

Use of Polymerase Chain Reaction, Cell Adhesion, Hemagglutination and Bacterial Clump Formation Tests in Detection of Enteraggregative Escherichia coli Strains

Follow this and additional works at: <https://www.jfda-online.com/journal>

Recommended Citation

Tsai, C.-C.; Chen, S.-Y.; and Tsen, H.-Y. (2001) "Use of Polymerase Chain Reaction, Cell Adhesion, Hemagglutination and Bacterial Clump Formation Tests in Detection of Enteraggregative Escherichia coli Strains," *Journal of Food and Drug Analysis*: Vol. 9 : Iss. 1 , Article 6.

Available at: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2809>

This Original Article is brought to you for free and open access by Journal of Food and Drug Analysis. It has been accepted for inclusion in Journal of Food and Drug Analysis by an authorized editor of Journal of Food and Drug Analysis.

以聚合壘鏈鎖反應、細胞吸附、血球凝集試驗與細菌團形成等方法檢測腸凝集性大腸桿菌

蔡政志 陳叔瑜 曾浩洋*

國立中興大學食品科學系
台中市國光路 250 號

(Received: June 8, 2000; Accepted: December 12, 2000)

摘 要

腸凝集性大腸桿菌 (Enteraggregative *Escherichia coli*, EAggEC) 為造成嬰兒下痢之病原性大腸桿菌之一。體外試驗顯示腸凝集性大腸桿菌以堆疊方式附著於組織培養細胞表面，稱為凝集吸附。本研究目的係比較聚合壘鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)、HeLa 細胞吸附試驗、血球凝集試驗與細菌團形成試驗等方法檢測 EAggEC 之結果。自不同下痢患者分離之 340 株大腸桿菌中，先經 PCR 篩選疑似 EAggEC 菌株，再利用另外三種活性試驗法測定結果，僅 3 株確定為 EAggEC，顯示 340 株收集自下痢患者臨床分離大腸桿菌菌株中，EAggEC 僅佔 0.88 %。至於 PCR 為負反應者，亦利用 HeLa 細胞吸附試驗與細菌團形成試驗方法檢測，發現並無正反應菌株。而上述篩選方法中，以體外 HeLa 細胞吸附試驗結果最為明顯，其次為細菌團形成試驗；而血球凝集試驗篩選方法所得結果，則不易判定。依本研究結果，建議在篩檢 EAggEC 菌株時，先以 PCR 方法，再配合 HeLa 細胞吸附方法，應可以準確鑑定 EAggEC 菌株。

關鍵詞：腸凝集性大腸桿菌，聚合壘鏈鎖反應，細胞吸附，細菌團，血球凝集試驗

前 言

腸凝集性大腸桿菌 (enteroaggregative *Escherichia coli*, EAggEC) 為開發中國家重要之病原大腸菌，可引起人畜之持續性下痢腹瀉⁽¹⁾。EAggEC 的特性分為四點：(1) 不像腸毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC) 具有複雜熱不穩定性腸毒素 (heat-labile enterotoxin, LT) 或熱穩定性腸毒素 (heat-stable enterotoxin, ST)；(2) 沒有和腸病原性大腸桿菌 (enteropathogenic *E. coli*, EPEC) 相同的 O:H 血清型，吸附方式非 EPEC 局部性吸附於 HEp-2 或 HeLa 細胞，不具 EPEC 吸附因子質體 (非第 I 型 EPEC)；(3) 不像腸侵入性大腸桿菌 (enteroinvasive *E. coli*, EIEC) 具有侵入上皮細胞的能力；(4) 不像腸出血性大腸桿菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) 具有類志賀氏毒素的活性⁽²⁾。在血球凝集試驗方面，根據其對 D-甘露糖的抗性與敏感性，又可分為 D-甘露糖-抗性血球凝集 (D-mannose-resistant hemagglutination, MRHA) 和 D-甘露糖-敏感性血球凝集 (D-mannose-sensitive hemagglutination, MSHA)⁽³⁾。Tzipori 等人⁽⁴⁾以 EAggEC 餵食小豬，在小腸上皮細胞上可發現緊密吸附的不正常黏液膠，經試驗

顯示為高密度 EAggEC 凝集形成的。將 EAggEC 注入打結成環的兔子迴腸內 (ligated rabbit ileal loops)，會表現凹窪的杯狀細胞，若以過碘酸-西福 (periodic acid-Schiff) 染色法可以觀察到附著性細菌包埋在內⁽⁵⁾。在體外組織培養試驗，EAggEC 吸附於小腸黏膜部位⁽⁶⁾。由健康成人自願受試實驗發現，經 EAggEC 感染之下痢必然伴隨著大量黏液的產生⁽⁷⁾，但對於產生大量黏液的機制目前還未知。EAggEC 菌株之吸附是一個相當複雜的現象，需要許多不同的纖毛結構才能促使其在 *in vitro* 之凝集吸附⁽⁸⁾。

一般傳統檢測 EAggEC 的方法有：(1) 生化型測試 (biochemical test) 和 (2) 血清型鑑定 (serological characterization)，此二種方法是鑑定致病性大腸桿菌最基礎的方法。依美國食品暨藥物管理局⁽⁹⁾對食品中致病性大腸桿菌的分離及鑑定，皆是先以預培養及高溫選擇性培養作初步菌株的分離純化，再經生化型和血清型試驗後才能判定。唯所需時間相當久，且必須有已建立的致病性大腸桿菌之血清學資料，才可確定為何種致病性之大腸桿菌^(10, 11, 12, 13, 14, 15, 16)。(3) 組織培養 HeLa 或 HEp-2 細胞之吸附試驗：致病性 *E. coli* 對細胞的吸附方式分為三型⁽¹⁷⁾，分別為局部吸附 (localized adhesion, LA)、凝集吸附 (aggregative adhesion, AA)，以及擴散吸附 (diffuse adhesion, DA)。所謂 LA 為細菌先聚集成微菌落

* Author for correspondence. Tel: 04-22870162;
Fax: 04-22870162; E-mail: hytsen@dragon.nchu.edu.tw

(microcolonies)，再吸附於細胞上，屬於EPEC之特徵，稱為第I型EPEC；AA則以stacked-brick方式附著（單層）於細胞或細胞外，屬於EAggEC菌株典型特性；DA以不規則方式吸附於細胞上，細胞附著之蓋玻片上則無菌體吸附，屬於DAEC吸附型式。

(4)血球凝集（hemagglutination, HA）試驗：EAggEC會與牛血、綿羊血、人類O型血、老鼠以及馬血反應造成血球凝集^(18, 19)。(5)細菌團形成（bacterial clump）之檢測；Albert等人⁽¹⁰⁾在研究EAggEC過程，發現在養菌20小時以上，在Mueller-Hinton培養液表面之玻璃瓶會有白色薄膜的菌團形成，是菌體與菌體之間的自凝集反應（autoagglutination, AA）。此方法亦有一些學者利用於檢測EAggEC菌株^(2, 20)。在核酸檢測技術方面，目前已有聚合鏈鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）快速檢測方法之引子組發表，包括有Schmidt等人發表之pCVD432/ start和pCVD432/ stop引子⁽²⁰⁾，以及Tsukamoto在aggR基因上設計之AggR-1/ AggR-2引子⁽²²⁾等，皆可應用於EAggEC菌株之測定；但曾發現Schmidt等人之PCR結果與吸附試驗結果有不一致現象⁽²⁰⁾。

一般而言，聚合鏈鎖反應具有準確性高、快速性和靈敏度高等優點；另外，有鑑於早期分類EAggEC的條件，為具典型凝集吸附形態、血球凝集和細菌團形成，任何不具有吸附、凝集或非典型吸附之菌株皆非EAggEC⁽¹⁷⁾。因此，本研究目的為先利用具快速檢測優點的PCR方法篩檢EAggEC菌株，再以其他活性測定方法確定其EAggEC活性；另比較PCR及EAggEC活性測定方法之可靠性及優缺點；此外，並調查下痢患者*E. coli*分離株中EAggEC之出現率。本研究首先以一組Schmidt等人發表之pCVD432/ start和pCVD432/ stop引子⁽²⁰⁾應用於三株EAggEC標準菌株及61株實驗室收集之其他*E. coli*菌株進行初步檢測；再利用此引子組於340株取自醫院下痢患者之臨床*E. coli*分離株進行PCR檢測，並就其中8株PCR正反應菌株及隨機挑選之127株PCR負反應菌株，以不同之EAggEC活性檢測方法進行再確認工作，此些檢測方法包括組織培養之HeLa細胞吸附、細菌團形成及血球凝集試驗。結果發現340株臨床分離株中，僅3株確定為EAggEC，其出現率不高，約為0.88%。

材料與方法

一、實驗材料

本研究所用菌株包括340株於1992 -1994年取自台中榮總下痢患者之臨床檢體分離*Escherichia coli*分離菌株，及64株實驗室收集的*E. coli*菌株，包括

三株腸凝集性大腸桿菌標準菌株（Table 1）；實驗所用細胞株為HeLa細胞（CCRC 60005，來源為epithelioid carcinoma, cervix, human）。

64株菌種來源包括美國馬里蘭大學醫學院疫苗發展中心（Center for Vaccine Development, CVD, University of Maryland School of Medicine, Baltimore），美國菌種保存中心（American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, U.S.A.），美國農業部（United State Department of Agriculture, USDA, U.S.A.），世界衛生組織（World Health Organization, WHO），加拿大蒙特婁大學（University of Montreal, Canada）以及台中榮民總醫院（Taichung Veterans General Hospital, TVGH, Taichung, Taiwan），食品工業發展研究所菌種保存及研究中心（Culture Collection and Research Center, CCRC, Hsin-Chu, Taiwan），衛生署疾病防治中心（Center for Disease Control, CDC, Taipei, Taiwan）。

二、實驗方法

切菌體培養

將一白金耳量之目標大腸桿菌接入3 mL Luria broth（yeast extract 5 g, tryptone 10 g, NaCl 5 g及H₂O 1000 mL），於37 °C培養8小時，細菌生長至對數期，取1 mL菌液作10倍連續稀釋後，取1 mL的適當稀釋液塗抹於Luria agar，作為菌數計算或暫時保存，以及後續PCR、吸附試驗和血球凝集試驗之用。

物聚合鏈鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）

參考Schmidt等人⁽²⁰⁾之方法行之。使用PCR引子組為根據Schmidt等人針對EAggEC質體pCVD432上某區域定序765-bp EAggEC probe（EMBL database library accession number X81423），所設計之pCVD432/ start和pCVD432/ stop引子組⁽²⁰⁾；其序列為pCVD432/ start：5'-CTGGC-GAAAGACTGTATCAT-3'，pCVD432/ stop：5'-CAATGTATAGAAATCCGCTGTT-3'（展陽公司）。目標菌株從-70 °C甘油保存瓶取一白金耳接入3 mL Luria-Bertani broth (LB)，培養8小時後，取100 μ L菌液加入1.5 mL離心管，再加入900 μ L無菌水成為菌體懸浮液。取10 μ L（約10⁵菌量）菌體懸浮液，放入0.5 mL微量離心管。首先加入配製好的30 μ L的PCR緩衝液（4/3×buffer），再加一滴礦物油覆蓋反應液表面後，將離心管置入PCR熱循環器，於94 °C加熱30分鐘將菌體分解（lysis）；接著降溫至80 °C，添加10 μ L 1×PCR緩衝液（含0.4單位之

Prozyme DNA polymerase), 使反應液總體積為 50 μL (Mg^{2+} 離子終濃度 1.5 mM), 且各組引子濃度皆為 1 pmole/ μL , 開始進行 PCR 反應。PCR 條件為 94°C 下維持 40 秒, 53°C 維持 1 分鐘, 72°C 維持 1 分鐘, 進行 30 個循環後, 以 72°C 維持 2 分鐘。所有過程皆以程式連結, 分析時取 10 μL 反應產物, 以 2% 瓊脂糖於 1×TAE 緩衝液中進行電泳分析, 經溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色, 以紫外線觀察後拍照。

犴吸附試驗

依據 Benjamin 等人⁽²²⁾之方法加以修飾。從液態氮保存筒取 HeLa 細胞保存瓶, 回溫後, 倒入角形培養皿內, 取 10 mL 新鮮 minimum essential medium alpha medium (α -MEM, GibcoBRL) (含青黴素-鏈黴素) 培養液加入角形培養皿, 於 37°C、5%CO₂ 氣體培養 16 小時。

將培養完成的 HeLa 細胞之角形培養皿, 倒掉舊的培養液, 以 1×PBS 緩衝液清洗角形培養皿兩次後, 加入 1×胰蛋白堿/乙二胺四乙酸(1×trypsin/EDTA)進行消化。加入 40 mL 新鮮 α -MEM (含青黴素-鏈黴素) 培養液。搖勻後, 取一 24 孔洞培養盤, 每個孔洞加入 0.5 mL 細胞懸浮液, 於 37°C、5%CO₂ 氣體培養 16 小時。

再將舊培養液吸出, 每個孔洞加入 0.5 mL 的 1×PBS 緩衝液, 重複清洗三次。加入 0.5 mL 新鮮 α -MEM (含 0.5% 甘露糖, 但不含青黴素-鏈黴素) 培養液, 以及 20 μL 上述實驗方法切之目標菌液 (約 10⁶ 菌量), 於 37°C、5%CO₂ 氣體培養 2 小時。

吸出舊培養液, 每個孔洞加入 0.5 mL 的 1×PBS 緩衝液清洗三次後, 加入 200 μL 之 10% 福馬林, 以每分鐘 100 轉之轉速搖晃固定 15-20 分鐘, 吸出福馬

林。加入 0.5 mL 的 1×PBS 緩衝液清洗三次; 加入 200 μL 結晶紫 (crystal violet) 染色 5 分鐘, 於倒立式相位差顯微鏡 (Nikon ECLIPSE TE300) 下觀察。

犴血球凝集試驗

依據 Yamamoto 等人⁽¹⁷⁾測試血球凝集試驗之方法行之。取 1 mL 新鮮抽取的 O 型人血液, 加入 50 mL 的 1×PBS 緩衝液或 50 mL 含 2% (wt/vol) D-甘露糖之 PBS 緩衝液, 使其成為 2% (vol/vol) 血球懸浮液。取 1 mL 上述實驗方法切之目標菌於 1.5 mL 微量離心管, 每分鐘 5000 轉之轉速, 離心 5 分鐘, 倒去上清液, 以 1 mL 之 PBS 緩衝液將其懸浮後, 進行二倍的連續稀釋。於 24 孔洞培養盤中, 加入 100 μL 連續稀釋的目標菌懸浮液與 100 μL 之 2% 紅血球懸浮液, 均勻混合, 將培養盤靜置於 37°C 下 20 分鐘, 於顯微鏡下觀察並判斷血球凝集力價 (titer), 力價為菌液以兩倍連續稀釋後, 能使血球懸浮液凝集之“最高稀釋倍數”。若加入 D-甘露糖後不影響凝集的稱為 D-甘露糖-抗性血球凝集 (D-mannose-resistant hemagglutination, MRHA), 影響凝集的則為 D-甘露糖-敏感性血球凝集 (D-mannose-sensitivity hemagglutination, MSHA)。

玳細胞團試驗

採用 Albert 等人⁽¹⁰⁾之試驗方法。菌體培養於 3 mL LB 培養基 8 小時後, 取一白金耳劃於 MacConkey agar, 隔夜培養。挑單一菌落接入 2 mL Mueller-Hinton 培養液, 於 37°C 下培養 20 小時, 觀察試管管壁是否有細菌團形成。

結果與討論

Table 1. *Escherichia coli* strains used in this study

Strains	Strain No, source ^a and toxin type
Non-pathogenic <i>E.coli</i> strains	E2(ATCC 25922), E3(ATCC 11775).
Enterotoxigenic <i>E.coli</i> (ETEC)	ETEC01(ATCC 35401, LTIh+STIh), 02(ATCC 43886, LTIh), 03(ATCC 43896, STI), 04(ATCC 33849, LTI), 05(ATCC 31618, STI), 06(WHO 103, STI), 07(WHO 110, LTI+STI), 08(WHO 112, LTI), 09(WHO 117, LTI), EWD299(ATCC 37128, LTIp).
Shiga-toxin producing <i>E.coli</i> (STEC) and enterohemorrhagic <i>E.coli</i> (EHEC)	01(CCRC 14824, O157:H7, SLTI+SLTII), 02(CCRC 14825, O157:H7, SLTII), 03(CCRC 13084, O157:H7, verocytotoxin), 04(CCRC 13086, O157:H7, verocytotoxin), 05(ATCC 35350, cytotoxic activity), 07(ATCC 43890, O157:H7 SLTI), 08(ATCC 43894, O157:H7, SLTI+SLTII), 10(USDA45750, O157:H7), 11(USDA 45753, O157:H7, SLTI), 12(USDA 45756, O157:H7, SLTI+SLTII), 13(USDA45750, O157:H7, SLTI+SLTII), 14-16(USDA, O157:H7), 17(NLFD I20), 18(NQS 317), 19-32(CCRC, O157:H7, VT), 37-48(USDA).
Enteroinvasive <i>E.coli</i> (EIEC)	01(CVD, O28ac:H-, <i>ipaH</i> , <i>ial</i>), 02(CVD, O124:H-, <i>ipaH</i> , <i>ial</i>), 03(CVD, O143:H-, <i>ipaH</i> , <i>ial</i>), 04(CVD, O164:H-, <i>ipaH</i> , <i>ial</i>), 05(ATCC 43893, O124: NM, <i>ipaH</i> , <i>ial</i>).
Enteropathogenic <i>E.coli</i> (EPEC)	01(CVD, O119, FAS+, EAF+, <i>aeA</i> +), 02(CVD, O127:H6, FAS+, EAF+, <i>aeA</i> +), 03(CVD, O128, FAS+, EAF+, <i>aeA</i> +), 04((NQS 315).
Enteraggregative <i>E. coli</i> (EAggEC)	17-2(CVD, O3: H2, EAST), 042(CVD, O44: H18, EAST), Agg01(CVD, O86: H2).
340 clinical isolates of <i>E. coli</i>	TVGH

^a Definition of strain sources, such as ATCC, CVD, WHO, CCRC, UM, USDA, CDC, and TVGH, are described in Material and Methods.

一、EAggEC PCR引子組及EAggEC之篩檢

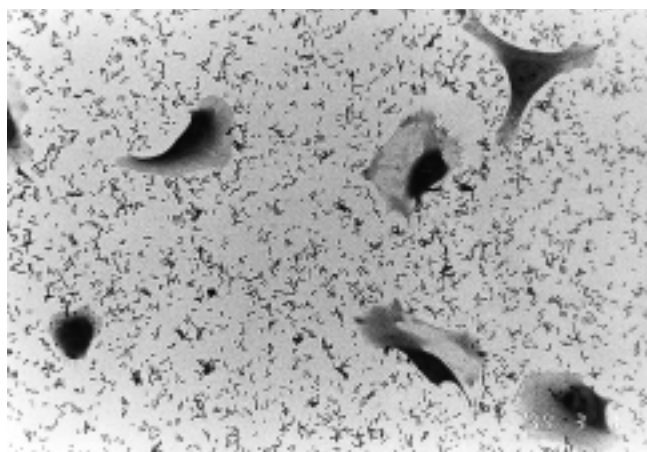
根據學者 Schmidt 等人⁽²⁰⁾針對 EAggEC 設計之 pCVD432/ start 和 pCVD432/ stop 引子組，首先以 3 株取自美國馬里蘭大學醫學院疫苗發展中心提供之 EAggEC 標準菌測試，結果編號 17-2, 042 及 Agg01 之三株標準菌株皆產生預期之 630 bp PCR 產物片段。再以相同 PCR 引子組針對本研究室收集之 61 株不同病原性及非病原性 *E. coli* 菌株 (Table 1) 進行 EAggEC 篩選，發現其中一株腸毒素型大腸桿菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC) T09 為正反應，疑似腸凝集性大腸桿菌；而其餘 ETEC, EHEC, EIEC, EPEC 及非病原性大腸桿菌，皆為負反應。將此引子組利用於 340 株收集自台中榮總之臨床分離大腸桿菌菌株之篩檢，發現有 4 株菌株產生預期之 630 bp

PCR 產物片段，菌株編號分別為 123, Agg02, Agg03 和 Agg04。上述經 PCR 初步認定為 EAggEC 之五株大腸桿菌菌株和三株標準菌進一步利用三種傳統檢測方法，包括細胞吸附試驗、血球凝集與細菌團形成試驗方法，確認是否具有 EAggEC 之活性。

二、吸附試驗

進行 HeLa 細胞之吸附試驗結果顯示，所收集之 *E. coli* 菌株且 PCR 為正反應之菌株中，包括編號 17-2、042、Agg01 之三株標準菌株及 Agg02、Agg03 與 Agg04 之臨床分離株皆有典型的凝集吸附形態，即菌體會兩兩排列或規則排列成直線，或以“疊磚結構” (stacked-brick) 吸附於 HeLa 細胞表面與玻片上，其中又以 17-2、042 (Figure 1A)、Agg02 和

(A)



(B)

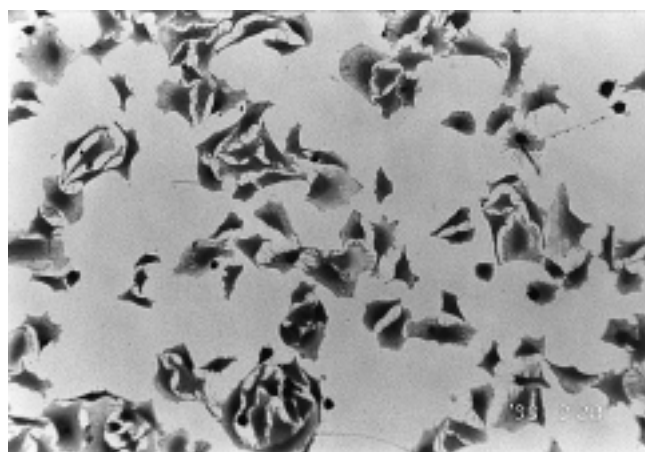
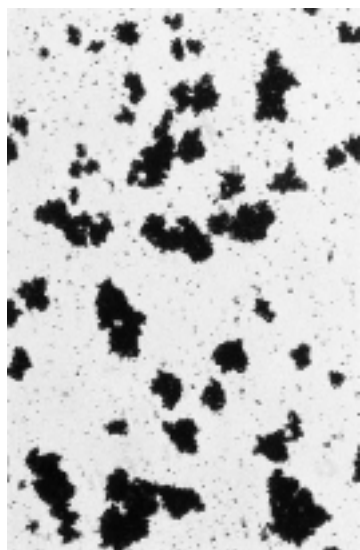


Figure 1. Adhesion test for *Escherichia coli* (A)042, and (B)T09 using HeLa cells. Experimental conditions were described in Methods. 400x.

(A)



(B)

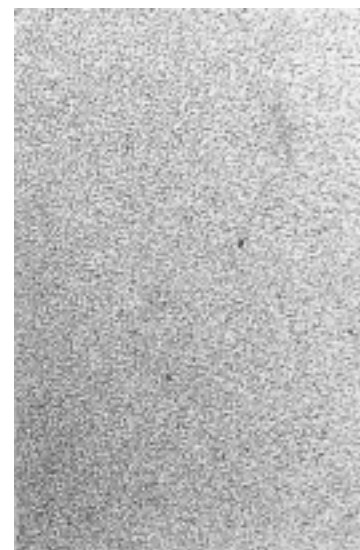


Figure 2. Hemagglutination test of EAggEC strains (A) Strain Agg01 without D-mannose and (B) Strain 123 with D-mannose. Experimental conditions were as described in Methods. A phase contrast microscope (80x) was used.

Agg04 四個菌株最為明顯。但其他二株 PCR 正反應之大腸桿菌菌株，編號 T09 (Figure 1B) 及 123，則在 HeLa 細胞與玻片上都無凝集吸附形態。本試驗顯示，由美國馬里蘭大學醫學院疫苗發展中心所得 EAggEC 標準菌株，包括 17-2 (O3:H2)、042 (O44:H18) 及 Agg01 (O86:H27)，皆具明顯的 HeLa 細胞凝集吸附型態，而由台中榮總獲得之 340 株 *E. coli* 臨床菌株，雖有 4 株是 PCR 正反應，但僅三株 Agg02、03 及 04，對 HeLa 細胞具吸附現象，其發生率不高，為 3/340 (約 0.88%)。此外，典型的凝集吸附形態只有在 EAggEC 才會發現，其他 *E. coli* 菌株，包括 ETEC, EPEC, EHEC 和 EIEC 等，均不會有此吸附現象⁽²⁾。

三、血球凝集試驗

Qadri 等人⁽²³⁾發表有關 EAggEC 血球凝集特性中，使用 6 種不同來源的紅血球，包括天竺鼠、小白鼠、大白鼠、人類 O 型血、綿羊和牛。發現大多數 EAggEC 菌株屬於 D-甘露糖-抗性血球凝集 (MRHA)，其表示添加 D-甘露糖有促進血球凝集表現，但不代表每種血球對菌體皆是屬於 MRHA；亦發現綿羊和牛之紅血球與少數 EAggEC 作用時，添加 D-甘露糖對凝集是抑制作用即 MSHA。作者更嘗試其他不同添加物質作為 EAggEC 的分類，包括 mucin, fetuin, α_1 -glycoprotein, N-acetylneuramin-lactose 和 N-acetylneuraminic acid，但大部分為抑制血球凝集作用，無法歸類出相關性。Nataro 等人⁽²⁴⁾利用血球凝集試驗檢測 EAggEC，表示其特異性只達 88%。因此，血球凝集試驗並不能完全作為菌株確認，不過，會產生血球凝集之菌株必為 EAggEC。

本研究為進一步了解不同 EAggEC 檢測方法之結果有何差異？即對上述以 PCR 及 HeLa 細胞吸附方法判定為 EAggEC 的菌株進行血球凝集試驗。結果如 Table 2 所示，所採用為 O 型人血，菌體經連續稀釋後再與血球懸浮液混合，發現前述 PCR 正反應之

標準 EAggEC 菌株 17-2 在加或不加 D-甘露糖下，稀釋 4 倍之菌液與人血混合，還可觀察到血球凝集現象，故其血球凝集力價為 4；菌株 Agg01 (Figure 2A) 和 Agg04 之血球凝集力價為 2；菌株 Agg02 之血球凝集力價為 1；Agg03 在加 D-甘露糖之血球凝集力價為小於 1，而不加 D-甘露糖之血球凝集力價為 1，由此可知 Agg03 可能屬於 D-甘露糖-敏感性血球凝集菌株；042 在加 D-甘露糖之血球凝集力價為 1，不加 D-甘露糖之血球凝集力價為小於 1；但對 HeLa 細胞無吸附現象之菌株 123 (Figure 2B) 和 T09，無論加或不加 D-甘露糖，皆不產生凝集現象，其血球凝集力價為小於 1。由於血球凝集現象之發生與菌液濃度密切相關，且各菌株之血球凝集力價不同，因此，以血球凝集試驗方法判斷腸凝集性大腸桿菌菌株較為不易。

四、細菌團形成試驗

將 PCR 正反應之疑似 EAggEC 菌株，包括 HeLa 細胞吸附及不具吸附現象之大腸桿菌菌株經細菌團形成試驗後，結果如 Figure 3 所示。所有對 HeLa 細



Figure 3. Clump formation test for seven strains *Escherichia coli*. Tube A~G represent the results of clump formation test for strain 042, 17-2, Agg02, Agg03, Agg04, 123, and T09, respectively. Strains in A~E tubes show positive results while strains in tubes F and G show negative results.

Table 2. Detection of EAggEC-like *E. coli* cells via different methods

Bacterial strains	PCR	Clump formation	Hemagglutination		Adhesion test
			mannose	no-mannose	
No. 17-2	+	+	+4	+4	AA ^a
No. 042	+	+	1	<1	AA
Agg01	+	+	+2	+2	AA
Agg02	+	+	+1	+1	AA
Agg03	+	+	<1	+1	AA
Agg04	+	+	+2	+2	AA
ETEC 09	+	—	<1	<1	—
No. 123	+	—	<1	<1	—
127 VGH strains ^b	— 127	— 127	ND ^c	ND	— 127

^a AA: aggregative adherence.

^b 127 VGH strains: 127 clinical isolates randomly selected from 340 TDGH strains described in Materials.

^c ND: not detection.

胞具AA吸附現象之菌株，皆在試管管壁上都有薄層細菌團的形成，尤其是標準菌株042所形成之細菌團，於管壁上形成相當明顯的一層。而兩株對HeLa細胞不具吸附作用，但PCR為正反應之大腸桿菌菌株，123及T09，則在管壁上無細菌團的形成。

此鑑定方法為Albert等人⁽¹⁰⁾在研究EAggEC過程，發現菌體在Mueller-Hinton培養基培養20小時以上，於培養液表面之玻璃瓶會有白色薄膜的菌團形成，是菌體與菌體之間的自凝集反應（autoagglutination, AA）。Albert等人⁽¹⁰⁾並證明41株EAggEC在經組織培養和DNA探針檢測無誤後，發現全部都有細菌團形成；而61株非EAggEC則無此現象，表示此法的特異性為100%正確率。本研究前述之8株PCR正反應菌株（Table 1），其細菌團形成試驗結果與吸附試驗之結果一致。

綜上所述，目前確認EAggEC菌株活性之方法包括有細胞吸附試驗、血球凝集試驗和細菌團形成試驗等；而其中以HeLa細胞吸附試驗最容易判斷、準確性高，但實驗過程最為繁雜，並需以顯微鏡觀察，成本高；血球凝集試驗之結果則不易判斷，但實驗過程較為簡單，成本較為便宜；細菌團形成試驗亦容易判斷，實驗過程只需在Mueller-Hinton培養液培養20小時後觀察試管壁即可，成本低，但所費時間較長。反觀PCR方法之優點為特異性高、靈敏度高以及實驗過程快速，但在最近發展出的檢測EAggEC之PCR方法而言，依本研究使用Schmidt等人⁽²⁰⁾發展之引子之實驗結果觀之；對EAggEC之判定，會有無EAggEC活性誤判為EAggEC菌株之結果發生。為了解PCR為負反應之菌株中，有無具EAggEC活性菌株的可能，本研究進一步將340株臨床菌株中，PCR為負反應之菌株，隨機挑選127株，利用HeLa細胞吸附試驗與細菌團形成試驗方法檢測，結果所有菌株皆為負反應（Table 2），此表示PCR為負反應之菌株，不致有具EAggEC活性，可排除錯誤負反應的可能性。此外，本研究結果亦顯示在造成下痢患者的臨床檢體分離之大腸桿菌中，其腸凝集性大腸桿菌所佔比例為3/340，約為0.88%，比例甚低。在巴西，曾有報告證實高達68%的持續性下痢案例和EAggEC有關⁽²⁵⁾；Gonzalez等人⁽²⁶⁾曾針對委內瑞拉國家之513位感染下痢嬰兒，發現在下痢病人中有26.9%為EAggEC感染所致。Vila等人⁽²⁷⁾研究西班牙兒童腹瀉中，顯示在115位腹瀉兒童中，受EAggEC感染者佔3.5%。因此，不同地區之腹瀉病例中，EAggEC的發生率並不相同。本研究之目的，為有鑑於近年來PCR技術的廣泛應用，先利用文獻上發表PCR之快速方法篩檢EAggEC菌株，並根據早期分類EAggEC之其他活性測定方法確定EAggEC活性；此外，亦比較EAggEC活性測定方法之優缺點及下痢患者*E. coli*分離株中

EAggEC之出現率。建議在篩檢EAggEC菌株時，先以PCR快速篩檢正反應之菌株，再配合細胞吸附方法，應可以準確篩檢出EAggEC菌株；或另行設計特異性高之PCR引子組，以準確區分不具EAggEC活性之菌株。

謝 誌

本研究報告承行政院衛生署之支持（計劃編號DOH87-TD-1087）得以完成，特此誌謝。

參考文獻

1. Huppertz, H.-I., Rutkowski, S., Aleksic, S. and Karch, H. 1997. Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in Western Europe. *Lancet* 349: 1660-1662.
2. Yamamoto, T., Endo, S., Yokota, T. and Echeverria, P. 1991. Characteristics of adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to human and animal mucosa. *Infection and Immunity* 59: 3722-3739.
3. Qadri, F., Haque, A., Faruque, S. M., Bettelheim, K. A., Robins-browne, R. and Albert, M. J. 1994. Hemagglutinating properties of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 510-514.
4. Talaska, T. 1992. Intestinal diseases and pathogenic *Escherichia coli* in early childhood-diagnostic methods and their value. *Kinderarztl. Prax* 60: 44-45. (Abs.)
5. Vial, P. A., Browne, R. R., Lior, H., Prado, V., Kaper, J. B., Nataro, J. P., Maneval, D., Elsayed, A. and Levine, M. M. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *Journal of Infectious Diseases* 158: 70-79.
6. Hicks, S., Candy, D. C. A. and Phillips, A. D. 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. *Infection and Immunity* 64: 4751-4760.
7. Nataro, J. P., Seriwatana, J., Fasano, A., Maneval, D. R., Guers, L. D., Noriega, F., Dubovsky, F., Levine, M. M. and Morris, JR. J. G. 1995. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infection and Immunity* 63: 4721-4728.
8. Knutton, S., Shaw, R. K., Bhan, M. K., Smith, H. R., McConnell, M. M., Cheasty, T., Williams, P. H. and Baldwin, T. J. 1992. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere *in vitro* to human intestinal mucosa. *Infection and Immunity* 60: 2083-2091.
9. Hitchins, A. D., Feng, P., William, D. W., Rippey, S. R. and Chandler, L. A. 1995. *Escherichia coli* and coliform bacteria Ch. 4. In "Bacteriological Analytical Manual". 8th ed. P.4.01-4.29. U. S. Food and Drug Administration Washington, D. C., U. S. A.

10. Albert, M. J., Qadri, F., Haque, A. and Bhuiyan, N. A. 1993. Bacterial clump formation at the surface of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 1397-1399.
11. Itoh, Y., Nagano, I., Kunishima, M. and Ezaki, T. 1997. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable: H10 Associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 2546-2550.
12. Knutton, S., Shaw, R. K., Bhan, M. K., Smith, H. R., McConnell, M. M., Cheasty, T., Williams, P. H. and Baldwin, T. J. 1992. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere *in vitro* to human intestinal mucosa. *Infection and Immunity* 60: 2083-2091.
13. Scaletsky, I. C. A., Silva, M. L. M., Toledo, M. R. F., Davis, B. R., Blake, P. A. and Trabulsi, L. R. 1985. Correlation between adherence to HeLa cells and serogroups, serotype, and bioserotypes of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 49: 528-532.
14. Scotland, S. M., Smith, H. R. and Rowe, B. 1991. *Escherichia coli* O128 strains from infants with diarrhea commonly show localized adhesion and positivity in the fluorescent-actin staining test but do not hybridize with an enteropathogenic *E. coli* adherence factor probe. *Infection and Immunity* 59:1569-1571.
15. Smith, H. R., Cheasty, T. and Rowe, B. 1997. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. *Lancet* 350: 814-815.
16. Vial, P. A., Browne, R. R., Lior, H., Prado, V., Kaper, J. B., Nataro, J. P., Maneval, D., Elsayed, A. and Levine, M. M. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *Journal of Infectious Diseases* 158: 70-79.
17. Yamamoto, T., Koyama, Y., Sonoda, E., Nakayama, S., Uchimura, M., Paveenkittiporn, W., Tamura, K., Yokota, T. and Echeverria, P. 1992. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. *Journal of Infectious Diseases* 166: 1295-1310.
18. Yamamoto, T., Wakisaka, N., Nakae, T., Kamano, T., Serichantalergs, O. and Echeverria, P. 1996. Characterization of novel hemagglutinin of diarrhea-associated *Escherichia coli* that has characteristics of diffusely adhering *E. coli* and enteroaggregative *E. coli*. *Infection and Immunity* 64: 3694-3702.
19. Yamamoto, T., Wakisaka, N., Nakae, T., Kamano, T., Serichantalergs, O. and Echeverria, P. 1996. Characterization of novel hemagglutinin of diarrhea-associated *Escherichia coli* that has characteristics of diffusely adhering *E. coli* and enteroaggregative *E. coli*. *Infection and Immunity* 64: 3694-3702.
20. Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S., Heeseman, J. and Karch, H. 1995. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 33:701-705.
21. Tsukamoto, T. 1996. PCR methods for detection of enteropathogenic *Escherichia coli* (localized adherence) and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Kansenshogaku Zasshi* 70: 569-573. Japanese.
22. Benjamin, P., Federrman, M. and Wanke, C. A. 1995. Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 63: 3417-3421.
23. Qadri, F., Haque, A., Faruque, S. M., Bettelheim, K. A., Robins-browne, R. and Albert, M. J. 1994. Hemagglutinating properties of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 510-514.
24. Nataro, J. P., Deng, Y., Maneval, D. R., German, A. L., Martin, W. C. and Levine, M. M. 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to Hep-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infection and Immunity* 60: 2297-2304.
25. Fang, G. D., Lima, A. A. M., Martins, C. V., Nataro, J. P. and Guerrant, R. L. 1995. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 21: 137-144.
26. Gonzalez, R., Diaz, C., Marino, M., Cloralt, R., Pequenez, M. and Perez-Schael, I. 1997. Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 35:1103-1107.
27. Vial, J., Gene, A., Vargas, M., Gascon, J., Latorre, C. and Jimenez De Anta, M. T. 1998. A case-control study of diarrhoea in children caused by *Escherichia coli* producing heat-stable enterotoxin (EAST-1). *Journal of Medical Microbiology* 47: 889-891.

Use of Polymerase Chain Reaction, Cell Adhesion, Hemagglutination and Bacterial Clump Formation Tests in Detection of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains

CHENG-CHIH TSAI, SHU-YU CHEN AND HAU-YANG TSEN*

Department of Food Science, National Chung Hsing University, 250 Kuokuang Road, Taichung, Taiwan, ROC

(Received: June 8, 2000; Accepted: December 12, 2000)

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAggEC) is one of the pathogenic *E. coli* strains which may cause diarrhoea. *In vitro* studies have shown that EAggEC strains could establish a “stacked-brick” like adherence pattern on the surface of tissue culture cells and such a pattern is termed as aggregative adherence (AA). The purpose of this study is to compare the methods of polymerase chain reaction (PCR), HeLa cell adhesion, hemagglutination, and bacteria clumping tests for the specific detection of EAggEC suspected strains. This study isolated 340 *E. coli* strains from clinical samples of diarrhea cases which were firstly screened with the PCR method for the presence of suspected EAggEC strains. Strains of negative PCR results were also confirmed with HeLa cell adhesion and bacteria clumping tests for the EAggEC activity. Results showed that of these 340 clinical isolates, only three are EAggEC strains. Thus, EAggEC strains accounted for 0.88% in total strains. Also, for the above described methods, the *in vitro* HeLa cells adhesion test gave the clearest results followed by the bacteria clumping test. The hemagglutination tests might generate ambiguous results.

Key words: Enteroaggregative *E. coli*, polymerase chain reaction, cell adhesion, bacteria clumping, hemagglutination