

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

A 群鏈球菌致病因子與疾病相關性之研究

Study of virulence factors and diseases correlation in group A streptococci

計畫編號：NSC 89-2320-B-041-006

執行期限：88 年 12 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：蔡佩珍 助理教授 (pjtsai@mail.tcu.edu.tw)

執行機構及單位名稱：嘉南藥理學院藥學系

一、中文摘要

A 群鏈球菌是引起人類重要傳染疾病的病原菌之一。在台灣各地不時有學齡兒童發生猩紅熱之疫情、偶有急性中毒性休克症候群、壞死性肌膜炎、或噬肉菌感染之報導，然而引發多樣性 A 群鏈球菌感染的致病因子，在世界各地的分布情形各不相同，因此在台灣探討 A 群鏈球菌致病因子與疾病相關性有其必要性。總觀 A 群鏈球菌致病因子很多，不論是破壞免疫球蛋白或補體，都會干擾宿主的防禦機制，其中以 M protein, Opacity factor, Protein F, Plasmin(ogen) receptor (Plr), Streptokinase (SK), Streptolysin O、S, Streptococcal pyrogenic exotoxin A、B、及 C 與疾病嚴重度有很強的相關性。過去我們曾利用 PCR 及 Southern hybridization 的方法偵測 *speA*, *speB*, *speC*, 及 *speF* 等基因型發現在侵襲性菌株與非侵襲性菌株中並無顯著的差異性。除此之外，目前台灣地區對外有關 A 群鏈球菌所發表的文獻，皆無 A 群鏈球菌致病因子與疾病相關性之報告。因此本計劃收集成大醫學中心 A 群鏈球菌臨床菌株，針對 SPE A、SPE B、及 SPE C 之表現型，*speA* 基因亞型分型作分析，並與 M protein 之分型作比對，建立台灣地區 A 群鏈球菌之監視管制系統。再經以統計方法分析 A 群鏈球菌其致病因子（基因型或表現型）與疾病之相關性，藉以瞭解本地區 A 群鏈球菌致病因子的分佈情形。由於台灣各地不時有 A 群鏈球菌嚴重感染之報導，有效分析各種不同致病因子，將有助於臨床診斷及治療，並提供衛生單位作為疫情控制之指標。

關鍵詞：A 群鏈球菌、*speA* 基因亞型

Abstract

Streptococcus pyogenes, group A streptococcus (GAS), is the major causative agent of a number of human diseases. Recently, striking increase in the frequency and severity of streptococcal infections included soft tissue necrosis, toxic shock-like syndrome, and scarlet fever in schooled children in Taiwan. However, the distribution of streptococcal virulence factor is worldwide different. Therefore, it is important to study of the streptococcal virulence factors in Taiwan. There are many streptococcal virulence factors, beside disruption the immunoglobulin or complement, all of them have the ability to interfere the host defense system. Among them, the M protein, opacity factor, protein F, plasmin(ogen) receptor (plr), streptokinase (SK), streptolysin O, S (SLO, SLS), streptococcal pyrogenic exotoxin A, B, and C (SPE A, B, C) have highly correlation with the clinical disease. We have demonstrated that neither the presence of *speA*, *speC*, *speB* or *speF* of the isolates is implicated in any particular clinical syndrome of patients with invasive GAS diseases by PCR and Southern hybridization methods. In addition, there is no any report to correlate the streptococcal virulence factors with clinical disease in Taiwan. To determine whether the spectrum of invasive GAS diseases in Taiwan parallels the increasing incidence and severity seen in other countries, we conducted reviewing all invasive GAS infections at Cheng Kung hospital centers in southern Taiwan. In this proposal, first, the phenotype of SPE A, B, C, and the subtypes of *speA* will be established and compared with the M protein serotype providing a GAS

infection surveillance system in Taiwan. Using the statistic analysis to understand the relationship between the virulence factors and the clinical disease. Base on these information, it will not only provide a better clinical care but also provide a valuable information for epidemiological study.

Keywords: group A streptococcus, *speA* subtype

二、緣由與目的

化膿性鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 是引起人類重要疾病之致命菌之一。此菌在臨床上可廣泛的引起多種疾病。過去由於抗生素療法進步及公共衛生的改進,此種 A 型鏈球菌感染之病例已顯著減少,且其併發症和死亡率亦已大幅降低。但自 1980 年代中期以來,此菌感染似有捲土重來之趨勢。近幾年來,台灣各地不時有 A 群鏈球菌流行性感染而導致猩紅熱的疫情報導,不只感染病例增加,其臨床上之表現不但多樣性,而且嚴重程度亦大大提高 (Stevens, 1992)。台灣地區因感染 A 群鏈球菌而引發之扁桃腺炎、咽喉炎、膿胞疹及蜂窩性組織炎相當常見,另外經由侵襲性菌株感染而產生毒性休克症候群症狀之病例亦時有所聞,根據高雄榮民總醫院與成大醫院的臨床研究報告指出,遭 A 群鏈球菌感染而引發毒性休克症候群之病人雖然經由適當的抗生素與外科治療,仍有許多患者於入院後短時間內死亡 (Chen et al., 1990; Wann et al., 1995; Yang et al., 1997; Hsueh et al., 1998)。在 1996 年 7 月份的行政院衛生署疫情報導中指出,1991~1994 年臺灣各醫學中心因 A 群鏈球菌感染引發嚴重性感染共 27 個病例,病發部位以四肢為主,均以抗生素合併外科手術治療,但死亡率還是高達 22.2% 以上 (行政院衛生署疫情報導, 1996)。如今在台灣各地不時有 A 群鏈球菌感染之病例、學齡兒童發生猩紅熱之疫情、以及噬肉菌感染之報導,如何有效的鑑定、治療及預防各種不同症狀之 A 群鏈

球菌感染為一重要課題。

自 1980 年以來,在北美及歐洲國家的研究指出,大部分嚴重性的 A 群鏈球菌感染,主要為某幾群特定的 M protein 血清型,此外,其菌株多帶有 A 群鏈球菌之熱原性外毒素 (Centers for Diseases Conroles and Prevention, 1994; Spencer, 1995)。然而,從最近的研究報告指出,引發嚴重性 A 群鏈球菌感染的熱原性外毒素,及 A 群鏈球菌的 M protein 血清型,在世界各地的分布情形卻各不相同 (Carapetis et al., 1995; Kiska, 1997)。但臺灣在過去幾年來,只有少數幾篇有關 A 群鏈球菌的臨床報告,缺乏深入探討細菌本身的研究。為了更了解臺灣地區病例不斷增加及越趨嚴重的可能性,我們收集近四年來南臺灣兩大教學醫院所分離之 A 群鏈球菌,分析南臺灣 A 群鏈球菌致病因子的分佈情形。由結果顯示,南臺灣 A 群鏈球菌株蛋白水解酵素扮演著一個不可忽視的角色。

由於先前的結果只針對臨床菌株分析致病因子之基因型作分析,因此進一步以西方墨漬法偵測這些菌株是否分泌熱原性外毒。此外,根據 Nelson et al. (1991) 的分析, *speA* 具有四種 alleles, 當中又以 *speA2* 與 *speA3* 為引發毒性休克症候群的主要基因型。因此進一步以 DNA 序列分析南台灣臨床菌株中 *speA* 基因的亞型。

三、結果與討論

1994 年, LaPenta 等人, 首先提出證據 A 群鏈球菌可以經由 actin polymerization 的方式可進入呼吸道上皮細胞內,而打破以往 A 群鏈球菌是寄生於細胞外的細菌之觀念。此外, 1995 年, Österlund 等人,提出對於不能用 penicillin 根除 A 群鏈球菌所感染之咽喉炎,若改用能進入細胞內的藥物,如: clindamycin、rifampicin 等,即可治癒病人,因此從臨床治療的觀點及電顯證實 A 群鏈球菌可為細胞內寄生的細菌。A 群鏈球菌侵入呼吸道上皮細胞的感染能力,可能有利於細菌

更侵入深層組織、或躲避宿主免疫系統的攻擊。

至於蛋白水解酵素，SPE B，在 A 群鏈球菌引發上皮細胞凋亡的過程中所扮演的角色，從使用 A 群鏈球菌野生株，及其蛋白水解酵素突變株，分別感染上皮細胞，發現具蛋白水解酵素的菌株可引發較大量的自殺性死亡細胞。利用共焦顯微鏡在細胞質內也可觀測到 A 群鏈球菌的存在，因其周圍分布著較高量的 SPE B，在雙重染色的結果下因而導致呈現黃色的顆粒狀。此外，並做 X-Z 軸的切面，確實觀察到 SPE B 及 A 群鏈球菌位於細胞內。由此得知，A 群鏈球菌野生株感染入細胞內確實可表現出 SPE B。因此 A 群鏈球菌之 SPE B 可能是在野生株感染入細胞內後，因大量表現而增強細胞凋亡的現象。由於已知驅動細胞凋亡的機轉中，細胞內部一些特定 caspase 家族的蛋白水解酵素之活化，可啟動細胞凋亡的一連串反應，同時也可能造成發炎反應的發生 (Savill et al., 1993)。已知 A 群鏈球菌的蛋白水解酵素，與 caspase-1，同為 cysteine protease 且生物活性類似，可活化 IL-1 β 的前驅物 (Kapur et al., 1994)，因此 A 群鏈球菌的蛋白水解酵素，SPE B，可能扮演例如活化 caspase-1 的角色。但是，由於不具蛋白水解酵素的突變株所引發細胞凋亡的現象，亦可為 caspase-1 抑制劑阻斷，因此除 SPE B 外，可能菌體本身還有其他活化 caspase-1 而引發細胞凋亡的分子存在。

由於已知 A 群鏈球菌的蛋白水解酵素於 1994 年已證實為 SPE B，具有多方位的生物性功能，其基因位於染色體上。本研究以各種不同蛋白水解酵素的抑制劑，取菌體培養之上清液經 azocasein assay 分析此蛋白水解酵素之特性，其中只有 cysteine protease 抑制劑有抑制效果，其餘 metalloprotease 抑制劑均無效，因此從實驗結果推斷，此蛋白水解酵素為一 cysteine protease。美國 A 群鏈球菌 genome project 的主持人 Ferretti 指出，在分析解讀 A 群鏈球菌 (SF370, M1, T1/19/8) 的 genome

中，A 群鏈球菌除 SPE B 外還具有 6 個蛋白水解酵素，但均為 metalloprotease，(<http://www.genome.ou.edu/>)，因此在菌體培養之上清液中此蛋白水解酵素的活性，主要可能為由 SPE B 所造成。

由於先前的結果只針對臨床菌株分析致病因子之基因型作，因此進一步以西方墨漬法偵測這些菌株是否分泌熱原性外毒。統計結果顯示 SPE A 的表現能力與侵襲性菌株具較高之相關性，因此值得注意防範。此外，根據 Nelson et al. (1991) 的分析，*speA* 具有四種 alleles，當中又以 *speA2* 與 *speA3* 為引發毒性休克症候群的主要基因型。因此進一步以 DNA 序列分析南台灣臨床菌株中 *speA* 基因的亞型，發現在南台灣地區臨床菌株中，大多是屬於 *speA2* 的基因型。

四、計畫成果自評

綜合以上結果得知，蛋白水解酵素的活性與臨床症狀如：軟組織壞死，休克，及死亡有顯著的統計相關性，顯示出在南台灣地區的菌株中，蛋白水解酵素在嚴重性感染上扮演著一個不可忽視的角色 (Hsueh et al., 1998)。而且蛋白水解酵素可增強 A 群鏈球菌侵入細胞內的能力 (Tsai et al., 1998)。此外，A 群鏈球菌的感染，不僅可進入上皮細胞中並引發 caspase 的途徑造成細胞凋亡 (Tsai et al., 1999)。由目前的研究顯示，A 群鏈球菌之蛋白水解酵素具有多樣化的生物特性，然而，在 A 群鏈球菌的感染過程中，蛋白水解酵素並不是唯一的致病因子，但可能扮演著不可忽視的重要角色。此外，本計劃針對這些致病因子蛋白質的分泌與否之表現型與其基因型做分析統計。結果顯示 SPE A 的表現能力與侵襲性菌株具較高之相關性，因此值得注意防範且在台灣多分布的是 *speA2* 的亞型。因其嚴重性的感染往往導致系統性的病變，因此如何由病灶處快速的影響全身，是值得進一步探討的問題。因此，由本研究不但更進一步明瞭 A 群鏈球菌侵入上皮細胞之角色，同時也引導出更多有趣的研究方向，倘若能再加以探討其更

深入的機轉，將有助於 A 群鏈球菌感染的治療及預防。

五、參考文獻

Carapetis, J., R. Robins-Browne, D. Martin, T. Shelby-James, and G. Hogg. 1995. Increasing severity of invasive group A streptococcal disease in Australia: clinical and molecular epidemiological features and identification of a new virulent M-nontypeable clone. *Clin. Infect. Dis.* 21:1220-1227.

Centers for Diseases Control and Prevention. 1994. Invasive group A streptococcal infections-United Kingdom,1994. *MMWR.* 43:401-402.

Chen, Y. M. D. C. Tarng, and L. S. Wang. 1990. Necrotizing fasciitis with toxic shock-like syndrome. Case report. *Chung Hua i Hsueh Tsa Chih - Chinese Med. J.* 46:117-120.

Hsueh, P.R., J. J.Wu, P. J. Tsai, J. W. Liu, Y. C. Chuang, and K. T. Luh. 1998. Invasive group A streptococcal disease in Taiwan is not associated with the presence of streptococcal pyrogenic exotoxin genes. *Clin. Infet. Dis.* 26:584-589.

Kapur, V., J. T. Maffei, R. S. Greer, L. L. Li, G. J. Adams, and J. M. Musser. 1994. Vaccination with streptococcal extracellular cysteine protease (interleukin-1 beta convertase) protects mice against challenge with heterologous group A streptococci. *Microb. Pathog.* 16:443-450.

Kiska, D. L. 1997. Staphylococcal and streptococcal toxic shock syndrome. *Clin. Microbiol. Newslett.* 19:33-40.

LaPenta, D., C. Rubens, E. Chi, and P. P. Cleary. 1994. Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12115-12119.

Österlund, A., and L. Engstrand. 1995. Intracellular penetration and survival of *Streptococcus pyogenes* in respiratory

epithelial cells in vitro. *Acta. Otolaryngol.* (Stockh) 115:685-688.

Nelson. 1991. Characterization and clonal distribution of four alleles of the *speA* gene encoding pyrogenic exotoxin A (scarlet fever toxin) in *Streptococcus pyogenes*. *J. Exp. Med.* 174:1271-1274.

Savill, J., V. Fadok, P. Henson, and C. Haslett. 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* 14:131-136.

Stevens, D. L. 1992. Invasive group A streptococcus infections. *Clin. Infect. Dis.* 14:2-13.

Tsai, P. J., C. F. Kuo, K. Y. Lin, Y. S. Lin, H. Y. Lei, F. F. Chen, J. R. Wang, and J. J. Wu. 1998. Effect of group A streptococcal cysteine protease on invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* 66:1460-1466.

Tsai, P. J., Y. S. Lin, C. F. Kuo, H. Y. Lei, and J. J. Wu. 1999. Group A streptococcus induces apoptosis in human epithelial cells. *Infect. Immun.* 67: 4334-4339.

Wann, S.R., M. Y. Yen, Y. S. Chen, J. H. Wang, W. K. Huang, T. S. Huang, J. H. Wang, Y. C. Lin, and D. L. Cheng. 1995. Streptococcal toxic shock syndrome in southern Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* 94:172-177.

Yang, Y. J., C. C. Liu, S. M. Wang, C. C. Hang, and J. J. Wu. 1997. Streptococcal toxic shock syndrome complicating varicella in children. *J. Formos. Med. Assoc.* 96:749-753.

行政院衛生署疫情報導 “噬肉菌-A 群鏈球菌感染性壞疽-在台灣之現況分析” 12(7): 201-211, 1996.