	+	-	-	+
12.12	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	+	-	-	+
1.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.19	R	R	-	+	-	+	12.0	R	S	-	+	-	-
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	-	+	-
12.0	R	R	-	+	-	+	12.0	R	R	-	+	-	+
12.0	R	R	-	+	-	+							

注:(1) E:红霉素; C:克林霉素; R:耐药; S:敏感; 红霉素耐药率为 100% (71/71); 克林霉素耐药率为 95.8% (68/71); *ermA* 的携带率为 5.6% (4/71), *ermB* 携带率为 90.1% (64/71), *mefA* 携带率为 4.2% (3/71), *Tn916* 携带率为 90.1% (64/71)。

2.4 红霉素耐药基因与菌株耐药性的符合关系  
本研究中携带 *ermA*、*ermB* 和 *mefA* 基因的 GAS 都对红霉素耐药,符合度为 100%。此外,有 2 株携带 *mefA* 基因和 1 株携带 *ermB* 基因的菌株对克林霉素敏感,这 3 株 GAS 同为 *emm12.0* 型。

### 3 讨论

世界各个地区 GAS 的 *emm* 分型研究结果显示,不同的国家和地区具有不同的优势 *emm* 型分布,主要以 *emm12* 型、*emm1* 型和 *emm4* 型为主<sup>[2-8]</sup>。本研究中 GAS 的主要 *emm* 分型结果与国内的大多

数研究结果一致,以 *emm12* 型(87.4%)为优势基因型。GAS 的疫苗组分主要是 *emm* 基因编码 M 蛋白的 N 末端型特异区,所以针对同一时期不同地区或者同一地区不同时期的 GAS,了解其主要的流行 *emm* 型别有助于构建适合本地区的基因工程疫苗,并可以预测未来 *emm* 型别的变化趋势。

2009-2010 年文献报道的土耳其、塞尔维亚、希腊、美国犹他州和意大利等的红霉素耐药率分别为 6.8%、9.0%、12.1% ~ 12.8%、2.4% 和 22.6%<sup>[3,9-11]</sup>;北京儿童医院研究的 188 株 GAS 红霉素耐药率已高达 95%<sup>[12]</sup>。本研究中 GAS 针对红

霉素和克林霉素的耐药率分别为 100% 和 95.8%。以上结果显示,北京市朝阳区 2011 年儿童感染 GAS 对红霉素的耐药情况已经非常严重,且已显著高于欧美国家。所以针对本地区儿童感染 GAS 经验用药可酌情首选其他类型的抗生素并要严格控制抗生素滥用。

目前 GAS 对大环内酯类抗生素耐药主要有两种机制:①由 *ermA* 和 *ermB* 基因编码的甲基酶介导的核糖体靶位修饰,通常为高水平耐药;②由 *mefA* 基因编码蛋白介导的泵出机制,通常为低水平耐药。北京市朝阳区儿童感染 GAS 以 *ermB* 基因介导的高水平耐药为主,而欧美国家及韩国和日本的文献则报道以 *mefA* 基因介导的低水平耐药为主<sup>[2,8-10,13-15]</sup>。这种现象提示耐药基因谱有地区差异,这种差异的确切原因仍需要进一步验证。*Tn916* 是一种结合转座子,可携带 *ermB* 基因通过结合作用直接进入受体细胞并整合到受体细胞 DNA 上,介导了耐药基因的传播。本研究中的 GAS 的 *Tn916* 携带率为 90.1%,提示 *Tn916* 转座子在北京市朝阳区儿童感染 GAS 菌株之间耐药基因扩散中起主要作用。

本研究显示利用分子生物学检测 GAS 的 *ermA*、*ermB* 和 *mefA* 基因与传统的 E-test 法红霉素药敏试验的结果是完全一致的,提示可以利用分子生物学方法快速检测的特点在较短的时限内鉴定 GAS 的耐药性。但是本研究的样本量有限,还不能确切地反映出这两种方法的真实符合度。

综上所述,北京市朝阳区 2011 年儿童感染 GAS 对红霉素有较高的耐药率且为高水平耐药,并与克林霉素存在较严重的交叉耐药。本地区的各级医院应该对 GAS 的这种高耐药性引起高度重视,在针对 GAS 感染的治疗过程中严格规范抗生素使用制度,避免滥用乱用抗生素。

#### 参考文献

[1] Ye YZ, Zhu QR, Yu H, et al. Erythromycin resistant genes and conjugative transposon in *Streptococcus pyogenes* of children in Shanghai[M]. Shanghai: Fudan University, 2008. (in Chinese) 叶颖子,朱启镛,俞蕙,等.上海地区儿童化脓性链球菌的红霉素耐药基因研究及 *Tn916* 检测[M].上海:复旦大学,2008.

[2] Bahnan W, Hashwa F, Araj G, et al. Emm typing, antibiotic resistance and PFGE analysis of *Streptococcus pyogenes* in

Lebanon [J]. *J Med Microbiol*, 2011, 60 (Pt 1): 98 - 101.

[3] Dundar D, Sayan M, Tamer GS. Macrolide and tetracycline resistance and *emm* type distribution of *Streptococcus pyogenes* isolates recovered from Turkish patients [J]. *Microb Drug Resist*, 2010, 16 (4): 279 - 284.

[4] Cha S, Lee H, Lee K, et al. The emergence of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Seoul, Korea [J]. *J Infect Chemother*, 2001, 7 (2): 81 - 86.

[5] 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.

[6] Chen ZH, Gong SF, Dong TM, et al. Typing of 104 *Streptococcus pyogenes* isolates from China based on *emm* gene sequence [J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2004, 24 (6): 489 - 491. (in Chinese) 陈志红,龚守芳,董天明,等.应用 *emm* 基因序列分析对 104 株 A 群链球菌分型[J].中华微生物学和免疫学杂志,2004, 24 (6): 489 - 491.

[7] Liang YM, Chang HS, Shen XZ, et al. *Emm* typing of *Streptococcus pyogenes* isolated from children with adenopharyngitis [J]. *Journal of China Pediatrics*, 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.

[8] Ma YL, Yang YH, Yu SJ, et al. *Emm* types and superantigen analysis of *Streptococcus pyogenes* isolated from Chinese children [J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2009, 29 (11): 1166 - 1169. (in Chinese) 马耀玲,杨永弘,俞桑洁,等.中国儿童 A 族链球菌感染菌株 *emm* 分型及超抗原基因谱分布[J].基础医学与临床,2009, 29 (11): 1166 - 1169.

[9] Pavlovic L, Grego E, Sipetic-Grujicic S. Prevalence of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* collected in Serbia [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2010, 63 (4): 275 - 276.

[10] Rowe RA, Stephenson RM, East DL, et al. Mechanisms of resistance for *Streptococcus pyogenes* in northern Utah [J]. *Clin Lab Sci*, 2009, 22 (1): 39 - 44.

[11] Michos AG, Bakoula CG, Braoudaki M, et al. Macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*: prevalence, resistance determinants, and *emm* types [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009, 64 (3): 295 - 299.

[12] Liu X, Shen X, Chang H, et al. High macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* strains isolated from children with pharyngitis in China [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2009, 44 (5): 436 - 441.

[13] Bley C, van der LM, Reinert RR. *mef(A)* is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2011, 37 (5): 425 - 431.

[14] Kobayashi I, Hasegawa M, Kanayama A, et al. Alarming trend of clarithromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Japan (1998-2002) [J]. *J Infect Chemother*, 2005, 11 (2): 56 - 58.

[15] Kim S, Yong LN. Antibiotic resistance and genotypic characteristics of group A Streptococci associated with acute pharyngitis in Korea [J]. *Microb Drug Resist*, 2004, 10 (4): 300 - 305.