

臺灣哺乳豬下痢症由來 *Escherichia coli* 之研究 III. Enterotoxins 及 Vero cytotoxin 之產生性

陳 清 久米常夫¹ 寶達勉² 椿志郎¹

在臺灣由哺乳仔豬下痢症分離所得大腸桿菌，供試127株中，其腸毒素（Enterotoxins, LT及ST）及 Vero cytotoxin（VT）之產生性加以研究之結果，檢出忌熱性腸毒素（Heat Labile Enterotoxin, 簡稱 LT）產生菌株有21.3%。LT或ST腸毒素產生性與菌體抗原及線毛抗原型之間，並未發現有太大的相關性。另外，不產生 LT、ST及VT之菌株中，亦發現具有987P或K99線毛者。而腸毒素或 Vero cytotoxin 之產生性與具有K88、K99及987P等線毛菌株之間，亦檢出無相關性者。

緒 言

特定血清型之一羣大腸菌，被稱為病原性大腸菌（Enteropathogenic *Escherichia coli*），而作為大腸菌病原因子，以菌體（Somatic 或 O）血清型為中心之研究，已有相當之進展。但是自從 Kohler^{9,10}（1967, 1968），Smith及Halls¹⁶（1967），Smith及Gyles¹⁷（1970）等指出幼畜下痢症的原因大腸菌，是由於毒素原性大腸菌之存在以來，對於下痢因子展開了新的討論。其後腸毒素之檢出方法，精製或物理化學性狀及生物活性，LT、ST之作用機序，Plasmid之支配等等相繼被解明。目前被確認為大腸菌之致病性因子者，有前篇所記載的定着因子—線毛（pili），本篇所要報告的腸毒素及最近被瞭解的而由Konowalchuk等¹¹（1977）所報告的 Vero cytotoxin, Kashiwazaki等⁷（1981）之猪 Loop factor等。但是，關於腸毒素產生株之生態學（Ecology）之報告非常少，不明瞭的地方仍很多。此乃由於腸毒素之檢索方法，係最近完成才開始加以整理的關係。在臺灣之情形也是同樣的，僅有嚴等⁹（1978）在一農場之少數分離株加以檢索，尚無系統性的調查研究。因此本篇所要報告的是在臺灣各地區由哺乳豬下痢症分離所得大腸桿菌，對於腸毒素產生株之調查研究，毒素原性大腸菌所引起下痢症病因論加以探討。

材料與方法

供試菌株：使用第一篇所記載的 127株，與第二篇所報告供試菌株相同。

對照菌株：以既知產生腸毒素菌株（LT、ST、VT）23株供試。

腸毒素之作法

忌熱性腸毒（LT）：以Evans變法培養基（表I），將供試菌株培養後置於 37°C 恆溫水槽，振盪培養24小時後，以8,000R. P. M遠心30分鐘後，抽取上清液，再經 0.45 μ m millipore filter濾過

Table 1. Formula of Modified Evans Medium

| | |
|---|---------|
| Casamino Acids | 20.0gm |
| Yeast Extract | 1.5gm |
| NaCl | 2.5gm |
| K ₂ HPO ₄ (0.05M) | 8.71gm |
| Glucose | 2.5gm |
| Trace Salt Solution | 1.0ml |
| Distilled Water | 1,000ml |
| pH 8.5 | |
| Formula of Trace Salt Solution | |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 10.0gm |
| MnCl ₂ 4H ₂ O | 1.0gm |
| FeCl ₃ 6H ₂ O | 0.135gm |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 0.4gm |
| Distilled Water | 1,000ml |

之濾液，作為LT產性調查研究之用。

耐熱性腸毒素 (ST)：使用 Evans 變法培養基，培養法與 LT 之情況相同處理後，再以 80°C 加熱 30 分鐘，供為 ST 產生性有無調查研究之用。

Vero cytotoxin (VT) 之作法

與 LT 之情況相同處理後，其培養上清濾液供為有無 Vero cytotoxin 檢查測定之用。

腸毒素之檢查方法

LT 之檢查法：依據 Donta⁴⁾ 等 (1974) 之報告，以小白鼠副腎 (Y-1) 細胞 (1×10^5 個/ml)，以 F10 培養基培養於 Falcon 之 Microplate，在 37°C 定溫箱中添加 5% CO₂ 之情況下培養 4 天，於培養發育完成之細胞，播種供試菌株之培養濾液各 0.025ml，再放回前述培養條件之定溫箱中感作培養 2 天後加以判定。培養細胞由紡錘形變為卵圓形之形態變化程度給予判定。Y-1 細胞係由農林水產省家畜衛生試驗場所分讓。

ST 之檢查法：依照 Dean 等³⁾ (1972) 報告之方法，以乳鼠胃內投與試驗加以研究，使用生後 3—4 日齡之 ICR 系小白鼠 (體重 2—2.5gm)，以加入 2% Evans blue (和光) 着色，將試料 0.1ml 直接胃內投入，20—28°C 室溫放置 4 小時後屠殺，全腸管重量與小白鼠體之比，其值在 0.09 以上者判定為陽性。

Vero cytotoxin 之檢查法：依照 Konowalchuk 等¹¹⁾ (1977) 及 Kashiwazaki 等⁶⁾ (1980) 所報告之方法，使用 Vero 細胞作為研究之用，Vero 細胞 (1×10^5 個/ml) 以 MEM (Gibco) 為培養基，培養於 Microplate。供試菌株之培養濾液 0.025ml 接種後，放置於 37°C 及 5% CO₂ 之定溫箱中培養，於第 3 天加以判定。與對照細胞相比，如有 25—30% 以上產生 CPE 者判定為陽性。Vero 細胞係由北里研究所分讓供試。

試驗成績

腸毒素 (Enterotoxins) 及 Vero cytotoxin 產生株之檢出成績：其結果詳如表 2 及圖 1、2、3 所示，在供試 127 株中產生 LT 者有 27 株 (21.3%)，ST 者有 11 株 (8.7%) 及 VT 者有 6 株 (4.7%)

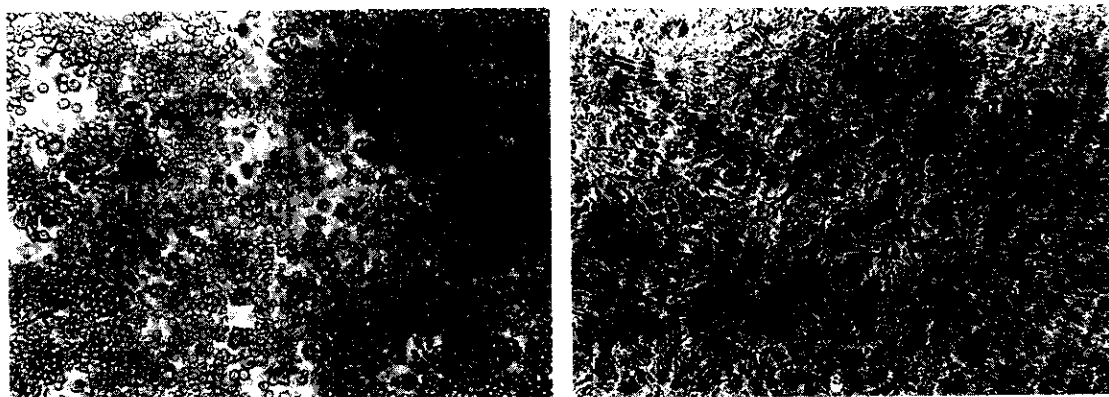


Fig. 1 Assay of heat labile enterotoxin using Y-1 cells:
Positive (left) and negative (right), $\times 225$.

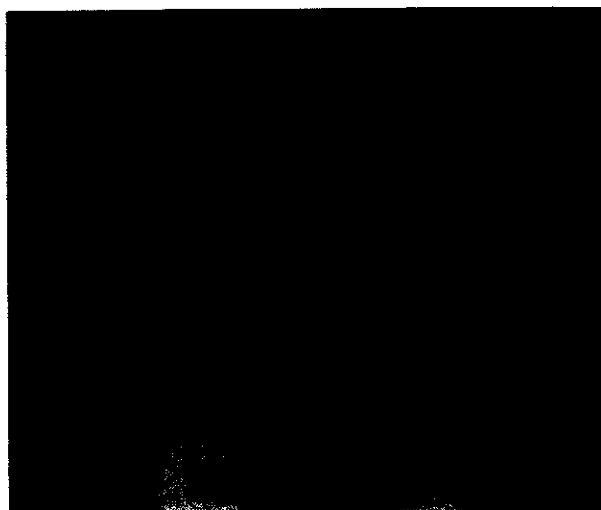


Fig. 2 Assay of heat stable enterotoxin: Positive (A) and negative (B.)

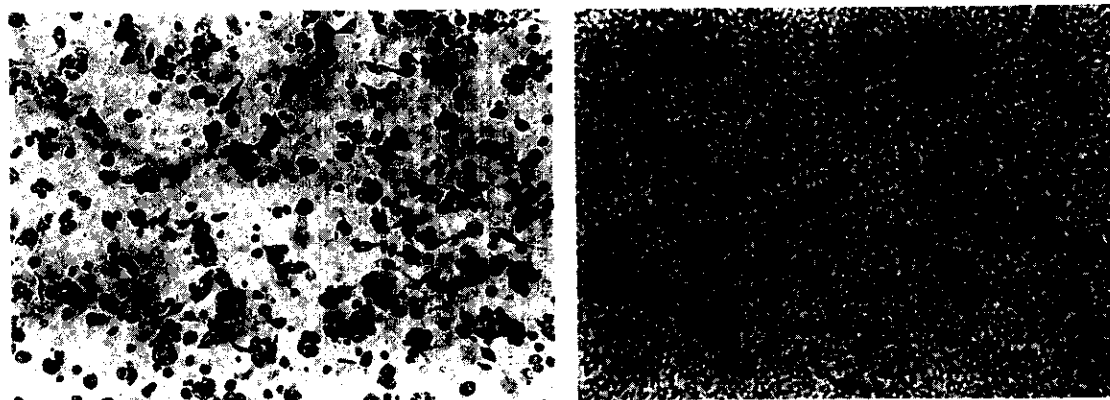


Fig. 3 Assay of Vero cytotoxin: Positive(left)and negative (right), $\times 225$.

Table 2. Results of Enterotoxins and vero Cytotoxins Assay

| No. of Strains Tested | Positive | | | |
|-----------------------|----------|-----------|----------|---------|
| | LT | ST | VT | |
| Isolates | 127 | 27(21.3)* | 11 (8.7) | 6 (4.7) |
| Control | | | | |
| LT+ | 12 | 12 | 10 | |
| ST+ | 10 | | | |
| VT+ | 1 | | | |

* Numeral in Parenthesis is shown Percentage.

。而對照既知菌株23株，均顯示其各自之特性成績。此等毒素產生菌株，雖大部份以單獨性被檢出，但是產生 LT, ST, VT等三種混合毒素者有2株，LT、ST及LT、VT等二種毒素混合產生者，各被檢出一株。

腸毒素及 Vero cytotoxin 產生性與菌體抗原型之相關性：其成績詳如表3所示，此等毒素與特定的O羣間雖無法認出其相關性，但是毒素產生菌株中，以0147較多之傾向略可窺知。

Table 3. Relationship between Enterotoxins, Vero Cytotoxin and O-serotypes

| Kind of toxin | No. of strains | O-serotypes (No. of strains) |
|---------------|----------------|--|
| LT+ | 23 | 08(1), 09(2), 0111(2), 0112ab(1), 0147(7), 0149(2), Untypable(8) |
| ST+ | 8 | 020ab(1), 0147(3), Untypable(4) |
| VT+ | 3 | 09(1), 0128(1), Untypable(1) |
| LT+ST+VT+ | 2 | 0147(1), Untypable(1) |
| LT+ST+ | 1 | 0147(1) |
| LT+VT+ | 1 | 0147(1) |

Total No. of strains tested: 127

腸毒素及 Vero cytotoxin 之產生性與線毛抗原型之相關性，其成績詳如表4所示，在產生毒素之38株中，保有 K88、K99及987P線毛者不超過8株(21.1%)。還有不產生LT、ST及VT之26個菌株中有6株(23.1%)具有K99及987P線毛。另外在保有987P線毛之20株中，小豬腸管結紮試驗ST陽性者有5株(25%)。因此，無法肯定認出腸毒素之產生性與此等三種線毛菌株間之相關性。

討 論

筆者等本次之試驗成績，LT產生菌株之檢出率雖只有21.3%，但却與澳洲 Kent⁸⁾等(1980)之報告約略相同。但是 Olsson等¹⁴⁾(1980)在瑞典之報告，ST產生菌株之檢出率高達48.5%，LT產生菌株則不超過14.4%。這次在臺灣之分離株，LT、ST二者之檢出率略低，尤以ST之檢出率偏低。Contrepolis等²⁾(1979)之報告，仔牛的下痢症分離株，ST產生菌株之60%同時具有K99線毛，Renault等¹⁵⁾(1978)之報告，仔豬下痢症分離株之69.2%，同時具有K88抗原及產生LT腸毒素。

Table 4. Relationship between the Production of Enterotoxins or Vero Cytotoxin and Pilus antigens

| Kind of toxin | No. of strains | tested | Pilus | | | |
|---------------|----------------|--------|-------|-----|------|----------|
| | | | K88 | K99 | 987P | K99+987P |
| LT+ | 23 | | | 2 | 2 | |
| ST+ | 8 | | 1 | | 3 | |
| VT+ | 3 | | | | | |
| LT+ST+VT+ | 2 | | | | | |
| LT+ST+ | 1 | | | | | |
| LT+VT+ | 1 | | | | | |
| LT-ST-VT- | 26 | | | 6 | 14* | 6 |
| Total | 64 | | 1 | 8 | 19 | 6 |

* Including 5 strains which were positive for the Porcine loop test.

對於仔猪之病原性方面，Söderlind及 Möllby¹³⁾ (1980) 報告，認為ST產生菌株較LT產生菌株為弱。但是筆者等之試驗成績顯示，腸毒素及 Vero cytotoxin 菌株與線毛抗原菌株間，未能認出有密切的相關性。在具產生腸毒素之38株中與三種線毛之中任何一種有關者，也不過8株 (21.1%) 而已。另外，在不產生毒素的26株中，有6株 (23.1%) 可見到K99及987P線毛，其他在20株保有987P線毛菌株中，乳鼠胃內投與試驗雖為陰性，但是小豬腸管結紮試驗則有5株 (25%) 呈現ST陽性。Burgess等¹⁾ (1978) 以乳鼠胃內投與試驗陽性者稱之為ST_a，而小豬腸管結紮試驗陽性者稱之為ST_b。而相同的情況，Olsson及Söderlind¹³⁾ (1980) 則稱之為ST_m或ST_p。其他Gyles⁵⁾ (1979) 則稱之為ST₁或ST₂。這種情況，我們認為已充分顯示ST腸毒素具有二種生物活性相異毒素之存在。其次，關於Vero cytotoxin係1978年Konowalchuk等¹²⁾ 所報告，認為大腸菌中某些菌株在其培養液中，具有某些特殊的毒性物質，對於Vero細胞顯示特殊毒性的一種細胞毒。Kashiwazaki等⁶⁾ (1980) 由各種病材所分離之138株大腸菌中，具產生VT者有8株 (5.8%)，筆者等這次之調查研究中，由哺乳仔猪下痢症所分離之127株大腸菌中，產生VT菌株者有6株 (4.7%)。VT產生菌株，雖常常可從人類及動物下痢病材中分離到，但是對於引起下痢之致病性迄至目前為止，尚無多大之研究。

致 謝

本題系列之研究與報告，承蒙日本北里大學獸醫畜產學部家畜傳染病學教授笹原二郎博士之懇切指導與校閱指正，留日期間蒙臺灣省政府經費之資助，謹併致萬分之感謝。

參考文獻

- 1) Burgess, M. N., Bywater, R. J., Cowley, C. M., Mullan, N. A. and Newsome, P. M.: Biological evaluation of a methanol solution, heat stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. *Infect., Immunol.*, 21: 526—531, 1978.
- 2) Contrepoint, M., Dubourguier, H. C., Bordas, C. and Gouet, P.: *E. coli* K99+ TS+ et diarrhée du veau. *Rec. Méd. Vét.*, 155: 553—558(1979).

- 3) Dean, A. G., Ching, Yi-chuan., Williams, R. G. and Harden, L. B. : Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: Application in a study of diarrhea in children in Honolulu., *J. Infect. Dis.*, *125*: 407—411, 1972.
- 4) Donta, S. T., Moon, H. W. and Whipp, S. C.: Detection of heat labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science*, *183*: 334—336, 1974.
- 5) Gyles, C. L.: Limitations of the infant mouse test for *Escherichia coli* heat stable enterotoxin. *Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, *43*: 371—379, 1979.
- 6) Kashiwazaki, M., Ogawa, T., Isayama, Y., Akaike, Y., Tamura, K. and Sakazaki, R.: Detection of Vero cytotoxic strains of *Escherichia coli* isolated from diseased animals. *Natl. Inst. Anim. Health Q.(Jpn)*, *20*: 116—117, 1980.
- 7) Kashiwazaki, M. Akaike, Y., Miyachi, T., Ogawa, T., Sugawara, M. and Isayama, Y.: Production of heat-stable enterotoxic component by *Escherichia coli* strains enteropathogenic for swine. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn)*, *21*: 21—25, 1981.
- 8) Kent, A. J., Links, I. J. and Luke, R. K. J.: Toxigenicities and serotypes of *Escherichia coli* isolated from Australian pigs. *Proc. Int. Pig Vet. Soc.*, 1980 Cong., Copenhagen, Denmark. 144, 1980.
- 9) Kohler, E. M.: Studies of *Escherichia coli* in gnotobiotic pigs: IV. Comparison of enteropathogenic and nonentero-pathogenic strains., *Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, *31*: 277—282, 1967.
- 10) Kohler, E. M.: Enterotoxic activity of filtrates of *Escherichia coli* in young pigs, *Am. J. Vet. Res.*, *29*: 2263—2274, 1968.
- 11) Konowalchuk, J., Speirs, J. I. and Stavric, S.: Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli* *Infect. Immunol.*, *18*: 775—779, 1979.
- 12) Konowalchuk, J., Dickie, N., Stavric, S. and Speirs, J. I.: Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. *Infect. Immunol.*, *20*: 575—577, 1978.
- 13) Olsson, E. and Söderlind, O.: Comparison of different assays for definition of heat stable enterotoxigenicity of *Escherichia coli* porcine strains. *J. Clin. Microbiol.*, *11*: 6—15, 1980.
- 14) Olsson, E., Smyth, C. J. and Söderlind, O.: Enterotoxigenicity patterns of Swedish porcine *E. coli*: Relationship to Ogroup and adhesins. *Proc. Int. Pig Vet. Soc.*, 1980 Cong., Copenhagen, Denmark. 143, 1980.
- 15) Renault, L., Mathieu, D. and Bourhis, E. Le: Detecting enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin: 2. Relationship between O and K antigens and the production of enterotoxin in strains isolated from the piglets after weaning. *Ann. Rech. Vet.*, *9*: 427—432, 1978.
- 16) Smith, H. W. and Halls, S.: a) (Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs, and rabbits. b) Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Pathol. Bacteriol.*, *93*: 499—529 and 531—543, 1967.
- 17) Smith, H. W. and Gyles, C. L.: The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin, *J. Med. Microbiol.*, *3*: 387—401, 1970.
- 18) Söderlind, O. and Möllby, R.: Virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from a field materials of piglets with diarrhoea from vaccinated and unvaccinated sows *Proc. Int. Pig Vet. Soc.* 1980 Cong., Copenhagen, Denmark. 145, 1980.
- 19) 嚴家清, 張靖男, 沈詠梅, 王貞富, 劉堂輝, 羅麗華 (1978): 仔猪病原性病大菌腸內毒素與病原性的鑑定。動物醫學 2, 82。

Studies on *Escherichia coli* Originated from Diarrhea of Suckling Piglets in Taiwan

III. Producibilities of Enterotoxins and Vero cytotoxin

Chinng CHEN, Tsuneo KUME¹, Tsutomu HOHDATSU² and Shrio TSUBAKI

The main purpose of this study was the producibilities of the enterotoxins (LT & ST) and vero cytotoxin (VT). In this study, 127 strains of *E. coli* were used, which were isolated from the suckling piglets with diarrhea in Taiwan. The ratio of strains observed was 21.3% in relation with the heat labile enterotoxin. There was little correlation of the producibilities between the LT or ST enterotoxins and the somatic or pili antigens of the *E. coli* strains. Furthermore, some strains without the producibilities of the LT, ST or VT were detected to possess 987p or K99 pili.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

1. School of Veterinary Medicine and Animal Science, Kitasato University, JAPAN

2. Research Center for Veterinary Science, Kitasato Institute, JAPAN

