

計畫編號：DOH94-DC-1008

行政院衛生署疾病管制局九十四年度委託科技研究計畫

B 群鏈球菌分子流行病學及表面蛋白致病因子之探討

## 研究報告

執行機構：國立成功大學

計畫主持人：吳俊忠

研究人員：伍展弘、何月仁、蘇勳璧、曾鈺晶

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見\*

目

錄

	頁碼
封面	
目錄	1
中文摘要	2
英文摘要	3-4
前言	5-8
材料與方法	9-10
結果與討論	11-18
結論與建議	19-20
參考文獻	21-25
圖、表	26-34

## 中文摘要

B 群鏈球菌(GBS)是造成新生兒肺炎(pneumonia)、腦膜炎(meningitis)、敗血症(sepsis)重要的病原菌之一，而成人尤其是罹患慢性疾病的老年人，受到 GBS 的感染也有逐漸增加的趨勢。根據本計畫第一年的研究發現，在 GBS 已知的血清型中，type III 與 type V 是台灣 GBS 感染較常見的；其中 serotype III 是造成新生兒 GBS 腦膜炎主要的血清型，其致病的機制仍不清楚。為探討 GBS 的致病機制，本計劃第二年進行 GBS 之 Alp 表面蛋白的分析，根據研究的結果顯示在所有 166 株由血液培養所分離之菌株中，其所表現之 Alp 表面蛋白基因以 *bca*、*alp2/3* 與 *rib* 為主，共占 84.9%，其中又以 *rib* 為最多，尤其是在新生兒的感染，所佔比例高達 70.5%；而成人 GBS 感染方面則以 *bca*、*alp2/3* 為最多。另外由血清型、PFGE 與 Alp 表面蛋白的分析也發現 type III /PFGE type 1/*rib*， type V / PFGE type 4 / *alp2/3* 與 type Ib /PFGE type 12 / *bca* 可能是在南台灣較為優勢的菌種。由於研究發現 GBS 新生兒 meningitis 的菌株中有高達 76.5% 帶有 *rib*，因此推論 Rib 蛋白可能在造成新生兒的 meningitis 中扮演重要的角色。由於 *rib* 基因的構造中有 80% 具有 tandem repeat 的特性，我們的研究顯示 Rib 的 tandem repeat 數目在臨床菌株中表現呈多樣性；並且 repeat 數目之不同與 GBS 的致病種類與嚴重程度似乎沒有顯著的關係，但與不同年齡的致病能力有關。

因此，若能深入了解 Rib 蛋白在 GBS meningitis 的致病機制，或者釐清 Rib 蛋白 tandem repeat 在致病過程所扮演的角色，將有助於未來在疫苗或者是藥物研發上提供新的方針，以達到健康促進與預防醫學的目的。

**Key words:** B 群鏈球菌、Alp 表面蛋白、Rib 蛋白、Tandem repeat、新生兒感染、腦膜炎

## 英文摘要

Group B Streptococci (GBS) is the leading cause of neonatal infections, e.g. pneumonia, sepsis and meningitis. In addition, it has emerged as an important pathogen among non-pregnant adults, especially the elderly with underlying diseases. According to previous studies, serotype III and V are the most prevalent strains of GBS in Taiwan, with serotype III alone accounting for the majority of neonatal meningitis. However, the pathogenesis remains unclear. In the present study, one hundred and sixty six GBS isolates from bloodstream infection were tested to examine the distribution of Alp surface protein. Most of Alp surface proteins were *bca*, *alp2/3*, and *rib* accounting for 84.8 % of the isolates, and *rib* was the most prevalent. Interestingly, 70.5 % of neonatal isolates expresses *rib*, indicating the important role contributed to the bacteremia in neonates. Comparatively, *bca* and *alp2/3* were the major forms of adult. From the analysis of connectedness among serotypes, pulse field gel electrophoresis (PFGE) type and Alp, three strains, type III/PFGE type 1/ *rib*, type V/ PFGE type 4/ *alp2/3*, and type Ib/PFGE type 12/ *bca* were dominate in south Taiwan. Further, 76.5 % of isolates causing meningitis of neonates was *rib*-positive; in other words, the *rib* gene may play an important role in the neonatal meningitis. The sequence analysis of *rib* revealed that 80% of the protein has various 79-residue tandem repeats. In this study, the number of tandem repeats of Rib protein has a wide variety in our clinical isolates. Furthermore, the variability of tandem repeats is irrelevant to the spectrum of diseases; instead, it is strongly related with the virulence to patients with different age group. Further characterization of the Rib protein in the pathogenesis of GBS meningitis or delineation of the major role of Rib tandem repeats in GBS infection are important for vaccine development and drug design.

**Key words:** Group B streptococcus, neonatal infection, Alp surface protein, Rib protein, tandem repeat, meningitis

## 一、前言

B 群鏈球菌(Group B streptococci GBS) 為一常見的侵襲性(invasive)病原菌，可經由懷孕的婦女的生殖道或在分娩過程中垂直傳染給新生兒，進而造成新生兒腦膜炎(meningitis)、敗血症(sepsis)、或肺炎 (pneumonia) (Trijbel-Smeulders *et al.*, 2003)，根據 1990 年的調查，在美國每 1,000 個新生兒約有 1.8 個被感染到 GBS，而這些 GBS 感染的新生兒約有 6% 致死率 (Zangwill *et al.*, 1992)。但在 1996 年，疾病管制局(CDC; the Centers for Disease Control and Prevention)開始建議進行產婦之 GBS 篩檢以預防新生兒之感染後，incidence rate 由 1993 年的 1.7(每 1000 個出生嬰兒)下降到 1998 年的 0.6 (Schrag *et al.*, 2000)，而在日本與歐洲也有相同的發現(Noshina *et al.*, 2002; Hafner *et al.*, 1998; Volumenie *et al.*, 2001)。相對的，在台灣由於長期相關的調查資料不足，所以對於 GBS 在新生兒的感染並無預防的政策，但根據馬偕與長庚醫院所做該院的調查顯示，台灣新生兒被 GBS 感染的病例數有攀升的趨勢，由 3.26-10.08 (1985-1995) 到 0-1.8 (1996-2001)；甚至比國外未進行產前預防 (intrapartum chemoprophylaxis) 時都要高(Ho *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2004)，值得相關單位的重視。此外，在非懷孕成人的部份，發現 GBS 的感染有愈來愈多的趨勢，incidence 由每 1000 位住院病人中 0.53 個案例(1993-1994)上升到 0.96 個案例 (1999-2000) (Blancas *et al.*, 2004)尤其是具有慢性疾病的老年人(Farley *et al.*, 2001; Schuchat A., 1999 )，主要的臨床表徵包括菌血症、心內膜炎(endocarditis)及壞死性筋膜炎(necrotizing faciitis)等，因此，國外對於 GBS 感染的關注已由新生兒擴展到成人。在台灣，根據本實驗室早期的報告發現在南台灣非懷孕成人造成 GBS 感染之發生率為千分之 1.6 (Liu *et al.*, 1997)，目前情形則不得而知，應值得繼續追蹤調查。

GBS 目前以 type-specific capsular polysaccharides 做為分類的依據，可分為九種不同的 serotypes，其中 types Ia、Ib、II、III 及 V 等五種 serotypes 較常發生於美洲 (Harrison *et al.*, 1998)；types VI 及 VIII 常見於懷孕的日本女性身上 (Lachenauer *et al.*, 1999)。根據本實驗室先前針對南台灣之 GBS 進行 8 年 351 病例的流行病學調查，發現其中以 type III (28.5%) 與 type V (27.1%) 分佈較多 (Ko *et al.*, 2001)。

關於 GBS 的致病機制目前仍不十分清楚，主要以其表面蛋白及多醣體或一些分泌毒素被視為重要的致病因子，如：莢膜多醣體， $\alpha$ C protein，Rib protein，hemolysin，C5a peptidase，CAMP factor 及 Hyaluronate lyase 等均有報導與 GBS 致病機制有關。莢膜之多醣體被認為可防止補體因子 (complement factor) C3b 與 GBS 表面結合進而抑制 alternative complement pathway 的活化 (Marques *et al.*, 1992)；CAMP 被證明具 membrane-damaging 的活性 (Podbielski *et al.* 1994)，而 GBS 之 hyaluronate lyase 被認為可作用在宿主之結締組織 (connective tissue) 上，以幫助 GBS 之侵入 (Gase *et al.*, 1998)。而細菌表面蛋白 (surface-associated proteins) 在革蘭氏陽性球菌的致病機制中常被視為是重要的致病因子，如 A 群鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*, GAS) 之 M protein，具有抑制補體活性、抗吞噬作用 (antiphagocytosis) 的功能及附著細胞的能力 (Hollingshead *et al.*, 1987; Jones *et al.*, 1988; Fischetti VA, 1991; Ellen *et al.*, 1974)。而 PspA 為 *Streptococcus pneumoniae* 之 lactoferrin-binding protein (Hammerschmidt *et al.*, 1999) 具有抑制 C3 convertase 活性的能力 (Tu *et al.*, 1999.)。就已知的 GBS 表面蛋白中，C protein 是第一個被鑑定出來的，其他則如 leucine-rich repeat protein (LRR)、ScpB protein 與 FbsA protein 等 (Seepersaud *et al.*, 2005; Beckmann *et al.*, 2002; Schuchat *et al.*, 2002) 也陸續被發表，由於發現在

mouse model 中  $\alpha$ C protein 的抗體可以保護小鼠免於 GBS 的感染(Lancefield *et al.* 1975)，意味著除莢膜之外，表面蛋白也可以引發 protective immunity，開啟 GBS 表面蛋白疫苗的研究方向。

$\alpha$ C protein 屬於 Alp 表面蛋白的一員，根據 Lindahl *et al.* 的分類，Alp 表面蛋白共可分四種： $\alpha$ C、Rib、R28 與 Alp2，在 DNA 的構造上， $\alpha$ C 蛋白與 Rib 較相似，而 R28 與 Alp2 則多了一段 nonrepeated region (Lindahl *et al.*, 2005)。根據報告顯示， $\alpha$ C 是 non-type III GBS 的主要表面蛋白，如 type Ia、Ib、II，而 type III 與 type V 則有較高的比例具有 Rib 蛋白(Lachenauer *et al.*, 2000; Stalhammar-Carlemalm *et al.*, 1993)。有關 Alp 蛋白的研究，目前仍以 C protein 為最多，依據其分子量、生化與免疫特性可將其分為  $\alpha$ C 及 C $\beta$  兩種 (Bevanger & Naess, 1985； Lindahl *et al.* 1990； Michel *et al.* 1991)；*bca* 為  $\alpha$ C protein 的表現基因，其中含有 9 個 identical repeats。而每一個 repeat 由 246 個核苷酸所組成，可 encode 一 82 個胺基酸片段。而 Rib 蛋白質的發現始於 1993 年，其大小約 123-kDa，其表現基因為 *rib*，其中含長的 signal peptide (55 amino acid residues) 及 12 repeats (Wasrfelt *et al.*, 1996, Stalhammar-Carlemalm *et al.*, 1993)，每個 repeat 由 237 個核苷酸所組成，可 encode 一 79 個胺基酸片段；根據 DNA 序列比對， $\alpha$ C 與 Rib 二者間有 61% identity，而在胺基酸的比對則 N 端有 61 % residue identity，repeat 區域有 47 % identity，但兩者間並沒有免疫交互反應發生 (Wasrfelt *et al.*, 1996)；另外由 western blot 分析發現兩者存在 regulatory ladder pattern 的現象，顯現蛋白質的 size heterogeneity，這種 heterogeneous polypeptides 的分子量差異與蛋白本身所擁有的 repeat region 數量有關 (Michel, *et al.* 1992)，現在則發現是由於在 repeat 區域中對酸敏感之 Asp-Pro 鍵被水解所造成，若將蛋白電泳的 pH 值調整到 pH7.0，則 laddering 的現象就消除了



(Stalhammar-Carlemalm *et al.*, 1999)；另外，這種 ladderling 的現象也出現在 *rib* 基因 PCR 的結果，每個片段的大小也是相差一個 repeat 即 237 bp (Wasrfelt *et al.*, 1996)，根據目前的推論這種現象可能是在 DNA replication 時 polymerase slipped mispairing 所造成。是否細菌經由蛋白質水解或 replication 時的 slippage 而造成的 size heterogeneity，以利於 GBS 的生存則有待進一步的探討。

根據抗血清的研究發現，以含 1 或 9 個 repeat 的  $\alpha$ C 蛋白 immunize 母鼠分別可提供新生鼠 65 及 11% 的免疫保護能力，亦即  $\alpha$ C 蛋白之 immunogenicity 及 protective efficacy 與 repeat 的數目成反比的關係 (Gravekamp *et al.*, 1997)，顯示多重 repeat 的存在會減弱抗體對完整  $\alpha$ C 蛋白以及對 N 端區域之反應，因此推論 repeat 片段具有提供菌株躲避宿主免疫攻擊的能力，其機制則未明。另外，根據最近 type Ia -specific  $\alpha$ C 蛋白質與人類子宮頸上皮細胞株的研究發現， $\alpha$ C protein 會藉由結合到宿主細胞表面之 glycosaminoglycan 而進入細胞中，並且是經由 actin-dependent 的機制進行 (Bolduc *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2004)。然而 Rib 被認為與 GAS 之 R28 protein 極為類似，而 R28 目前被歸類為 GAS adhesin 之一 (Stalhammar-Carlemalm *et al.*, 1999)，所以 Rib 是否亦與  $\alpha$ C 蛋白或 GAS 之 M protein 扮演如 antiphagocytosis、adhesion 及 internalization 等之生物功能則是本計劃未來主要探討的議題。

## 二、材料與方法

### 染色體DNA之抽取

取新鮮菌落接種至30 ml TSBY (Tryptic soy broth , Yeast extract) , 於37°C 培養箱中隔夜生長，離心取菌體，以10 µg/ml Mutanolysin及5 mg/ml Lysozyme在37°C作用1小時，再以5 % SDS在65°C作用30 min，之後以phenol-chloroform萃取DNA，最後以酒精沈澱，乾燥後回溶於500 µl TE buffer，保存於4°C。

### Alp表面蛋白基因之分析

參考Creti group之multiplex PCR assay(Creti *et al.*; 2004)，設計universal forward以及*bca*、*rib*、*alp2/3*、*epsilon*等5'端及3'端的引子（如Table 1）進行聚合酶連鎖反應，經電泳分析，根據已知片段的大小分別判斷Alp表面蛋白基因的種類。

### Rib表面蛋白基因tandem repeat數目分析

設計*rib*基因repeat區域專一的5'端及3'端的引子（如Table 1），針對Rib-positive GBS 進行PCR的分析，涵蓋全長包括N端signal sequence後之序列、tandem repeat region至C端的片段，取其major band的大小扣除前後段長度再除以repeat的長度來計算tandem repeat 的數目。

### 聚合酶連鎖反應（Polymerase chain reaction；PCR）

於0.2 ml之微量離心管依序加入染色體DNA、之5'端及3'端的引子（如Table 1）、0.15 mM dNTP、1× Polymerase buffer及1 unit DyNAzyme polymerase（Finzyme OY, Espoo, Finland），總反應體積為50 µl，於Perkin

Elmer GeneAmp PCR system 2400中進行反應。反應條件為95°C 變性1分鐘，再以各引子特定的黏合溫度（annealing temperature）進行黏合作用1分鐘，接著以72°C 反應2-4分鐘，共進行30個循環後。所得到的產物以洋菜膠體電泳（agarose gel electrophoresis）進行分析。

### 統計分析

所有 categorical 變數的分析採用 two-tailed Fisher's exact test，以  $P$  值  $<0.05$  代表統計上有顯著的意義。

### 三、 結果

本計劃第一年已完成血液培養菌株之蒐集，並分析各菌株之莢膜血清型與脈衝電泳型，同時也探討與臨床表徵(clinical manifestation)之關係；根據 serotype 分析，發現 type III 的比例高達 43.8%，相較於 type V 的 19.0%，顯示 type III GBS 可能是較 invasive 的 (Fig. 1)。在所有 type III 菌株中有 70% 的是感染新生兒的，又其中以 LOD (late-onset) 的新生兒佔 78 % ；然而，成人的感染中 type III 僅佔 21.5%，與 type Ia, V 共同為主要的感染 type，顯現 type III GBS 在新生兒感染的重要性。另外，在 type III 與臨床表徵的關係，也發現主要以 primary bacteremia 與 meningitis 最多，但二者相當，分別佔 35.6、33.3 %；其中較值得關注的是所有 type III meningitis 的案例全部都是新生兒感染的菌株，並且 85 % 都是 LOD 的新生兒，顯見 type III 在 LOD 新生兒的 meningitis 扮演極為重要的角色。到底 serotype III GBS 如何導致新生兒的 meningitis 則是一個非常值得探討的議題。

由於 GBS 的 pathogenesis 至今仍不清楚，故本計畫之第二年主要探討 B 群鏈球菌之表面蛋白的分佈，並分析其與臨床表徵的關係。根據文獻關於 GBS 之表面蛋白以 Alp 蛋白研究較多，已知 Alp 表面蛋白依照基因的相似性約可分四種： $\alpha$ C、Rib、Alp2/3、epsilon (Creti *et al.* 2004)，但也存在其他些微不同的分類(Lindhahl *et al.*, 2005)；截至目前，其種類分佈與血清型、染色體圖譜是否有關並不清楚，所以是本年度研究探討的重點。另外這些基因共通的特性是包含有不同數目的 tandem repeat，並且約佔總基因長度的 60-80%；又 repeat 的數目多樣性可能會影響免疫成效之優劣(Gravekamp *et al.*, 1997; 1998)，但與 GBS 致病的嚴重性則仍無定論 (Lindhahl *et al.*, 2005)，根據 *Haemophilus influenzae* 研究發現 tandem repeat 數目與所導致之疾病嚴重性有關 (Van Belkum *et al.* 1997)，所以本計畫亦擬分析 Rib 蛋白之

tandem repeat 數目的變化，並探討其與 GBS 的 virulence 的關係。

### A. Alp 表面蛋白種類之分佈

本研究利用四種 GBS Alp 表面蛋白專一的引子(Table 1)，針對 165 株血液培養之 GBS 進行 Multiplex PCR 反應，分析其 Alp 表面蛋白的種類分佈，若菌株帶有 $\alpha$ C 表面蛋白的基因則應該在 PCR 電泳上出現 398 bp 的 band，而 Rib 蛋白的基因則應該出現在 295 bp，Alp2/3 與 Epsilon 表面蛋白則分別是 334 與 200 bp (Fig. 2)，由分佈圖顯現在所分析的菌株中 Alp 表面蛋白基因以 *bca*、*alp2* 與 *rib* 為主，其百分比分別為 25.5, 26.1 及 33.3%( Fig. 3)，尤其是在新生兒的感染，*rib* 所佔比例高達 70.5 % (Fig. 4)，推論 Rib 蛋白在 GBS 新生兒血液感染可能扮演相當重要的角色，尤其與成人之感染做比較 (70.5 % vs 19.8 %;  $p < 0.05$ ; Fig. 5)；但到底 Rib 如何參予 GBS 在新生兒的致病機轉應是未來值得深入探討的重點。

### B. 探討各種 Alp 表面蛋白與 B 群鏈球菌的莢膜血清型、染色體基因圖譜與疾病嚴重程度是否相關

交叉分析 Alp 表面蛋白的分佈與莢膜血清型及 PFGE type，也發現 serotype III 的菌株帶有 *rib* 基因的有 82%，而 serotype V 則有 75% 帶有 *alp2/3*，serotype Ib 則有 91% 帶有 *bca* (Table 2;  $p < 0.05$ )；而 PFGE type 的分析也發現 type 1、type 4 與 type 12 則分別與 *rib*、*alp2/3* 與 *bca* 有顯著的關係 (Table 3； $p < 0.05$ )，加上前一年度探討之 serotype 與 PFGE 之關係，都反映出 serotype、PFGE type 以及 Alp 表面蛋白三者之間是明顯相關的，是否是地理因素而造成特定的菌落之優勢抑或是代表著其他意義則有待進一步的分析。此外，分析 157 株 GBS 之 Alp 表面蛋白與臨床表徵的關係，經過統計分析得知其分布是有意義的，尤其是 *rib* 佔所有 meningitis 案例的 76%

(Fig. 6;  $p < 0.05$ )，而 primary bacteremia 則並不專一在哪一種表面蛋白的菌株，而 cellulitis 則以表現 *alp2/3* 與 *bca* 的菌株為主，由 Rib 蛋白的特異性顯見其在 GBS meningitis 可能扮演重要的角色，是值得深入探討的議題。

### C. Rib 蛋白之基因 tandem repeat 數目的分析

根據前面的研究發現 Rib 蛋白與 type III GBS 有顯著的相關，尤其是在新生兒血液感染方面；也已知 Rib 基因帶有 tandem repeat 的特性，並且在電泳或 SDS-PAGE 的分析上都會出現 ladder 的現象，因此本研究針對帶有 Rib 蛋白基因之 53 株菌株，利用專一之引子分析其 repeat 數目(Fig. 7)，由的分佈圖顯現新生兒感染之菌株 high tandem repeat ( $\geq 6$ ) 與 low tandem repeat(0-5)的株數比例大約是 1.6:1，而成人的比例約 3:1(Fig. 8)，顯示相較於新生兒，成人受到 Rib-containing GBS 的感染多是帶有高 repeat 數目的菌株。

### D. 探討 Rib 蛋白基因之 tandem repeat 數目的穩定性

為排除 Rib 基因在 PCR 所呈現 ladder 的特性，是由於同一株菌株之 population 中存在不同 repeat 數目的 colonies 所造成的抑或是其他特殊 molecular mechanism 所造成結果，本計劃進一步由每一菌株挑選五個 single colonies 進行 PCR 分析，發現其 PCR pattern 是均一的(Fig. 9)，代表其 population 中各個 colony 之 Rib 基因的大小是一致的。另外也將 GBS 經過不同時間的培養，取其染色體進行 *rib* 基因之 PCR 分析，以確認 Rib 蛋白基因之 repeat 數目在不同 culture stage 的穩定性，由結果也發現 Rib 基因的 repeat 數目是不受培養時間之長短而改變(Fig. 10)，但是否會隨著不同代數而有所改變，則有待進一步分析。

#### **E. 探討 repeat 數目與 GBS 致病的種類或嚴重程度的關係。**

進一步探討 Rib 蛋白之 tandem repeat 是否與 GBS 之致病的種類有關，由分析的結果顯示 Rib 的 tandem repeat 數目與致病的種類沒有明顯的關係，除了 primary bacteremia 有較多樣性的 repeat range (3-13)，而 meningitis 則 repeat range 由 5-13，二者平均的 repeat 數目相近 (6.9/6.5)；若分析 repeat 數目與個案的年齡的關係，由 clustering analysis 的結果可以看出隨著年齡的增加(Fig. 11)，所感染到的 Rib-containing GBS 其 Rib 的 tandem repeat 的數目也逐漸增加；另外由的平均 repeat 數目也確實可以看到這種趨勢(Fig. 12)。

#### 四、討論

由過去的研究結果發現 GBS 的感染在成人與新生兒的臨床表徵明顯不同，新生兒多以 meningitis、pneumonia 與 primary bacteremia 表現，其中 meningitis 佔 43.2%，並且都是屬於出生 24 小時以後感染( $p < 0.05$ )，代表可能是經由出生之後才由母親或接觸者而感染到 GBS；而 pneumonia 則主要表現在 EOD 的新生兒，尤其是出生 24 小時內即發病的( $p < 0.05$ )，顯現其可能在子宮內或在生產過程經過產道時受到感染。而成人感染的臨床表徵則較不明顯，較值得關注的是有 39.6% 以 primary bacteremia 表現，並不清楚其來源，另外有 25.2% 除了菌血症外同時也表現 cellulitis/necrotizing fasciitis，其因果關係值得深入探討；另外，由於這種 soft tissue infection 的 pathogenesis，其機制至今仍是不清楚，是否與 A 型鏈球菌一樣具有相同的機制，則是未來值得探討的議題。關於 Alp 表面蛋白與疾病的關係，由研究發現新生兒感染之 GBS 有 70.5% 表現 Rib 表面蛋白，而成人感染之 GBS 則主要表現  $\alpha C$  與 Alp2/3 蛋白；由於 Rib 蛋白與 meningitis 有顯著的關係，所以，到底 Rib 在新生兒 meningitis 所扮演的角色，是提供 GBS adhere 到宿主的表面？幫助 GBS internalize 進入宿主細胞？或是促使 GBS 能穿過 blood brain barrier (BBB) 而進入腦細胞以引發發炎的反應？都是未來值得探討的議題。另外， $\alpha C$  與 Alp2/3 表面蛋白是感染成人之 GBS 之主要的 Alp 蛋白，與 Rib 蛋白同樣具有相似的蛋白構造，何以會有宿主的選擇性，並且所造成的臨床表徵也不盡相同，是由於宿主之免疫力運作之結果所造成的？抑或是蛋白本身結構之差異而造成其功能有所不同，而影響其 virulence 或 invasion 的能力，則有待進一步探討。

根據 PCR 的結果顯示，Rib 蛋白基因在不同的臨床菌株之大小表現不同，這種多樣性是由於 tandem repeats 的數目不同所造成，如 PCR 片段大



小有 2.8 kb，則相對的 repeat 的數目應該有 9 個，每一個 repeat 的差距是 237 bp，根據目前的推測，這種 ladder 的現象是由於在 DNA replication 時 *recA*-independent slipped-strand mispairing 所造成(Puopolo *et al.*, 2001)，惟一般 slippage 的 size 大小如真核細胞大都只有數十 bp，而在 *E.coli* 之 *tetA* 的 direct repeat 也只有 101bp，所以如 Rib 蛋白基因的 repeat size 大到 237bp，slipped-strand mispairing 是否也能正常進行，或是存在有 GBS 專一的模式則有待證實；另外，這種 *in vitro* 的模式是否也是 GBS 在 *in vivo* 下 tandem repeat deletion 機制，則仍不清楚。根據  $\alpha$ C 蛋白的研究推論，Rib 蛋白在 GBS *in vivo* 其 size 是會變的，但根據研究的結果顯示 Rib 蛋白在 GBS 的不同 culture stage，其基因的大小是穩定的，亦即 laddering pattern 是不變的；然而是否只有在母親 passage 到胎兒，或是特定的環境之下，才會啟動這種機制，則有待進一步的探討。又到底這種特性對 GBS 而言，是為 survival 或 virulence 也是值得研究的議題。另外，實驗過程中也發現，將 Rib 含 tandem repeats 的 DNA 片段構築在 vector 上並 transform 到 *E.coli*，似乎也會有同樣的情形，所以，顯然這種特性不是只有在 GBS 才會發生，則比較可能的原因是由於構造上的特殊所造成。

已知有許多病原菌與 GBS Rib 蛋白一樣具有 tandem repeat 的現象，根據目前的了解這些 repeats 可能扮演著 gene stability, gene transfer, phase variation, 或 antigenic variation 的角色(Rocha *et al.*; 1999)；根據本研究的結果，在不同培養時間下，Rib 的 repeats 數目並沒有發生改變；或許利用 RT-PCR 進一步分析在不同 stage 之下 *rib* 基因的表現情形，應可以釐清是否具有 phase variation 的功能；另外，一般 phase variation 的 repeats 不管是在 ORF 或 promoter region，通常只有數十 bp，沒有如 Rib 這種長的 repeat，因此，目前比較被接受的推論可能與 antigenic variation 有關。當然，Rib 是否

與 $\alpha$ C 表面蛋白一樣具有 adhesion, internalization 的角色仍有待進一步分析。另外，關於 tandem repeat 區域的功能，根據 $\alpha$ C 目前的報告指出，repeat 部分可能是 protective immunity 的 target 位置(Kling *et al.*, 1991; Madoff *et al.*, 1997)，但是否 immunize repeat 部份的蛋白也可以引發 protective immunity 則不得而知。另外，Rib 蛋白在 in vivo 情況下，是否也是很穩定，或是類似 $\alpha$ C 蛋白一樣會有 escape immunity 的現象發生(Gravekam *et al.*, 1998)，則有待進一步探討。

Rib 蛋白 tandem repeat 的數目在臨床菌株的表現相當多樣，到底這種不同的 repeat 所代表的意義是如何，是否與 GBS 的 virulence 有關，目前尚無定論；根據本計劃研究的結果，Rib 基因 repeat 數目的多寡與致病的種類沒有顯著的關係，但由於 Rib 蛋白是 serotype III GBS 主要的 Alp 表面蛋白，又 type III 是主要造成新生兒 meningitis 的 serotype，所以推測 Rib 之 tandem repeat 可能與 GBS 之 virulence 或致病的嚴重程度有關。根據 $\alpha$ C 蛋白的研究顯示當老鼠 pretreat 高 repeat  $\alpha$ C 蛋白的抗體後，較少 repeat 的  $\alpha$ C-containing GBS 會比高 repeat 的  $\alpha$ C-containing GBS 具有較強的 virulence，但對於 untreat 的老鼠，則 repeat 的高低是沒有差別的(Gravekam *et al.*, 1998)，意即在 nonimmune 的情況下，不管 repeat 多寡的  $\alpha$ C-containing GBS 都具有相同的 virulence，而在有抗體的存在情況之下，低 repeat 的 GBS 可能由於受到 capsule 等表面分子的遮蔽作用，比較不會受到抗體的攻擊，因此顯現較強的 virulence。然而，一般自然產生的 Alp 蛋白都帶有多 tandem repeat，所以理論上較長 repeat 的蛋白對人類而言應有較強的 virulence，而較少 repeat 菌株則可能是經由宿主的免疫力作用下，GBS 為躲避免疫攻擊而進行縮減的結果，所以會有各種大小不同之 Alp 蛋白的菌株產生。在人體的 immune 系統作用之下，到底是低 repeat 的 Rib 蛋白具有較強的 virulence

還是高 repeat 的 Rib? 根據本計劃新生兒的分析結果顯示, 不管是 high tandem repeat 或是 low tandem repeat 的 Rib-containing GBS, 對新生兒都有相近的 virulence, 但相較之下, 在成人的感染則顯現以帶有 high tandem repeat 的 Rib-containing GBS 較多; 這樣的結果似乎顯示當新生兒免疫能力尚不健全時, 不管是 high tandem repeat 或是 low tandem repeat 的 Rib-containing GBS, 對新生兒的感染能力似乎是沒有差別的, 但對免疫能力較健全的成人而言, 則 high tandem repeat 的 Rib-containing GBS 比 low tandem repeat 有較強的 virulence。然而, 對於大於 70 歲的成人, 理論上其與新生兒同屬於免疫力較差的一群, 何以其受到的 GBS 感染都是屬於 high tandem repeat 的 Rib-containing GBS? 推究其可能的原因在於高齡的病患除免疫功能較差外, 同時也受到較多的 underline diseases 與慢性藥物的多重作用, 造成即使其免疫反應有利於 high/low tandem repeat 的 Rib-containing GBS 的感染, 但複雜的環境下使之反而需要 high virulence 之 high tandem repeat 的 Rib-containing GBS 才容易引發感染, 所以若分析  $\geq 70$  歲的 8 位成人的個案中, 有 6 位是平均 11.5 個 repeats, 所以符合前述的推論。因此, 目前比較合理的看法, 認為 Alp 蛋白的 tandem repeat 的數目應是二種選擇力量作用下所呈現的結果: 1) 細菌的 virulence 與 2) 宿主的免疫力, 細菌傾向以含多 repeat 蛋白的菌株 virulence 較強, 在宿主的免疫的壓力之下, 多 repeat 蛋白有利於快速改變 repeat 數目使菌株能逃脫宿主免疫的攻擊, 以便有機會再擴展 repeat 以散播到新的宿主, 所以可以產生許多不同較低 repeat 數目之蛋白的菌株(Lindahl et al., 2005), 但對宿主而言, 較少 repeat 數目的菌株由於 delete 的空間較少, 所以有利於宿主免疫細胞的攻擊。然而, 宿主的 underline diseases 與所服用之藥物對人體生態環境的影響, 應該也是值得參考的因素。

## 五、結論與建議

本研究的結果顯示所收集之 GBS 臨床株主要表現三種 Alp 表面蛋白： $\alpha$ C、Alp2/3 與 Rib，明顯地 Rib 蛋白在 GBS 新生兒感染可能扮演重要的角色；而成人 GBS 的感染則以帶有 $\alpha$ C 與 Alp2/3 表面蛋白為主要；另外結合過去對 serotype 與 PFGE 的研究，發現 serotype、PFGE type 以及 Alp 表面蛋白三者之間是明顯相關的，顯見南台灣的 GBS 優勢種有：serotypeIII/PFGE type1/Rib、serotypeV/PFGE type4/Alp2/3 與 serotype Ib/PFGE type12/ $\alpha$ C。另外，由 Alp 表面蛋白與致病種類的關係顯現 Rib 蛋白與 meningitis 有顯著的關係，其他則比較沒有特異性。

Rib 基因在 *in vitro* 的環境下，其 repeat 數目是不受培養時間之長短而改變的。但不同代數之間、特定的條件或 *in vivo* 的情況之下，是否是會改變則有待進一步釐清。在 tandem repeat 的角色方面，由研究發現，repeat 數目的多寡與致病的種類與嚴重程度並無明顯的相關，最主要也是最嚴重的新生兒 GBS 感染的二種臨床表徵 meningitis 與 primary bacteremia，其平均 repeat 數目是相近的，其他如 arthritis、pneumonia 等由於樣品數不夠多 (3； 6)，因此無法下定論。但在 virulence 方面的關係可能是有意義的，因為相較於新生兒，成人受到 Rib-containing GBS 的感染多是帶有高 repeat 數目的菌株，是否代表高 repeat 數目的 Rib-containing GBS 具有較高的 virulence，有待更多的證據來確認。

由本計劃之結果顯現 Rib 蛋白在 GBS 新生兒感染扮演重要的角色，尤其與 meningitis 有關，由於新生兒的 GBS 感染有 40-60% 會導致 meningitis，也具有高死亡率，即使是存活下來，預後的情形也是相當不好的，通常會有永久性的神經異常(permanent neurological sequelae)、腦性麻痺(cerebral palsy)、失明與失聰等後遺症，因此值得高度重視。另外，若能了解 Rib 在

GBS meningitis 的致病機制，或者釐清 Rib 蛋白 tandem repeat 所扮演的角色，將有助於未來在疫苗或者是藥物研發上提供新的方針，以達到健康促進與預防醫學的目的。

## 六、參考文獻

- Baron, MJ, Bolduc GB, Godberg MB, Auperin TC, Madoff LC: Alpha C protein of group B streptococcus binds host cell surface glycosaminoglycan and enter cells by an actin-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2004; 279: 24714-23.
- Beckmann C, Waggoner JD, Harris TO, Tamura GS, Rubens CE: Identification of novel adhesions from group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect Immun* 2002; 70: 2869-76.
- Bevanger L, Naess AI: Mouse-protective antibodies against the Ibc proteins of group B streptococci. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1985; 93:121-4.
- Blancas D, Santin M, Olmo M, Alcaide F, Carratala J, Gudiol F: Group B streptococcal disease in nonpregnant adults: incidence, clinical characteristics, and outcome. *Eu. J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:168-73.
- Bolduc GR, Baron MJ, Gravekamp C, Lachenauer CS, Madoff LC: The alpha C protein mediates internalization of group B streptococcus within human cervical epithelial cells. *Cell Microbiol* 2002; 4:751-8.
- Chung MY, Ko DJ, Chen CC, Huang CB, Chung CH, Chen FS, Hwang KP: Neonatal group B streptococcal infection: a 7-year experience. *Chang Gung Med J* 2004; 27: 501-8.
- Creti R, Fabretti F, Orefici G, von Hunolstein C: Multiplex PCR assay for direct identification of group B Streptococcal Alpha-protein-like protein genes. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1326-9.
- Ellen RP, Gibson RJ: Parameters affecting the adherence and tissue tropisms of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 1974;9:85-91.
- Farley MM: Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Di.* 2001; 33: 556-61.
- Fischetti VA: Streptococcal M protein. *Scientific American* 1991; 264:58-65.
- Gase K, Ozegowski J, Malke H: The *Streptococcus agalactiae hylB* gene

- encoding hyaluronate lyase: completion of the sequence and expression analysis. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1398:86-98.
- Gravekamp C, Rosner B, Madoff LC: Deletion of repeats in the alpha C protein enhances the pathogenicity of group B streptococci in immune mice. *Infect Immun* 1998; 66:4347-54.
- Gravekamp, C, Kasper DL, Michel JL, Kling DE, Carey V, Madoff LC: Immunogenicity and protective efficacy of the alpha C protein of group B streptococci are inversely related to the number of repeats. *Infect Immun* 1997; 65:5216-21.
- Hafner E, Sterniste W, Rosen A, Schuchter K, Plattner M, Asboth F, Philipp K: Group B streptococci during pregnancy: a comparison of two screening and treatment protocols. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 677-681
- Hammerschmidt S, Bethe GH, Remane P, Chhatwal GS: Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1999; 67:1683-7.
- Harrison, LH, Elliott JA, Dwyer DM, Libonati JP, Ferrieri P, Billmann L, Schuchat A.: Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. *J Infect Dis* 1998;177:998-1002.
- Ho HY, Wu CT, Ku YT, Huang FY, Peng CC: Group B streptococcal infection in neonates: an 11-year review. *Aca Paediatr Tw* 1999; 40:83-6.
- Hollingshead SK, Fischetti VA, Scott JR: A highly conserved region present in transcripts encoding heterologous M proteins of group A streptococci. *Infect Immun* 1987; 55:3237-9.
- Jones KF, Hollingshead SK, Scott JR, Fischetti VA: Spontaneous M6 protein size mutants of group A streptococci display variation in antigenic and opsonogenic epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:8271-5.
- Kling DE, Gravelamp C, Madoff LC, Michel JL: Characterization of two

- distinct opsonic and protective epitopes within the alpha C protein of the group B *Streptococcus*. *Infect Immun* 1997; 65:1462-7.
- Ko WC, Lee HC, Wang LR, Lee CT, Liu AJ, Wu JJ: Serotyping and antimicrobial susceptibility of group B streptococcus over an eight-year period in southern Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:334-9.
- Lancefield R, McCarty CM, Everly WN: Multiple mouse-protective antibodies direct against group B streptococci. Special reference to antibodies effective against protein antigens. *J Exp Med* 1975; 142: 165-79
- Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Tchiman Y, Ohtsuka H, Kaku M, Paoletti, P, Ferrieri LC, Madoff LC: Serotype VI and VIII predominate group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J Infect Dis* 1999; 179:1030-3.
- Lachenauer CS, Creti R, Michel JL, Madoff LC: Mosaicism in the alpha-like protein genes of group B streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9630-5.
- Lindahl G, Akerstrom B, Vaerman JP, Stenberg L: Characterization of an IgA receptor from group B streptococci: Specificity for serum IgA. *Eur J Immunol* 1990; 20:2241-7.
- Lindahl G, Stalhammar-Carlemalm M, Areschoug T: Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:102-27
- Liu JW, Wu JJ, Ko WC, Chuang YC: Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of invasive group B streptococcal infections in nonpregnant adults in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1997; 96:628-33.
- Madoff LC, Michel JL, and Kasper DK. A monoclonal antibody identifies a protective C-protein alpha-antigen epitope in group B *Streptococcus*. *Infect Immun*. 1991; 59:204-10.
- Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, Wessels MR: Prevention of C3



- deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect Immun* 1992; 14:3986-93.
- Michel JL, Madoff LC, Kling DE, Kasper DL, Ausubel F M: Cloned alpha and beta C-protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity. *Infect Immun* 1991; 59:2023-8.
- Michel JL, Madoff LC, Olson K, Kling DE, Kasper DL, Ausubel FM: Large, identical, tandem repeating units in the C protein alpha antigen gene, *bca*, of group B streptococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:10060-4.
- Noshina K, Suzuke Y, Nishida H, Kaneko K, Matsuda S, Kobayashi M, Kadoi N: Trend of neonatal group B streptococcal infection during the last 15 years. *Pediatr Int* 2002; 44: 641-6.
- Puopolo KM, Hollingshead SK, Carey VJ, and Madoff: Tandem repeat deletion in the alpha C protein of group B streptococcus is *recA*-independent. *Infect Immun* 2001; 69: 5037-45.
- Rocha EP, Danchin A, and Viari A: Functional and evolutionary roles of long repeats in prokaryotes. *Res Microbiol.* 1999; 150:725-33.
- Schuchat A: Group B streptococcus. *Lancet* 1999;353: 51-6.
- Schuchat A, Zakikhany K, Schreiner M, Frank R, Spellerberg B, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ: A fibrinogen receptor from group B streptococcus interacts with fibrinogen by repetitive unit with novel ligand binding sites. *Mol Microbiol* 2002; 46: 557-69.
- Seepersaud R, Hanniffy SB, Mayne P, Sizer P, Le Page R, Wells JM: Characterization of a novel leucine-rich repeat protein antigen from group B Streptococci that elicit protective immunity. *Infect Immun* 2005; 73: 1671-83
- Stalhammar-Carlemalm M, Stenberg L, Lindahl G: Protein Rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *J Exp Med* 1993; 177:1593-603.

- Stalhammar-Carlemalm, M, Areschoug T., Larsson C, Lindahl G: The R28 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. *Mol Microbiol* 1999; 331:208-19.
- Trijbel-Smeulders MAJM, Adriaanse AH, Gerards LJ, Kimoen LL: Strategy to prevent neonatal early-onset group B streptococcal disease in the Netherlands. *Rev Med Microbiol* 2003; 14:35-9.
- Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ: Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1999; 67:4720-4.
- Van Belkum A, Scherer S, Van Leeuwen, Willemsse D, Van Alphen L, Verbrugh H: Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1997; 65:5017-27
- Volumenie JL, Fernandez H, Vial M, Lebrun L, Frydman R: Neonatal group B streptococcal infection. Results of 33 months of universal maternal screening and antibioprohylaxis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 64: 79-85.
- Wastfelt M, Stalhammar-Carlemalm M, Delisse AM, Cabezon T, Lindahl G: Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure. *J Biol Chem* 1996; 271:18892-7.
- Zangwill KM, Schuchat A, Wenger JD: Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. *Morbid Mortal Weekly Rep* 1992; 41:25-32.

## 七、圖、表

TABLE 1. 本研究所設計之 Group B Streptococcus PCR 增幅反應引子

Primer	mer	Sequences <sup>a</sup> (5'-3')	Location (bp)	Reference
Alpha C reverse	24	TACATGTGGTAGTCCATCTTCACC	428	Creti <i>et al.</i> , 2004
Rib reverse	25	CATACTGAGCTTTTAAATCAGGTGA	325	Creti <i>et al.</i> , 2004
Alp2/3 reverse	29	CACTCGGATTACTATAATATTTAGCAC	364	Creti <i>et al.</i> , 2004
Epsilon reverse	27	CCAGATACATTTTTTACTAAAGCGG	230	Creti <i>et al.</i> , 2004
Forward	24	TGATACTTCACAGACGAAACAACG	30	Creti <i>et al.</i> , 2004
Rib-NT-r	25	TT <u>GCGGCCG</u> GCATCTGGGATTCGAGG	690	This study
Rib-CT-f	24	CC <u>CATGGT</u> TACCTCGAATCCCAGAT	673	This study
Rib-CT-r	25	TT <u>GCGGCCG</u> GCTGTACGTGGATCGAC		This study
Rib-NcoI-f <sup>a</sup>	29	CCCATGGCTGAAGTAATTTTCAGGAAGTGC	166	Seepersaund et
R-NotI-r <sup>a</sup>	37	TTGCGGCCGTCATCCTCTTTTTTCTTAGAAACAG	4167	al.2005

<sup>a</sup>: Restriction sites used for cloning purposes are in underline.

Table 2. Correlation of surface protein gene profiles and serotype

	<i>bca</i>	<i>rib</i>	<i>alp-2</i>	<i>epsilon</i>	none	total
<b>Ia</b>	4		1	6	6	17
<b>Ib</b>	10 <sup>a</sup>		1			11
<b>II</b>	2	1				3
<b>III</b>	1	37 <sup>b</sup>	6	1		45
<b>V</b>			15 <sup>c</sup>	3	2	20
<b>VI</b>	1			1		2
<b>Non</b>	3	1	3			7
<b>total</b>	21	39	26	11	8	105

a, b, c:  $p < 0.05$

Table 3. Correlation of surface protein gene profiles and PFGE type

	<i>bca</i>	<i>rib</i>	<i>alp-2</i>	<i>epsilon</i>	none	total
<b>1</b>		12 <sup>b</sup>	1	3		16
<b>3</b>	1	1	3			5
<b>4</b>			9 <sup>c</sup>			9
<b>5</b>	1	4	1			6
<b>7</b>		3				3
<b>9</b>	1					1
<b>10</b>	1	4				5
<b>11</b>					1	1
<b>12</b>	4 <sup>a</sup>			3	1	8
<b>20</b>					2	2
<b>27</b>		1				1
<b>total</b>	8	25	14	6	4	57

a, b, c :  $P < 0.05$

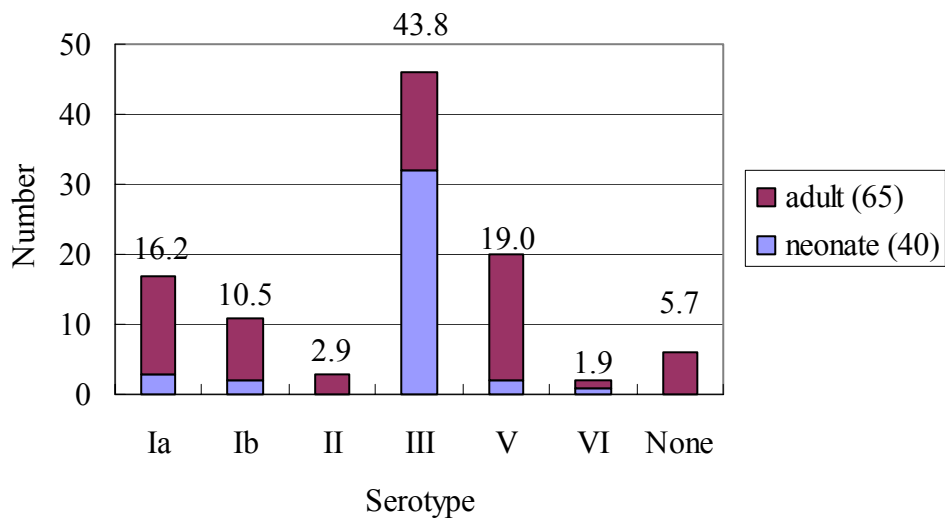


Fig 1. Distribution of serotype in 105 isolates recovered from patients of bacteremia

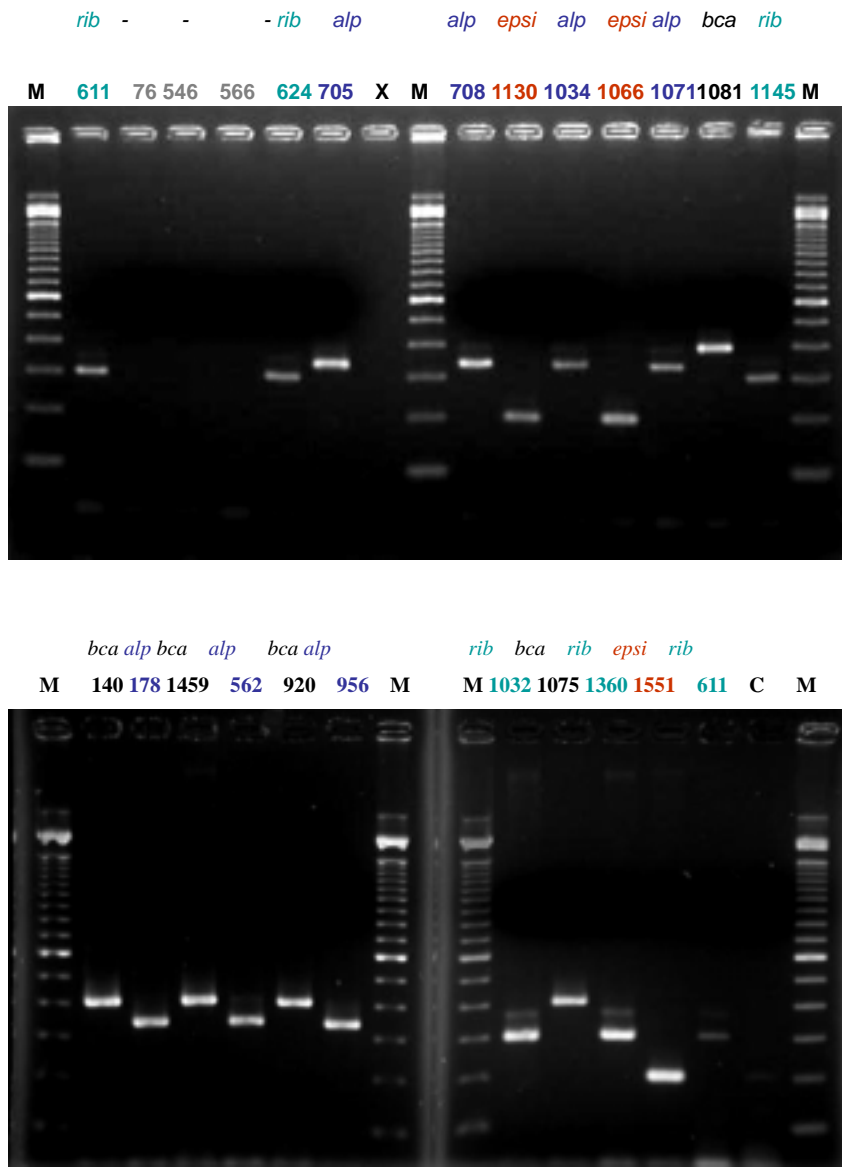


Fig. 2 Gel electrophoresis of multiplex PCR amplification products.

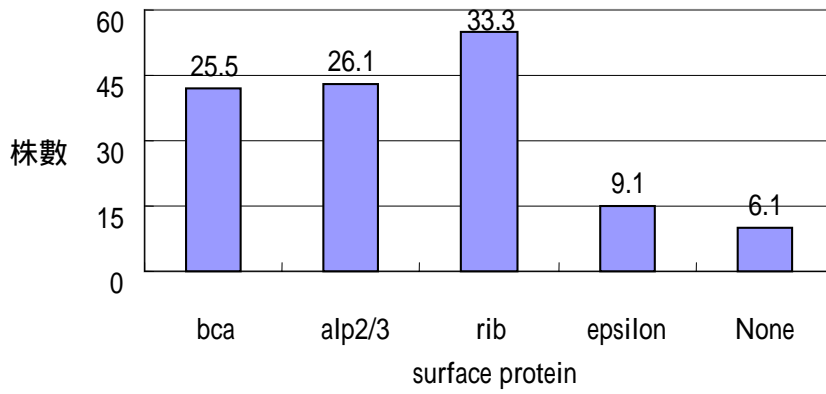


Fig. 3 Distribution of Alp protein genes in 166 isolates recovered from bloodstream

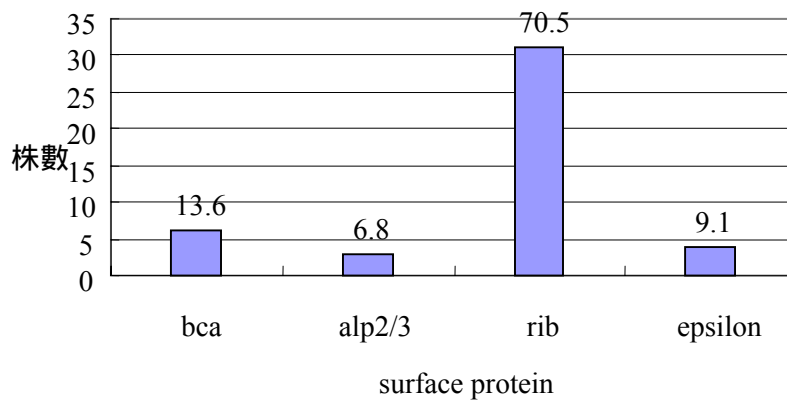


Fig. 4 Distribution of Alp protein genes in 44 neonatal isolates recovered from bloodstream

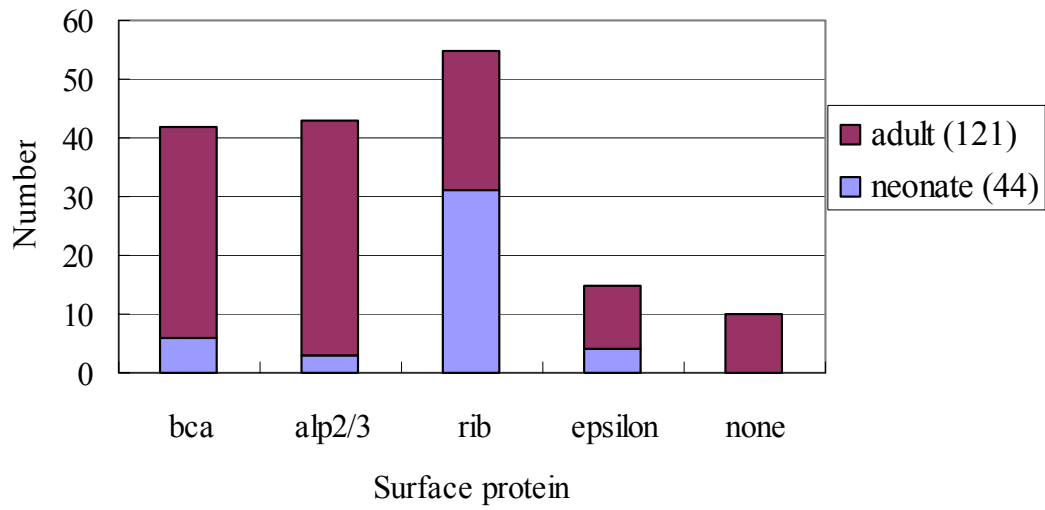


Fig. 5 Distribution of Alp protein genes among bloodstream isolates recovered from neonates and adults

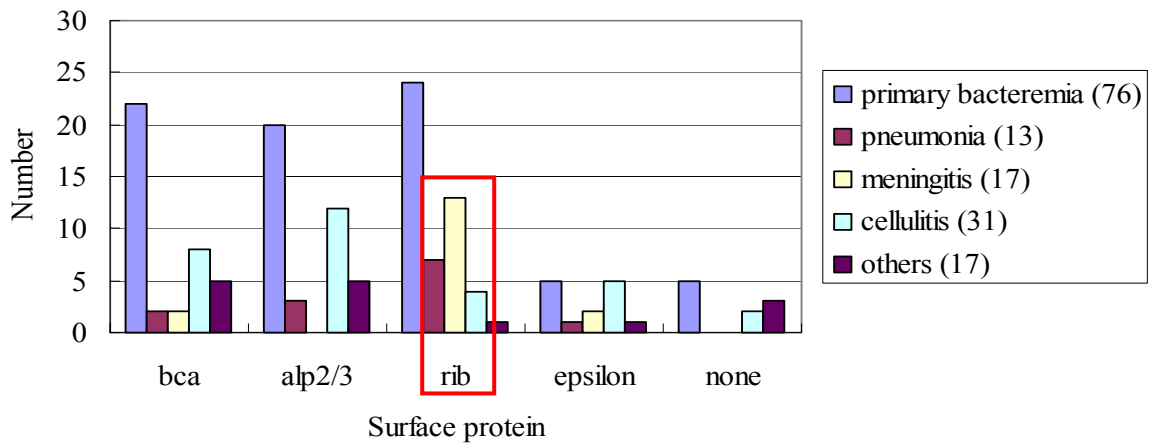
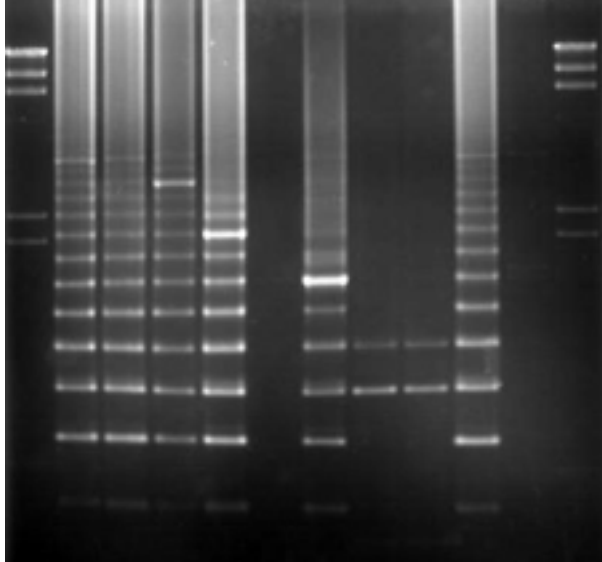


Fig. 6 Distribution of Alp surface proteins among different clinical manifestations

M 611 611 15 506 1081 51 1066 1034 974 870 M



M 611 375 457 709 755 M 974 812 C M

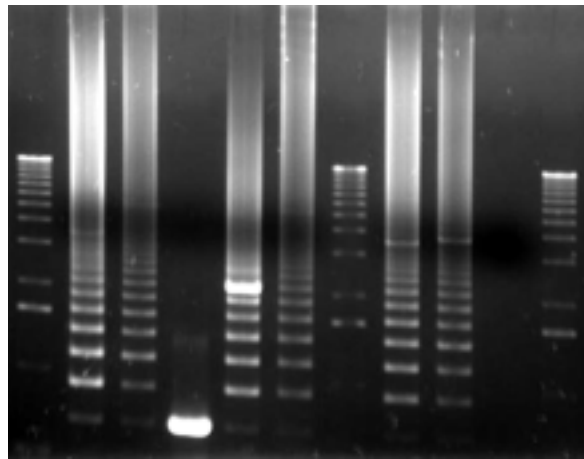


Fig. 7. Gel electrophoresis of *rib* PCR amplification products.



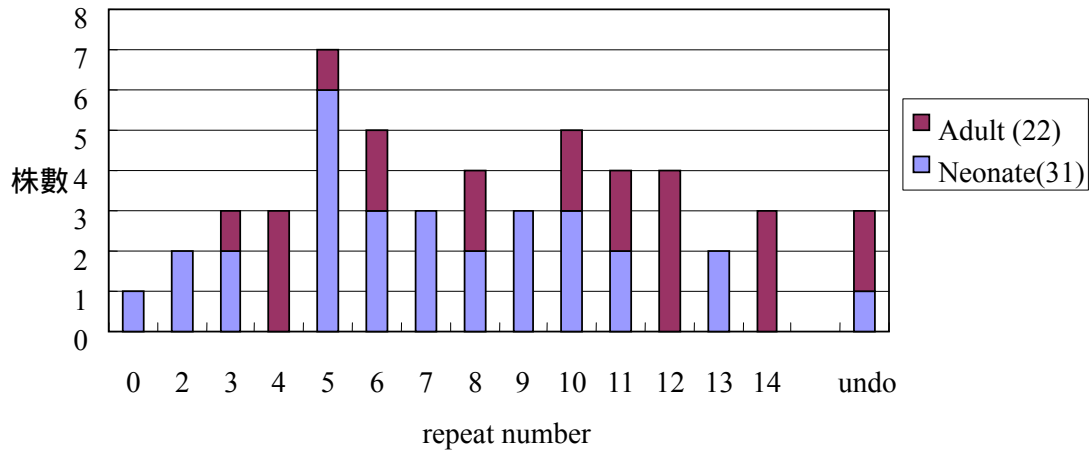


Fig. 8 Distribution of repeat number in rib gene among neonates and adults

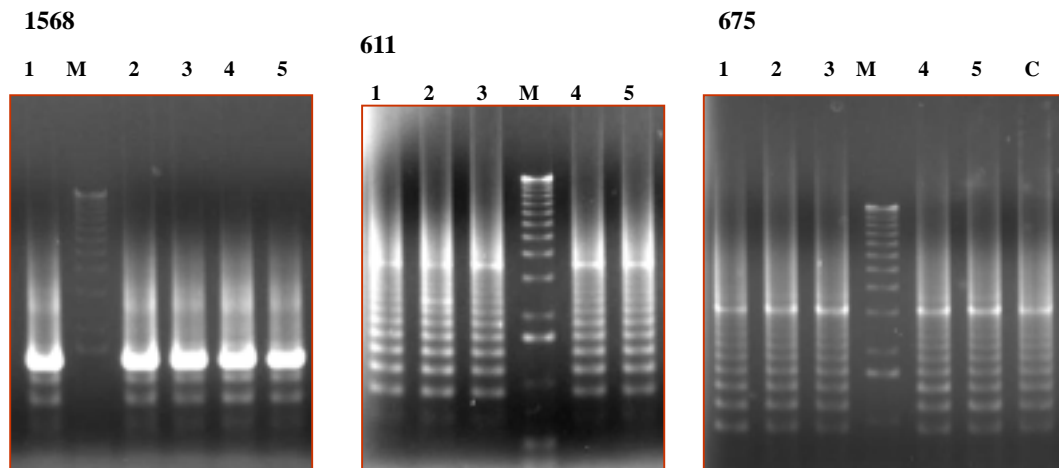


Fig. 9 Uniformity of repeat number of *rib* genes

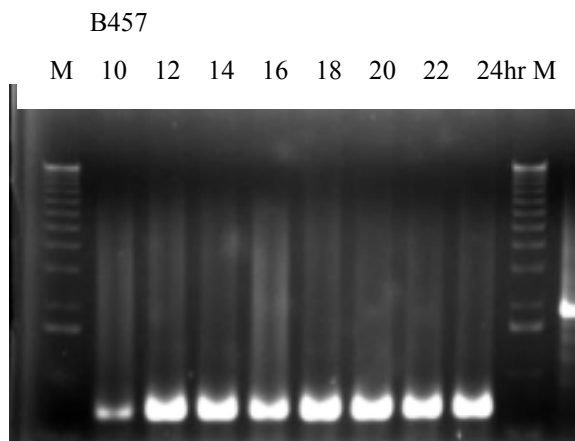
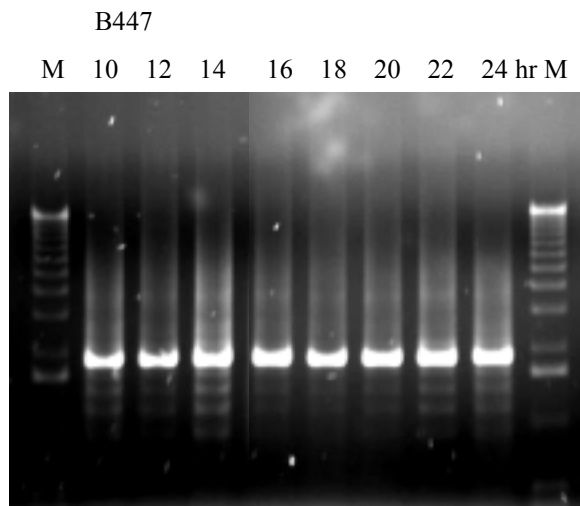


Fig. 10 Stability of repeat number of *rib* gene in different culture time.

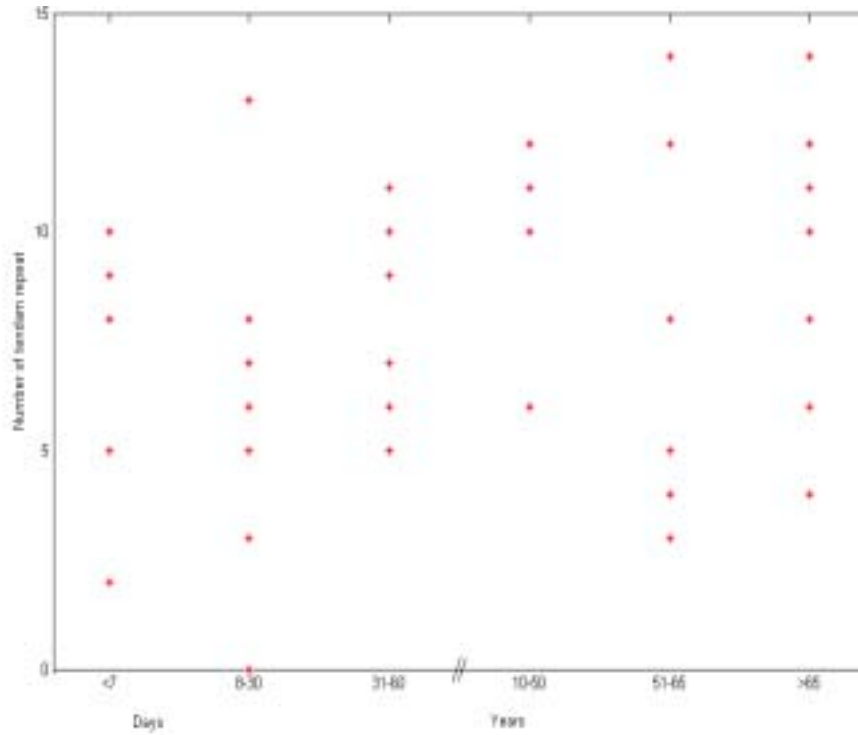


Fig. 11 Clustering analysis of age and tandem repeats of *rib* gene

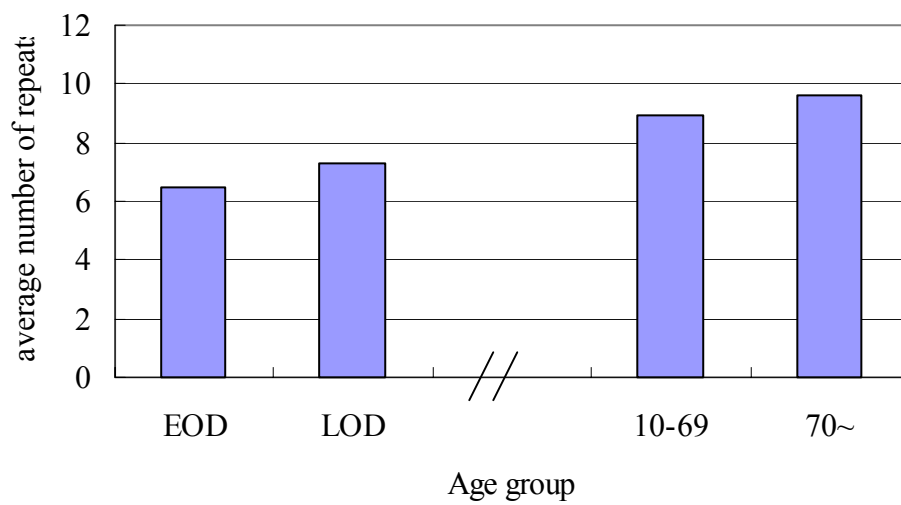


Fig. 12 Average number of Rib tandem repeats among different age groups