

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## Streptococcus bovis 之紅黴素抗藥基因選殖及分析(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2314-B-002-279-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院醫事技術學系暨研究所

計畫主持人：鄧麗珍

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 18 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫進度報告

*Streptococcus bovis* 之紅黴素抗藥基因選殖及分析 (1/2)

## Cloning and characterization of genetic element of erythromycin-resistant determinant in *Streptococcus bovis*

計畫編號：NSC 93-2314-B-002-279

執行期限：93年8月1日至94年7月31日

主持人：鄧麗珍 國立台灣大學醫學院 醫事技術學系

### 一、中英文摘要

在我們近年來對鏈球菌的藥物感受性試驗探討中，發現 *S. bovis* 呈現與其他鏈球菌顯著不同的抗藥型式，其是對紅黴素(erythromycin)的抗藥型式。在對紅黴素有抗藥性的鏈球菌菌株中，通常以 M phenotype、cMLS<sub>B</sub> 為主要(所佔百分比因菌種而有所差異)，inducible phenotype (iMLS<sub>B</sub>)較少見。然而，在我們針對 1996 至 2000 年臺大醫院所分離出的 *S. bovis* 菌株 (60 株)進行藥物感受性試驗時，發現 *S. bovis* 具有高比例的 iMLS<sub>B</sub> 菌株，以 PCR 及序列分析，發現這些 iMLS<sub>B</sub> 菌株帶有在鏈球菌中不曾發現的 *erm(T)* 基因(Teng *et al.*, 2001)。文獻及基因庫的資料顯示 *erm(T)* 基因主要存在於 *Lactobacillus*，如 *Lactobacillus reuteri* 的質體(plasmid, pGT633)。由於我們首次在鏈球菌菌屬中發現帶有與 *Lactobacillus* 之 *erm(T)* 具高度相似性之基因。因此本計劃選殖 *S. bovis* NTUH-7421 抗藥菌株之完整 *erm(T)* 基因及上下游部份，定序後以進一步了解 *S. bovis* 對紅黴素具高比例 iMLS<sub>B</sub> 抗藥之機轉。由 NTUH-7421 *erm(T)* 序列構造發現 *erm(T)* 兩端帶有 IS1216V-like elements。

**關鍵詞：***Streptococcus bovis*、*erm(T)* 基因、序列分析

### Abstract

Clinical isolates of *S. bovis* are usually susceptible to penicillin. However, macrolides and related drugs have been suggested as alternatives for treatment of

streptococcal infections when the patient is allergic to penicillin. We found an unusual high prevalence of inducible erythromycin resistance was found in *S. bovis* isolates in Taiwan. We previously found that 14 of 21 iMLS *S. bovis* isolates carried *erm(T)* erythromycin resistance genes by the detection of PCR and sequencing (Teng *et al.* AAC, 2001). Sequence analysis of amplified fragment was shown to be very similar to that of *ermGT (ermT)* from *Lactobacillus reuteri* (98.5% identity of nucleotides). This was the first report of the *erm(T)* class of erythromycin resistant determinants found in *S. bovis*. The high rate of inducible erythromycin resistance among *S. bovis* isolates in Taiwan was not reported before. Since the upstream and downstream sequences of *S. bovis erm(T)* are still unknown, the objectives of the present study were to clone and sequence the entire genetic element of erythromycin resistance determinant in order to understand the mechanism of inducible erythromycin resistance in *S. bovis*. We found that the *erm(T)* gene in NTUH-7421 was preceded by a 60-nucleotide leader peptide sequence and flanked by two IS1216V-like elements with the same polarity.

**Keywords:** *S. bovis* group, *erm(T)* genes, sequencing, IS1216V-like elements

### 二、緣由與目的

*Streptococcus bovis* 屬於 D 群鏈球菌，為人體或動物腸道的正常菌叢，但也會引起多種疾病，對於老年人或免疫力低者容易造

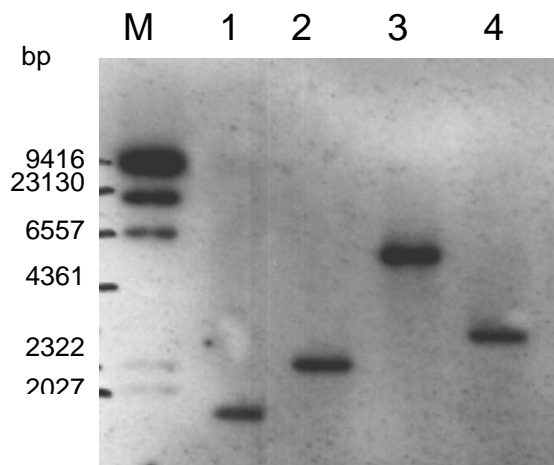
成感染，可造成菌血症、心內膜炎、腦膜炎等<sup>(1-6)</sup>。所引起之心內膜炎佔引起心內膜炎的細菌中約 5% 至 14%。更有許多報告指出 *S. bovis* 感染也可能與大腸癌有相關<sup>(7)</sup>。其治療一般以為主，但，近來也有不少報告指出 *S. bovis* 的抗藥性有增加趨勢。在我們及其他學者過去的研究中，顯示在對紅黴素有抗藥性的鏈球菌株中，以 M phenotype (只對 macrolide 有抗藥，對 Lincosamide 類藥物如 clindamycin 為 susceptible)、cMLS<sub>B</sub> 為主要(所佔百分比因菌種而有所差異)，iMLS<sub>B</sub> 少見。其抗藥基因以 *ermB* (*ermAM*) 為最常見。表現 iMLS<sub>B</sub> 或 cMLS<sub>B</sub> 則通常是 leader peptide 決定<sup>(8-10)</sup>。然而，在我們針對 1996 至 2000 年臺大醫院所分離出的 *S. bovis* 菌株 (60 株) 進行藥物感受性試驗時，發現 *S. bovis* 的抗藥表現型迥異於其他鏈球菌，具有非常高比例的 iMLS<sub>B</sub> 菌株，60 株 *S. bovis* 中有 38 株(63.3%) 為紅黴素高抗藥株(MICs >128µg/ml)，其中 17 株(45%) 為 cMLS<sub>B</sub>，21 株(55%) 為 iMLS<sub>B</sub>，而其中並無任何 M phenotype 菌株<sup>(11)</sup>。以 PCR 及序列分析，發現這些 iMLS<sub>B</sub> 菌株帶有在鏈球菌中不曾發現的 *ermT* 基因(Teng *et al.*, 2001)，*Erm*(T) 基因即 *ermGT*，由於過去命名相當混亂，近來有學者將 *erm* 基因名稱重新整理。在 21 株 iMLS<sub>B</sub> 菌株中，14 株則帶有 *erm*(T) 基因，只有 7 株帶有 *ermB* 基因。文獻及基因庫的資料顯示 *erm*(T) 基因主要存在於 *Lactobacillus*<sup>(12-13)</sup>。如 *Lactobacillus reuteri* 的質體(plasmid, pGT633)中發現 *erm*(T)，其序列顯示帶有著比 *erm*(C) 之 leader sequence 多出 26 個重複核苷酸的完整 Leader sequence 之後亦有學者自豬糞便分離出 *Lactobacillus* sp.，其質體(p121B) (Whitehead *et al.*, 2001) 含 *erm*(T)。由於我們首次在鏈球菌菌屬中發現帶有與 *Lactobacillus* 之 *erm*(T) 具高度相似性之基因，但其上下游序列構造如何？是否具典型 leader sequence 以致於造成 inducible 的特性？基因位於質體或染色體？是否像 *van* gene 可傳遞至其他細菌？是否與 *Lactobacillus* 有關連？等等許多問題均不

清楚。因此本計劃嘗試選殖 *S. bovis* 抗藥菌株之完整 *erm*(T) 基因及上下游部份，以進一步了解 *S. bovis* 對紅黴素具高比例 iMLS<sub>B</sub> 抗藥之機轉。

### 三、結果

**菌株.** *S. bovis* 菌株含 ATCC 參考菌株 1 株(ATCC 43144) 與具 *erm*(T) 基因之 erythromycin-inducible 抗藥臨床菌株 10 株。這些臨床菌株均來自 2000 至 2003 年台大醫院檢驗醫學部細菌科血液培養分離 *S. bovis* 菌株，具 *erm*(T) 基因者。但序列選殖及分析先以 NTUH-7421 為主。

**Southern blot.** 由已知的 *erm*(T) 部份基因序列設計引子，其 PCR product 為 probe，進行 Southern blot。下圖為 NTUH-7421 之 Southern blot 結果。



圖一. M, DNA marker. Lane 1, *Clal*; lane 2, *DdeI*; lane 3, *EcoRI*; lane 4, *HindII*.

**LA-PCR.** 利用已知的部份序列進行 NTUH-7421 之 *erm*(T) 基因 cloning and sequencing。由 Southern blot 結果選取適當的酵素切割，接上 linker (cassette) 後，進行一次及二次 PCR。

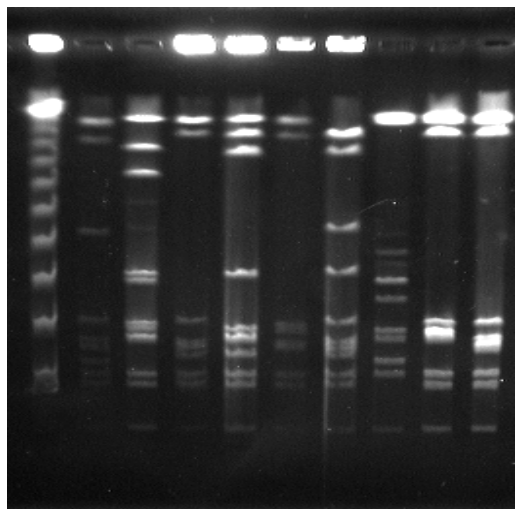
**Sequencing.** 將 LA-PCR product 進行序列分析。NTUH-7421 之 *erm*(T) 基因序列分析包 *erm*(T) 完整基因 leader peptide 與其上、下游序列。序列結果已 submit 至 GenBank，預定 2006 年前會發表。在上游

區域比對出可能為核糖體蛋白質 L32 及 L33 的基因序列：rpmF 與 rpmG (相似度分別為 92.3%及 94.67%；Accession number: AE010120, AE006634)；而緊接著 erm(T) 下游的約三百個核酸序列與 p121B 中 erm(T) 基因下游的序列相似度達 92%(Accession number: AF310974),在更下游則有另一個 IS1216V-like element。

**leader sequence 序列比較.** *S. bovis* erm(T) 之 leader sequence 為 60-nucleotide 組成，encode 出 19 amino acid: MGIFSIFVINTVHYQPNNK。基因上游序列比 ermC 之 leader sequence 序列多出 26 個重複核甘酸的完整 Leader sequence。

**IS1216V-like elements.** 於 NTUH-7421 序列中發現 erm(T)兩端含有 IS1216V-like elements (相似度：99.5%)，兩端帶著 23bp 的反重複序列(inverted repeats, IR)。

**PFGE 分型.** Pulsed-field gel electrophoresis patterns of SmaI-digested genomic DNA of the nine *S. bovis* strains.顯示並無 clonal。



#### 四、討論

由 NTUH-7421 之 erm(T) 基因序列分析，至少可得知以下初步結論。

- (1). 確定是 erm(T)，single copy。
- (2). 含有完整 leader peptide，應是與 inducible phenotype 相關。
- (3). erm(T) 兩端含有 IS1216V-like elements

IS1216V element 常見於腸球菌種

(15,16)(如 *Enterococcus faecium*)中，存在於 Tn1546，與醣基肽類(glycopeptide)抗藥 (Brown *et al.*, 2001)或 vancomycin 抗藥有關。*S. bovis* 菌株也有 vancomycin 抗藥報告<sup>(17)</sup>，是否與 IS1216V 有何相關，目前無法得知。由於核酸序列分析之 IS1216V-like element 下游序列仍未得到，無法了解更下游部分是否仍存在其他抗藥基因，但極有可能 erm(T)位在一可能跳躍子(putative transposon)上，因此造成在臺大醫院紅黴素高抗藥性 *S. bovis* 菌株中有高比例為 iMLS 抗藥型，且帶有 erm(T)。因此將來最好能繼續分析其他帶 erm(T)之 iMLS *S. bovis* 菌株之上下游基因結構，以更了解此獨特的抗藥特性。過去所知 erm(T)基因主要存在於 *Lactobacillus*，目前已很確定也在鏈球菌(只有 *S. bovis*)上出現。由於 *S. bovis*、腸球菌、*Lactobacillus* 同屬於腸道內之正常菌叢，有很多機會接受外來藥物的刺激而篩選出抗藥菌株，且本身亦可能成為抗藥基因的儲存池(reservoir)。而 erm 基因常位於細菌染色體或質體上的跳躍子，有可能在不同菌種甚至菌屬間進行傳遞，造成抗藥的傳播。特別的是，含 erm(T) 之 *S. bovis* 幾乎都是 biotype II/2，不在其他 biotype，甚或其他鏈球菌的菌種出現。此外，*S. bovis* biotype II/2 近來被重新命名為 *Streptococcus pasteurianus* sp. nov.<sup>(18, 19)</sup>。Schlegel 等人提出將 *S. bovis* biotype II/1 重新命名為 *Streptococcus infantarius*。是否表示這些 biotype 間 genetic background 具有很大差異，也值得探討。近來香港<sup>(20)</sup>也有學者依據我們在 2001 年 AAC paper 所列的 PCR 方法，發現他們的 *S. bovis* 菌株也有 erm(T)存在，顯示此研究的重要性。

#### 五、成果自評

- (1). LA-PCR Cloning 在 5'部份進行順利，但在 3'部份並不順利，需繼續完成。
- (2).序列分析：我們已順利完成 NTUH-7421 erm(T)基因之大部份 sequencing。其他菌株也將繼續分析。
- (3). 第二年將利用 I-CeuI restriction，分析是否為 chromosome location。

## 六、參考文獻

- [1] Duval, X. et al. 2001. Definite *Streptococcus bovis* endocarditis: characteristics in 20 patients. Clin Microbiol Infect 7:3-10
- [2] Ballet, M., G. Gevigney, J. P. Gare, F. Delahaye, J. Etienne, and J. P. Delahaye. 1995. Infective endocarditis due to *Streptococcus bovis*, A report of 53 cases. European Heart J. 16:1975-1980.
- [3] Grant, R. J., T. R. Whitehead, and J. E. Orr. 2000. *Streptococcus bovis* meningitis in an infant. J. Clin. Microbiol. 38: 462-463.
- [4] Muhlemann, K., S. Graf, and M. G. Tauber. 1999. *Streptococcus bovis* clone causing two episodes of endocarditis 8 years apart. J. Clin. Microbiol. 37:862-863.
- [5] Herrero, I. A. et al. 2002. Reevaluation of *Streptococcus bovis* endocarditis cases from 1975 to 1985 by 16S ribosomal DNA sequence analysis. J. Clin. Microbiol. 40:3848-3850.
- [6] Tripodi, M. F., L. E. Adinolfi, E. Ragone, E. Durante Mangoni, R. Fortunato, D. Iarussi, G. Ruggiero, and R. Utili. 2004. *Streptococcus bovis* endocarditis and its association with chronic liver disease: an underestimated risk factor. Clin. Infect. Dis. 38:1394-1400
- [7] Ellmerich, S. et al. 2000. Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. Carcinogenesis 21:753-756.
- [8] Horinouchi, S, W. H. Byeon, and B. Weisblum. 1983. A complex attenuator regulates inducible resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin type B antibiotics in *Streptococcus sanguis*. J. Bacteriol. 154:1252-1262.
- [9] Rosato, A., H. Vicarini, and R. Leclercq. 1999. Inducible or constitutive expression of resistance in clinical isolates of streptococci and enterococci cross-resistant to erythromycin and lincomycin. J. Antimicrob. Chemother. 43: 559-562.
- [10] Mayford, M., and B. Weisblum. 1990. The *ermC* leader peptide: amino acid alterations leading to differential efficiency of induction by macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. J. Bacteriol. 172:3772-3779.
- [11] Teng, L. J., Hsueh PR, Ho SW, Luh KT. 2001. High prevalence of inducible erythromycin resistance among *Streptococcus bovis* isolates in Taiwan. Antimicrobial Agents Chemother 45: 3362-3365.
- [12] Tannock, G. W., J. B. Luchansky, L. Miller, H. Connell, S. Thode-Andersen, A. A. Mercer, and T. R. Klaenhammer. 1994. Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (*ermGT*) from *Lactobacillus reuteri* 100-63. Plasmid 31:60-71.
- [13] Whitehead, T. R., and M. A. Cotta. 2001. Sequence analyses of a broad host-range plasmid containing *ermT* from a tylosin-resistant *Lactobacillus* sp. isolated from swine feces. Current Microbiol. 43:17-20.
- [14] Polzin, K. M., and M. Shimizu-Kadota. 1987. Identification of a new insertion element, similar to gram-negative IS26, on the lactose plasmid of *Streptococcus lactis* ML3. J. Bacteriol. 169:5481-5488
- [15] Handwerger, S., and J. Skoble. 1995. Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 39:2446-2453.
- [16] Heaton, M. P., L. F. Discotto, M. J. Pucci, and S. Handwerger. 1996. Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a VanA plasmid with an *Enterococcus faecium* sex pheromone-response plasmid. Gene 171:9-17.
- [17] Poyart, C., C. Pierre, G. Quesne, B. Pron, P. Berche, and P. Trieu-Cuot. 1997. Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: Characterization of a *vanB* transferable determinant in *Streptococcus bovis*.

- Antimicrob. Agents Chemother. 41:24-29.
- [18] Clarridge, J. E., III, S. M. Attorri, Q. Zhang, and J. Bartell. 2001. 16S ribosomal DNA sequence analysis distinguishes biotypes of *Streptococcus bovis*: *Streptococcus bovis* biotype II/2 is a separate genospecies and the predominant clinical isolate in adult males. J. Clin. Microbiol. 39:1549-1552..
- [19] Poyart, C., G. Quesne and P. Trieu-Cuot. 2002. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (soda) sequences: reclassification of *Streptococcus infantarius* subsp. Coli as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteuianus* sp. nov. Int J Syst Evolu Microbiol 52:1247-1255.
- [20] Lee, R. A., P. C. Y. Woo, A. P. C. To, S. K. P. Lau, S. S. Y. Wong, and K.-Y. Yuen. 2003. Geographical difference of disease association in *Streptococcus bovis* bacteraemia. J Med. Microbiol. 52:903-908