

## 台灣地區腹瀉型病原性大腸桿菌流行概況分析

\*吳芳姿、王明琴、陳豪勇

行政院衛生署疾病管制局 研究檢驗中心

### 摘要

大腸桿菌在腹瀉及食物中毒疫情中扮演相當重要角色，在臺灣地區，由於大腸桿菌型別種類繁多並且缺乏菌株收集管道，對於 *E. coli* 所引起的腹瀉也不重視，因此缺乏各類致病型完整流行趨勢，及詳細流行概況分析調查資料。本研究中收集台灣地區北、中、南合作醫院及本實驗室通報腹瀉糞便檢體，經分離後共 649 株大腸桿菌，以 Multiplex-PCR、核酸探針法，配合(O:H)血清型別分析，各類型占總收集陽性菌株之百分比如下：EHEC (0.15%)、ETEC (7.08%)、EIEC (4.9%)、EAggEC (0.92%)，雖各型別發生率並非很高，但可以看出在台灣地區 ETEC 及 EIEC 感染比率較高，分析結果可初步瞭解近年臺灣地區各型別腹瀉性大腸桿菌之流行概況。

關鍵詞：腹瀉型大腸桿菌、致病因子分析、聚合酵素鏈反應、血清型別鑑定、毒素鑑定

### 前言

大多數大腸桿菌(*Escherichia coli*)在人體腸道中為正常菌群，提供人體所需之維生素 B<sub>12</sub> 及 K。但並不是所有的大腸桿菌均無致病性，部份血清型別會引起腹瀉及食物中毒等症狀，目前已經確定之 O:H 血清型別約有 200 種以上，Levine<sup>(1)</sup> 等人依據腹瀉型大腸桿菌的致病特性及發病型態歸納，主要分成六大類：腸毒素型大腸桿菌(enterotoxigenic *E. coli*; ETEC)、腸侵襲性大腸桿菌(enteroinvasive *E. coli*; EIEC)、腸病原型大腸桿菌(enteropathogenic *E. coli*; EPEC)、腸內附著性大腸桿菌(enteroadherent aggregative *E. coli*; EAggEC)、棲

息性大腸桿菌("attaching and effacing" *E. coli*)、腸道出血性大腸桿菌(enterohemorrhagic *E. coli*; EHEC)<sup>(2,3,4)</sup>。此六大類型大腸桿菌除了在致病型態上有所差異外，其生長特性、營養需求及生化特性上均無多大差別(腸道出血性大腸桿菌中之 O157:H7 型例外，因其缺乏 glucuronidase 無法發酵 sorbitol，因此可應用選擇性培養基分離)，因此尚無法以一般培養基方式鑑別分離，有時必須配合動物試驗及細胞培養毒性及附著性分析加以區分。

關於腹瀉性大腸桿菌依致病型態與致病因子特性區分，相關研究顯示：

1. 腸毒素性大腸桿菌 (ETEC)：於熱帶氣候地區最常見之感染性腹瀉菌，常引起旅行者腹瀉，當地以小孩及斷奶之嬰兒引起之症狀較為嚴重。引起腹瀉之主要原因為此菌分泌的腸毒素，其致病機轉為熱耐受性腸毒素(heat-stable enterotoxin; STa)及熱敏感性腸毒素(heat-labile enterotoxin; LT D)，作用於小腸細胞，刺激後使細胞內 adenylate cyclase 或 guanylate cyclase 增加，進而使體液流失造成水樣便<sup>(1,3,4)</sup>。目前用來分辨 ETEC 的特徵除了 LT I 及 STa 外，還可依：O 血清型(Lipopolysacchride)、H 血清型(flagella)及 CFA (colonization factor antigens)<sup>(5)</sup>進一步分析。
2. 腸侵襲性大腸桿菌 (EIEC)<sup>(6)</sup>：此類型大腸桿菌的生化特性、基因特性及致病型態與 *Shigella* spp.極為相似。由研究報告顯示，多數流行性感染由食物或水造成，鮮少由人傳人的方式互相傳染。臨床特徵為水樣性腹瀉，但有少部份嚴重病人會有類似痢疾的現象(血便、糞便中出現黏膜細胞及白血球)。其致病因子基因位於質體 pInv (plasmid of Invasive) 及染色體上，致病基因產物負責侵入及調節破壞大腸上皮細胞<sup>(5,6)</sup>，並在細胞內繁殖，再侵入鄰近其它上皮細胞，造成破壞性細胞發炎反應。傳統檢測 EIEC 以 Sereny (guinea pig keratoconjunctivitis) 試驗及 Hela 細胞毒性試驗來鑑別，目前已有研究利用 probe hybridization 或 PCR 偵測 *ial* 基因作為快速鑑別。

3. 腸病原性大腸桿菌 (EPEC)<sup>(6)</sup>：在開發中國家嬰兒腹瀉個案中 EPEC 扮演相當重要的角色，常發生於夏天及小於 2 歲嬰兒孩童。在受感染者小腸組織切片中可發現一 A/E (attaching and effacing) 部位，為附著在腸細胞上菌體的 intimate 與小腸絨毛形成的一融合區塊，可直接在電子顯微鏡下觀察到或以螢光染色方式觀察。此類菌的致病機制分成三階段，(1) Localized adherence：60MDa (EAF, EPEC adherence factor) 質體之產物<sup>(7)</sup> 調節 BFP (bundle-forming pilus) 附著於小腸黏膜上皮細胞；(2) Signal transduction：*eae* 及其他基因被活化並破壞微絨毛結構；(3) Intimate adhere：細菌藉由 intimin 附著至小腸上皮細胞，並破壞小腸黏膜形成 A/E 部位<sup>(8,9,10)</sup> 引起水樣狀腹瀉，並於糞便中可發現黏膜細胞。在 1995 年 Second International Symposium on EPEC 舉辦以前，EPEC 辨別方式僅以特定 O:H 血清型別分類，但在此會議中得到一共同鑑別歸類方法：A/E 部位、Stx-negative (由於部分 EHEC 也會在腸道形成 A/E 部位) 及具 EAF 質體者為典型 EPEC，若缺 EAF 質體為非典型 EPEC。
4. 腸道出血性大腸桿菌 (EHEC)：最早於 1983 年觀察到此類菌，於兩起大型爆發流行事件中，病人出現嚴重腹絞痛、水樣狀腹瀉接續黏稠狀血便、輕微或無發燒症狀，且部分 (10%以下) 病人因併發嚴重的腎衰竭、溶血性尿毒症候群 (hemorrhagic uremic syndrom; HUS) 及血栓性血小板缺乏性紫斑症 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP)<sup>(11, 12, 13)</sup> 而死亡。主要致病機轉為菌體附著於小腸黏膜，並釋放 Vero 毒素 (分為 VT I 及 VT II，又稱為 SLT I 及 SLT II) 使小腸細胞受損，引起出血情形。目前研究學者多認為 Vero 毒素為其主要致病因子，檢測方法主要以 RPLA 或 ELISA 方法測檢出菌是否分泌毒素，或以 PCR<sup>(14,15,16)</sup> 方式測 *vt I* 及 *vt II* 基因，及 O157:H7 型大腸桿菌特殊缺陷基因 *uidA*。
5. 腸內附著性大腸桿菌 (EAaggEC)<sup>(6,17,18)</sup>：在 Cravioto 等人分析 EPEC 之

HEp-2 細胞附着性試驗過程中首次發現，研究顯示辨認 EA<sub>g</sub>EC 方式歸納如下：生化反應為 *E. coli*，不分泌 ST 或 LT 腸毒素，並且以 AA (Aggregative adherence) 形態附着於 HEp-2 細胞上。臨床上病人有 68% 會持續性腹瀉 (≥ 14 天)，並且多數為嬰兒，有嘔吐無發燒現象。EA<sub>g</sub>EC 感染具有區域性，此類病患多發生於開發中國家，如墨西哥、智利、伊朗及孟加拉等國。針對於此類菌的致病機制目前均未有一定論。

大腸桿菌是相當大類的細菌族群，全球各地區均有實驗室針對其中一至二類型詳細研究，尤其美國與歐盟組織已在近幾年架構 *E. coli* 監測網，並於每年開國際性會議討論世界性流行趨勢與研究發展，在各研究中收集自腹瀉性大腸桿菌研究分析資料，對於致病機制與分析方法有部份已相當清楚；但在臺灣地區，尙未有詳細流行概況分析調查資料。本研究中收集台灣地區北、中、南合作醫院腹瀉糞便檢體，經分離後共 564 株大腸桿菌。研究分析結果可瞭解臺灣地區各型別腹瀉性大腸桿菌之流行概況。

## 材料與方法

### 一、試驗使用之菌株

#### (一) 標準對照菌株：

在本研究中爲了建立聚合酵素鏈反應快速鑑定方法，委託食品工業發展研究所菌種保存及研究中心 (Culture Collection and Research Center; CCRC, 新竹, 台灣) 購買美國標準菌種中心 (American Type Culture Collection; ATCC, Rockville, Maryland, USA.) 之 *E. coli* 標準菌株，菌株編號及血清型別列於表一。

#### (二) 臨床菌株：

- (1) 由 89 年 7 月至 90 年 4 月間收集本局傳染病通報檢體，具有腹瀉症狀並分離出之 *E. coli* 之臨床菌株，共計 85 株。
- (2) 自臺大醫院、台中榮民總醫院及成大醫院，收集門診及住院疑

似 *E. coli* 引起腹瀉病患之分離株，分別收到 251、200、199 株菌株，但因部份為混合菌，經本實驗室重新分離並以 API-20E 生化分析後之菌株數分別為 225、160、179 株，共 564 株。

## 二、生化鑑定試驗

- (一) 挑選次培養於營養培養基之菌落，作 Oxidase 試驗，並接種於 TSIA、SIM、CIT、Urea Agar-Urease Test Medium，37°C 培養 18 小時，隔日判定結果。
- (二) 選用快速生化鑑定套組 API-20E (bioMerieux, Inc., France)，依據套組條件製備菌液、接種菌液於鑑定盤各反應格、培養、判讀結果，可依反應結果得到一組數字，查尋判定是否為 *E. coli*。

## 三、O、H 血清型別分析

本實驗使用日本生研 (Denka Seiken Co., LTD., Japan) 及丹麥血清研究所 (Statens Serum Institut, Denmark) 生產之致病性大腸桿菌 O、H 抗血清，共 68 種 O 血清型及 54 種 H 血清型。

- (一) 玻片凝集法：僅適用於 O 血清型別分析
  - (1) 將載玻片先以蠟筆分格，分別於兩分格內滴入適量的抗血清或無菌生理食鹽水 (測定是否有自體凝集現象)，再以無菌牙籤挑取次培養於營養培養基上之新鮮菌落，先於玻片一角塗勻後再與抗血清或無菌生理食鹽水混合均勻，約 5~10 秒觀察凝集情形。若為陽性反應以肉眼可看見凝集，陰性反應則呈均勻乳狀色，另一情形稱之為 O-Rough，即偽陽性，以生理食鹽水取代抗血清與菌株反應時也會有凝集的情形。
  - (2) 確認試驗：玻片凝集法為活菌試驗，因活菌菌體表面有許多不同之表面抗原，為避免陽性反應為偽陽性 (cross-reaction)，將陽性反應菌株培養液或懸浮液至於 100°C 水浴 1 小時，待冷卻後

重複 (1) 中之步驟，若仍凝集為陽性反應。

#### (二) 試管凝集法：適用於 H 血清型別鑑定

(1) 於 SIM 試驗中，運動呈陽性之菌落，數次培養於 H-semi Agar 中之內管，於 37°C 培養約 18 小時（視該菌運動快慢而定），再取最後一管菌，挑選外管表面之菌液次培養至 H Broth 中，培養 6 小時，取出菌液加入 0.5% formaldehyde 後，以試管或微量 96 孔盤作凝集試驗。陽性反應應於水浴靜置後，底部產生白色薄膜，並且以生理食鹽水取代血清之陰性對照反應無凝集現象者。

#### 四、菌株 DNA 抽取

將標準菌株或臨床分離菌株接種於 5 mL Gram Negative (GN) 培養液中，於 37°C 下隔夜培養，以 13,000~16,000 x g 離心 5 分鐘，留下菌體抽取 DNA。DNA 抽取以 Puregene DNA Isolation Kits (Model D-6000\*, Gentra Systems, Inc., Minneapolis, USA)。

#### 五、聚合酵素鏈反應

將抽取之 DNA 為模板加入反應混合液 (1 x reaction buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.8 at 25°C, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100; 300 μM deoxynucleotide triphosphates; 500 nM each primer; 0.5U/25 μL ProZyme™ II thermostable DNA polymerase (FINNZYMES OY, Espoo, Finland)。各反應條件如表二，引子序列及產物大小列於表三。聚合酵素鏈反應使用溫控循環器 (GeneAmp® PCR System 2400, Perkin Elmer, Foster City, U.S.A)，產物取 10 μL，依分子量大小選取 2.0 % 或 0.8% 洋菜膠進行電泳分析。

#### 六、聚合酵素鏈反應靈敏度試驗

將菌株接種於 Tryptic Soy Broth (TSB) 培養液中培養，再以平板計數法計算菌數，取 10<sup>5</sup> CFU/mL 菌液作 10 倍序列稀釋，之後以 100°C 水浴 5 分鐘處理後，離心除去菌體，取上清液 1 μL 作為聚合酵素鏈反應靈敏度試驗之

模板，反應條件如表四。

## 七、毒素分析試驗

### (一) 熱耐受性腸毒素試驗

將標準菌株接種在 Casamino acid-Yeast extract (CA-YE, Difco Laboratories, Detroit, USA) 培養液中於 37°C 以 120 rpm 振盪培養 18~20 小時。再以 1,000 x g 離心 30 分鐘，除去菌體，取上清液使用大腸桿菌熱耐受性腸毒素鑑定試劑 (COLIST EIA kit, Seiken, Japan) 進行測試 STa 毒素。

### (二) 熱敏感性腸毒素試驗

將菌株接種於含 Lincomycin (90 µg/mL) 腦心浸出培養肉湯 (BHI; Difco Laboratories, Detroit, USA)，於 37°C 以 120 rpm 振盪培養 18~20 小時，再以 1,000 x g 離心 30 分鐘，去除上清液後，加入 1 mL 生理食鹽水形成懸浮液。添加 10,000 U/mL polymycin B，再於 37°C 以 120 rpm 振盪培養 30 分鐘，以 3,000 x g 離心 20 分鐘，除去菌體，取上清液使用大腸桿菌熱敏感性腸毒素鑑定試劑 (V-ET RPLA kit, Seiken, Japan) 進行測試 LT I 毒素。

### (三) Vero 毒素試驗

將標準菌株接種在 CA-YE 培養液於 37°C 以 120 rpm 振盪培養 18~20 小時。以 1,000 x g 離心 30 分鐘，除去菌體，取上清液使用大腸桿菌 vero 毒素鑑定試劑 (VEROTOX-F RPLA kit, Seiken, Japan) 可同時進行 VT I 及 VT II 毒素測試。

## 八、限制酵素片段長度多型性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

為了區分 EPEC 及 EHEC 的 *eae* 基因 PCR 產物，將 LP1/LP2 及 LP1/LP3 引子對的 PCR 增殖產物，取 10 µL 以 PstI 或 HaeIII 限制酵素切割，置於 37 °C 水浴 2 小時，以 1.0 % 洋菜膠進行電泳分析，使用 DNA Molecular Weight Marker VI (Boehringer Mannheim, Germany) 作為分子量大小標幟。

## 結果與討論

### 一、標準方法之建立

近年來，聚合酵素鏈反應已漸漸應用於許多食品及臨床檢驗上，用以鑑別病原菌，對於致病性大腸桿菌歷年來也有許多研究報告發表，但都僅分別針對單一致病型別 (virotype) 之大腸桿菌進行檢測。本研究參考美國疾病管制中心(CDC)及致病性大腸桿菌致病因子探討文獻<sup>(14,15,16)</sup>中，挑選八對致病基因引子，分別以各型別 ATCC 購買之標準株 (如表一) 進行 multiplex 聚合酵素鏈反應，反應條件及引子序列如表二及表三，調整後可縮短傳統檢驗時間，並準確鑑定致病性大腸桿菌。

此外將 PCR 應用於臨床檢驗中，除檢測之正確性外，靈敏度亦相當重要。在本研究中分別以 *E. coli* 標準株序列稀釋後為模板，並選用各致病型別專一引子進行測試，結果列於表四，各種致病型別之大腸桿菌，測定之靈敏度均在於  $10^1 \sim 10^2$  CFU/assay 之間。在 1996 年 Public Affairs and Technical and Legislative Committee 中曾提到食品檢體中 O157:H7 大約 20~100 CFU/g 即可致病，其致病量為 *Salmonella* 致病量的萬分之一，因此有必要以靈敏度較高之方法檢測，本研究結果顯示，以 PCR 方式測定 O157:H7 之 *uidA*、*vt I* 基因，靈敏度為  $10^2$  CFU/assay，*vt II* 基因檢測靈敏度為  $10^1$  CFU/assay，因此靈敏度足以鑑定出致病菌量。1994 年 Yavzori<sup>(16)</sup> 等人設計 *ial* 基因引子，以此對引子測試 PCR 靈敏度約為  $6.4 \times 10^3$  CFU/assay，而在本研究中 PCR 靈敏度為  $10^2$  CFU /assay，由此可顯出本研究的正確性及靈敏度。

由於致病性大腸桿菌在全球一直是一項公共衛生問題，因此快速且靈敏度高的鑑定檢測方法相當重要。傳統培養基檢測法及血清鑑定必須花費 4~7 天，尤其 EPEC 及 EIEC 必須再作動物試驗或細胞試驗確認型別，所需時間更長；但以 PCR 方法鑑定檢測僅需數小時。本研究綜合以前文獻中發表的引子，並且嘗試將條件相近的引子一起作 multiplex-PCR，檢測結果與傳統生



化、血清分型及毒素鑑定結果相符。

## 二、臨床檢體之應用

(1) 由 89 年 7 月至 90 年 4 月間本局傳染病通報之檢體中，有腹瀉症狀並分離出之 *E. coli* 菌株為臨床菌株樣本，共計分離 85 株確定 *E. coli* 菌株，其中能與購買之 O 型抗血清凝集共 27 株，約占 31.76 %。此外，3 株 ST 毒素 EIA 試驗為陽性 (3.5%)，以 PCR 及 RPLA 測定 Vero 毒素及 LT 毒素結果均為陰性。

(2) 91 年 3 月至 11 月自臺大醫院、台中榮民總醫院及成大醫院，收集門診及住院疑似 *E. coli* 引起腹瀉病人之分離株，分別收到 251、200、199 株菌株，但因部份為混合菌，經本實驗室重新分離並以 API-20E 生化分析後之菌株數分別為 225、160、179 株，共 564 株。

自醫院收集之臨床菌株以 API-20E 做進一步生化分析，剔除生化反應結果非 *E. coli* 之菌株，將生化反應結果整理於表五，並與 API-20E 試劑提供之資料比對。本實驗室收集的菌株中，測試 arginine dihydrolase 之 ADH 及 sobitol、rhamnose、melibiose 醣類發酵之 SOR、MEL、RHA 試驗結果比率高於三家醫院收集的菌株，其中關於 sobitol 陰性菌株比例較高，可能與本實驗室使用 SMAC 挑菌有關。在台中榮總的菌株中 CIT 試驗陽性率占 0.6%，IND 試驗陽性率占 1.9%，明顯比其他實驗室菌株陽性率（均為 0）高，其中菌株的特殊性值得進一步探討。

臨床菌株共 649 株，各菌株之 O 血清型別，使用與致病性相關之 49 種抗血清測試，結果列於表六。於結果中均有檢體與 49 種抗血清呈凝集反應，其中臺大醫院與成大醫院菌株凝集反應陽性的血清型別較分散，無特定的分布；台中榮總的菌株有集中的趨勢，偏重於 O1 (3.1%)、O18 (3.1%)、O44 (3.8%)、O125 (3.7%)、O166 (2.5%)；本實驗室分離株，集中於其中 12 種血清型別，其中 O27 (2.4%)、O44 (4.7%)、O128 (2.4%)。各區可利用

致病性 O 型抗血清分析之菌株數占各區收集之大腸桿菌菌株數比為：臺大醫院 15.1%，台中榮總 29.3%，成大醫院 9.4%，本實驗室為 31.7%。

除生化及血清型別分析試驗外，挑選已建立之聚合酵素鏈反應之六對致病基因引子，進行臨床菌株共 649 株之聚合酵素鏈反應，分析後之 86 株陽性，結果列於表七。由聚合酵素鏈反應分析之各類型陽性結果為：EHEC 1 株，其 VT I 及 VT II 均陽性，此陽性菌株即於 90 年 9 月，本實驗室成功分離之台灣本土性第一例腸道出血性大腸桿菌（圖一），並利用 PFGE 與國內農場中牛之分離菌株作親源性分析<sup>(19,20)</sup>；EPEC 共 46 株，其中 LT 陽性 4 株、ST 陽性 42 株；EIEC 共 32 株，EaggEC 6 株，無 EPEC 菌株。因此，各類型占總收集菌株（649 株）之百分比如下：EHEC（0.15%）、EPEC（7.08%）、EIEC（4.9%）、EaggEC（0.92%）。雖各型別發生率並非很高，仍有很多菌株無法分析血清型別，但可以看出在台灣地區 EPEC 及 EIEC 感染比率較高。

在本研究進行中，為了將傳統生化鑑定及血清型別分析之結果與聚合酵素鏈反應之結果分析比較，因此花費相當的人力及時間於血清型別分析，將一株菌株完成完整的 O、H 血清型別鑑定需連續 7 天時間，而以 PCR 鑑定應用於臨床致病性大腸桿菌之診斷，不但可以縮短鑑定時間與流程，且 multiplex-PCR 之效果亦相當不錯，更可同時鑑定多種型別之致病性大腸桿菌。

## 建議

大腸桿菌為腹瀉性疾病之重要感染源，歐美之國家參考實驗室近來非常重視，已成立監測網，定期收集疫病流行概況及菌株，並每年舉行年會討論；美國 CDC 將分離之菌株基因作 PFGE 分析，並成立 PulseNet 基因資料庫。因此在國外如果爆發疫情，很快就能追溯感染源。在台灣，因檢驗致病性大腸桿菌經費較高也需要較多人力，所以無單位定期監測分析大腸桿菌，但建立大腸桿菌分析之實驗室及基因資料庫是國際趨勢，建議能組成一研究團隊將台灣的本土性參考實驗室架設起來。

## 致謝

感謝臺大醫院薛博仁醫師、鄧麗珍教授、陳玉姬醫檢師，台中榮民總醫院石健民主任、林進福醫檢師，成大醫學院吳俊忠教授，提供本研究之臨床檢體及實驗上之建議。

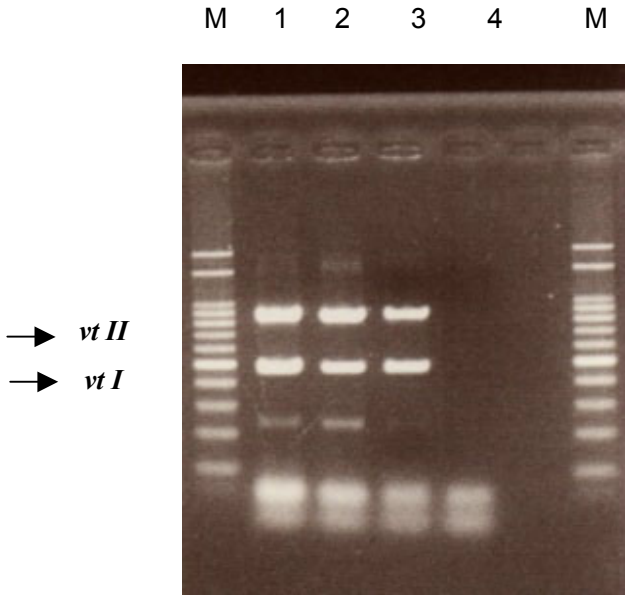
研究計畫 DOH90-DC-2021

## 參考文獻

1. Levine MM: *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 1987; 155: 377-389
2. Levine MM, Edelman R: Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev* 1984; 6: 31-51
3. Robins-Browne MR: Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev. Infect Dis* 1987; 9:28-53
4. Rowe B: The role of *Escherichia coli* in gastroenteritis. *Clin Gastroenterol* 1979; 8: 625-644
5. Wolf MK: Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 569-584
6. Nataro PJ, Kaper BJ : Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142-201
7. LaBrec EH, Schneider H, Magnani TJ, et al: Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. *J Bacteriol* 1964; 88: 1501-1518
8. Sansonetti PJ, Kopecko DJ, Formal BS: Involvement of a plasmid in the

- invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 1982; 35: 852-860
9. Baldini MM, Nataro JP, Kapper JB: Localization of a determinat for Hep-2 adherence by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1986; 52: 334-336
  10. caletsky LSC, Silva MLM, Trabulsi LR: Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hela cells. *Infect Immun* 1984; 45: 534-536
  11. Tzipori S, Wachsmuth IK, Smithers J, et al: Studies in gnotobiotic piglets on non-O157: H7 *Escherichia coli* serotypes isolated from patients with hemorrhagic colitis. *Gastroenterology* 1988; 94: 590-597
  12. Karmali MA, Steele BT, Petric M: Sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stool. *Lacent* 1983; 1: 619-620
  13. Kamali MA, Petric M, Lin C: The association between idiopathic hemolytic-uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985; 151: 775-782
  14. Cebula TA, Payne WL, Feng P: Simultaneous identification of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 248-250
  15. Schmidt H, Russmann H, Karch H: Virulence determinants in nontoxigenic *Escherichia coli* O157 strains that cause infantile diarrhea. *Infect Immun*.1993; 61: 4894-4898
  16. Yavzori M, Cohen D, Wasserlauf R, et al : Identification of Shigella species in stool specimens by DNA amplification of different loci of the Shigella

- virulence plasmid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994; 13: 232-237
17. Baudry B, Savarino SJ, Vial P, Kaper JB, et al: A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *E. coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *J Inf Dis* 1990; 161:1249-1251
  18. Schmidt H, Knop C, Franke S, et al : Development of PCR for screening of enteroaggregative *E. coli*. *J Clin Microbiol*.1995; 33:701-705
  19. Wu FT, Tsai TY, Hsu CF, et al : Isolation and determination of *Escherichia coli* O157:H7 associated with the first clinical case in Taiwan. *J Formo Med Asso* 2005; 104: 206-209
  20. Tsai TY, Luo WC, Wu FT, et al : Molecular subtyping for *Escherichia coli* O157:H7 isolated from Taiwan. *Microbiol Immunol* 2005; 49 (Accept on Apr 27th)



圖一、國內首例 O157 病患之 *vt I* 及 *vt II* 基因聚合酵素鏈反應結果

M :100 bp DNA ladder (MBI, Fermentas Ltd., NY, USA)

Lane 1 : EHEC (CCRC 15376)

Lane 2 : Y350-1(臺灣分離牛株)

Lane3 : TW-1 (台灣第一例人類分離株)

Lane 4: negative control

表一、本研究使用之標準對照菌株

ATCC* No.	CCRC** No.	Lab*** No.	Serotype	Toxin	Virotype
43890	15373	-	O157:H7	VT I	EHEC
43889	14825	-	O157:H7	VT II	EHEC
35150	15376	-	O157:H7	VT I、VT II	EHEC
43894	15377	-	O157:H7	VT I、VT II	EHEC
43895	14824	-	O157:H7	VT I、VT II	EHEC
43888	15374	-	O157:H7	-****	EHEC
35401	15372	-	O78:H11	LT、ST	ETEC
43893	15375	-	O124:NM	-	EIEC
29552	15530	-	O111ab:H21	-	EPEC
23985	15536	-	O142:H6	-	EPEC
-	-	Eagg1		-	EAggEC
-	-	Eagg2		-	EAggEC

\* ATCC: American Type Culture Collection

\*\* CCRC: Culture Collection and Research Center

\*\*\* Lab: From Japan stool isolates

\*\*\*\* -: do not release VT I, VT II, LT and ST

**表二、致病性大腸桿菌致病因子基因之聚合酵素鏈反應條件**

Stage	Gene						
	<i>lt</i>	<i>sta</i>	<i>vtI/vt2</i>	<i>uidA</i>	<i>eae</i>	adhere plasmid	<i>ial</i>
I	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min	95°C, 5 min
II: denaturing	94°C, 1min	94°C, 1min	94°C, 1min	94°C, 90sec	94°C, 45sec	94°C, 40 sec	94°C, 1 min
annealing	45°C, 1min	45°C, 1min	62°C, 1min	60°C, 90sec	64°C, 1min	48°C, 1min	45°C, 70sec
extension cycle no.	72°C, 1min 30	72°C, 1min 30	72°C, 1min 30	72°C, 90sec 35	72°C, 150sec 30	72°C, 1min 30	72°C, 90sec 30
III	72°C, 10 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min

**表三、聚合酵素鏈反應引子及產物大小**

Gene	Primer	Sequence	Product size (bp)	Virotype
<i>lt I</i>	LT1	5'-AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA-3'	132	ETEC
	LT2	5'-CGTGCTCAGATTCTGGGTCTC-3'		
<i>sta</i>	ST1	5'-TTTATTTCTGTATTGTCTTT-3'	171	ETEC
	ST2	5'-CAATTACAACACAGTTCACAG-3'		
<i>vt I</i>	NS1	5'-CAGTTAATGTGGTGGCGAAG-3'	475	EHEC
	NS2	5'-CACAGACTGCGTCAGTGAGG-3'		
<i>vt II</i>	NS5	5'-CTTCGGTATCCTATTCCCGG-3'	862	EHEC
	NS7	5'-CGCTGCAGCTGTATTACTTTC-3'		
<i>uid A</i>	PT2	5'-GCGAAAACACTGTGGAATTGGG-3'	252	O157:H7
	PT3	5'-TGATGCTCCATAACTTCCTG-3'		
<i>eae</i>	LP1	5'-CCCGGGATCCATGATTACTCATGGTTTTT-3'	2817, 2802*	EPEC
	LP2	5'-CCCGAATTCTTATTTTACACAAGTGGC-3'		
	LP3	5'-CCCGAATTCTTATTCTACACAAACCGC-3'		
Adhere plasmid	PD1	5'-CTGGCGAAAGACTGTATCAT -3'	630	EAEC
	PD2	5'-CAATGTATAGAAATCCGCTGTT -3'		
<i>ial</i>	ial 1	5'-GTGGATGGTATGGTGAGG-3'	320	EIEC
	ial 2	5'-GGAGCCAACAATTATTT-3'		

\* LP1/LP2 聚合酵素鏈反應引子及產物大小 2817 bp, LP1/LP3 聚合酵素鏈反應引子及產物大小 2802 bp.

**表四、PCR 偵測各引子對之靈敏度**



Virotype	ETEC		EHEC			EPEC	EIEC	
Gene	<i>lt I</i>	<i>sta</i>	<i>vt I</i>	<i>vt II</i>	<i>uid A</i>	<i>eae</i> (LP1/LP3)	<i>eae</i> (LP1/LP2)	<i>ial</i>
Sensitivity (CFU/assay)	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>

表五、臨床菌株以 API-20E 套組分析統計結果

生化試驗 百分比	ON PG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	UER	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
台大	97.3	16.5	96.4	58.6	0	0	0	0	100	0.5	0	100	99.5	1.4	98.2	97.3	73.3	98.6	0.9	99.5	0
中榮	100	18.1	93.8	67.5	0.6	0	0	0	98.1	1.2	0	100	100	0.6	100	98.1	71.9	100	1.2	100	0
成大	95.5	16.8	92.2	62.6	0	0	0.6	0.6	100	0	0	100	98.9	1.1	98.3	98.9	60.9	95.5	1.1	99.4	0
CDC Taiwan	96.5	51.8	96.5	49.4	0	0	1.2	0	100	1.2	0	100	100	2.4	87.1	87.1	52.9	88.2	0	100	0
總數	97.4	21.6	94.6	60.7	0.2	0	0.3	0.2	99.5	0.6	0	100	99.5	1.2	97.2	96.6	66.9	96.8	0.9	99.7	0
<i>E. coli</i> 1	90	1	74	70	0	1	3	0	89	0	0	99	98	1	91	82	36	75	3	99	0
<i>E. coli</i> 2	26	1	45	20	0	1	1	0	50	0	0	99	90	1	42	30	3	3	1	70	0

表六、臨床菌株各血清型之菌株數及所佔比例

菌株來源	臺大醫院		台中榮總		成大醫院		CDC Taiwan		Total*	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
O1	0	0.0	5	10.6	1	5.9	0	0.0	6	4.8
O3	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O4	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O6	0	0.0	0	0.0	1	5.9	0	0.0	1	0.8
O8	1	2.9	0	0.0	1	5.9	1	3.7	3	2.4
O14	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O15	1	2.9	0	0.0	1	5.9	0	0.0	2	1.6
O17	2	5.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	1.6
O18	2	5.9	5	10.6	2	11.8	0	0.0	9	7.2
O20	0	0.0	1	2.1	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O23	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O27	0	0.0	1	2.1	0	0.0	2	7.4	3	2.4
O28ac	0	0.0	0	0.0	1	5.9	0	0.0	1	0.8
O29	1	2.9	0	0.0	1	5.9	1	3.7	3	2.4
O30	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O44	2	5.9	6	12.8	1	5.9	4	14.8	13	10.4
O46	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O48	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O53	0	0.0	1	2.1	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O55	0	0.0	1	2.1	1	5.9	0	0.0	2	1.6
O71	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O75	2	5.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	1.6
O82	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O86a	0	0.0	2	4.3	1	5.9	0	0.0	3	2.4
O88	2	5.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	1.6
O90	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O111	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O114	0	0.0	2	4.3	1	5.9	0	0.0	3	2.4
O115	0	0.0	0	0.0	1	5.9	1	3.7	2	1.6
O119	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O123	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O125	2	5.9	6	12.8	0	0.0	0	0.0	8	6.4
O126	0	0.0	1	2.1	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O127a	0	0.0	1	2.1	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O128	0	0.0	0	0.0	1	5.9	2	7.4	3	2.4
O138	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O142	0	0.0	2	4.3	0	0.0	0	0.0	2	1.6
O143	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	3.7	1	0.8
O144	0	0.0	1	2.1	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O146	1	2.9	3	6.4	0	0.0	1	3.7	5	4
O148	0	0.0	1	2.1	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O151	0	0.0	1	2.1	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O153	0	0.0	1	2.1	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O157	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	3.7	1	0.8
O158	0	0.0	2	4.3	1	5.9	0	0.0	3	2.4
O159	1	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.8
O166	2	5.9	4	8.5	1	5.9	1	3.7	8	6.4
O168	0	0.0	0	0.0	1	5.9	1	3.7	2	1.6
O169	1	2.9	0	0.0	0	0.0	11	40.7	12	9.6
菌株總數	34		47		17		27		125	
型別數	49	27	20		16		12			

表七、臨床菌株聚合酵素鏈反應分型分析結果

Virutype	EHEC		ETEC		EIEC	EPEC	EAEC
gene No.	<i>vt1</i>	<i>vt2</i>	<i>lt</i>	<i>st</i>	<i>ial</i>	<i>eae</i>	Adhere plasmid
台大	0	0	1	17	14	0	3
中榮	0	0	3	8	17	0	0
成大	0	0	0	13	1	0	3
CDC Taiwan	1	1	0	4	0	0	-
Total	1	1	4	42	32	0	6