

計畫編號：DOH93-DC-2025

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

台灣地區本土及境外移入阿米巴痢疾之分子流行病學研究

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局研究檢驗組

計畫主持人：鄧洪音

研究人員：江峻昇、徐水源、蕭偉宏、詹韻仙

執行期間： 93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見\*

## 目錄

	頁碼
封面	
目錄	( 2)
摘要	( 3)
前言	( 5)
材料與方法	( 8)
結果	(11)
討論	(14)
參考文獻	(16)
圖	(19)
表	(25)

## 摘要

世界衛生組織 (WHO) 根據近年來各項證據，於 1997 年將非致病性阿米巴分類成一新種別—*Entamoeba dispar*，建議對患者感染之阿米巴原蟲致病性加以區分後再予藥物治療及防治，同時指出發展致病性痢疾阿米巴鑑別診斷系統、重新建立阿米巴痢疾盛行率調查資料、致病性痢疾阿米巴之分子流行病學研究為現今阿米巴感染症研究之重點。本研究將利用已開發之檢體處理、DNA 萃取及 PCR 技術，以前人已使用之 serine-rich *E. histolytica* protein gene (*srehp*) 及 *locus 1-2* 為基因型別標幟，針對台灣某精神病院住院病人糞便檢體中所發現之痢疾阿米巴進行基因型別鑑定，發現流行於該院之痢疾阿米巴有兩型主要的 *srehp* 型別及四型 *locus 1-2* 基因型別。同時合併日本學者所發表之日本及泰國病例之痢疾阿米巴型別進行親緣關係分析，初步結果可見台灣、日本及泰國之 *srehp* 或是 *locus 1-2* 型別並無法完全區別，有待未來更多型別納入本研究所提出的親緣關係分析模式，作為全球各地區痢疾阿米巴型別區分之依據。

**關鍵詞**：阿米巴痢疾、基因型別、分子流行病學

## 英文摘要

The amoebiasis meeting held by WHO in 1997 claimed that amoebiasis is the infection with pathogenic *Entamoeba histolytica* whereas the morphologically indistinguishable *E. dispar* is merely commensal amoeba residing in the human intestinal tract. The development of diagnostic kits specific for *E. histolytica*, renewed prevalence survey and molecular epidemiology thus became the important issues in amoebiasis research. By taking advantage of the techniques involved in the stool specimens processing, DNA extraction and PCR developed in this laboratory, the *srehp* and *locus 1-2* genotypes out of the *E. histolytica* isolated from the mental residents in one of the mental hospitals in Taiwan have been investigated. There is two major *srehp* genotypes transmitted there though more than 20 minor types were also identified. Besides, 4 different *locus 1-2* genotypes were identified. We also proposed a model for phylogenetic analysis, which is based upon the fact that the frequency for the mutation is much larger than that of tandem repeats extension. The data of genotype from Japan and Thailand were combined and analyzed. Preliminary results indicated that there are no distribution differences among Taiwan, Japan and Thailand isolates. More data need to be incorporated from different sources and different areas of the world to test this model.

Keyword: *Entamoeba*, genotype, molecular epidemiology

## 前言

阿米巴感染症 (amoebiasis) 之病原痢疾阿米巴 (*Entamoeba histolytica*) 主要藉由糞口 (fecal-oral) 途徑傳染，無症狀之囊體攜帶者 (carrier) 為傳染之主源。痢疾阿米巴主要寄生於寄主腸道，大部分被感染者無症狀，它可能伺機侵入腸道上皮細胞，造成腹瀉、血便、大腸潰瘍，甚者穿過腸道感染其他臟器，引發致命性肝膿瘍 (liver abscess) 等。

人類阿米巴感染症之病例於 1875 年發表、1903 年命名病原為 *E. histolytica* 後，型態學描述一樣的原蟲也出現在許多無症狀「病人」(asymptomatic carriers) 糞便中，1925 年 Emile Brumpt 將這類無致病力之原蟲重新命名為新種 *E. dispar*，以示區隔。「致病性」及「新種原蟲」引發愈半世紀之爭議與研究，1993 年，Diamond 與 Clark 綜舉生化、免疫與遺傳等證據闡明兩個型態「極度相似」的 *E. histolytica* 與 *E. dispar* 實為兩個不同的 species<sup>2</sup>。*E. histolytica* 感染可能造成潰瘍或膿瘍等病變，而 *E. dispar* 感染不致造成任何臨床症狀。1997 年，WHO/PAHO/ UNESCO 針對阿米巴感染症做出革命性的結論與建議<sup>3</sup>，amebiasis 自此定義為 *E. histolytica* 之感染且無論是否有臨床上的症狀發生，以往臨床檢驗以鏡檢為主要之判定標準面臨新的考驗。病原定義之修正導引出新的阿米巴感染症研究方向：*E. histolytica* 專一診斷方法技術之開發、盛行率之重新調查、*E. histolytica* 蟲

株之基因鑑別、阿米巴症分子流行病學研究、阿米巴感染成為侵入性疾病及傳染模式、*E. histolytica* 致病機轉、疫苗之評估與開發等。

據 Walsh<sup>4</sup> 於 1981 年估計，全世界有四億八千萬人感染痢疾阿米巴，其中三千萬人有臨床症狀，四萬至十萬人死亡，感染人數需依 WHO 新定義重新修正，然其發病與死亡人數高居寄生蟲疾病之第二位（僅次於瘧疾），為極重要之熱帶傳染病，我國將之列為第二類法定傳染病，感染高危險群主要是長期集體療養之精障及智障人士、男同性戀者、外籍勞工及外籍新娘等。在非洲南部致病性阿米巴流行地區，*E. histolytica* 與 *E. dispar* 的感染率約為十比一，印度及中南美洲，*E. histolytica* 與 *E. dispar* 的感染率幾近一比一，至於其他地區，invasive amoebiasis 更是極度稀有<sup>5,6</sup>。阿米巴症分子流行病學研究仍屬萌芽階段，用於區分致病性痢疾阿米巴之 isoenzyme pattern 生化分析無法有效區分蟲株<sup>7</sup>；遺傳證據方面，正待開發適用之基因變異標幟，以便將 *E. histolytica* 蟲株做有效分型，自其中鑑定出較具侵入性的蟲株，並應用於追蹤感染者，以探討其病理進程及傳播模式。

*E. histolytica* 基因體的大小尚無定論，肇因為 *E. histolytica* 原蟲生活史各階段細胞核數目不一以及染色體套數 (ploidy) 未知<sup>8,9</sup>，基本上，它擁有 linear 染色體及 circular 染色體，後者類於基因載體，又稱為 episome，rRNA 基因位於其中，其基因序列常作鑑定 *Entamoeba* spp. 中

的種別<sup>10, 11</sup>。*E. histolytica* 之基因體具有 intron<sup>12</sup> 及 retrotransposon<sup>13-15</sup> 等真核生物之特徵，它同時也具有 repetitive DNA，例如 strain-specific gene (*ssg*)<sup>16, 17</sup>、serine-rich *E. histolytica* protein (SREHP) 基因 (*srehp*)<sup>18</sup>、chitinas 基因 (*chit*)<sup>19</sup>、asparagine-rich *E. histolytica* antigen 基因 (*ariel*)<sup>20</sup> 等 tandem repeats，已被初步嘗試於痢疾阿米巴之基因分型，另有 SINE, LINE-like repeat 等 interspersed repeats<sup>14</sup>，尚未應用於基因分型。*ssg* 位於 episome 中 rRNA 基因之上游，含 tandemly repeats<sup>17</sup>，因近來發現某些分離株缺乏此一基因<sup>21</sup>，*ssg* 較難作為型別標幟。SREHP 是一表面抗原，功能不明，具有 8-amino acid (aa) 到 10-aa 之 tandem repeats，其基因之 repeat 數目及序列均有多形變異 (polymorphism)<sup>1, 22-25</sup>，以其基因變異位於 coding sequence 中，多屬 synonymous polymorphism。最近分離出 *locus 1-2* 及 *locus 5-6* 二基因<sup>26</sup>，其中包含十個左右具變異性之 tandem repeats，為新興的分型標幟，又以 *locus 1-2* 變異較複雜。本研究蒐集台灣東部一精神療養院院民中阿米巴痢疾患者之糞便檢體，採用本實驗室自行開發的核酸抽取暨 PCR 技術，針對 *srehp* 及 *locus 1-2* 兩個分型標幟進行分析。

## 材料與方法

### 材料

ProSpect<sup>®</sup> 痢疾阿米巴微分析盤檢驗套組 (ProSpect<sup>®</sup> *Entamoeba histolytica* Microplate Assay 購自 Remel (USA)，Guanidine thiocyanate 購自 Amersham Pharmacia Biotech (USA)，矽藻土 (Celite<sup>®</sup>) 購自 Merck (Germany)，AmpliTaq<sup>®</sup> DNA polymerase 購自 Applied Biosystems (USA)，Platinum<sup>®</sup> Pfx DNA polymerase 及 TOPO TA Cloning Kit for sequencing 購自 Invitrogen (USA)；NuSieve 3:1 agarose 購自 Cambrex (USA)，Chelex<sup>®</sup> 購自 Bioi Rad (USA)，痢疾阿米巴蟲株 HM1:IMSS 購自 ATCC (USA)，限制酶 *AluI* 購自 New England BioLabs (USA)，其他藥品均為試藥級。

### 檢體來源及分析處理

於某精神醫院收集住院病患之新鮮糞便檢體，採集後於 24 小時內進行 ELISA 試劑 ProSpect<sup>®</sup> *Entamoeba histolytica* Microplate Assay 初步篩檢，陽性者重新採集三次（不同天）新鮮糞便，依據實驗室自行開發之系統流程進行 DNA 萃取及 *E. histolytica/dispar* 之 PCR 鑑別檢驗<sup>27</sup>。

### 疾阿米巴蟲株培養

標準痢疾阿米巴蟲株 HM1:IMSS 之培養係參考 Diamond 等所開發的培



養基及培養條件<sup>28</sup>。

### 蟲株 *srehp* 基因型別鑑定 nested PCR 及序列分析

Nested PCR 之引子選取係參考 Ayeh-Kumi 等所建立之系統<sup>23</sup>，第一階段反應使用 SREHP-5 (5'- GCT AGT CCT GAA AAG CTT GAA GAA GCT G -3') / SREHP-3 (5'- GGA CTT GAT GCA GCA TCA AGG T -3') 引子對，可增幅 *E. histolytica srehp* 545-bp (in HMI:IMSS strain) 之基因片段，第一階段反應包括：2.5 µl DNA template，0.5 µM SREHP-5/SREHP-3，PCR buffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.3, 50 mM KCl)，200 µM dNTP，1.5 mM MgCl<sub>2</sub>，0.1 µg/µl BSA，0.05 U/µl AmpliTaq<sup>®</sup> DNA polymerase，反應總體積為 50µl，首先在 94 °C 加熱 2 分鐘，緊接進行 35 個循環反應，每個循環包括：94 °C ×15 秒，50 °C ×15 秒，72 °C ×1 分鐘，最後以 72 °C ×6 分鐘終止反應。第二階段反應使用 nSREHP-5 (5'- TAT TAT TAT CGT TAT CTG AAC TAC TTC CTG -3') / nSREHP-3 (5'- TGA AGA TAA TGA AGA TGA TGA AGA TG -3') 引子對，可增殖第一階段反應產物中 *E. histolytica srehp* 450-bp (in HMI:IMSS strain) 之基因片段。第二階段反應包括：2 µl 第一階段反應產物，0.5 µM nSREHP-5/nSREHP-3，1X PCR buffer，200 µM dNTP，1.5 mM MgCl<sub>2</sub>，0.1 µg/µl BSA，0.05 U/µl AmpliTaq<sup>®</sup> DNA polymerase，反應總體積為 25 µl。在 94 °C 加熱 2 分鐘後，進行 35 個循環反應，每個循環包括：94 °C ×15 秒，50 °C ×15 秒，72 °C ×40 秒，最後以 72 °C ×6 分鐘終止反應。反應完成後經 2% 洋菜瓊脂電泳檢測產物長度。

兩階段之 PCR 產物可另以限制酵素 *AluI* digestion 加以確認。PCR 產物由洋菜膠中回收純化後，直接進行 DNA 核酸序列分析，或是如下述轉殖至 pCR 4-TOPO 後進行定序分析。

### 蟲株 locus 1-2 基因型別鑑定 PCR 及序列分析

*locus 1-2* 之 PCR 乃選取 Zaki 及 Clark 所建立之引子對<sup>23, 26</sup>，*locus 1-2* PCR 使用的引子對為 R1 (5'-CTG GTT AGT ATC TTC GCC TGT-3')及 R2 (5'-CTT ACA CCC CCT TCT TCT ATA ATT-3')，PCR 反應包括：5  $\mu$ l DNA template，0.5  $\mu$ M R1/R2，PCR buffer，200 $\mu$ M dNTP，2.5 mM MgCl<sub>2</sub>，0.05 U/ $\mu$ l AmpliTaq<sup>®</sup> DNA polymerase，反應總體積為 100 $\mu$ l。在 96  $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘後，進行 30 個循環反應，每個循環包括：94  $^{\circ}$ C  $\times$ 1 分鐘，60  $^{\circ}$ C  $\times$ 1 分鐘，72  $^{\circ}$ C  $\times$ 2 分鐘，最後以 72  $^{\circ}$ C  $\times$ 5 分鐘終止反應。反應完成後經 polyacrylamide 電泳/銀染檢測產物長度，產物長度會因蟲株的不同而有差異，但主要位於 400 bp 上下。PCR 產物回收純化後，進行 DNA 核酸序列分析。

### PCR 產物之選殖及定序

為進一步分析 *srehp* 及 *locus1-2* 之基因序列，另採具 3' to 5' exonuclease 校勘活性之 Platinum<sup>®</sup> Pfx DNA polymerase 進行 PCR 反應，條件如下：5  $\mu$ L template DNA，0.3  $\mu$ M primer mix，1X Pfx Amplification buffer，1.0 mM MgSO<sub>4</sub>，0.3 mM dNTP mixture 及 1.25 U Pfx DNA polymerase，反應最終體積為 50  $\mu$ L，在 94  $^{\circ}$ C 加熱 3 分鐘後，進行 35 個循環反應，每個循環包括：94  $^{\circ}$ C  $\times$ 15 秒，60  $^{\circ}$ C  $\times$ 15 秒，68  $^{\circ}$ C  $\times$ 2 分鐘。

PCR 產物之選殖使用 TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing，將上述 *srehp* 及 *locus1-2* 之增幅產物插入 pCR 4-TOPO 載體中，轉感大腸桿菌，經培養後純化其質體。以限制酵素及洋菜膠電泳確定為 *srehp* 及 *locus1-2* 之增幅產物，再進行單邊 DNA 定序，以 BLAST 程式將部份序列與 GeneBank 資料庫比對後，再進行全長定序。

## 結果

### 檢體蒐集及初步酵素免疫分析與 PCR 分析

本研究統計收集了某精神療養院全院 1976 名住院者之糞便檢體，以 ProSpect<sup>®</sup> *Entamoeba histolytica* Microplate Assay 進行 *E. histolytica/dispar* 抗原之初步篩檢，總計有 80 件為陽性。此 80 件陽性個案另採三次（不同天）新鮮檢體，經抽取純化 DNA 及 PCR 鑑別檢驗後，發現有 41 名為 *E. histolytica* 感染（表一）。該精神療養院已成立四十年，近十年來屢有阿米巴痢疾病例檢出，最近一次篩檢工作在 87 年，當時以 EIA 及鏡檢為主，並未區分 *E. histolytica* 及 *E. dispar*，一共於 1,582 位受檢者中檢出 358 名感染 *E. histolytica/dispar*，之後院內住民衛生環境有極大改善。在這次 41 名感染者中，有五名為近五年新入院者，有一人甚至僅入院五個月，表示該病仍持續該院傳播中。

### 蟲株 *srehp* 暨 *locus1-2* 基因型別鑑定

上述 41 名 *E. histolytica* positive 之檢體 DNA 依方法一節所述進行 *srehp* 及 *locus1-2* 之 tandem repeat 片段之 PCR 增幅及定序後，及結果列於圖一、圖四。

### DNA 重複序列之前處理、字串模式建立及演化樹之分析

*srehp* 之 DNA 序列依 Haghghi 等 2002 年<sup>1</sup>之 tandem repeat 劃分模式為基礎 (圖一)，先將 DNA 序列轉譯成 aa 序列，保留 tandem repeats 及其對應 DNA 序列，切除其餘序列。以 aa 之重複單元 (repeat unit) 為準將對應之 DNA 序列切割後複製於 Microsoft Office EXCEL 之工作表欄位，再以特定英文字母取代 DNA 之 repeat unit 後，成為 *srehp* 字串 (string)。

觀察含有許多 tandem repeats 之 *srehp* string 中，尚有 repeat 間的核苷酸鹼基突變，有些突變為 synonymous mutation，有些則非，我們將依這些突變及 tandem repeats 數目來分析<sup>29</sup>，分析之前提假設為：突變之機率較低，tandem repeat 之形成涉及 DNA 複製時的 slippage mechanism，而非有性生殖之基因重組，其機率較高。瀏覽 *srehp* string，依其相似度找出共同模式，將字串區分出 13 個位址 (Site A、B、C、、、、及 M)，並依 site 之順序將 string 拆解，如此 *srehp* string 得以排列在一起 (圖二)，如是可回歸正確的 site alignment 拆解後之 string，可轉譯成兩組數字，第一組依 Site 之「有」或「無」來定義，有=1，無=0；第二組則依位址之 repeat unit 之數目 (Site Number) 填寫。每一條 *srehp* 都有 site 及 site No. 兩組數字，紀錄於 EXCEL 之工作表欄位。

*Srehp* string 之 site 及 site No. 兩組數字，自 EXCEL 工作表轉存文字檔後，輸入 BioNumeric 4.01 版 (Applied Maths, USA) 進行分析。分析採用複合

資料組(Composite data set)以交叉比對之演算法計算 *srehp* string 間之相似度，site 及 site No 之權重比為 4:1，最後演化樹以 UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) 法來建構 (圖三)。

*Locus1-2* 之親源演化分析亦採用同樣模式進行 (圖四、五及六)。

經上述模式分析後將各種代表型別加入表一，在 41 個檢出 *E. histolytica* 之檢體中檢體中，24 件可直接以 nested PCR 增幅出主要的 *srehp* 片段，並加以定序，其中以第 7 型 (11 件) 及第 15 型 (12 件) 為主要之 *srehp* 型別，另有 1 件為第 19 型；8 件經 nested PCR 及電泳分析後產物超過一個，PCR 產物進行選殖定序後可得到多樣的 *srehp* 片段；另外 9 件無法以增幅方式分析，結果大致可看出第 7 及第 15 型為該院流行主要之型別，也是感染給近十年進住院民之主型，而其他零星附型皆出現於住院年數至少十年之住民，住民之園區房舍常因精神狀況及健保支付等原因異動，資料中無法顯現 *srehp* 型別與園區房舍之關聯。*locus 1-2* 片段經 PCR 增幅後皆為單一產物，只鑑定出四型 (表一、圖四)，第一型與第二型較類似，第三型型與第四型較類似，但是無法鑑別出主要型別。

## 討論

利用 *srehp* 及 *locus 1-2* 含 tandem repeats 之片段進行基因分型為現在世界阿米巴痢疾研究實驗室主要工作，主要分型工作僅限於痢疾阿米巴之培養蟲株<sup>22, 23, 26</sup>，所累積之型別資料庫極為有限，我們受惠於自行開發的「檢體直接萃取 DNA」及「PCR」技術，可針對所有通報及主動篩檢之病例檢體進行型別鑑定，可迅速增加資料庫之數量，使其更具代表性，並與其個案資料作連接，進行本土與他國病例之型別區分及資料庫建立。將有助於爆發流行時疫情調查分析及防治工作。

本計畫針對台灣某精神醫院住院病人四十一人所感染之痢疾阿米巴進行 *srehp* 及 *locus 1-2* 基因分型，經與 Haghghi 等<sup>1</sup>所發表日本國內病例及東南亞泰國病例<sup>25</sup>之分型相較，迅速加入二十二型新的 *srehp* 型別及兩型新的 *locus 1-2* 型別，依據突變之機率較低而 tandem repeat 之形成機率較高之假設，可暫且將全球病例已具 *srehp* 及 *locus 1-2* tandem repeat 序列的各種型別之親緣關係做一分析（圖三、圖六），因為全球病例之型別資料極有限，台灣本土病例、日本病例、泰國病例及印度病例為主要者，且互相穿插，有待世界各地區匯入更多更多 *srehp* 及 *locus 1-2* 基因的 tandem repeat 序列資料才能區分出主要型別。本實驗室已提供痢疾阿米巴研究領域自糞便檢體直接抽取 DNA 及 PCR 增幅的相關技術，現提出親緣分析模式，旨在號召該領域相關研究者一同取得資料並彙集資料以驗證分析模式。

本研究所篩檢之對象皆無臨床症狀，但該精神病院在十年前屢傳阿米巴肝膿瘍病例及因之死亡個案，本研究無法針對基因分型與致病與否或是侵入性與否的關係做結論，有待未來實驗室分析更多臨床通報（具臨床症狀）之病例資料，實驗室現在已掌握台灣另外一家精神病院及啟智教養院

病例、愛滋病及男同性戀之阿米巴感染者、東南亞外勞健檢等檢體，將在最短時間內將其分析完畢，相信所得資料將為世界上最完整者。為來對於各種流行病學分析、進一步發展成為侵入性疾病的機轉、以及傳染模式等研究將及有助益。

## 參考文獻

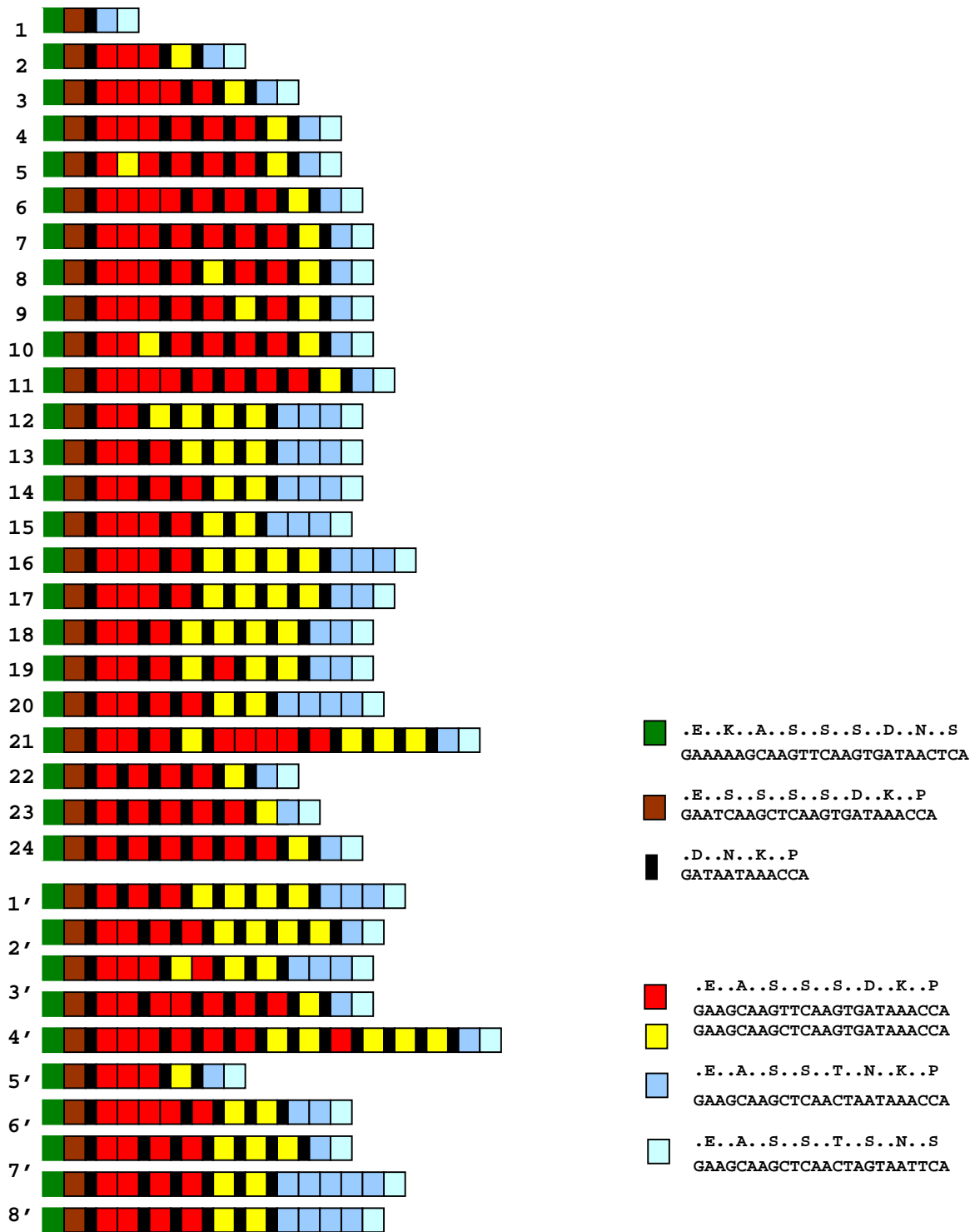
1. Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G, Nozaki T. Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *J Clin Microbiol*. Nov 2002;40(11):4081-4090.
2. Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol*. May-Jun 1993;40(3):340-344.
3. Anonymous. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull*. Mar 1997;18(1):13-14.
4. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis*. Mar-Apr 1986;8(2):228-238.
5. Clark CG. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene meeting at Manson House, London, 19 February 1998. Amoebic disease. *Entamoeba dispar*, an organism reborn. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Jul-Aug 1998;92(4):361-364.
6. Stanley SL, Jr. Amoebiasis. *Lancet*. Mar 22 2003;361(9362):1025-1034.
7. Sargeant PG, Williams JE, Grene JD. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1978;72(5):519-521.
8. Willhoeft U, Tannich E. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. Mar 15 1999;99(1):41-53.
9. Bhattacharya A, Satish S, Bagchi A, Bhattacharya S. The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol*. Apr 10 2000;30(4):401-410.
10. Bhattacharya S, Som, I., Bhattacharya, A. The ribosomal DNA plasmids of *Entamoeba*. *Parasitol Today*. 1998;14:181-185.
11. Silberman JD, Clark CG, Diamond LS, Sogin ML. Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small-subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biol Evol*. Dec 1999;16(12):1740-1751.
12. Willhoeft U, Campos-Gongora E, Touzni S, Bruchhaus I, Tannich E. Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Protist*. Jul 2001;152(2):149-156.
13. Sharma R, Bagchi A, Bhattacharya A, Bhattacharya S. Characterization of a retrotransposon-like element from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. Aug 2001;116(1):45-53.
14. Van Dellen K, Field J, Wang Z, Loftus B, Samuelson J. LINEs and SINE-like elements of the protist *Entamoeba histolytica*. *Gene*. Sep 4 2002;297(1-2):229-239.



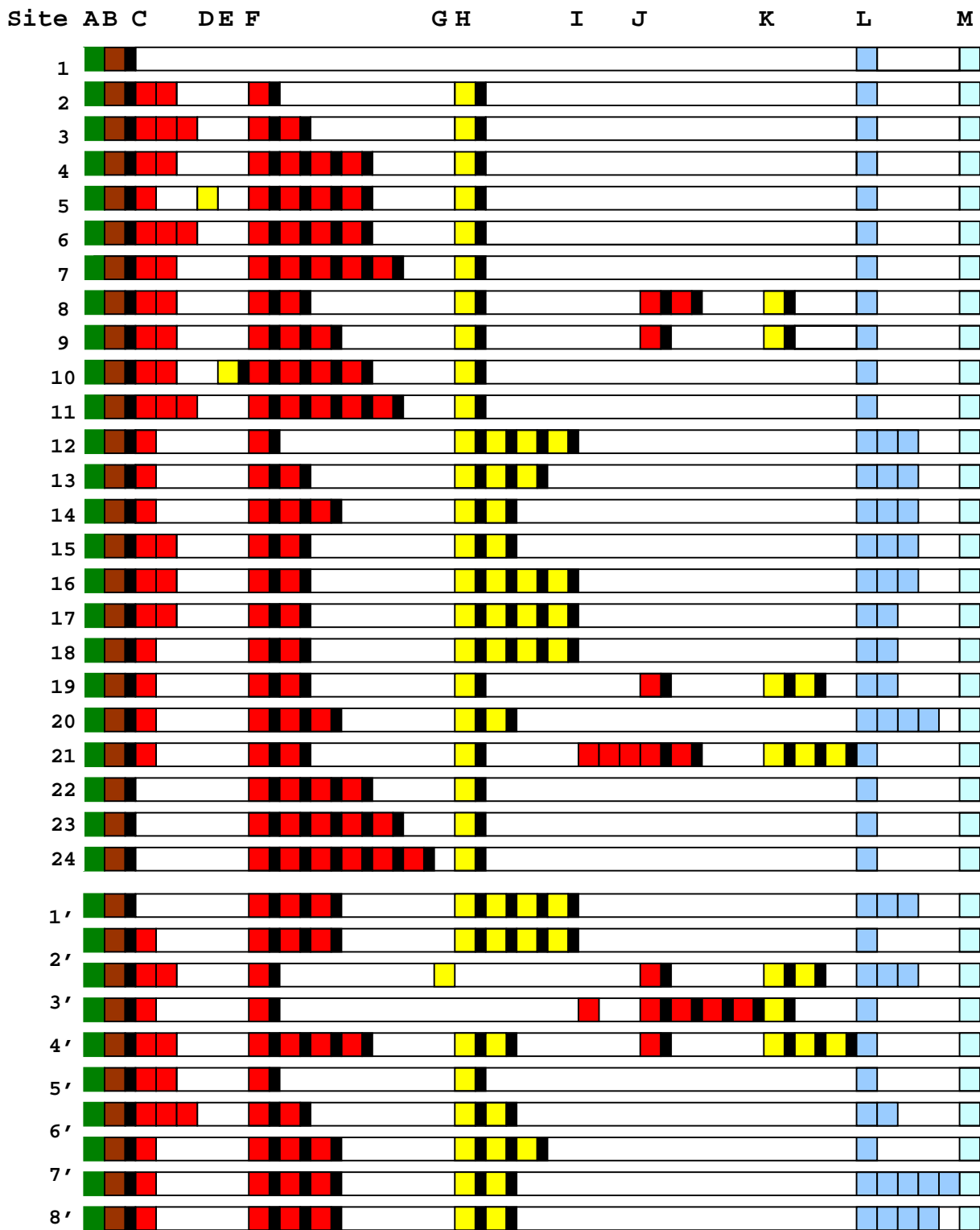
15. Willhoeft U, Buss H, Tannich E. The abundant polyadenylated transcript 2 DNA sequence of the pathogenic protozoan parasite *Entamoeba histolytica* represents a nonautonomous non-long-terminal-repeat retrotransposon-like element which is absent in the closely related nonpathogenic species *Entamoeba dispar*. *Infect Immun*. Dec 2002;70(12):6798-6804.
16. Burch DJ, Li E, Reed S, Jackson TF, Stanley SL, Jr. Isolation of a strain-specific *Entamoeba histolytica* cDNA clone. *J Clin Microbiol*. Apr 1991;29(4):696-701.
17. Clark CG, Diamond LS. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. *Exp Parasitol*. Dec 1993;77(4):450-455.
18. Li E, Kunz-Jenkins C, Stanley SL, Jr. Isolation and characterization of genomic clones encoding a serine-rich *Entamoeba histolytica* protein. *Mol Biochem Parasitol*. Feb 1992;50(2):355-357.
19. de la Vega H, Specht CA, Semino CE, et al. Cloning and expression of chitinases of *Entamoebae*. *Mol Biochem Parasitol*. Apr 1997;85(2):139-147.
20. Mai Z, Samuelson J. A new gene family (ariel) encodes asparagine-rich *Entamoeba histolytica* antigens, which resemble the amebic vaccine candidate serine-rich E. *histolytica* protein. *Infect Immun*. Jan 1998;66(1):353-355.
21. Sehgal D, Mittal V, Ramachandran S, Dhar SK, Bhattacharya A, Bhattacharya S. Nucleotide sequence organisation and analysis of the nuclear ribosomal DNA circle of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. Oct 1994;67(2):205-214.
22. Ghosh S, Frisardi M, Ramirez-Avila L, et al. Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: evidence of a bottleneck (Demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. *J Clin Microbiol*. Oct 2000;38(10):3815-3821.
23. Aye-Kumi PF, Ali IM, Lockhart LA, Gilchrist CA, Petri WA, Jr., Haque R. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. *Exp Parasitol*. Oct 2001;99(2):80-88.
24. Verweij JJ, Vermeer J, Brienens EA, et al. *Entamoeba histolytica* infections in captive primates. *Parasitol Res*. Jun 2003;90(2):100-103.
25. Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Nozaki T. Geographic diversity among genotypes of *Entamoeba histolytica* field isolates. *J Clin Microbiol*. Aug 2003;41(8):3748-3756.
26. Zaki M, Clark CG. Isolation and characterization of polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol*. Mar 2001;39(3):897-905.
27. Hung C-C, Deng H-Y., Hsiao W.-H., Hsieh S.-M., Hsiao C.-F., Chen M.-Y., Chang S.-C., Su K.-E. Invasive amebiasis is an emerging parasitic disease in patients with

human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. *Arch. Intern. Med.* 2004;(in press).

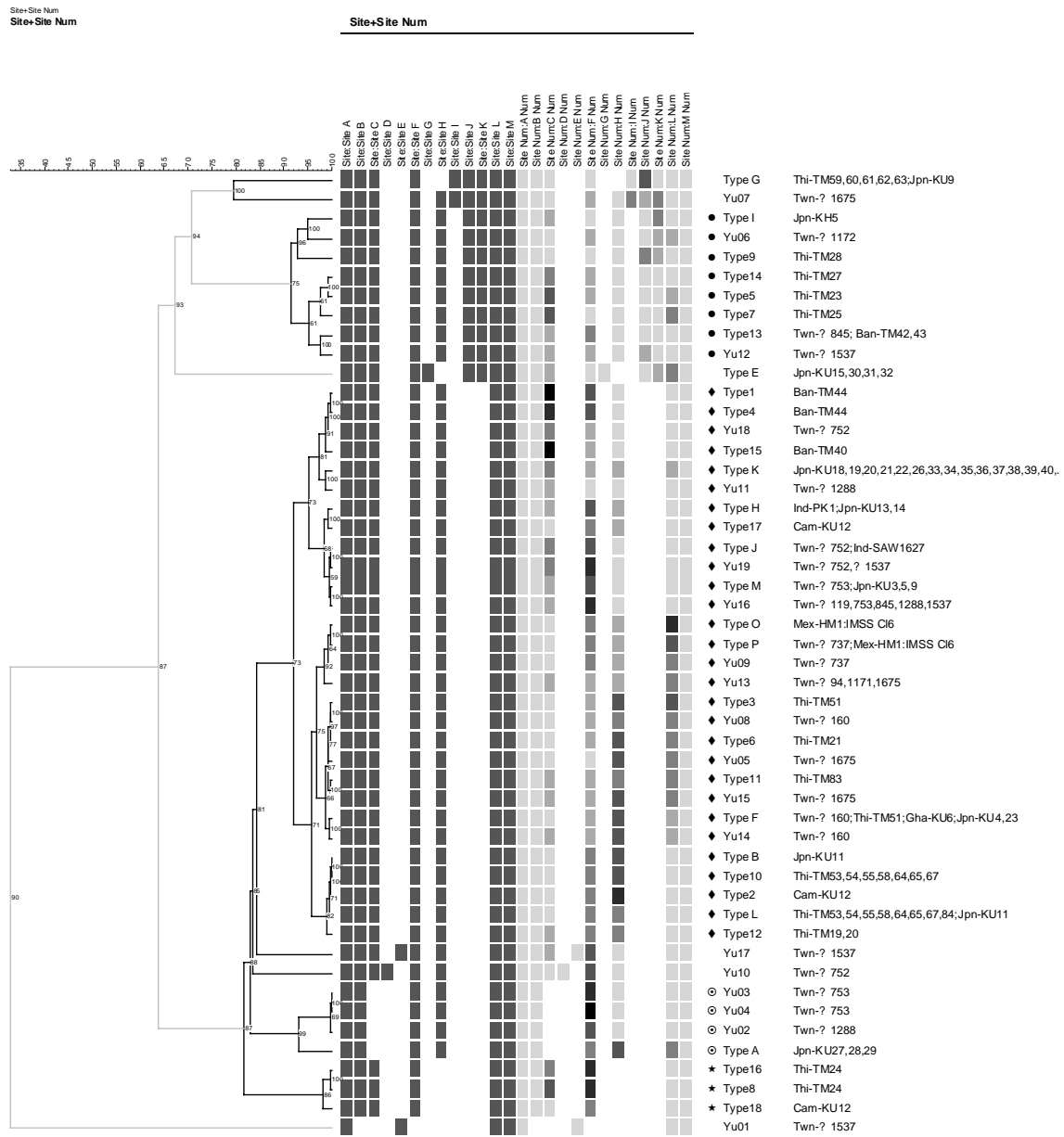
- 28.** Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1978;72(4):431-432.
- 29.** Rich SM, Ayala FJ. Population structure and recent evolution of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 20 2000;97(13):6994-7001.



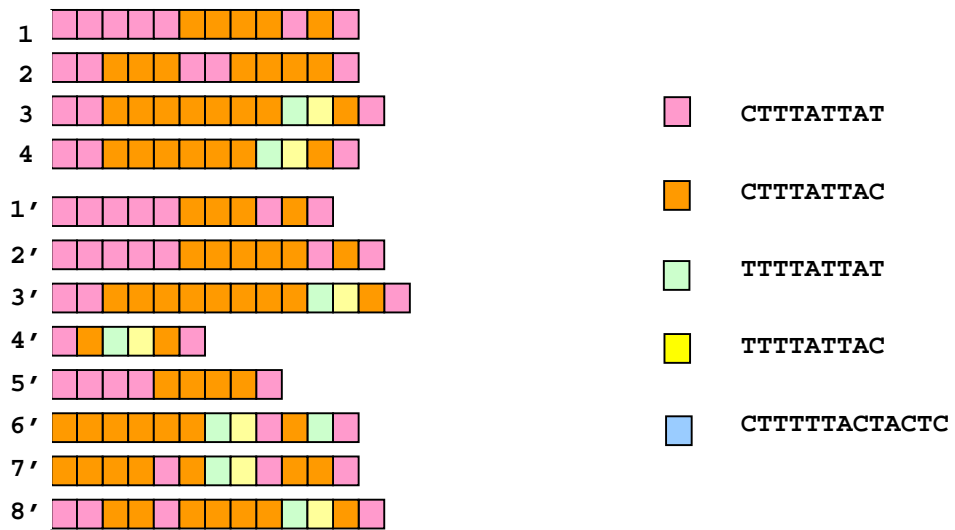
圖一、 *srehp* 基因之示意圖；1、2、3、、、24 為本研究分析檢體所得之序列，1'、2'、、、8' 為 Haghghi 等分析日本病例額外所得<sup>1</sup>。



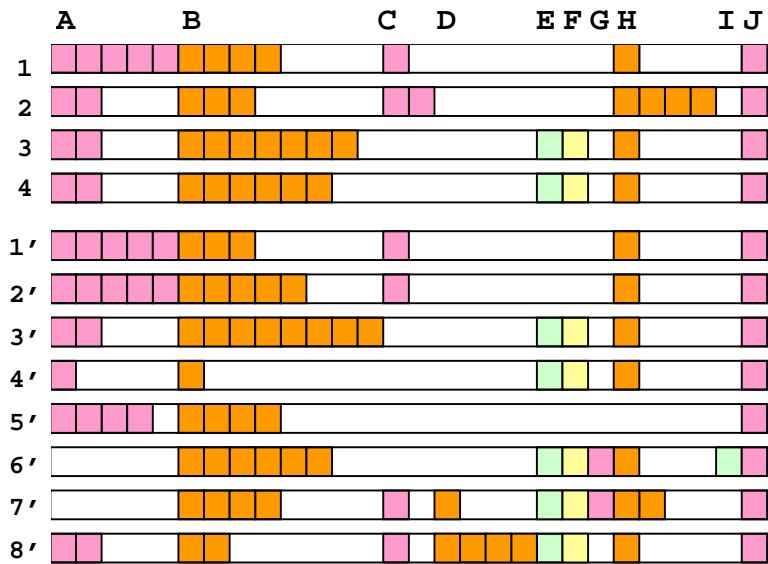
圖二、拆解後之 *srehp* 基因序列



圖三、*srehp* 親源系統分析。



圖四、 *locus 1-2* 基因之示意圖；1、2、3、4 為本研究分析檢體所得之序列，1'、2'、3'、4'、5'、6'、7'、8' 為 Haghig 等分析日本病例額外所得<sup>1</sup>。



圖五、拆解後之 *locus 1-2* 基因序列





圖六、locus 1-2 親源系統分析。



附表一、台灣某精神病院院民 (n=1976) 中 *E. histolytica* 感染者基本資料及 *E. histolytica* 基因型別

編號	性別	年齡	居住園區 <sup>1</sup> -院舍	同房	住院年數	<i>Srehp</i>	<i>locus1-2</i>
30	M	42	A-1		13	ND	ND
90	F	45	A-2		5/12	ND	ND
94	F	31	A-2		1	15	1
119	M	42	B-A		17	7	ND
155	M	54	B-A		8	15	4
160	M	59	B-A		36	13, 17, 18	3
459	M	37	B-D	12	11	7	3
460	M	49	B-D	12	27	7	ND
628	M	37	B-F		17	15	ND
633	M	76	B-F		35	15	ND
729	M	54	C-01		27	15	2
737	M	62	C-01		10	14,20	ND
752	M	61	C-01	109	25	3,5,6,11	ND
753	M	45	C-01	109	25	4,7,23,24	ND
778	M	39	C-01		11	7	3
793	M	44	C-01		19	ND	ND
845	M	61	C-02		35	7,9	ND
879	M	60	C-02		27	7	ND
1059	F	61	C-04		19	15	ND
1171	F	48	C-05	513	3	15	1
1172	F	50	C-05	513	22	19	ND
1218	M	52	C-06	602	31	15	ND
1220	M	55	C-06	602	31	ND	ND
1236	M	43	C-06	606	20	7	3
1238	M	36	C-06	606	13	ND	ND
1239	M	40	C-06		18	ND	ND
1252	M	52	C-06		23	ND	ND
1288	M	58	C-06		28	2,7,22	3
1290	M	36	C-06	616	10	15	1
1294	M	50	C-06	616	26	15	ND
1347	M	47	C-07		30	15	1
1351	M	52	C-07		29	ND	ND
1367	M	36	C-07		3	7	3
1380	M	72	C-07		30	7	4
1507	M	50	D-01		27	7	3
1537	M	52	D-01		28	1,7,8,10,11	3
1631	F	66	D-09		7	15	ND
1664	F	51	D-09		4	ND	ND
1675	F	54	D-10		20	12,15,16,21	ND
1763	M	54	D-11		33	7	3
1962	M	43	D-15		18	7	ND

<sup>1</sup> 園區 A、B：精神狀況穩定，可接受職訓；C：精神狀況穩定，整體功能中下，需護理及生活輔導；D:嚴重退化精神症狀。