

Toxigenní profily a *emm* typizace *Streptococcus pyogenes* v České republice v letech 2011 a 2012

Toxigenic profiles and emm typing of Streptococcus pyogenes in the Czech Republic in 2011 and 2012

Jana Alboková, Daniela Lžičarová, Jana Kozáková

Souhrn

Streptococcus pyogenes, celosvětově rozšířený patogen, způsobuje celou řadu neinvazivních a invazivních onemocnění od akutní faryngitidy a impetiga po nekrotizující fascitidu a streptokokový syndrom toxického šoku. Cílem práce bylo stanovení toxigenních profilů metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR) a *emm* typizace *S. pyogenes* pro epidemiologické účely a statistické vyhodnocení vztahu *emm* typu a genů toxigenního profilu k invazivitě onemocnění.

V Národní referenční laboratoři pro streptokokové nákazy Státního zdravotního ústavu v Praze bylo v letech 2011–2012 vyšetřeno celkem 111 izolátů *S. pyogenes* pětadvaceti různých *emm* typů a 37 toxigenních profilů (streptokokové pyrogenní exotoxiny A-C, F-M, Z, streptokokový superantigen *ssa* a streptokokový mitogenní exotoxin Z *smeZ*). 55 izolátů bylo invazivních a 56 neinvazivních. V uvedeném období prevaloval typ *emm1* (31,5 %) následovaný typem *emm28* (11,7 %) a typem *emm12* (9,9 %).

U všech izolátů byl potvrzen streptokokový pyrogenní exotoxin B a F (*speB* a *speF*). *SpeG* a *smeZ* měla většina kmenů (97,3 % a 92,8 %), *ssa* byl zjištěn u 8,1 % kmenů a *speL* u 3,6 % kmenů. Nebyla potvrzena statisticky významná souvislost mezi *emm* typem a invazivitou izolátů ani mezi toxigenním profilem a invazivitou izolátů.

Streptococcus pyogenes, a globally spread pathogen, is the cause of a wide range of invasive and non-invasive diseases, from acute pharyngitis and impetigo to necrotizing fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome. The study objectives were toxigenic profiling of *S. pyogenes* isolates by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and *emm* typing for epidemiological purposes and analysis of the relationships between *emm* types, toxigenesis, and disease invasiveness.

In 2011–2012, the National Reference Laboratory for Streptococcal Infections, National Institute of Public Health, analyzed 111 isolates of *S. pyogenes* assigned to 25 *emm* types and 37 toxigenic profiles (streptococcal pyrogenic exotoxins A-C, F-M, and Z, streptococcal superantigen *ssa*, and streptococcal mitogenic exotoxin Z *smeZ*). Fifty-five isolates were invasive and 56 were non-invasive. The most prevalent *emm* type was *emm1* (31.5%), followed by *emm28* (11.7%) and *emm12* (9.9%).

All isolates carried genes for streptococcal pyrogenic exotoxin B and F (*speB* and *speF*), most isolates (97.3% and 92.8%) harboured *speG* and *smeZ*, respectively, 8.1% of isolates were *ssa* positive, and 3.6% encoded *speL*. No statistically significant association was found between *emm* type or toxigenic profile and invasiveness of isolates.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2014; 23(10): 365–368.

Klíčová slova: *Streptococcus pyogenes*, streptokokový pyrogenní exotoxin, *emm* typizace, RT-PCR, toxigenní profil

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, streptococcal pyrogenic toxin, *emm* typing, RT-PCR, toxigenic profile

Streptococcus pyogenes, streptokok skupiny A, je výhradně lidský patogen. Jeho rozšíření je celosvětové [1, 2, 3, 4,]. Je původcem fokálních pyogenních infekcí v různých lokalizacích (akutní tonsilofaryngitida, impetigo), invazivních infekcí (fokální infekce provázené bakterémií – erysipel, pneumonie, infekce měkkých tkání, meningitida, septická artritida, osteomyelitida – bakterémie či sepse bez prokázaného infekčního fokusu, streptokokový syndrom toxického šoku) a sterilních poststreptokokových následků vznikajících pravděpodobně na autoimunitním podkladě (revmatická horečka, akutní poststreptokoková glomerulonefritida). Tato práce se zaměřuje na objasnění role

streptokokových pyrogenních exotoxinů v patogenezi invazivních onemocnění způsobených druhem *S. pyogenes*. Invazivní onemocnění je podle pracovní skupiny pro závažná streptokoková onemocnění [3] vymezeno klinickými známkami toxického šoku nebo průkazem *S. pyogenes* v primárně sterilním klinickém materiálu u onemocnění bez přítomnosti klinických známek toxického šoku. Důležitý faktor virulence *S. pyogenes* a také epidemiologický marker je M protein, který je kódován *emm* genem. Specifická M proteinu je určena epitopem umístěným na 40 až 50 zbytkách aminokyselin na jeho aminovém konci a tento region M proteinu nedává zkřížené reakce.

Mezi významné faktory virulence *S. pyogenes* patří i streptokokové pyrogenní exotoxiny A-C, F-M a Z, *ssa* a *smeZ*. *Spe* náleží do skupiny superantigenů, které mohou indukovat masivní sekreci cytokinů jako gama interferon, interleukin-1, interleukin-2, interleukin-6 a tumor nekrotizující faktor alfa [4, 5].

Streptokokové pyrogenní exotoxiny jsou kódovány buď

chromozomální DNA (*speB*, *speF* a *speG*) nebo fágovou DNA (*speA*, *speC*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM*, *speZ*, *ssa* a *smeZ*). *SpeB* je cystein proteáza, jeden z „housekeeping“ genů, a proto se používá jako pozitivní kontrola izolace DNA. *SpeF* je identický se streptokokovou deoxyribonukleázou. *SpeC* patří spolu s *speA* k nejvíce prozkoumaným a nejvariabilnějším genům [6].

Emm typizace a detekce superantigenů

Gen *emm* byl amplifikován a sekvenován dle protokolu [7]. Určení typu a subtypu *emm* se provádí ve spolupráci s Centrem pro kontrolu a prevenci nemocí CDC [8].

Izoláty *S. pyogenes* byly testovány na přítomnost genů streptokokových pyrogenních exotoxinů A – C, F – M a Z, *ssa* a *smeZ*.

Obecné složení RT-PCR reakce:

Master mix:

5 µL SsoFast EvaGreen supermix

2 µL Forward primer (10 µM)

2 µL Reverse primer (10 µM)

K 1 µL izolované DNA se přidá 9 µL Master mixu do 0,2 mL PCR zkumavek.

RT-PCR probíhala za těchto podmínek: denaturace 3 minuty při 95 °C, 40 cyklů 15 s při 95 °C, 15 s annealing a 15 s elongace při 72 °C. Poté následovalo měření křivky tání při růstu teploty o 0,5 °C po dobu 5 s v rozmezí 65 °C – 95 °C.

RT-PCR se měřila na přístroji Bio-Rad CFX 96 Real-Time System s termálním cyklem C1000 a výsledky byly hodnoceny programem Bio-Rad CFX Manager. Univariální analýza byla vypočítána programem EPITABLE.

Výsledky a diskuse

Výsledky *emm* typizace a rozdělení dle invazivity vzorků v letech 2011–2012 jsou uvedeny na **obrázku**.

V uvedeném období prevaloval typ *emm1* (31,5 %), následovaný typem *emm28* (11,7 %) a typem *emm12* (9,9 %). Věkový průměr pacientů byl (45±25) let, minimum 1 měsíc, maximum 95 let. Ve zkoumaném souboru byl diagnostikován 1 případ meningitidy, 4 syndromy toxického šoku, 7 případů sepse, 43 případy bakterémie a 56 případů fokální infekce bez bakterémie.

Výskyt streptokokových superantigenů u jednotlivých *emm* typů a jejich invazivity shrnuje **tabulka**.

Celkem bylo naměřeno 37 různých toxigenních profilů. Nejméně zkoumaných genů (4 geny) měl subtyp *emm69.1*, nejvíce genů (8 genů) bylo nalezeno u subtypu *emm3.1* a subtypu *emm28.0*. Stejně jako uvádí Rivera et al [4], byl *ssa* zjištěn u subtypů *emm3.1* a *emm4.0*.

SpeB a *speF* vykazovalo 100% izolátů. V práci Schmitze et al [2] jsou však uvedeny dva izoláty *emm12*, u kterých *speB* nenaměřili. Meisal et al [9] nenalezl *speB* u jednoho kmene *emm82*.

SpeG bylo potvrzeno u 97,3 % vzorků, *smeZ* u 92,8 %, *speJ* u 45,9 %, *speH* u 42,3 %, *speA* u 38,7 %, *speC* a *speI* 35,1 %, *speZ* u 23,4 %, *speM* u 18,0 %, *speK* u 14,4 %. *ssa* u 8,1 % a *speL* u 3,6 % vzorků. Procento zastoupení jednotlivých genů v souborech se liší geograficky [6] i časově [5] a je výrazně ovlivněno výběrem izolátů v jednotlivých studiích.

V souladu s prací Chatelliera et al [5] byly u subtypu *emm1.0* přítomny geny *speA*, *speB*, *speF*, *speG* a dále *speJ* a *speZ*. Jeden izolát *emm1.0* měl navíc i gen pro *speC* a neměl gen *speI*. Neinvazivní subtypy *emm3.2* se odlišovaly v přítomnosti *smeZ*. Rozdíl mezi invazivním a neinvazivním izolátem vykazoval subtyp *emm28.0*, kde jeden invazivní vzorek měl navíc *speK* a *speM*, a dále subtyp *emm12*, kdy se invazivní a neinvazivní izolát lišil v přítomnosti *smeZ*. Neinvazivní izoláty *emm89.0* měly stejný toxigenní profil jako invazivní izoláty, shodný s profilem *emm80.0*.

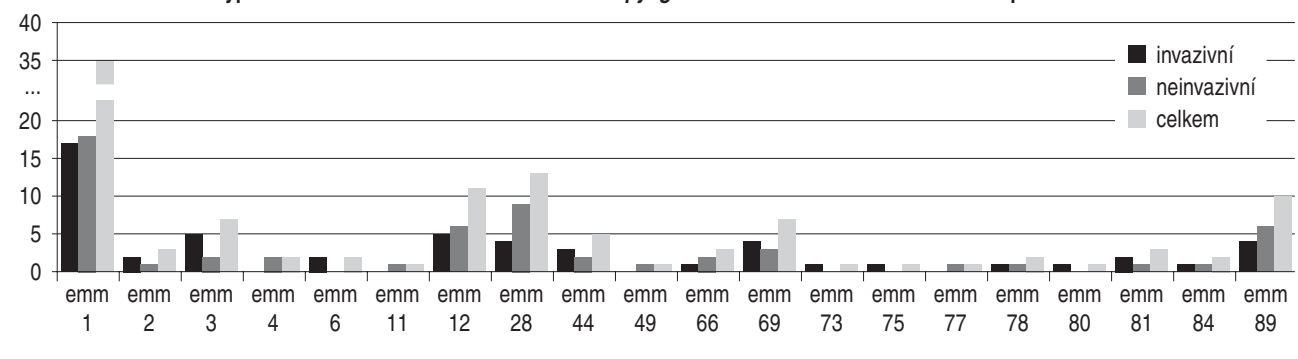
V roce 2011 byly všechny vzorky měřeny v tripletu a výsledky byly shodné. V rámci interní validace se jednou za 3 měsíce provádí měření jednoho vzorku paralelně a ani zde nebyla zaznamenána neshoda. U streptokoků skupiny G byl zjištěn pouze *speB*, ostatní superantigeny byly negativní.

Ke zjišťování, zda rozdíl ve výskytu některých genů u invazivních a neinvazivních izolátů stejného *emm* typu je statisticky významný, byla použita univariální analýza. Pro vymezení statistické významnosti byla zvolena běžná hodnota p-value < 0,05.

U žádného ze zkoumaných *emm* typů ani žádného z genů toxigenního profilu není p-value < 0,05, což znamená, že žádný ze zkoumaných vlivů není signifikantně významný na hladině významnosti $\alpha = 5 \%$.

Při použití běžné statisticky významné hladiny p-value < 0,05 byl negativně spojen s invazivitou typ *emm44.0* a *emm69.1* v roce 2012. Ostatní hodnoty nejsou statisticky

Graf: Distribuce *emm* typů neinvazivních a invazivních izolátů *S. pyogenes* v letech 2011–2012 v České republice



Tabulka: Výskyt streptokokových superantigenů u jednotlivých *emm* typů a jejich invazivity.

<i>emm</i>	inv.	<i>spe A</i>	<i>spe B</i>	<i>spe C</i>	<i>spe F</i>	<i>spe G</i>	<i>spe H</i>	<i>spe I</i>	<i>spe J</i>	<i>spe K</i>	<i>spe L</i>	<i>spe M</i>	<i>spe Z</i>	<i>ssa</i>	<i>smeZ</i>
1.0	I	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
1.0	I	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
1.0	N	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
1.29	N	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+
1.44	N	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
2.0	I	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
2.0	N	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
2.0	N	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3.1	I	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3.1	I	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
3.2	N	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
3.2	N	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
4.0	I	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
6.4	N	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
11.0	I	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
12.0	I	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
12.0	I	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12.0	N	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
12.0	N	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
12.0	N	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
28.0	I	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
28.0	I	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
28.0	I	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
28.0	N	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
28.0	N	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
44.0	I	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
44.0	N	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
49.0	I	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
66.0	I	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
66.0	N	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
69.1	I	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
69.1	I	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
69.1	N	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
69.1	N	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
73.0	N	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
75.0	N	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
77.0	N	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
78.3	I	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
78.3	N	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
80.0	N	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
81.0	N	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
81.1	I	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
81.1	N	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
84.0	I	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
84.0	N	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
84.0	N	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
89.0	I	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
89.0	N	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
117.0	N	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+

Legenda: + přítomnost genu; - nepřítomnost genu; I invazivní izolát; N neinvazivní izolát.

signifikantní a tudíž nelze predikovat vazbu mezi *emm* typem a invazivitou onemocnění.

Diference mezi stejnými *emm* typy zahrnují přítomnost či absenci jednoho nebo dvou streptokokových pyrogenních exotoxinů ve srovnání s dominantním profilem. Evropská studie [2] zahrnující velký počet izolátů *S. pyogenes* uvádí, že každý *emm* typ je charakterizován predominancí jednoho či dvou toxigenních profilů odrážejících rozšíření několika klonů celého světa.

V NRL stále pokračuje sledování toxigenních profilů a *emm* typizace všech zaslaných izolátů *S. pyogenes*. Z výsledků této práce vyplývá, že stanovení *emm* typu ani toxigenního profilu u konkrétního izolátu nemá význam pro predikci jeho invazivity, což je ve shodě se závěry dalších autorů [1, 4, 6]. Sledování těchto charakteristik má význam v epidemiologii onemocnění způsobených *S. pyogenes* [2, 6]. Metoda RT-PCR pro stanovení toxigenního profilu *S. pyogenes* se bude v NRL v dalších letech využívat pro zpřesnění charakteristiky izolátů a predikci výskytu jiných než dominantních klonů v rámci *emm* typu.

LITERATURA

- [1] McMillan DJ, Beiko RG, Geffers R, Buer J, Schouls LM, Vlamonckx BJM, Wannet JB, Sriprakash KS, Chhatwal GS. Genes for the Majority Of Group A Streptococcal Virulence Factors and Extracellular Surface Proteins Do Not Confer an Increased Propensity to Cause Invasive Disease. *CID*, 2006; 43: 884–891.
- [2] Schmitz FJ, Beyer A, Charpentier E, Normark BH, Schade M, Fluit AC, Hafner D, Novak R. Toxin-gene profile heterogeneity among endemic invasive European group A streptococcal isolates. *J Infect Dis*, 2003; 188: 1578–1586.
- [3] The Working Group on Severe Streptococcal Infections. 1993. Defining the group A streptococcal toxic shock syndrome. Rationale and consensus definition. *JAMA*, 1993; 269: 390–391.
- [4] Rivera A, Rebollo M, Miró E, Mateo M, Navarro F, Gurgui M, Mirelis B, Coll P. Superantigen gene profile, *emm* type and antibioticresistance genes among group A streptococcal isolates from Barcelona, Spain. *Journal of Medical Microbiology*, 2006; 55: 1115–1123.
- [5] Chatellier S, Ihendyane N, Kansal RG, Khambaty F, Basma H, Norrby-Teglund A, Low DE, McGeer A & Kotb M. Genetic relatedness and superantigen expression in group A *Streptococcus* serotype M1 isolates from patients with severe and nonsevere invasive diseases. *Infect. Immun*, 2000; 68: 3523–3534.
- [6] Commons R, Rogers S, Gooding T, Danchim M, Carapetis J, Browne R, Curtis N. Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with *emm* types. *J Med Microbiol*. 2008; 57: 1238–1246.
- [7] The Centers for Disease Control and Prevention *Emm* typizace. Dostupné na [www: http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emm-type.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emm-type.htm)
- [8] The Centers for Disease Control and Prevention Stanovení *emm* typu. Dostupné na [www: http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm)
- [9] Meisal R, Andreasson IKG, Hoiby EA, Aaberge IS, Michaelsen TE, Caugant DA. *Streptococcus pyogenes* Isolates Causing Severe Infections in Norway in 2006 to 2007: *emm* Types, Multilocus Sequence Types, and Superantigen Profiles. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 842–851.

Ing. Jana Alboková, CSc.
MUDr. Daniela Lžičařová
MUDr. Jana Kozáková
NRL pro streptokokové nákazy
SZÚ - CEM