

不同 *emm* 基因型化脓性链球菌的菌落形态

欧阳霖^{1,2} 王小光^{1,2} 宋驰萍^{1,2} 陈明亮³ 张颖华^{1,2,Δ}

(¹上海市闵行区疾病预防控制中心微检科 上海 201101; ²复旦大学公共卫生学院闵行分院 上海 201101;

³上海市疾病预防控制中心微生物实验室 上海 200336)

【摘要】 为探究不同 *emm* 基因型的化脓性链球菌的特异性菌落形态,对2019年1—12月从猩红热儿科患者中分离的179株化脓性链球菌进行 *emm* 基因测序与分型,观察不同 *emm* 基因型的菌落形态。结果表明4种 *emm* 基因型(*emm*12, *emm*1, *emm*3 和 *emm*4)的菌落特点明显不同, *emm*12型及亚型菌落为光滑型或粗糙型,直径较小,约0.5 mm。 *emm*1型及亚型均为光滑型,明显区别于 *emm*12型的是肉眼可见的菌落大小差异, *emm*1型菌落较大,大小约为 *emm*12型的2倍。 *emm*3型菌落为所有基因型里最大的,直径3~4 mm,属于黏液型,明显不同于其他3种菌落特点。 *emm*4型大小约0.5 mm,表面光滑或粗糙,溶血不典型。化脓性链球菌的菌落形态有明显的 *emm* 基因型特异性,不同 *emm* 基因型菌株的菌落特点不同,同一基因型的各亚型菌落特征相同,不同菌落形态可以辅助早期辨别化脓性链球菌的 *emm* 基因型。

【关键词】 化脓性链球菌; 菌落形态; *emm* 基因型

【中图分类号】 Q934 **【文献标志码】** B **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2021.04.022

Distinctive colony morphology categorized by *emm* genotypes of *Streptococcus pyogenes*

OUYANG Lin^{1,2}, WANG Xiao-guang^{1,2}, SONG Chi-ping^{1,2}, CHEN Ming-liang³, ZHANG Ying-hua^{1,2,Δ}

(¹Department of Microbiology, Minhang District Centre for Disease Control and Prevention, Shanghai 201101, China; ²Minhang Branch, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 201101, China; ³Department of Microbiology, Shanghai Municipal Centre for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

【Abstract】 To categorize the specific colony morphology of *Streptococcus pyogenes* with different *emm* types, the colony characteristics of a total of 179 *S. pyogenes* strains isolated from children patients with scarlet fever from Jan 2019 to Dec 2019 were observed and described. And *emm* gene sequencing and typing were performed. The distinctive colony morphology was observed in 4 *emm* types (*emm*12, *emm*1, *emm*3 and *emm*4). The colonies of *emm*12 type and its subtypes isolates were smooth or rough in a diameter of 0.5 mm. Compared with *emm*12, *emm*1 type and its subtypes were all smooth and presented much bigger colonies than *emm*12, which were in a diameter of 1 mm as double as *emm*12. Quite different from others, *emm*3 type were mucoid with the largest diameter of 3–4 mm. The colonies of *emm*4 type was about 0.5 mm in diameter with smooth or rough surface, but their beta-hemolytic were slightly different from the colonies of other 3 types. The isolates of *S. pyogenes* with different *emm* genotypes owned their special colony morphology. The subtype colonies within the same genotype had the same characteristics. Specific colony morphology could be used for helping to early differentiate *emm* genotypes of *S. pyogenes*.

【Key words】 *Streptococcus pyogenes*; colony morphology; *emm* genotype

上海市闵行区自然科学研究课题(2019MHZ004);上海市闵行区公共卫生重点学科基金(MGWXK08)

^ΔCorresponding author E-mail: yhzhangcdc@sina.com

网络首发时间:2021-07-06 15:48:09 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1885.R.20210706.1333.012.html>

* This work was supported by the Natural Science Foundation of Minhang District, Shanghai (2019MHZ004) and Key Public Health Discipline Foundation of Minhang District Health Commission, Shanghai (MGWXX08).

菌落是单个菌体或孢子在一定的固体培养基上生长繁殖后形成的肉眼可见的微生物聚集体,菌落形态(大小、形状、边缘、颜色等)是辨认和鉴定菌种的重要标志。研究表明菌落特征与细菌表型和分子特征相关^[1-2],基因水平的变化会导致菌落形态的改变^[2-4],同一种属的病原菌基因型不同,菌落形态往往也不同,区别菌落形态有助于快速鉴别细菌种属,甚至辅助鉴别基因型。

化脓性链球菌属 A 群 β 溶血链球菌,能引起猩红热、丹毒、新生儿败血症、脑膜炎、产褥热以及链球菌变态反应性疾病等。菌落形态是实验室初步判断化脓性链球菌的重要依据,化脓性链球菌在 37℃ 培养 18~24 h 后,在血琼脂平板上一般形成直径约 0.5 mm、圆形凸起、边缘整齐、表面光滑或略粗糙、半透明或透明、 β 溶血的灰白色菌落^[5]。表型由基因型决定,研究表明一些细菌基因的变化会导致同一种属细菌的菌落形态变化^[6-7]。目前微生物实验室对菌落的观察多停留在传统的认知阶段,未能更进一步区分菌落形态的细微差异,我们在对化脓性链球菌分离培养鉴定的过程中发现不同 *emm* 基因型分离株的菌落形态存在明显差异,各亚菌落特点具有 *emm* 基因型特异性,总结如下。

资料和方法

菌株来源 来源于上海市闵行区疾病预防控制中心微生物实验室 2019 年 1—12 月自上海市闵行区猩红热监测点儿童咽拭子标本中分离培养的化脓性链球菌菌株。

菌落形态观察 菌株划线接种于含 5% 无菌脱纤维羊血的琼脂平板(上海科玛嘉微生物技术有限公司),37℃ 培养 18~24 h,观察并记录菌落形态(形状、大小、溶血等)。

生化确认实验 用化脓性链球菌的纯培养物配置 0.5 麦氏浓度菌悬液,加入 Vitek GP 生化鉴定卡(生物梅里埃)进行生化鉴定,ID% 为 99% 鉴定为化脓性链球菌。

***emm* 基因测序及分型** *emm* 基因扩增、测序和比对按照美国 CDC 网站化脓性链球菌测序方案进行(<https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/emm-typing-protocol.html>)。以 DNA 为模板,用通用引物 PCR 扩增,上游引物:5'-TATT(C/G)GC-

TTAGAAAATTAA-3',下游引物:5'-GCAAGTT-CTTCAGCTTGTTT-3'。反应体系为 qPCR Mix 15 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 上下游引物各 0.5 μ L, DNA 模板 2 μ L,补充 ddH₂O 至 30 μ L。PCR 扩增程序:94℃ 1 min;94℃ 15 s \times 15;47℃ 30 s \times 15;72℃ 延伸 1 min 15 s \times 15;94℃ 15 s \times 15;47℃ 30 s \times 15;72℃ 延伸 1 min 15 s,每个循环递增 10 s \times 15;72℃ 延伸 7 min;4℃ 保持。委托上海生物人技术有限公司完成 PCR 扩增产物纯化及测序。测序序列提交至数据库比对(<https://www2a.cdc.gov/ncidod/biotech/strepblast.asp>),序列同源性 99% 判为同一 *emm* 基因型。

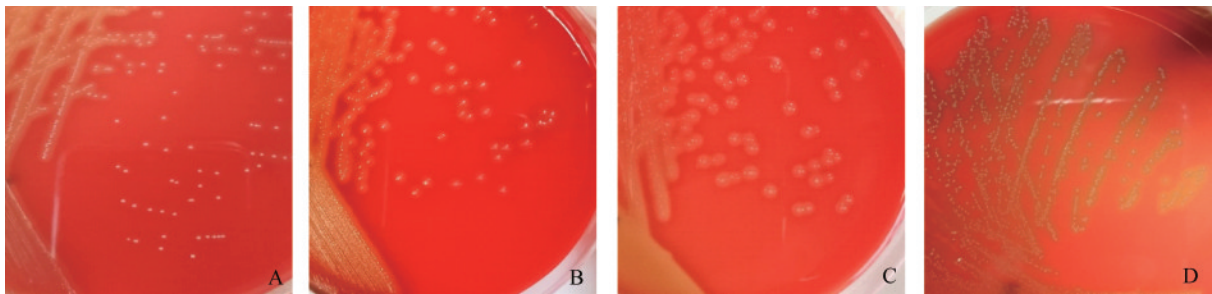
结果

菌落形态 179 株化脓性链球菌在血平板上菌落大小、表面特征和溶血情况存在肉眼可见的差别,据此分为 A、B、C、D 4 种菌落形态(图 1)。A:灰白色,约 0.5 mm,表面光滑或粗糙, β 溶血;B:灰白色,约 1 mm,比 A 菌落大,表面光滑, β 溶血;C:3~4 mm,为所有菌落里最大的,黏液型(这是明显不同于其他 3 种菌落的特点), β 溶血;D:约 0.5 mm,表面光滑或粗糙,溶血现象不同于其他 3 种菌落,介于 α 溶血和 β 溶血之间。

菌落形态与 *emm* 基因型的关系 不同 *emm* 基因型的菌落特征明显不同,同一基因型亚型的菌落特征相同。4 种基因型的菌株有与之对应的 4 种不同的菌落形态(图 1),分别称之为 *emm*12, *emm*1, *emm*3 和 *emm*4 型菌落(表 1)。

讨论 表型由基因型决定,表型差异源于基因水平的差异,菌落形态的不同也有其分子生物学基础。化脓性链球菌 *emm* 基因编码膜表面 M 蛋白,不同 *emm* 基因 5' 端的高变区碱基组成不同,根据这一结构特点把化脓性链球菌分成不同的 *emm* 基因型,也造成了菌落形态的不同。

化脓性链球菌流行 *emm* 基因型存在国家/地区差异^[8-12]。本研究中化脓性链球菌 *emm* 基因型和国内外其他学者的研究结果相符^[13-16],主要为 *emm*12 型和 *emm*1 型(80%~97%),因此就我国大部分地区而言,化脓性链球菌的菌落形态也以这两种常见。这两个基因型的菌落形态的明显区别在于菌落大小,*emm*1 型(包含 3 种亚型)菌落较大,约为



A: *emm*12 type and subtypes; B: *emm*1 type and subtypes; C: *emm*3 type; D: *emm*4 type.

图1 化脓性链球菌的4种菌落形态图谱

Fig 1 Distinctive colony morphology categorized by *emm* genotypes of *S. pyogenes*

表1 179株四种 *emm* 基因型化脓性链球菌的菌落形态

Tab 1 The colony characteristics of four *emm* genotypes in 179 *S. pyogenes*

Category	Size (mm)	S/R	Hemolytic	<i>emm</i> genotypes
Colony A	0.5	Smooth /Rough	β	<i>emm</i> 12.0(97), <i>emm</i> 12.19(15), <i>emm</i> 12.21(n=1), <i>emm</i> 12.37(1), <i>emm</i> 12.40(2), <i>emm</i> 12.66(1), <i>emm</i> 12.67(2), <i>emm</i> 12.68(1), <i>emm</i> 12.69(4)
Colony B	1	Smooth	β	<i>emm</i> 1.0(49), <i>emm</i> 1.25(2), <i>emm</i> 1.75(1)
Colony C	3-4	Mucoid	β	<i>emm</i> 3.0(1)
Colony D	0.5	Smooth	NA	<i>emm</i> 4.0(2)

*emm*12型(包含9种亚型)菌落的2倍大小,虽然两种菌落只有0.5 mm的差异,但在血平板上肉眼非常容易观察出差别,*emm*1型菌落溶血环比*emm*12型菌落大,因此可以凭借菌落大小区别这两种常见的*emm*基因型菌株。除此之外,*emm*1型均为光滑型,而*emm*12型有光滑型和粗糙型两种。

与*emm*12和*emm*1不同,*emm*3和*emm*4型在我国少见报道。和其他*emm*基因型菌落不同,*emm*3型菌落属于黏液型菌落,半透明水滴状,且菌落是所有化脓性链球菌中最大的,约是其他的3倍以上,容易辨别,与Tamayo等^[17]对130株*emm*3型黏液型菌落的描述相符。黏液型化脓性链球菌的这一特征具有时效性,Crater等^[18]研究表明其在对数生长初期菌落特征最明显,到生长平台期这一特征容易消失。我们在研究中也发现这种菌落在培养16~18 h黏液型最明显,超过24 h则不明显。因此我们在化脓性链球菌分离培养18 h时观察一次。*emm*3型菌落属于黏液型,但并不是所有黏液型都是*emm*3型,个别黏液型化脓性链球菌属于*emm*6型^[19]。*emm*3型是欧洲某些国家比较常见的基因型^[10],我国少见报道,也有可能是因为该菌菌落形态比较特殊,不符合典型的化脓性链球菌的菌落形态特征,在实验室检测中易被忽略。

*emm*4型菌落不同于其他化脓性链球菌的特征是溶血环,介于α溶血和β溶血之间。*emm*4型菌落的溶血特征可能是由于*emm*4型菌株编码溶血素的

基因发生改变所致。本研究只分离到2株*emm*4型化脓性链球菌,国内也鲜有报道*emm*4型分离株,部分原因可能是其非典型的菌落特点导致漏检。韩国学者曾报道2017年韩国*emm*4型化脓性链球菌突然增多^[20],在化脓性链球菌的鉴定过程中应注意观察具有该特征的菌落,防止*emm*4型菌落漏检。

菌落形态是细菌鉴定过程中最早观察到的特征,根据特有的菌落特征可以初步鉴别种属。随着分子生物学技术的发展和认知水平的提高,可以进一步细分同一种属细菌不同基因型的菌落特点。本研究中检测出4种*emm*基因型,菌落特点各有不同。由于我国目前常见的化脓性链球菌基因型为*emm*12和*emm*1型^[13-14],因此我们在初步鉴别化脓性链球菌时,可根据两种基因型不同的菌落特点早期辨别*emm*12和*emm*1型。

综上所述,化脓性链球菌菌落有明显的*emm*基因型特异性,不同*emm*基因型菌落形态不同,同一基因型的各亚型菌落特征相同,可根据菌落形态的基因型特异性辅助早期辨别化脓性链球菌的*emm*基因型。

作者贡献声明 欧阳霖 *emm*基因测序,论文撰写。王小光,宋驰萍,张颖华 菌株分离培养。陈明亮,张颖华 研究设计,论文撰写。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] CRUZ DE CARVALHO R, MAURICIO A, PEREIRA MF, *et al.* All for one: the role of colony morphology in bryophyte desiccation tolerance[J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10:1360-1371.
- [2] WU K, ZHENG Y, WU Q, *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* *cqsA* controls production of quorum sensing signal molecule 3-hydroxyundecan-4-one and regulates colony morphology[J]. *J Microbiol*, 2019, 57(12):1105-1114.
- [3] SUN ZB, WANG Q, SUN MH, *et al.* The heat shock protein 70 gene is involved for colony morphology, sporulation and mycoparasitism of *Clonostachys rosea* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2019, 366(15):188.
- [4] KHIDER M, WILLASSEN NP, HANSEN H. The alternative sigma factor RpoQ regulates colony morphology, biofilm formation and motility in the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* [J]. *BMC Microbiol*, 2018, 18(1):116.
- [5] 尚红,王毓仁,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].第4版.北京:人民卫生出版社,2015:655.
- [6] WANG X, ZHENG X, HUANG M, *et al.* A Comparative genomic analysis between small colony variant and wild type of *Burkholderia pseudomallei* in a patient with bacterial liver abscess[J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2019, 21:16-21.
- [7] BI X, DAI W, WANG X, *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on the growth, colony maintenance, and attached bacterial community composition of colonial cyanobacteria [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019, 26(15):14977-14987.
- [8] PAVEENKITTIPORN W, NOZAWA T, DEJSIRILERT S, *et al.* Prevalent *emm* types and superantigen gene patterns of group A *Streptococcus* in Thailand [J]. *Epidemiol Infect*, 2016, 144(4):864-869.
- [9] IMOHL M, FITZNER C, PERNICIARO S, *et al.* Epidemiology and distribution of 10 superantigens among invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Germany from 2009 to 2014[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7):e0180757.
- [10] FRIAES A, MELO-CRISTINO J, RAMIREZ M, *et al.* Changes in *emm* types and superantigen gene content of *Streptococcus pyogenes* causing invasive infections in Portugal[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):18051.
- [11] GERGOVA R, MUHTAROVA A, MITOV I, *et al.* Relation between *emm* types and virulence gene profiles among Bulgarian *Streptococcus pyogenes* clinical isolates [J]. *Infect Dis (Lond)*, 2019, 51(9):668-675.
- [12] DAUBY N, MIENDJE DEYI VY, DELFORGE V, *et al.* *Streptococcus pyogenes* infections with limited *emm*-type diversity in the homeless population of Brussels, 2016-2018 [J]. *Int J Infect Dis*, 2019, 81:52-56.
- [13] 马春娜,彭晓旻,吴双胜,等.北京市2015—2017年猩红热及咽部感染患者A组链球菌超抗原基因特征研究[J].中华流行病学杂志,2018,39(10):1375-1380.
- [14] 高昆,陈明亮,韩倩,等.上海市部分地区儿童A群链球菌感染分子流行病学及药物敏感性分析[J].中华检验医学杂志,2017,40(5):322-326.
- [15] 肖海军,殷晓晴,张慧莲,等.深圳地区儿童A群致病性链球菌感染流行现状及M蛋白基因分型分析[J].现代检验医学杂志,2016,31(6):51-54.
- [16] 张代涛,杨鹏,吴双胜,等.2011-2014年北京地区儿童咽扁扁桃体炎感染病例A组链球菌 *emm* 分型研究[J].疾病监测,2015,30(11):917-921.
- [17] TAMAYO E, MONTES M, GARCIA-MEDINA G, *et al.* Spread of a highly mucoid *Streptococcus pyogenes emm3/ST15* clone[J]. *BMC Infect Dis*, 2010, 10:233-237.
- [18] CRATER DL, DE RIJN IVAN. Hyaluronic acid synthesis operon (*has*) expression in group A streptococci[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(31):18452-18458.
- [19] WALKER LW, MONTOYA L, CHOCHUA S, *et al.* Increase in invasive group A streptococcal disease and emergence of mucoid strains in a pediatric population: february-june 2017[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2019, 6(7):1-7.
- [20] KIM S, LEE S, PARK H, *et al.* Predominance of *emm4* and antibiotic resistance of *Streptococcus pyogenes* in acute pharyngitis in a southern region of Korea [J]. *J Med Microbiol*, 2019, 68(7):1053-1058.

(收稿日期:2020-09-30; 编辑:王蔚)