

二、緣由與目的

致病性大腸桿菌(*Escherichia coli*) 被發現為人類的致病菌已有一段時間，主要分為六大類。enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)、enteroinvasive *E. coli* (EIEC)、enteropathogenic *E. coli* (EPEC)、enteroadherent *E. coli* (EAEC) 或 enteroaggregative *E. coli* (EAggEC)、diffusely adherent *E. coli* (DAEC) 及 enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)等(1-3)。其中以 ETEC 最常見，並最常發生於嬰幼兒或旅行者。目前所知之 ETEC 之主要致病因子為 heat-labile 或 heat-stable toxin (4)。此外近年來發現 ETEC 表面含有特殊抗原：Colonization factor antigen (CFA)，與致病力或免疫均有關，直至目前已經有多種 CFAs 被發現：CFAI, CFAII, CFAIV 等等(5-6)。抗原種樣分佈與地區有關。EIEC 之主要致病因子與 *Shigella* 相同，為 invasion plasmid locus (*ial*) 或 IpaH (invasion plasmid antigen H, multiple copies on both plasmid and chromosome)。事實上 EIEC 的生化反應也與 *Shigella* 類似，如 lysine-negative、non-motile 等。它們均為侵犯大腸黏膜。目前認為 EIEC 是經由 epithelial penetration、endocytic vacuole lysis、細胞內增殖、在細胞質內移動、侵入鄰近細胞、達到致病。致病基因主要位於質體上、主要為 Ipa 蛋白。IpaA 與 IpaB、C、D 蛋白為分泌蛋白，各有功能。Ipa 基因的表現尚受到其他因素的調控。EPEC 在 1940 年即被發現，但直到最近幾年致病因子才較清楚(1,7)。EPEC 含有一段 35-kb locus (LEE locus)，其中主要為 *eae* 基因(*E. coli* attaching and effacing) (7,8)；EPEC 之另一重要致病因子為 bundle-forming pilus gene (BFP gene)，負責最初的 attachment (8)。EAggEC 可附著於 Hep-2 或 HeLa cells，而 EAggEC 之 adherence pattern 較為特殊。近來 Yamamoto 等人更發現 EAggEC 之致病因子之一 enteroaggregative enterotoxin I (EAST1)也存在於 ETEC 中，且非致病菌株也可能含此毒素(1,9)。因此

EAST1 扮演的角色並不清楚。疾病正確的診斷與治療需要臨床醫師、檢驗師、及衛生單位密切合作。發展快速、有效、經濟的檢驗技術絕對是必需且重要的。了解當地菌株之抗原種類對將來發展疫苗亦是重要的。此計劃構想為同時比較培養方法與以標準菌株建立聚合酶連鎖反應，自檢體快速偵測 *E. coli*。由於 stool 中含有 bilirubin、bile salts，為很強的 PCR 抑制劑，通常無法直接從 stool 作 PCR。近年來有一些檢體處理改良方法可提高 PCR 敏感度，如先在 enrichment media 培養數小時，簡單 lysis 後，即進行 PCR。或利用 Sepharose CL-6B spin-column 處理以除去 fecal specimens 中的 PCR 抑制物 (10,11)。此計劃將嘗試使用 Sepharose CL-6B spin-column 處理檢體。PCR 預期產物為 708 bp (LT)、424 bp (ipaH)、324 bp (BFP)、182 bp (ST)、111 bp (EAST1) (12-16)。在今年度的計劃我們增加幾對引子。也進行 dot blot，並對產物進行定序分析。此外，以氣相色層分析進行菌體脂肪酸的分析。

三、結果

設計 PCR 對於引起腹瀉之主要四種 *E. coli*，如 ETEC、EAggEC、EPEC、EIEC/*Shigella*，對 150 株臨床菌株做快速偵測。臨床檢體之分離則先選取二歲以下嬰兒有腹瀉症狀而沒有其他腹瀉病菌者。自 EMB 培養基觀察，若是主要為 *E. coli*，則挑選二至三菌落做 PCR。做實驗前先確認是大腸桿菌，之後將菌株粹取 DNA，以已知之 primers 進行 PCR，跑膠。對照已知菌株(表一)PCR product 大小。有一部份則加以定序確認。

表一：Reference strains for positive control

CDC reference strain	specific gene	serotype
72-5474	LT & ST producing	O15:H11
B2872	LT producing	O88
TX-1	ST producing	O78:H12
TD-213	Invasive gene	

(1) ETEC

針對 ETEC 的 LT-I 基因選用 LT23/LT424 和 LT76/LT746 這兩對引子，預期分別可以得到 450-bp 和 708-bp 的 PCR 產物。結果只有第 17、142 號檢體在 400~500-bp 之間出現 specific band，但也同時有非特異的 band 存在。ST 也可分為 ST-I 和 ST-II，其中 encode ST-I 之一的是 *estA* 基因，針對這個基因我們選用了 ST-JW14/ST-JW7 這對引子，預期得到 190-bp 的 PCR 產物。分別以 55°C 和 50°C 的 annealing temp. 進行反應之後，得到兩株細菌呈現 PCR positive 的結果。(LT 和 ST 的結果參考圖一) 另外，再針對 ETEC 的 invasive loci *tia* 選用 ETEC-TiaF/R，則是得到一株 PCR positive 的結果。Dot blot 結果參考圖二。

(2) EAeggEC:

以 EAEC-F/EAEC-R 引子進行 PCR 反應 (Annealing temp 53°C) 後，將產物注入膠體跑電泳，再以 Ethidium Bromide 染色、照相後，可見到第 17 和 155 號檢體的菌株有明亮的 single band，經比對 DNA marker 其大小約在 600~700-bp 之間，與預期產物 630bp 相符合。而第 18 號檢體的菌株則是在相當的位置出現兩條較弱、且距離相近的 band。續將 PCR 產物分別以限制酶 *DraI* 和 *AluI* 切割，結果第 17 號以兩種限制酶切割所得片段的大小與預期一致 (以 *DraI* digest 可得到 273-bp、357-bp DNA 片段，以 *AluI* digest 可得到 391-bp、239-bp DNA 片段)。第 155 號以 *DraI* 切割的結果與預期一致，可是卻無法被 *AluI* 切。第 18 號以兩種限制酶切割產物與第 17 號的結果相似，但同時存在非預期大小的 band。序列結果如附圖三。

(3) EIEC

將 150 株臨床菌株以及 TD213-G 作為 positive control，以 ipaH-F/R 這對引子進行 PCR 反應，發現第 101、105 號檢體在 400~500-bp 處有明顯的單一 band，與 TD213-G 的結果一致，並與預期出現的 424-bp 相似。而第 92、112 號檢體在相對應的位置也有 band 出現，但是也同時出現

nonspecific band。經挑選出 18 株檢體，包括第 92、112、101、105 號檢體，以及 TD213-G 作為 positive control，再以 ial-F/R 這對引子進行 PCR 反應，經膠體電泳後發現第 101、105 號檢體在 300~400bp 附近有 specific band，與預期出現的 320bp 大小相似。但同時在大於 1kb 處有 nonspecific band。而 TD213-G 的 pattern 和 101、105 號一致。至於第 92、112 號則沒有 band 出現。

(4) EPEC

為了偵測菌體中是否有 EPEC 的 EAF plasmid，以 EAF1/25 引子進行 PCR 反應，得到所有檢體皆為 negative。再以 BFP422/138 進行 PCR 反應，則有 6 個菌株得到 positive 的結果。

(5) 菌體脂肪酸 (Cellular fatty acid) patterns 將抽出的菌體脂肪酸 (共 26 株臨床菌株) 注入氣相層析儀進行分析，並連線 MIS system，比對資料庫中既有的菌體脂肪酸成分比例 (表二)。發現有 96% 的菌株 (25/26) 都以 *E. coli* 為最可能的菌種。表示以菌體脂肪酸的氣相層析分析對於初步鑑定 *E. coli* 有一定的可信度。另外，MIS system 同時也將菌體之各種類脂肪酸成分，佔全部可分析之脂肪酸計算成百分比。在尚未分群的情況下，所有被分析的菌株其脂肪酸成分皆以 16:0 這種脂肪酸含量最高，其次是 cyc-17:0。

四、討論

由已完成的 PCR 反應、Dot Blot Hybridization、及序列分析結果得知，在 150 株臨床菌株中，有五株為 ETEC，六株可能為 EPEC，有四株可能為 EIEC，三株為 EggEC，十株可能為 EggEC 或 ETEC。其中尤其以 EAeggEC-F/R 檢出 10 株為最多的檢出率。值得注意的是，繼 Savarino 等人發現 EAEC 會產生 EAST1 後 [5]，在 1996 年 Yamamoto 等人也提出報告說明在某些能使人類致病的 ETEC strain [7]，其質體存在有一段基因，和 *astA* 有相同的序列。所以以上述引子 EAEC-F/R 進行 PCR 分析的結果，可以同時作為偵測 EAEC 和 ETEC

的參考。最近有一論文以 multiplex 方式可同時偵測多種致病性大腸桿菌基因，應是不錯的方法 [17]。

疾病正確的診斷與治療需要臨床醫師、檢驗師、及衛生單位密切合作。發展快速、有效、經濟的檢驗技術絕對是必需且重要的。了解當地菌株之抗原種類對將來發展疫苗亦是很重要的。利用聚合酵素連鎖反應快速鑑定病原菌是近年來目標之一。本年度以此法先篩選可能菌株，第二年時會以血清型及毒素測定確認，最終目標為自檢體直接測試。聚合酵素連鎖反應結果中，有些有非特異之 band 出現。雖然嘗試降低溫度，仍然無法消除非特異之 band。但我們又發現若菌株含有特定基因時，常為單一 band。當然若只看 band 有無即判斷並不可靠。此結果仍需以毒性試驗等及 dot blot 甚至序列測定確認比較好。10 株同時顯示 EggEC 及 ETEC 的均陽性，是否這些菌株具有共同基因，在有些文獻也有報告(9)。但是否也有可能為非特異性反應，也需進一步確認。

在菌體脂肪酸(CFA)的氣相層析方面，我們將 26 株臨床菌株的層析分析結果比對資料庫中既有的 CFA 資料顯示，有 25 株(96%)被鑑定為最可能是大腸桿菌，且可能性多在 70% 以上。顯示以 CFA 來鑑定大腸桿菌菌種有相當的可信度。在此計劃中，我們嘗試想更進一步以 CFA 作為 *E. coli* 分群的方式(圖四)，卻發現雖然在以 PCR 分出的五群之間，其脂肪酸比例互有差異，但是其差異的程度並不足以作為分群的準則。得到這樣的實驗結果可能原因有很多，一方面由於每一群的樣本數都很少(五群中有三群在五株以下)，以這樣的母群做出的平均值其統計上的意義並不充分。甚至在某些群中出些的一些極值，也應該考量是否存在有實驗過程的誤差。因此仍需要測試更多的菌株才能下結論。另外，這樣的實驗結果僅表示在這次的實驗當中，以 PCR 反應的結果與 CFA 分析的結果並沒有發現一致性。事實上，致病性大腸桿菌的分群仍須針對表現型進行檢驗，例如血清型測試、毒素試驗以作為確認，

而這個部分在這次實驗中並沒有進行。

五、成果自評

已完成自分離菌株測試 PCR 部份及 dot blot，及定序工作，顯示的確有致病性大腸桿菌。但此結果仍需以毒性試驗、血清型測試等測定確認。菌體脂肪酸的分析結果顯示 EIEC 與其他大腸桿菌有一些差異。但仍需要測試更多的菌株才能下結論。

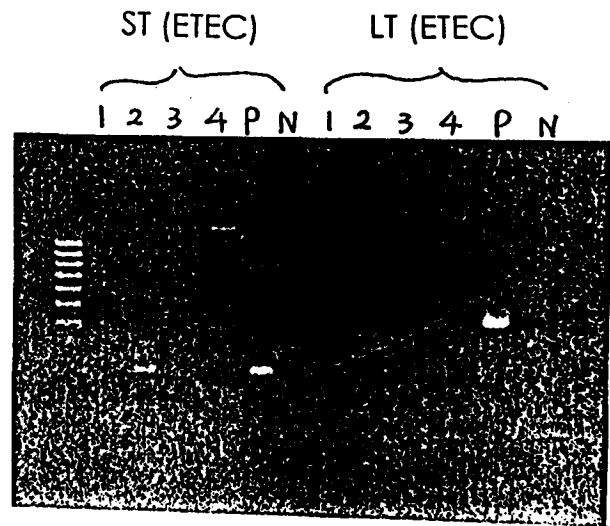
六、參考文獻

- [1] Nataro JP and Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11:142-201.
- [2] Riley LW et al. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308:681-685.
- [3] Levine MM. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis 155:377-379.
- [4] Spangler BD. 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Microbiol Rev. 56:622-647.
- [5] Wolf MK. 1997. Occurrence, distribution, and association of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic. Clin Microbiol Rev 10:569-584
- [6] Nirdnoy W, Serichantalergs O, Cravioto A. et al. 1997. Distribution of colonization factor antigens among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with diarrhea in Nepal, Indonesia, Peru, and Thailand. J Clin Microbiol 35:527-530.
- [7] Law D. 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 7:152-173.
- [8] Giron JA et al. 1993. Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. J Infect Dis.

168:1037-1041.

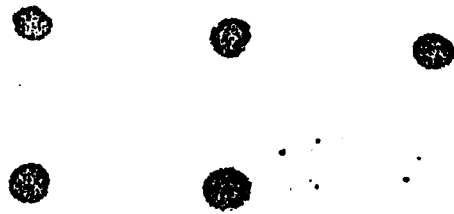
- [9] Yamamoto T and Echeverria P. 1996. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun* 64:1441-1445.
- [10] Lou Q et al. 1997. Rapid and effective method for preparation of fecal specimens for PCR assays. *J Clin Microbiol* 35:281-283.
- [11] Tornieporth NG et al. 1995. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. *J Clin Microbiol* 33:1371-1374.
- [12] Paton AW. et al. 1993. Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31:3063-3067.
- [13] Fratamico PM et al. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 33:2188-2191.
- [14] Stacy-Phipps S, Mecca JJ, Weiss JB. 1995. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. *J Clin Microbiol* 33:1054-1059.
- [15] Franck SM, Bosworth BT, Moon HW. 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin Microbiol* 36:1795-1797.
- [16] Hubbard AL, Harrison DJ, Moyes C, McOrist S. 1998. Direct detection of *eae*-positive bacteria in human and veterinary colorectal specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 36:2326-30.
- [17] Pass MA, Odedra R, Batt RM. 2000. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microbiol* 38:2001-2004.

圖一：ETEC 之 PCR 產物電泳圖



P: positive control (CDC 72-5474)
N: Negative control

圖二：ETEC 之 Dot blot 圖



圖三：第 17、155 號菌株的 PCR 產物(以 EAEC-F 為引子)之序列比較

EAEC17(上排) x EAEC155 (下排)

```
1 TCCAGTTTAAATTCTTATTCTCTTGATATCGAAGAGTTAGATATTAATAGA 50
      |
1 .....TTCTTATTCTCTTGATATCGAAGAGTTAGATATTAATAAA 40

51 CATAACAATATAAAAACGATGTTACCAGATATAAATATAGGGTTAGGGCA 100
      |
41 AATAACAATATAAAAACAATGTTGCCAGATATAAATATAGGGTTAGGACA 90

101 GTATATAACAACAATCAATGGTTCTCATCTATTACAGACAGCCATTTTT 150
      |
91 GTATATAACAACAATCAGTGGTTCTCATCTTTACAGACAGCAATTTTT 140

151 ATTTATCATTATCCTATAATCTTCTATCGGCTTATGAAGCAAAAATGCAG 200
      |
141 ATTTATCATTATCCTATAATCTTCTATCGGCTTATGAAGCAAAAATGCAG 190

      DraI
      ↓
201 AATAATAAATTGGATATTGCTAATTAATAAATATATTGAAATGCTTAG 250
      |
191 AATGATAAATTGAATGTTGCTAATTAATAAATATATTGAAATGCTTAG 240

251 TGAGAGGAACAACACTACATAATTAATTTGTTCTCGGAAATTATTAECTATA 300
      |
241 TGAAAGGAACAACACTATATAATTAATTTGTTCTCGGAAGTTATTAECTATA 290

      AluI
      ↓
301 AGATAAAAAAATCTCACCTGATGTTGATGCTCGAGAGATATAGGAAGCTC 350
      |
291 AGATAAAAAAATCTCACCTTATGTTGATGCGCGAGAGATATAAAAAATTC 340

351 AATAAAGAATACGAAATTGCAAAGCGTAAAAATGTCAATTGGATTAATATC 400
      |
341 AATAAAGAATACGAAATTGCAAAGCATCAAATGTCAATTGGATTAATATC 390

401 TGCTCTTGATGTAGAGATGATATATAATTTTACAAAAATCAGGTTTG 450
      |
391 TGTTCTTGATGTGCGAGATGAGATATAATATATTACAAAAATCAGGTTTG 440

451 ATATTGATGTCCTTGAGGAGGAGAAAGTTTACTGTCAGATAAAATCTCG 500
      |
441 ATATTAATGTCCTTGAGGAGGAAGAAAGTTTACTGTCAGATAAAATTTTCG 490

501 AGAGAATATCATGTTCCCTGAGAGTGCAATCCCAGACATTACATATCATAA 550
      |
491 AGAGAATATTATGTTCCCTGAGAATGCAATCCCAG..... 524
```

表二：各群致病性大腸桿菌之菌體脂肪酸成分比例

Component 碳數：不飽和鍵	% (mean) of total chromatographic area				
	diarrheagenic E.coli subgroup (strain number)				
	EAEC (2)	EAEC/ETEC (10)	ETEC (5)	EPEC (5)	EIEC (2)
12:0 ALDE	2.87	2.234	2.83	1.926	2.605
12:0	4.415	3.692	3.805	3.605	3.615
14:0	6.935	8.176	7.045	8.718	8.82
15:0	1.84	3.811	1.63	3.764	4.415
16:1 iso I/14:0 3OH	5.525	5.731	5.57	6.262	5.73
16:1 ω7c/15 iso 2OH	4.86	5.569	4.625	5.996	2.62
16:0	34.35	33.381	35.05	33.04	33.455
17:0 cyclo	20.455	20.658	21.285	20.318	22.99
17:0	1.51	1.369	1.285	1.346	1.185
18:1 ω7c	5.885	5.95	5.39	6.796	3.69
18:0	1.455	1.223	1.33	1.162	1.355
19:0 cyclo ω8c	10.155	7.277	9.505	6.178	8.805

註：EAEC 只選取經 Restriction analysis 及序列分析確認的兩株；EIEC 只選取經 Dot Blot 及序列分析確認的兩株。

圖四：

Tree Diagram for 31 Cases
Single Linkage
Euclidean distances

