

腸出血性大腸桿菌之檢驗與鑑定

李詩益¹ 林金絲²

¹ 三軍總醫院臨床病理科

² 壠新醫院病理檢驗科

前言

大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 為體內腸道中之正常菌群 (normal flora)。此菌群被視為內生性 (indigenous) 之細菌，可幫助人體抵抗病原菌的侵入，亦能提供人體所需的維生素 B12 及 K。然而，並非所有的大腸桿菌均無致病性，約有 4%-8% 的菌株會引起腸道感染症及食物中毒等疾病 [1]，所造成的臨床意義與正常的大腸桿菌有很大的差異，我們稱之為病原性大腸桿菌 (enterovirulent *E. coli*, EV-EC)。EVEC 可依致病方式、臨床症狀及血清型別，分成六種亞型：包括致病性大腸桿菌 (enteropathogenic *E. coli*, EPEC)、產毒性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)、出血性大腸桿菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)、侵襲性大腸桿菌 (enteroinvasive *E. coli*, EIEC)、附着性大腸桿菌 (entroadherent *E. coli*, EAEC) 以及擴散附性大腸菌 (diffuse-adherence *E. coli*, DAEC) 等 (表一)。其中以 EHEC 造成的疾病最嚴重，也最受到重視。自從 EHEC 中的 O157:H7 血清

型 *E. coli* 於 1982 年首次在美國造成出血性大腸炎群突發後 [2]，在英、美、加、日等先進國家皆有造成流行的情形。特別是在 1996 年，此型病菌在日本爆發近萬人之大流行，造成十幾人之死亡，引起軒然大波 [3]。台灣地處鄰近，更應對此病菌潛在的威脅提高警覺，提早注意。本篇文章將對於 EHEC 的特性、臨床症狀加以說明，並且著重於此菌群檢驗與鑑定之方法，最後對於預防及治療做討論。希望能加強醫院工作人員對此菌群的認識與注意，一旦發生流行，可以有最好的處理措施。

生物特性

腸出血性大腸桿菌在生長條件、營養需求及一般檢驗之生化特性等，和正常的 *E. coli* 並無明顯之差異 (*E. coli* O157:H7 除外)。然而，EHEC 在染色體有一段 stx 的基因，可以製造一種和 *Shigella dysenteriae* 所產生的 shiga toxin 構造幾乎完全相似的毒素，稱之為 shiga-like toxin (SLT)。因為此毒性會引起 Vero 細胞形成細胞病變 (cytopathic effect, CPE)，所以

表一 不同致病性大腸桿菌引起人類腸道感染之特性

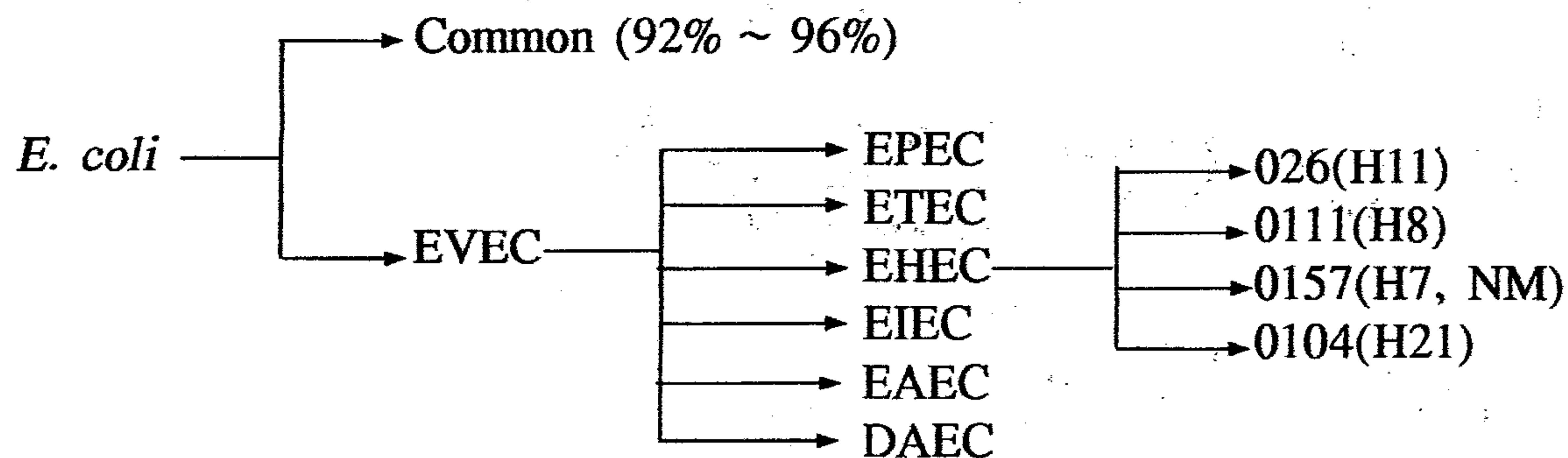
Strain	Pathogenic mechanisms	Enteric infection(s)	Common clinical presentations	Common age group	Common risk factor
ETEC	LT and ST	Diarrhea; traveler's diarrhea	Profuse watery diarrhea, cramps, nausea, dehydration	adults, children	foreign travel (usually Mexico)
EPEC	Adherence factor; attachment to and effacement of intestinal epithelium	Acute diarrhea	Watery diarrhea, fever, vomiting, mucus in stool	children < 2 yr old, adults	age < 2 yr
EIEC	Invasion and destruction of intestinal mucosal epithelium	Dysentery similar to Shigella dysentery	Dysentery; scant stool; Adults: blood, mucus, and leukocytes in stool; fever; cramps		foreign travel (usually Mexico)
EHEC (VTEC)	Shiga-like toxins (Verocytotoxin)	Diarrhea; hemorrhagic colitis	Diarrhea (no leukocytes); abdominal cramps; blood in stool; no fever, HUS, # and TTP* may or may not be present	children, elderly	consumption of undercooked ground beef
EAggEC	Unknown	Chronic and acute	Watery diarrhea	all ages	unknown

*TTP : thrombotic thrombocytopenic purpura

#HUS : hemolytic uremic syndrome

此毒素又稱為 Verotoxin，而 EHEC 又因此稱為 Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC)[4]。從歷年來的流行事件中，我們不難發現，EHEC 的傳染窩主要是牛隻（致病菌通常存活於健康牛隻的腸道）和人類。而感染的來源主要是受該菌群污染的牛肉（特別是絞肉）、生乳、果汁以及水[5]。當人吃下了烹煮不當的肉品，未經巴斯德消毒的乳品、果汁，飲用不淨的水源或在污染的水中游泳，以及人與人間的糞口方式傳染都是造成 EHEC 感染的原因。在血清分型方面，*E. coli* O157:H7 為主要菌種，其他的血清型還包括 O26 (H11)、O11(H8)、O124 等，亦可能造成相同症狀之疾病

（圖一）。一般而言，EHEC 的感染力很強，很少的細菌（只要 100 隻左右）即可能造成感染。主要的對象是小孩、老人以及抵抗力較弱的人。其潛伏期約三至八天，小於五歲的孩童，在感染三週後仍有 53% 可由糞便中培養出菌株；在大於五歲的孩童及成人中，感染三週後，卻只有 8% 可由糞便培養出來。因此，在小於五歲的孩童的可感染期是相當長的。就 *E. coli* O157:H7 而言，在美國每年至少有 20,000 個病例，約 250 人死亡[6]。因此，1987 年起，美國各地紛紛將此菌列為報告傳染病。其他物理特性方面，在 75 °C 下加熱 1 分鐘就可被殺死，也因此美國農業部規定，絞肉餅



圖一 病原性大腸桿菌之分類

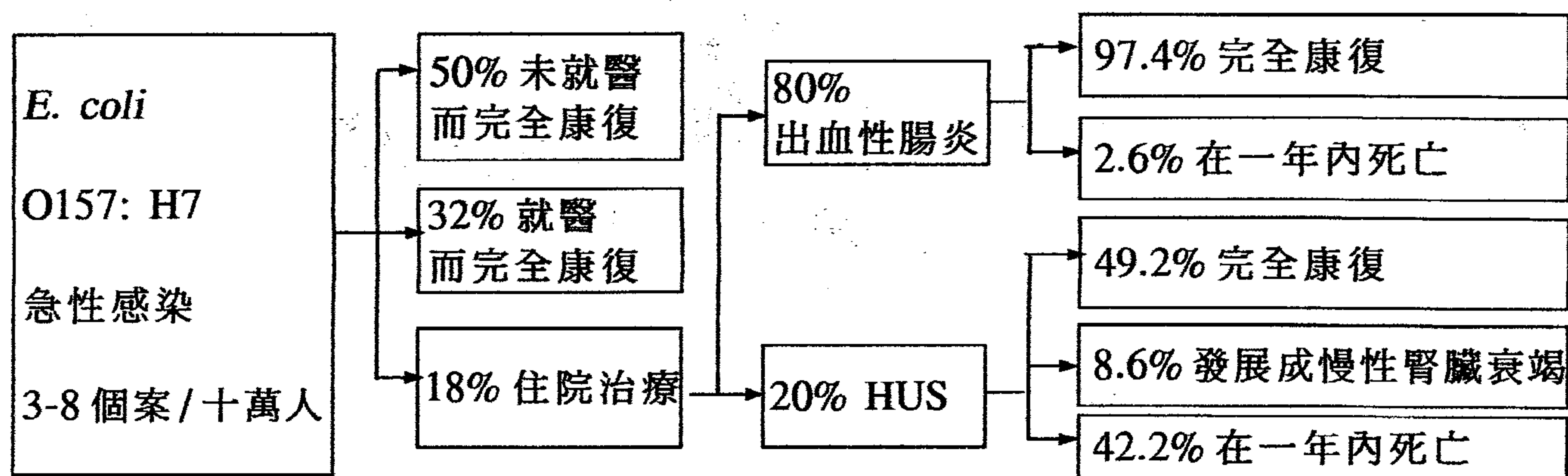
中心溫度需達 76.6°C 才可確保食用安全。在酸鹼值影響方面，較一般的 *E. coli* 耐酸，在 pH3.7 至 pH3.9 中，於 30°C 下可存活 9 天，而 4°C 下更達 22 天之久，但其對一般的消毒劑如鹼性肥皂或 70% 酒精，就具相當感受性，可以輕易地殺死此菌。

臨床症狀

腸出血性大腸桿菌引起的症狀，從溫和的腹瀉到出血性結腸炎，會伴隨著嚴重的腹痛和帶血的下痢便。雖然 EHEC 和 *Shigella* 會產生相似的毒素，但有一點和 *Shigella* 不同的是 EHEC 並不會直接侵犯腸黏膜，因此不會引起病患發高燒，同時在糞便中也不會出現白血球。這是 EHEC 比較特別的地方。在 EHEC 的染色體上有另一段 *eae* 基因 (attaching and effacing gene)，會 encode 一種吸附蛋白，叫做 intimin。此蛋白可提高 EHEC 在人體腸道中的吸附能力，使其不致隨著腸蠕動而排出體外，讓毒素 (SLT) 有足夠的時間進入細胞，造成蛋白合成功能受損，進而使細胞死亡。所

以，SLT 並非引起氯離子分泌的增加，而是造成吸收細胞死亡的增加，致使腸道不平衡而產生腹瀉。

若病情未及時控制，一旦毒素進入血液，經由血液循環聚積於腎臟，破壞腎臟之過濾功能，就會引發溶血性尿毒症 (hemolytic uremic syndrome, HUS)[7]。HUS 具備三種病徵，包括急性腎病變、溶血性貧血併碎裂紅血球及血小板減少症；臨床上可見少尿或無尿、意識障礙、浮腫、血尿、黃疸及出血斑等症狀。根據統計，一般約有 2% 至 7% 的感染病患會產生 HUS (圖二)，在爆發流行時，產生此併發症的機率更高達 30%。在美國小孩子的 HUS 是一個相當嚴重的疾病，死亡率亦相當的高，而研究發現絕大部分都和 EHEC 中的 *E. coli* O157:H7 有很大的關係 [8]。倘若侵害的器官擴大至腦或中樞神經系統，更會引起血栓性血小板缺乏紫斑症 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)，造成中樞神經系統病變、腦梗塞和發燒等症狀，但在小孩的感染病中，不常見此併發症。



圖二 *E. coli* O157: H7 感染情形統計圖

檢驗與鑑定

一、檢體的收集

檢體的來源為糞便或肛門拭子 (Cary-Blair swab)，根據美國疾病管制中心 (CDC) 的標準，對於糞便檢體，在冷藏的狀態下，應立刻做檢驗；在冷凍狀態下，隔日再做即可。而肛門拭子的保存時間較久，冷藏下，可在二至三天內做檢驗；若冷凍保存，三天後再做也可以。採檢的時間應於發病一週內儘速採檢、送驗。醫護人員在採檢同時，應填寫檢體送驗單及疑似感染腸出血性大腸桿菌病患基本資料表。若有使用抗生素 (一般不建議用抗生素)，則應於停藥後四十八小時後採檢。採檢的對象包括明顯血便患者、在食物中檢出有此菌的食物中毒患者以及找不出其他病原菌的患者等。

二、醫院及檢驗室的處理

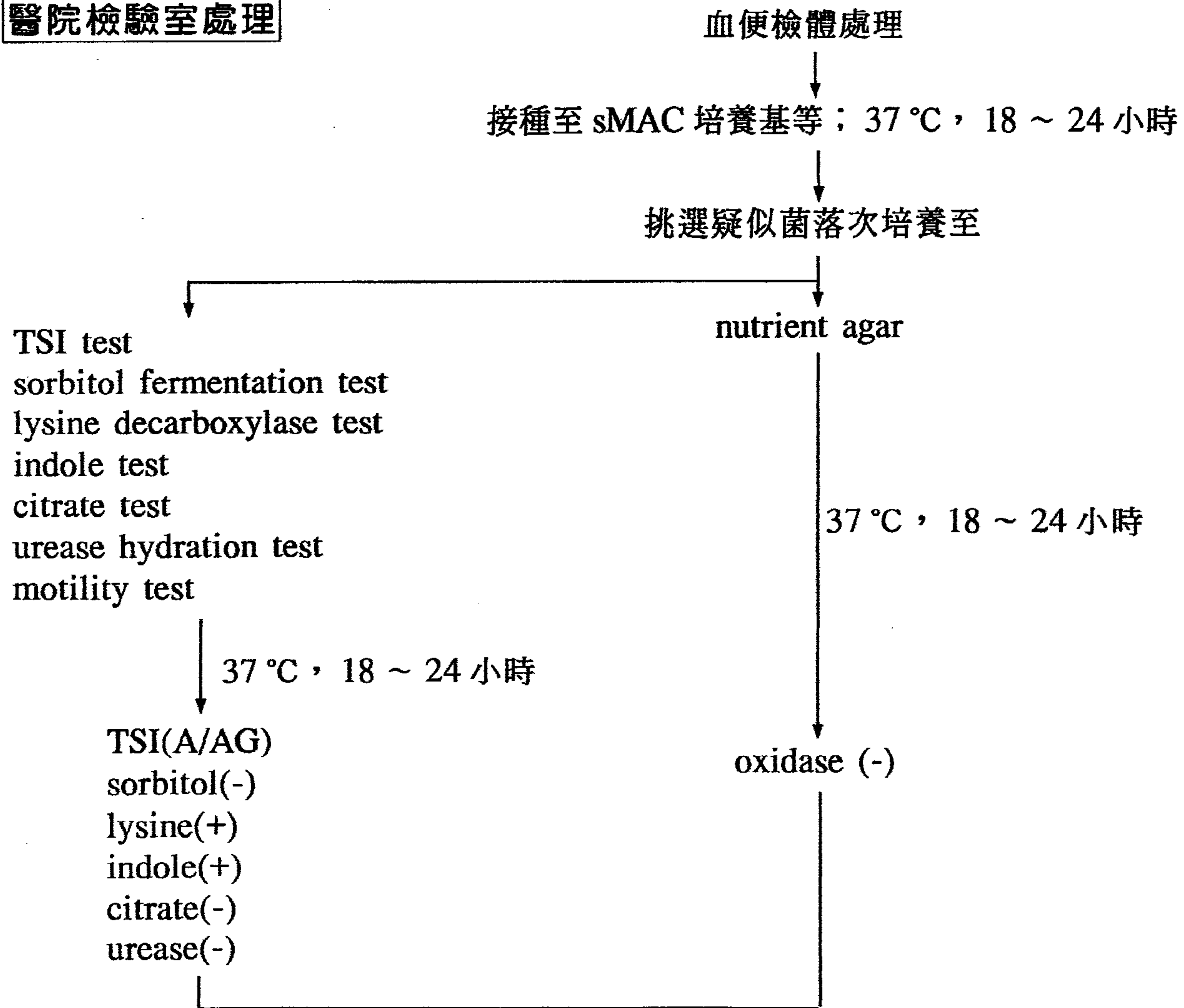
由於 EHEC 中以 *E. coli* O157:H7 最常見，所引起的症狀也最嚴重，而其又有不同於其他 *E. coli* 的特性，所

以一般醫院及檢驗室均對此菌株做檢驗與鑑定 (美國 CDC 也只對 EHEC 中的 O157 型做監測)。檢驗步驟是先將血便檢體接種至選擇性培養基 (如 sorbitol MacConkey agar, sMAC)，經過 18 至 24 小時 37°C 的培養後，挑選四至五個疑似菌落，做次培養及生化試驗，確定是 *E. coli* 後，再做 O157 抗血清試驗 (此試驗及以下試驗由預研所確認)。若為陽性，且具運動性，則做 H7 抗血清試驗，均為陽性，則可確定病例；若 O157(+) 而不具運動性，則做 SLT(VT) 毒素測試，若為陽性則確定病例 (圖三)。

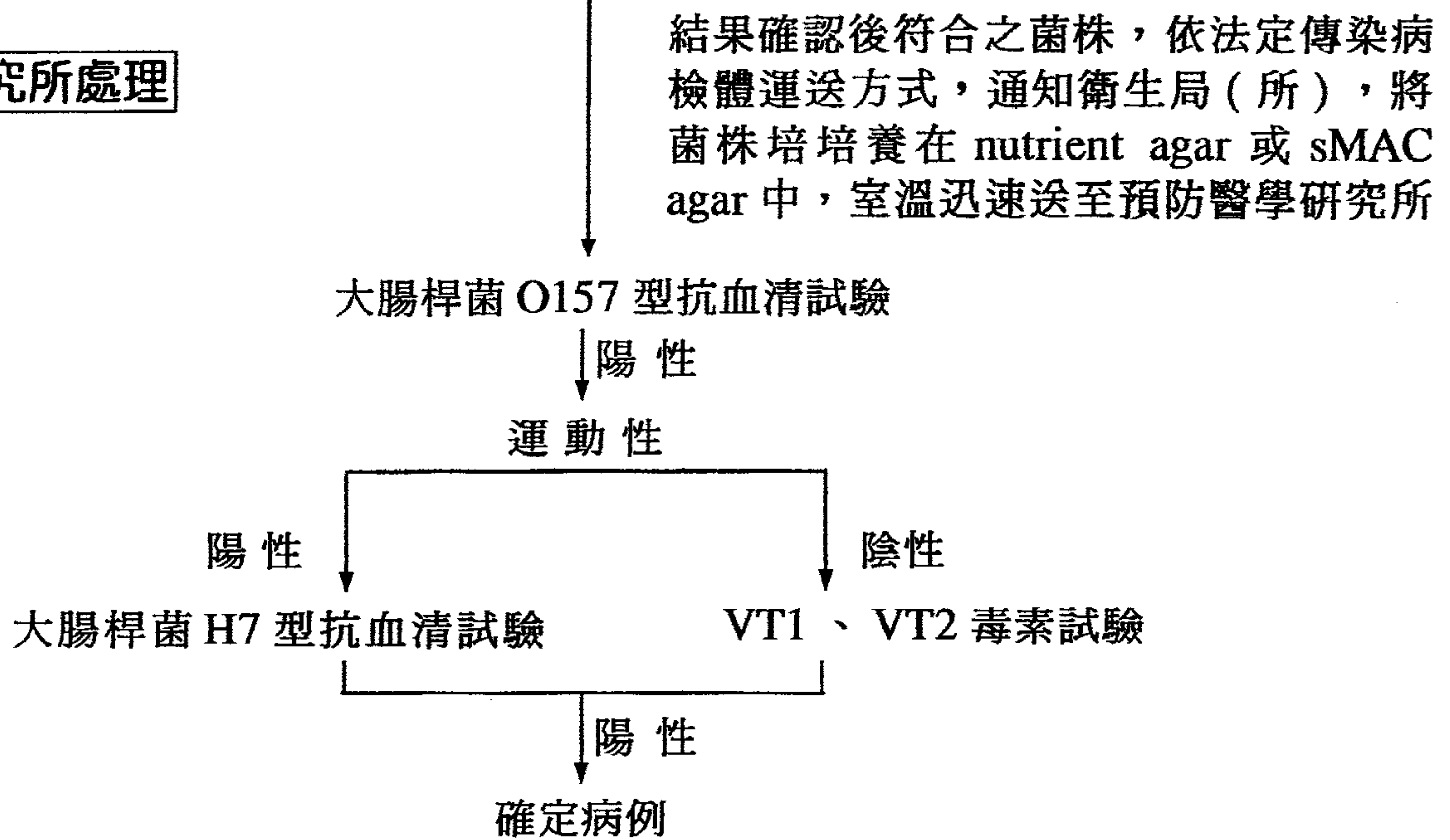
三、選擇性培養基

其實除了 sMAC 之外，還有幾種常用的培養基，包括 CT-sMAC (sMAC with cefixine 和 tellurite)、BCM O157、CHROM agar、Fluorocult media 及 Rainbow agar O157 等 (表二)。sMAC 和 CT-sMAC 都是利用 *E. coli* O157:H7 無法發酵 sorbitol 的特性而設計，該菌會在培養基上產生無色的菌落而達到初步篩選的效

醫院檢驗室處理



預防醫學研究所處理



圖三 E. coli O157 之分離與鑑定流程

表二 選擇性培養基

	<i>E. coli</i> O157: H7	一般
sMAC*	無色	粉紅—紅色
CT-sMAC	無色	No growth
CHROM agar	淡紫	藏青色
Fluorocult	無螢光	螢光
BCM	深藍色	淡藍色
Rainbow agar	藍黑色	紅色系

* Sorbital non-fermenter: *Proteus*, *Morganella*, *E. coli* O157: H7

果。不同的是 CT-sMAC 還含有抗生素 cefixime 和 Tellurite，可以抑制 *Proteus* 和 *Morganella* 等 sorbitol 非發酵性革蘭氏陰性桿菌的生長，因此選擇性比 sMAC 來得更好。Fluorocult media 則是針對 *E. coli* O157:H7 缺乏 β -D-glucuronidase 的特性而設計的。該菌無法將培養基中的 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MDG) 分解，故其菌落在紫外線波長 360nm 下不產生螢光，可輕易地與其他的腸道菌做區分；而在 CHROM agar 上，*E. coli* O157: H7 菌落呈淡紫色，一般的 *E. coli* 則為藏青色；在 BCM O157 上，*E. coli* O157:H7 為深藍色的菌落，不同於一般 *E. coli* 的淡藍色；至於 Rainbow agar O157 不但可以很容易地區分藍黑色的 *E. coli* O157: H7，也可以區分 VTEC (EHEC) 和一般非致病性 *E. coli*；VTEC 在 Rainbow agar O157 上是藍色系的菌落，而非致病性的 *E. coli* 則屬紅色系。各個實驗室可依喜好、成本的考量，選

用合適的培養基，達到分離 *E. coli* O157:H7 的效果，但一般建議至少應具備 sMAC。

四、血清型別鑑定

致病性大腸桿菌 (EEC) 中，每一個亞型內之菌株與血清型別有關係。血清型別的鑑定是依據體抗原 (O) 及鞭毛抗原 (H) 來區分，目前腸內菌的抗原共分成 170 種，而市售的 monovalent 抗原約 50 多種，但一般都是先以 polyvalent 抗原 (含多種 monovalent Ag) 做篩選，比較合乎經濟效益，而 H 抗原目前市售的約有 22 種。目前各實驗室基於成本的考量，通常是將確定菌種送到預研所，由該單位進行血清型別的確證。

五、毒素分析試驗

EHEC 的特性之一就是它們均能分泌 shiga-like toxin (SLT) 又稱為 Verotoxin (VT)，而此毒素又分成 VT I 和 VT II 兩種，EHEC 至少能製造其中的一種。目前有許多方式來偵測此二種毒素，最常用的是 RPLA (reverse

passive latex agglutination) 方法測試。其原理是將抗 VTI 或抗 VTII 的抗體致敏於乳膠微粒上，在微量滴定盤的格子中加入增菌培養基上清液，若上清液中含有 VTI 或 VTII，會與加入的致敏的乳膠微粒接合，在盤底可以觀察到擴散性接合的現象；若不含毒素，則乳膠微粒在盤底形成集中的一點。亦可做連續稀釋以測得毒素的效價。

六、快速鑑定

(一) 免疫分析法

利用免疫分析法鑑定 O157:H7 是一種快速只需單一步驟的方法。其原理是先將抗 *E. coli* O157:H7 的抗體接合於濾膜上，將增菌完成的菌液滴在濾膜上後，經免疫擴散原理，若菌液含 O157:H7 則會與膜上之抗體產生免疫反應，形成一帶狀生成物，達到鑑定的效果。

(二) 乳膠凝集法

和一般乳膠凝集法相似。先將抗 *E. coli* O157:H7 的抗體接合於乳膠微粒上，挑取一個懷疑之菌落，以無菌水乳化後，取一滴菌液與一滴乳膠試劑混合，均勻搖動後，若產生凝集則為陽性反應。

(三) 分子生物學之鑑定

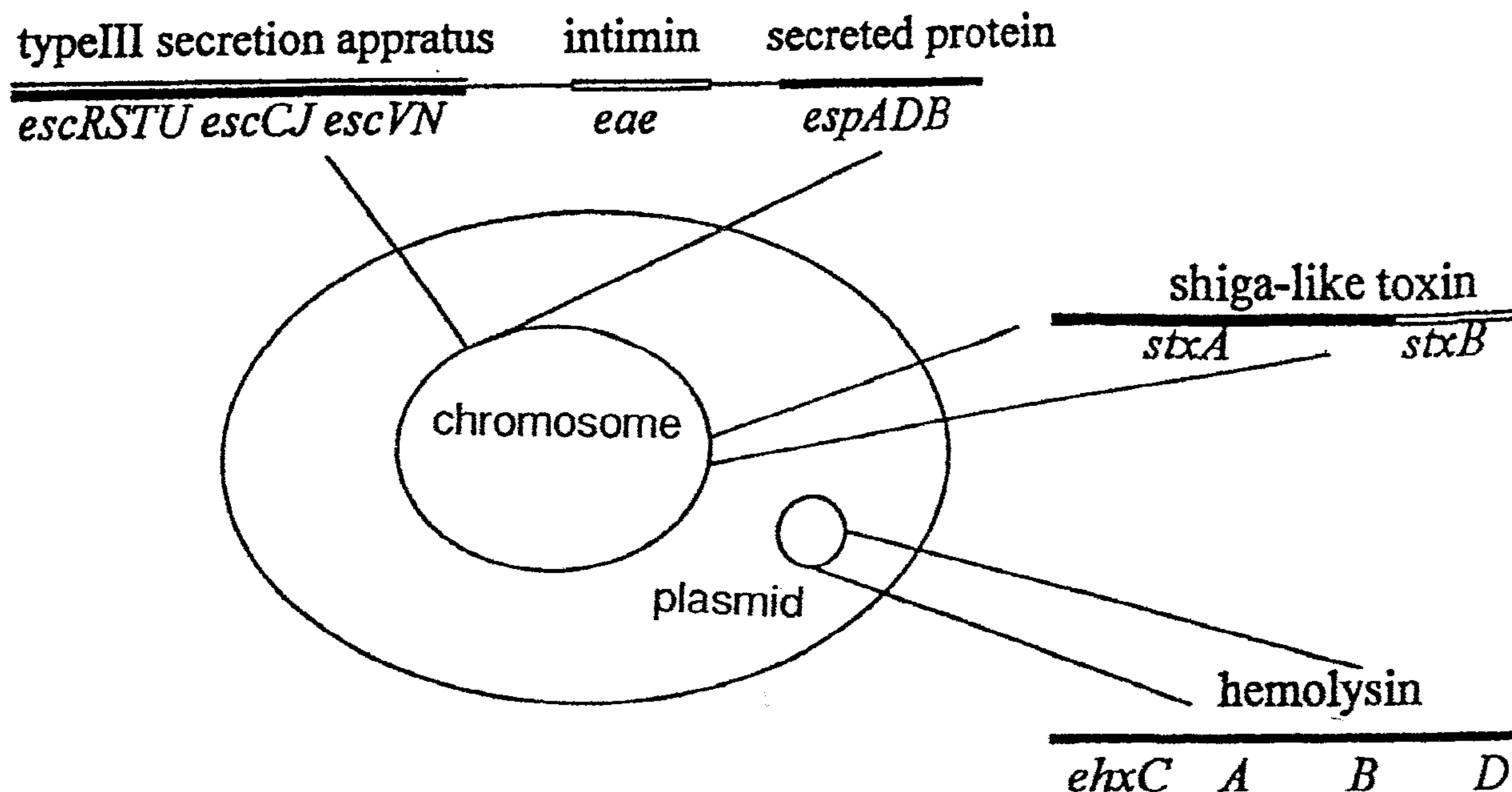
大多數的實驗室都是利用 sMAC 來分離，再以血清分型試驗確認 *E. coli* O157:H7。但因病患常常延誤採檢時間，糞便中菌量可能不多，導致低分離率的情形；此外也可能有偽陽性的結果，如 *Escherichia hermannii* 其 sorbitol 反應亦為陰性，且會與 *E. coli*

O157:H7 抗血清反應。故近年來，許多學者利用分子生物學方法來偵測，包括 DNA 探針 (DNA probe)、聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)、multiplex PCR 等，可以加快檢驗的速度及提高敏感度；在分型方面，方法包括限制片段長度之多形性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、脈衝式膠電泳 (pulse-field gel electrophoresis, PFGE) 和嗜菌體分型 (phage-typing) 等，以 PFGE 最常被使用。細菌分型在流行病學上可提供很有用的資訊。

利用分子生物學的方法來對致病性大腸桿菌 (EEC) 做分型，已越來越被廣泛地應用，這歸功於分子生物學的進步以及我們對於 EEC 致病因子與其基因的了解，不但可以對單純的菌株做鑑定，近年來，由於檢體處理的改良，將檢體中抑制 PCR 反應的物質如 bilirubin、bile salt 加以除去，我們更可以直接由檢體來進行 PCR 反應。在 EHEC 方面，我們偵測的致病因子之基因包括製造吸附蛋白 intimin 的基因 *eae*、表現 SLT 的毒素基因 *stx*、以及其他分泌性蛋白和溶血素的基因 *espADB* 和 *ehx* 等 (圖四)。

預防與治療

由於 *E. coli* O157:H7 的主要傳播途徑是帶菌的家畜和家禽、受污染的水以及被該菌感染的患者，因此，可針對此採取預防措施。在污染源之預防方面，應對高危險之帶菌家畜施行



圖四 腸出血性大腸桿菌 (EHEC) 之致病基因圖

注射，減少帶菌或擴散病菌的機會；在牲畜屠宰加工的過程中，要避免牲畜的腸內物（糞便）污染肉品，於食用前應經過適當的烹調處理，避免食用生乳、不潔的水；處理食品時，應充分洗淨；處理食品的器具、容器也要洗淨，以防二次污染。在接觸患者的預防措施方面，受感染的人，尤其是兒童，應經常用肥皂洗手，以減少傳播的危險性；被患者糞便污染的衣服，除煮沸或以消毒劑清洗外，須與家人的衣物分開清洗，並在陽光下充分曬乾；接觸患者糞便的物品，應用鹼性肥皂或 75% 的酒精消毒，再以大量的清水沖洗。

治療原則方面，一般是採用支持療法，讓病患安靜休息，補充水分，給予容易消化的食物；對於無法進食

的患者則給予靜脈注射，絕對不可以使用止瀉劑或任何腸道蠕動抑制劑，因為這可能會使得細菌及毒素在體內停留的時間增加，導致病情的惡化，甚至會發生嚴重的併發症。雖說志賀氏菌所引起的痢疾可使用口服抗生素有效地加以治療，然而，想用抗生素治療 *E. coli* O157:H7 的感染，到目前為止，藥物的選擇還是莫衷一是。在日本有抗生素無法改善症狀的報告，甚至還有因為使用 sulfamethoxazole-trimethoprim、gentamicin 等抗生素而使病情惡化成 HUS 的報告 [9]。一般認為這是因為細菌被抗生素殺死後釋放出大量毒素的結果，所以並不鼓勵使用抗生素來治療。而一旦併發 HUS，即須以急性腎衰竭 (ARF) 之原則來處理，維持體液及電解質之平衡，必要

時須使用透析治療；若併發為TTP，其治療要領為儘快進行血漿置換術，避免輸血小板以免引起栓塞。

結 語

雖然台灣地區目前尚未證實 *E. coli* O157: H7 感染之病例報告，但根據預研所及藥物食品檢驗局的報告，在抽驗的牛糞和食品中曾找到此菌，是非常值得我們注意的地方。就連英、美以及我國鄰近國家日本，這些醫療衛生先進的國家都有流行的報告，在台灣可能是國人的飲食習慣不同於這些國家的關係吧？而降低了感染的機會，然而是真的沒有，還是沒有檢測出來，有待澄清。我們當然希望不要有流行或病例的發生，但「無恃敵之不來，正恃吾有以待之。」我們必須對此病菌有警覺，具備送檢的認識以及檢驗的能力，再配合適當的治療，一旦發生流行，可以在臨床醫師、檢驗室及衛生單位的密切配合下，有最好的應變能力，達到最好的醫療品質。

參考文獻

1. Elmer W, Steplen D, Paul C, et al: Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Lippincott, Philadelphia, New York. 5th ed: 196-200.
2. Anonymous: From the Centers for Disease Control and Prevation. Preliminary report: foodborne outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections from hamburgers-western United States. MMWR CDC Surveill Summ 1993; 42: 85-6.
3. Moriguchi N, Yagi K, Yamamoto T, et al: The drug sensitivity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and antibiotics treatment for hemorrhagic enterocolitis--from an outbreak of enterocolitis in Sakai city. Jap J Antibiotics 1997; 50: 591-6.
4. Konowalchuk J: Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immunol 1977; 18: 775-9.
5. Parry SM, Salmon RL, Willshaw GA, et al: Risk factors for and prevention of sporadic infections with vero cytotoxin (shiga toxin) producing *Escherichia coli* O157. Lancet 1998; 351: 1019-22.
6. Sparling PH: *Escherichia coli* O157: H7 outbreaks in the United States, 1982-1996. J Am Veterin Med Assoc 1998; 213: 1733.
7. Fitzpatrick M: Haemolytic uraemic syndrome and *Escherichia coli* O157. Br Mpd J 1999; 318: 684-5.
8. Mahon BE, Griffin PM, Mead PS, et al: Hemolytic uremic syndrome surveillance tomonitor trends in infection with *Escherichia coli* O157: H7 and other shiga toxin-producing *E. coli*. Emerg Infect Dis 1997; 3: 409-12.
9. Higami S, Nishimoto K, Kawamura T, et al: Retrospective analysis of the relationship between HUS incidence and antibiotics among patients with *Escherichia coli* O157 enterocolitis in the Sakai outbreak. [Japanese] Kansenshogaku Zasshi-J Jap Assoc Inf Dis. 1998; 72: 266-72.

推薦讀物

1. 民國八十八年四月行政院衛生署預防醫學研究所細菌組編印：腸出血性大腸桿菌檢驗研習會講義。
2. 日本厚生省：O-157 型病原性大腸菌感染症治療指南，1996 年 8 月 2 日。