

行政院衛生署疾病管制局九十年度委託研究計畫

成果報告

(自 90 年 2 月 至 90 年 12 月止)

計畫名稱：克雷白氏肺炎桿菌性腦膜炎：細胞分析模式的建立，致病因子的分離鑑定  
和致病機制的探討

計畫編號：DOH90-DC- 1028

研究起訖：90 年 2 月 9 日至 90 年 12 月 31 日

申請機構：國立交通大學

主持人：彭慧玲

職 稱：副教授

聯絡電話：035712121 ext. 56916, 56925

電子郵件：hipeng@cc.nctu.edu.tw

聯絡人：彭慧玲

傳 真：035729288

填表日期：91 年 8 月

## 摘要：

克雷白氏肺炎桿菌屬一伺機性感染的細菌，臨床上常造成菌血、尿道和呼吸道感染。此菌在台灣糖尿病病人引起化膿性肝膿瘍、眼內炎和敗血性肺栓塞的顯著比例，特別受到重視。最近，成人和幼兒罹患克雷白氏肺炎桿菌腦膜炎的病例在國內外均有報導，同時因為克雷白氏肺炎桿菌高比例的抗藥性問題，針對新目標做新藥開發的工作更是刻不容緩。為了解克雷白氏肺炎桿菌腦膜炎的致病機轉，我們和台北榮總馮長風醫師合作，收集了克雷白氏肺炎桿菌腦膜炎菌株做了下列分析：在此計畫中的十九株菌包括十七株來自台北榮總和實驗室原先收集自林口長庚的兩株經質體分型共區分成十三群，除了大部分的菌都帶有 100 kb 以上的大質體外，多樣的質體型顯示這些腦膜炎菌株沒有特定的質體型；另外，我們以聚合酶鏈鎖反應和南方墨點法分析這些菌株的第一型和第三型黏附蛋白 FimH 和 MrkD、侵入因子基因 IalK 等基因的分佈，結果我們發現腦膜炎分離株帶有這些基因序列的比例分別為 84 %、94.7 % 和 89.4 %，相較於被報導過的結果，FimH 基因在腦膜炎分離株的分佈略低，而帶有 *mrkD* 的比例卻明顯的偏高。同時，我們以酵母菌凝聚及紅血球凝聚測試來分析這些菌株第一型和第三型纖毛黏附的活性，測試結果發現 *fimH*、*mrkD* 基因的分佈和菌株的凝聚活性沒有絕對的相關性，這結果暗示著這些腦膜炎分離株可

能帶其他的黏附蛋白。為了進一步探討 MrkD 可能和腦膜炎的關聯性，我們將這些 *mrkD* 基因以 RFLP 分出四型—*mrkDv1*、*mrkDv2*、*mrkDv3* 和 *mrkDv4*，而以 *mrkDv1* 的比例最高 (14/19)，但其意義有待進一步證明。接著我們再以 MrkD 特定黏附的胞外基質包括第四和第五型膠原蛋白來分析不同 *mrkD* 基因型的黏附能力，結果發現 *mrkD* 基因型與膠原蛋白的黏附活性高低無關。最後，我們分析這些菌株對 Int 407、HCT-8 細胞株的黏附活性，我們發現對膠原蛋白有較高黏附活性的菌株對這兩株細胞也有明顯的黏附特性。

## Abstract:

*Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic pathogen which often causes bacteremia, urinary and respiratory tract infections. In Taiwan, the close association between *K. pneumoniae* liver abscess, septic endophthalmitis, chest wall abscess and meningitis with diabetes has drawn a lot of concerns. The occurrence of *K. pneumoniae* meningitis in either newborn or in adult patients have recently been reported worldwide. Moreover, the increasing number of the multi-drug resistance *K. pneumoniae* urges for a novel means of antibacterial strategy. In order to understand the pathogenic mechanism of *K. pneumoniae* meningitis, we initiated the study by collaboration with Dr. C-P. Fung in Taipei Veterans General Hospital (VGH). Seventeen meningitis isolates obtained from VGH together with two isolates previously collected in our laboratory from Chang Gung medical center in Lin Kou were initially subject to plasmid pattern analysis. Diverse patterns were observed indicated that not a representing plasmid pattern could be identified for the meningitis isolates except that most of them carry a plasmid(s) larger than 100 kb. Moreover, PCR and Southern blotting analysis were performed to analyze the presence of type 1 and type 3 fimbrial adhesions, *fimH* and *mrkD*, and the invasion associated gene *ialK*. It appeared that most of the isolates contained the *fimH*, *mrkD*, *ialK* genes respectively with a ratio of 84%, 94.7%, and 89.4%. Comparing to that of the published reports, the *fimH*-containing ratio is somewhat lower. Whereas, the *mrkD*-containing ratio of the isolates is much higher. In the mean time, the assays including yeast agglutination and hemagglutination were carried out to assess respectively the type 1 and type 3 fimbrial activities. However, the isolates which do not contain either *fimH* or *mrkD* still carry relatively high

agglutination capability implying the presence of a novel adhesin in the isolates. In order to pursue further the role of *mrkD*, the PCR products containing the *mrkD* were subject to *Sau3AI* digestion and the mixtures resolved by electrophoresis on an agarose gel. Four types of RFLP were identified among the isolates which include *mrkDv1*, *mrkDv2*, *mrkDv3*, and *mrkDv4*. Most interestingly, fourteen of the isolates are *mrkDv1* type and the significance will be investigated. Finally, we also tried to measure the binding activity of the isolates to the MrkD specific ECMs including type IV and type V collagen, and to the epithelial cell lines Int407 and HCT-8. The results appeared that the isolates which carry a higher binding activity to the ECM also revealed a strong binding activity to the cell line.

## 前言：

克雷白氏肺炎桿菌是臨床上最常見的伺機性感染細菌，經常造成院內病人的菌血症、尿道和呼吸道感染。此菌引起糖尿病病人化膿性肝膿瘍、眼內炎、腦膜炎和敗血性肺栓塞的顯著比例（15, 31, 40, 55, 62），特別受到我們國內醫生、感染專家與學者的重視。為了進一步研究這個特別的現象，國家衛生院於民國八十七年一月，在台北榮民總醫院召開了一個會議，即以「克雷白氏肺炎桿菌化膿性肝膿瘍」作為議題。幾個醫學中心及學術研究單位，以血清分型、核糖體 RNA 型、質體型、染色體基因分型、及對不同抗生素的感受性等實驗都無法證明特定的克雷白氏肺炎桿菌分離株與化膿性肝膿瘍的相關性。而真正存在克雷白氏肺炎桿菌與化膿性肝膿瘍之間的機制尚待釐清。

克雷白氏肺炎桿菌是常見引起腦膜炎的革蘭氏陰性細菌之一（29, 44, 45, 46），台大醫院最近報導在 1993-1998 年間，36 例成人腦膜炎的確定病原中，克雷白氏肺炎桿菌比例最高，佔了百分之三十三（21）。同時，高雄長庚醫院及國外醫學中心也有類似的報告，甚至指出克雷白氏肺炎桿菌和大腸桿菌腦膜炎病例有超越 B 群鏈球菌的現象（13, 14, 19, 29）。不管是成人、幼兒或新生兒腦膜炎，因為日趨嚴重的克雷白氏肺炎桿菌抗藥性的問題（63），阻礙了抗生素治療的時效性，往往造成病人死亡或嚴重的腦部病

症 (22, 32, 38)。成人的克雷白氏肺炎桿菌腦膜炎，通常發生於有潛在性疾病的病人包括糖尿病或惡性腫瘤病人 (26, 43, 45, 46)。但是，台大醫院在最近的報導中指出，這些潛在性疾病、年齡、性別等因素並不影響抗生素的療效 (22)，顯示克雷白氏肺炎桿菌是腦膜炎的致病主因。

克雷白氏肺炎桿菌的致病因子包括夾膜、脂多醣 (lipopolysaccharide) 及螯合鐵蛋白等和其致病能力的相關性已經證明 (52, 58)。大而厚的夾膜構造可以保護克雷白氏肺炎桿菌，避免被多型核球噬菌細胞 (polymorphonuclear granulocytes) 攻擊，第二型夾膜 (K2) 是歐美最常見且毒性較高的血清型 (49)，然而在台灣以第一型夾膜 (K1) 血清型居多，引起化膿性肝膿瘍的克雷白氏肺炎桿菌也以 K1 血清型為主 (50)；脂多醣是革蘭氏陰性細菌的致病因子，我們實驗室在數年前也證實克雷白氏肺炎桿菌 *galU* 突變株因為無法合成完整的脂多醣而失去毒性 (12)；有關螯合鐵蛋白和克雷白氏肺炎桿菌的致病性研究很多，最近，我們實驗室在克雷白氏肺炎桿菌中發現位在病源性島嶼 (pathogenicity island) 上的螯合鐵蛋白基因，顯示螯合鐵蛋白和致病性密切相關 (42)。

大部分細菌性腦膜炎的發生是經由全身性的菌血症侵入腦部，藉產生的毒性因子來刺激發炎反應，而強烈的發炎反應往往造成嚴重的後遺症和死亡的病例 (61)。大腸桿菌 K1 夾膜被認為是引起大腸桿菌腦膜炎的主因

(35, 39)，後來加州洛山機醫學院 Kim 的研究群陸續證實夾膜外有許多因子真正參予腦膜炎的致病過程，其中包括黏附蛋白 (adhesin)、入侵蛋白 (invasin)、外膜蛋白 (outermembrane protein) 等分子 (7, 8, 53, 54)。目前為止，在克雷白氏肺炎桿菌中已有四型黏附蛋白的報告，其中第一型黏附蛋白和其他腸內菌一樣，幾乎遍佈所有的克雷白氏肺炎桿菌分離株，一般認為可能參與致病但並不是必要的因子 (33)；少數的克雷白氏肺炎桿菌株帶有第三型黏附蛋白，被認為在尿道感染和呼吸道感染中扮演重要的功能，但由於決定此蛋白的基因因為分布在質體或染色體上而有不同的黏附特性現，其致病角色還待證明 (27, 34, 57, 60)；另外兩種黏附蛋白 KPF-28 (18) 和 CF29K (17) 在最近才被證明和腸道細胞的黏附有關；入侵性蛋白的存在也在最近才被報告 (25)。而克雷白氏肺炎桿菌如何經菌血途徑造成腦膜炎的機制不明，所以本計劃研擬分析鑑定特定的黏附蛋白和侵入性蛋白，希望藉阻斷這些毒性蛋白的活性來控制克雷白氏肺炎桿菌腦膜炎。

細菌致病的過程，必須要有特定基因的表現來適應多變的環境，來達成感染的目的。而兩個分子組成的訊號傳遞系統 (two-component system) 是存在細菌中最常見的一種調控系統，可藉由偵測外界環境的變化來調控基因的表現 (48, 51)。Two-component system 由感應激蛋白和反應調控蛋白組成。感應激蛋白位於細胞膜上，負責接收外來的訊息，藉由自體磷酸



化作用後，再將組胺酸殘基 (histidine) 上的磷酸傳送給細胞質內的反應調控蛋白的天門冬胺酸殘基，來活化反應調控蛋白 (10, 59)。活化的反應調控蛋白則負責促進或抑制特定基因或基因組的表現，而這些基因或基因組往往與細菌的毒性表現相關 (11, 24)。在革蘭氏陰性細菌中，以博德氏百日咳桿菌 (*Bordetella pertusis*) 的 two-component system 研究最清楚 (10, 11)，因為這套系統控制許多博德氏百日咳桿菌的毒性基因表現 (24, 37)，所以命名為 *bvgAS* (*Bordetella virulence genes*) 基因組；同樣的在大腸桿菌的類似基因組稱為 *evgAS* (*Escherichia virulence genes*) (30)；我們實驗室在這兩年發現在克雷白氏肺炎桿菌中至少有兩套類似的 two-component system，我們分別命名為 *kvgASQR* (2, 41) 和 *kvgASII* (4)，這兩套基因組和克雷白氏肺炎桿菌致病的機制還待證明。由於這種訊息傳遞方式陸續在各種病原細菌中發現 (9)，而新藥開發針對阻斷組胺酸殘基激酶作用，不僅可以對抗細菌感染，也可解決日趨嚴重的抗藥性問題 (9, 20)。因此，我們希望能了解類似的訊號傳遞系統在克雷白氏肺炎桿菌引起腦膜炎的過程中所扮演可能的調控角色，進一步尋求對抗細菌感染的目標。

## 材料與方法：

### 實驗試劑藥品和材料來源

本實驗室配置 LB (Luria-Bertani) 培養基及培養液中的 tryptone 及 yeast extract 購自啟新 (Difco)，而限制酶購自勁因 (Promega)、諾貝爾 (Biolab) 或進階 (MBI)。Tag 聚合酶購自生工，融合蛋白純化試劑購自默克 (Novagen)，用於 Dot-Blotting 標定探針的 DIG-labelling kit 和購自羅氏 (Boehringer Mannheim)，抽取噬菌體的 kit 購於諾貝爾 (Qiagen)，其他藥品則購自季勗 (Sigma) 及 Merck。引子組的序列見表一，為實驗室研究克雷白氏肺炎桿菌的黏附蛋白和侵入蛋白時設計 (1,3)。

### DNA 技術

#### 質體型分析一

細菌質體的抽取和分析參照 Kado 和 Liu 的方法 (36)。

#### 染色體抽取一

細菌染色體的製備參照 Peng 等人的方法 (50) 並做適度修正。首先，取 1 毫升隔夜培養的菌液，離心之後用 0.8 毫升的 lysis 溶液 (200 mM NaCl，

20 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, 0.2 % Triton X-100, 5 mM DTT, 80  $\mu$ g lysozyme) 溶開於 37°C 放置 30 分鐘後加入 4  $\mu$ l 蛋白酶 K (20 mg/ml), 在 50°C 水浴作用 2 小時於, 接著置於冰上 10 分鐘, 再加入 250  $\mu$ l 的飽和食鹽水, 搖晃之後, 以 1600 x g 離心 10 分鐘, 分別取 500  $\mu$ l 的上清液到兩個 1.5 毫升的離心管中, 並各加入 1000  $\mu$ l 95% 酒精 (-20°C), 搖晃之後以 16000 x g 離心 10 分鐘, 最後倒掉上清液, 用冰的 75 % 酒精清洗 2 次, 烘乾並以 50  $\mu$ l TE 溶液溶解之後保存於 -20°C。

#### PCR 和 RFLP (Restriction fragment length polymorphism) —

以抽取染色體 DNA 為模版, 加上各引子組以特定的狀況 (1, 3) 作 PCR, PCR 產物再分別以洋菜膠電泳分析。針對第三型黏附蛋白基因 MrkD 分型, 先將增幅後的產物利用酵素 *Sau3AI* 切割, 切割後的片段以洋菜膠電泳分析。

#### 南方轉印墨點法 —

參照 Sambrook 和 Russell 的方法 (56), 先將待測 DNA 電泳分離, 電泳膠經處理後, 以 20x SSC 轉印到纖維膜 (NC membrane) 上, 然後將纖維膜放入袋中, 加入探針, 68°C 雜交 16 小時, 纖維膜浸泡於 blocking 試劑

中 1 小時，改將纖維膜改置於含有 4  $\mu$ l Anti-Dig-AP 抗體的 20 毫升 blocking 試劑中，在室溫搖晃 45 分鐘，用清洗液 (maleic acid buffer, 3 % Tween 20) 沖洗後，纖維膜浸入加有 NBT 和 BCIP 的鹼性磷酸緩衝液 (100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl pH 9.5) 中呈色。

### **酵母菌及血球凝集測試**

#### **酵母菌凝集測試一**

參照 Adlerberth 等人 (6) 及細菌致病機制技術手冊 (16) 的方法，我們先將克雷白氏腦膜炎菌株養在 LB 中，於 37°C 下養 16 個小時；另外，酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae* AH109) 則培養於 30°C、YPD 培養液中約 60 個小時。然後，於 96 well U 型 plate 內，取 100  $\mu$ l 而濃度為每毫升  $1 \times 10^9$  cells 的 KP (以 PBS 清洗和復溶)，並且作兩倍倍率稀釋，稀釋完後的菌體加入 200  $\mu$ l 而濃度為每毫升  $6 \times 10^4$  cells 的 *Saccharomyces cerevisiae* (也以 PBS 清洗和復溶)，混合的菌液置於室溫下 5 分鐘，再放置 4°C 冰箱中靜置 16 個小時後觀察凝集的情形。

#### **血球凝集測試一**

參照細菌致病機制技術手冊 (16) 和 Gerlach 等人的方法 (27)，我們先將克雷白氏腦膜炎菌株 LB 中於 37°C 下靜置培養 24 小時，接著將經 PBS 清

洗和復溶的菌液（約每毫升  $1 \times 10^9$  cells）和同體積經 PBS 清洗和復溶、並經 0.01% tannic acid 處理 15 分鐘後 3% 的 A 型紅血球混合放入 96 孔的 U 型盤，最後加入 2% D-mannose 並觀察凝集結果。

### **膠原蛋白吸附活性測試**

先將購自 Sigma 的膠原蛋白以 50  $\mu$ M 的濃度黏附在 96 孔的平盤上，置於 4°C、16 小時後以 0.1% 的 PBS-BSA 清洗三次各五分鐘，再以 2% 的 PBS-BSA 浸泡於 22°C、2 小時，接著依 Sebghati 等人的方法 (57) 加入先以 0.1% 的 PBS-BSA 清洗復溶的菌液（約每毫升  $1 \times 10^9$  cells），混合置於 22°C、2 小時。最後，以 0.1% 的 PBS-BSA 清洗三次後加入 0.1% 的 Triton X-100，經反應五分鐘後將混合液系列稀釋塗抹於 LB 平板上，於 37°C 培養後計算菌數。

### **細胞株吸附活性測試**

我們測試的細胞株 Int-407 ( Intestine-407)，為人類胚胎腸細胞株取自我們系裡袁俊傑老師實驗室，而 HCT-8 則購自新竹食品工業研究所；Int-407 培養於 BME (Basal Eagle medium, Hyclone-SH30159-03) 含 10 % 的胎牛血清中，培養在 37°C，5 % CO<sub>2</sub> 的培養箱中。參照 Favre-Bonte 等人 (23) 和 Giannasca 等人的方法 (28)，我們先將細胞株種於 12 孔的培養皿中，

培養至 80 % 滿 (約  $10^5$  的細胞)，用 PBS 洗二次，加入 2 毫升不含血清的培養液，再加入與細胞數比例約 1:30 的細菌 (養於含 2 % mannose 的 LB 培養基中)，在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  的培養箱中 1 小時後，用 PBS 洗三次，最後加入 0.1 % 的 Triton X-100 混合 5 分鐘後，取作用後的細胞液作系列稀釋並作塗盤計算菌數。

結果：

### 1. 菌株的收集

我們和台北榮總的馮長風醫生合作，收集了十七株克雷白氏腦膜炎菌分離株如表二，編號為 VHm1-17。除了菌落型態區別外，我們進一步分析這些菌株利用乳糖和丙二酸的能力。同時，由於實驗室在做 PhoA 鹼性磷酸酶的研究，因此我們也測試了這些菌株 PhoA 的活性，結果發現這些分離株均含有鹼性磷酸酶。為了確認沒有地理分布的因素，我們由實驗室收集的菌株中挑出了兩株克雷白氏菌腦膜炎分離株 CG25 和 CG28 作為對照組。我們也以實驗室最常研究的對象 CG43 最為另一對照組。

### 2. 質體的分型

我們依照 Kado and Liu 的方法 (36)，分離這些菌的質體型，我們發現這些菌株的質體型差異很大，結果如圖一。而除了 VHm2 和 CG28 外，所有的腦膜炎分離株都帶有 100 kb 以上的質體，我們可以依這些菌體的質體分型分為十三類。

### 3. 第一型黏附蛋白 *FimH* 基因分佈

在克雷白氏菌中已有四型黏附蛋白的報告，其中第一型黏附蛋白 *FimH* 幾乎遍佈在所有的克雷白氏菌中 (52)。我們利用實驗室先前設計的 *FimH* 引子組 (1)，將這些菌株以 PCR 分型，並且以 *fimH* 為探針，以南方墨

點法做更進一步的確認。結果發現長庚分離株 CG28 和榮總分離株 VHm2、VHm11 不含有 *fimH* 基因，而這些分離株帶有此基因的比例為 84 % (如圖二、圖三)。

#### 4. 第三型黏附蛋白 *MrKD* 的基因分佈

先前研究發現少數的克雷白氏菌株帶有第三型黏附蛋白，所以第三型黏附蛋白被認為和致病性有較高的相關性 (52, 60)。如圖四、圖五，我們發現大部分克雷白氏腦膜炎分離菌株具有 *mrkD* 基因，只有榮總分離株 VHm11 不具 *MrKD* 的基因。這十七株榮總分離株帶有此基因的比例為 94.7 %。

#### 5. 腦膜炎侵入蛋白 *IalK* 的基因分佈

克雷白氏菌中的 *IalK* 和 *Bartonella baciliformis* 入侵紅血球的侵入蛋白 *IalA* (47) 有相似的酵素功能(5)、而和大腸桿菌 K1 腦膜炎菌株致病蛋白 *YdgP* (8) 在序列上有 98 % 的相同。所以，我們分析這些菌株的 *IalK* 基因的分佈，結果如圖六、圖七，我們發現不帶 *FimH* 基因的長庚分離株 CG28 和榮總分離株 VHm2 也不含有此蛋白的基因。這些分離株帶有 *IalK* 基因的比例為 89.4 %。

#### 6. *MrkD* 基因 RFLP 分型

第三型黏附蛋白的基因型態已知有數種-*mrkDc1*、*mrkDc2*、*mrkDp*、



*mrkDv1*、*mrkDv2*、*mrkDv3*、*mrkDv4* (1)，因此我們利用 *Sau3AI* 酵素處理經 PCR 增幅的 *mrkD* 產物，結果如圖八及表二所示，這些腦膜炎菌株可分成 *mrkDv1*、*mrkDv2*、*mrkDv3*、*mrkDv4* 四大類型，而其中有十四株均為 *mrkDv1*。

### 7. 酵母菌及血球凝集試驗

一般以酵母菌凝集測試第一型纖毛黏附的活性(6)，而加入 2% D-mannose 的血球凝集試驗則在測試第三型纖毛黏附的活性 (27)。如表二所示，大致上可以分成凝集和不凝集兩種，而將此活性結果和第一、三型黏附蛋白基因分佈進行比較，可以發現凝集反應和基因的有無沒有絕對的關性。

### 8. 膠原蛋白黏附活性測試

不同的 *mrkD* 基因型對第四、五型的膠原蛋白有不同的吸附能力 (57)，我們比較 *mrkDv1~4* 的膠原蛋白黏附能力的結果如圖九，可以發現 *mrkDv1~4* 基因型與膠原蛋白黏附能力沒有明顯的相關性，而其中 VHm2、VHm5、VHm6 及 VHm8 對膠原蛋白有明顯的黏附能力，VHm6 及 VHm8 對第四、五型膠原蛋白的黏附活性有顯著差異。

### 9. 細胞吸附測試

由於克雷白氏菌常在成人身上引起腦膜炎，感染最有可能的原因是克雷白氏菌經由侵入腸道造成菌血而引起的 (61)，所以我們以腸道細胞株

Int-407、HCT-8 為對象。除了待測的腦膜炎菌株，我們還以 CG43、大腸桿菌 XL1-Blue 為對照組。結果顯示如圖十，VHm5、VHm6 及 VHm8 對腸道細胞株 Int-407、HCT-8 均有明顯的黏附能力，和對膠原蛋白的黏附活性成正相關。另外，VHm14 及 CG28 也有很高的黏附活性。

## 討論與建議:

我們和台北榮總馮長風醫師合作，收集並且分析克雷白氏肺炎桿菌腦膜炎菌株。首先我們分析菌株的質體型、第一型和第三型黏附蛋白基因和侵入蛋白基因 *ialK* 的分佈，希望能了解是否有特殊的致病因子與腦膜炎感染性有關。由實驗結果，我們發現到這些分離株大多具有第一型、第三型黏附蛋白和侵入蛋白基因，比例分別高達 84 %、94.7 %和 89.4 %，其中 VHm2 不具有 *fimH* 和 *ialK* 基因、VHm11 不具有 *fimH* 和 *mrkD* 基因。由於測試的菌株數目太少，這些因子與克雷白氏肺炎桿菌腦膜炎的關係，仍待進一步的確認；在質體分型方面，我們可以發現到這十九株分離株中就可以分成十三型，差異性非常大，雖然這些分離株所攜帶的質體差異性很大，但是十九株中有十七株都帶有大於 100 kb 的質體顯示大質體可能扮演重要角色，由於我們實驗室在著手分析於克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中已被定序接近完成約 200 kb 的毒性質體，特定毒性因子的鑑定將有助於我們進一步探討這些大質體的功能；而 *mrkD* RFLP 分型結果，其中佔有最高比例的 *mrkD*<sub>v1</sub> 是否有特別意義，我們正著手建構此四種不同的 *mrkD* 基因型態，將利用 *E. coli* 表現系統來觀察不同 *mrkD* 基因型和功能上的相關性；雖然對這些菌株的分析，沒有能鑑定出對膠原蛋白或細胞株特定的黏附活性，

但其中 VHm6 和 VHm8 對第四、五型膠原蛋白明顯的黏附活性差異，將可以作為尋求特定黏附蛋白的對象；而相同的，VHm5 和 VHm6 對 Int407 和 HCT-8 細胞株粘附的差異性，也是我們將繼續研討的目標。未來，我們可藉今年建立的活性測試模式來分析並純化這些致病因子引起腦膜炎可能的致病機轉，達到研擬干擾致病的目的。

## 參考文獻：

1. 呂文玲，克雷白氏肺炎菌 CG43 第三型纖毛黏附因子的鑑定，國立清華大學生命科學研究所碩士論文，中華民國九十年。
2. 楊淑理，肺炎克雷白氏毒力菌株特异性基因的鑑定：*kvgASQR* 基因群的序列及表現分析，國立清華大學生命科學研究所碩士論文，民國八十九年六月。
3. 蔡易芊，克雷白氏肺炎桿菌參與致病的基因：鑑定與特性分析，大學生物科技研究所碩士論文，民國八十九年七月。
4. 賴旻初，克雷白氏肺炎桿菌 *KvgAII* 基因之選殖與表現分析，生物科技研究所碩士論文，民國八十九年七月。
5. 黃盈蓉，國立交通科技研究所碩士論文，中華民國九十年。
6. Adlerberth I, Ahrne S, Johansson ML, Molin G, Hanson LA, Wold AE: A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62:2244-51.
7. Badger JL and Kim KS: Environmental growth conditions influence the ability of *Escherichia coli* K1 to invade brain microvascular endothelial cells and confer serum resistance. *Infect. Immun.*1998; 66:5692-5697.
8. Badger JL, Wass CA and Kim KS: Identification of *Escherichia coli* K1 genes contributing to human brain microvascular endothelial cells invasion by differential fluorescence induction. *Mol. Microbiol.* 2000; 36:174-182.
9. Barret JF and Hoch JA.: Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob. Agent. Chemo.*1998; 42:1529-36.
10. Beier D, Deppisch H and Gross R.: Conserved sequence motifs in the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. *Mol. Gen.Genet.* 1996; 252: 169-176.
11. Boucher PE, Menozzi FD and Loch C. The modular architecture of bacterial response regulators. Insights into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis*. *J. Mol. Biol.*1994; 241: 363-377.
12. Chang HT, Lee JH, Deng WL, Fu JF and Peng HL: Virulence and outer membrane properties of a *Klebsiella pneumoniae galU* mutant. *Microbial Pathogenesis* 1996; 20:255-61.
13. Chang C, Y. H , Chiu NC, Li WC and Huang FY: Characteristics of neonatal bacterial meningitis in a teaching hospital in Taiwan from 1984-1997. *J. Microbio. Immunol. Infect.* 2000; 33:100-104.

14. Chang WN, Lu CH, Huang CR and Chuang YC: Mixed infection in adult bacterial meningitis. *Infection* 2000; 28:8-12.
15. Chou FF and Kou HK: Endogenous endophthalmitis associated with pyogenic hepatic abscess. *J. Am. Coll. Surg.* 1996; 182:33-36.
16. Clark VL and Bavoil PM: *Bacterial Pathogenesis: selected methods in enzymology.* Academic Press. 1997.
17. Di Martino P, Bertin Y, Girardeau JP, Liverlli V, Joly B and Darfeuille-Michaud A : Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun* 1995; 63:4336-4344.
18. Di Martino P, Liverlli V, Sirot D, Joly B and Darfeuille-Michaud A: A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4 producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun* 1996; 64:2266-2273.
19. Endo A, Masunaga K, Masaki R, Minato M, Takada M, Takahashi S and Harada K: Bacterial changes in neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr Jpn* 1996; 38:12-16.
20. Fabret C and Hoch JA: A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J. Bacteriol.* 1998; 180:6375-6383.
21. Fang CT, Chang SC, Hsueh PR, Chen YC, Sau WY and Luh KT: Microbiologic features of adult community-acquired bacterial meningitis in Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* 2000; 99:300-304.
22. Fang CT, Chen YC, Chang SC, Sau WY and Luh KT: *Klebsiella pneumoniae* meningitis: timing of antimicrobial therapy and prognosis. *QJM* 2000; 93:45-53.
23. Favre-Bonte S, Darfeuille-Michaud A and Forestier C: Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. *Infect. Immun.* 1995; 63: 1318-1328.
24. Finn TM and Amsbaugh DF: Vag8, a *Bordetella pertussis* *bvg*-regulated protein. *Infect. Immun.* 1998; 66:3985-9.
25. Fumagalli O, Tall BD, Schipper C and Oelschlaeger TA: N-glycosylated proteins are involved in efficient internalization of *Klebsiella pneumoniae* by cultured human epithelial cells. *Infect. Immun* 1997; 65:4445-51.
26. Fuse H, Ohkawa M and Asamoto T: Infected renal cystic mass associated with bacterial meningitis: a case report. *Int. J. Urol.* 1996; 3: 301-303.
27. Gerlach GF, Clegg S, Allen BL. Identification and characterization of the gene encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesions of *Klebsiella pneumoniae*. *J.*

- Bacteriol. 1989; 171:1262-70.
28. Giannasca KT, Ginnasca PJ and Neutra MR: Adherence of *Salmonella typhimurium* to Caco-2 cells: identification of a glycoconjugate receptor. *Infect. Immun.* 1996; 64:135-145.
  29. Greenberg D, Shinwell ES, Yagupsky P, Greenberg S, Leibovitz E, Mazor M and Dagan R: A prospective study of neonatal sepsis and meningitis in southern Israel. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1997; 16:768-773.
  30. Gross R, Arico B and Rappuoli R: Families of bacterial signal-transduction proteins. *Mol. Microbiol.* 1989; 3:1661-1667.
  31. Han SHB: Review of hepatic abscess from *Klebsiella pneumoniae*. An association with diabetes mellitus and septic endophthalmitis. *West. J. Med.* 1995; 162:220-224.
  32. Harvey D, Holt DE and Bedford H: Bacterial meningitis in the newborn: a prospective study of mortality and morbidity. *Semin Perinatol.* 1999; 23:218-225.
  33. Hornick DB, Allen BL, Horn MA and Clegg S: Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 1991;29:1795-1800.
  34. Hornick DB, Thommandru, J, Smits W and Clegg S: Adherence properties of an *mrkD*-negative mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1995; 63:2026-2032.
  35. Hoffman JA, Wass C, Stin MF and Kim KS: The capsule supports survival but not traversal of *Escherichia coli* K1 across blood-brain barrier. *Infect. Immun.* 1999; 67:3566-3570.
  36. Kado and Liu: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145: 1365-1373.
  37. Karimova G., Bellalou J and Ullmann A: Phosphorylation-dependent binding of BvgA to the upstream region of the *cyaA* gene of *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.* 1996; 20: 489-496.
  38. Khaneja M, Naprawa m J, Kumar A and Piecuch S: Successful treatment of late-onset infection due to resistant *Klebsiella pneumoniae* in an extremely low birth weight infant using ciprofloxacin. *J. Perinatol.* 1999; 19:311-314.
  39. Kim KS, Itabashi H, Gemski P, Sadoff J, Warren RL and Cross AS: The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. *J. Clin Invest* 1992; 90:897-905.
  40. Lau YJ, Hu BS, Wu WL, Lin YH, Chang HY and Shi ZY: Identification of a major cluster of *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with liver abscess

- in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:412-4.
41. Lai YC, Yang SL, Peng HL and Chang HY: Identification of the genes specifically expressed in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2000. 68:7149-51.
  42. Lai YC, Chang HY and Peng HL: Identification of the in vivo expressed genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2000. 69:7140-5.
  43. Lu CH, Chang WN and Wu HS: *Klebsiella pneumoniae* meningitis: analysis on clinical features of thirty-two adult patients. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih (Taipei)* 1997; 60:296-302.
  44. Lu CH, Chang WN, Chuang YC and Chang HW: The prognostic factors of adult gram-negative bacillary meningitis. *J. Hosp. Infect.* 1998; 40:27-34.
  45. Lu CH, Chang WN and Chuang YC: Resistance to third-generation cephalosporins in adult gram-negative bacillary meningitis. *Infection* 1999; 27:208-211.
  46. Lu JJ, Perng CL, Lee SY and Wan CC: Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:2076-2080.
  47. Meginnis HE, Raji A, Valenzuela MS, Ggarcia F, Hoover R. Adhesion to and invasion of cultured human cells by *Bartonella bacilliformis*. *Infect. Immun.* 1992; 60:4051-8.
  48. Miller JF and Cossart. 1999. Host-microbe interaction: bacterial pathogenesis before the post-genomic era. *Current opinion in Microbiology* 2:15-7.
  49. Nassif X and Sansonetti PJ: Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun* 1986; 54:604-8.
  50. Peng HL, Wang PY, Wu JL, Chiu CT and Chang HY: Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*. *Chinese J Microbiol and Immun.* 1991; 24:10-17.
  51. Perraud A L, Weiss V and Gross R: Signaling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trend. Microbiol.* 1999; &:115-120.
  52. Podschun R and Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998;11:589-603.
  53. Prasadarao NV, Wass CA, Weiser JN, Stins MF, Huang SH and Kim KS: Outermembrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* 1996; 64:146-153.



54. Prasadarao NV, Wass CA and Kim KS: Endothelial cell GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* 1996; 64:154-160.
55. Saccente M: *Klebsiella pneumoniae* liver abscess, endophthalmitis, and meningitis in a man with newly recognized diabetes mellitus. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 29:1570-1571.
56. Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 2001.
57. Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1998; 2887-94.
58. Simoons-Smit AM, Verwij-Van Vught AM and MacLaren DM: The role of K antigen as virulence factors in *Klebsiella*. *J. Med Microbiol* 1986; 21:133-7.
59. Soncini FC and Groisman EA: Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J. Bacteriol.* 1996; 178:6796-6801.
60. Tarkkanen AM, Virkola R, Clegg S and Korhonen TK: Binding to the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infect. Immun.* 1997; 65:1546-1549.
61. Tunkel AR and Scheld WN: Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6:118-136.
62. Wang JH, Liu YC, Lee SS, Yen MY, Chen YS, Wang JH, Wann SR and Lin HH: Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 26:1434-1438.
63. Wiener J, Quinn JP, Patricia PA, Goering RV, Nathan C, Bush K and Weinstein R A: Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA* 1999; 281:517-23.

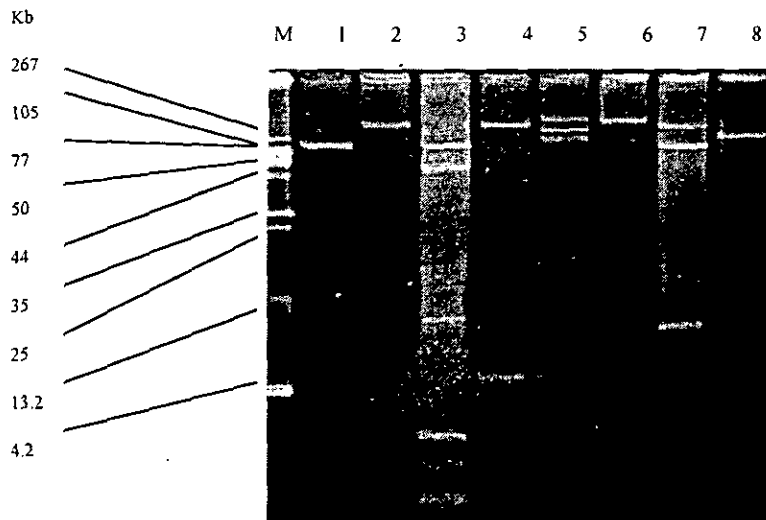
引子組	序列 (5'-3')
Inv01(IalK 基因)	5'-CGGCTGTCACGCGCTTTC-3'
Inv02(IalK 基因)	5'-GTTTAAACGCGGCGCGCT-3'
SL0077(FimH 基因)	5'-ATGATGAAAAATAATCC-3'
SL0078(FimH 基因)	5'-GAACGCCTATCCCCTGCGCC-3'
SL0079(MrkD 基因)	5'-ATGAAAAAACTGACGCTTTT-3'
SL0080(MrkD 基因)	5'-CGCATTAATCGTACGTCA-3'

表一:本實驗中所使用到的引子的序列

編號 (病例號碼)	Type 1 fimbrial adhesin ( <i>fimH</i> )	Type 3 fimbrial adhesin ( <i>mrkD</i> )	MrkD variant	Yeast agglutination (菌液稀釋倍數)	MRHA (菌液稀釋倍數)
CG25	(+)	(+)	V1	1/16	(-)
CG28	(-)	(+)	V4	1/16	1
VHm1 (6635)	(+)	(+)	V1	(-)	1
VHm2 (6277)	(-)	(+)	V2	(-)	(-)
VHm3 (6613)	(+)	(+)	V1	(-)	(-)
VHm4 (7780)	(+)	(+)	V1	1/4	(-)
VHm5 (8811)	(+)	(+)	V3	1/16	1/4
VHm6 (7622)	(+)	(+)	V1	1/8	1/8
VHm7 (3845)	(+)	(+)	V1	(-)	1/2
VHm8 (6565)	(+)	(+)	V1	(-)	1
VHm9 (3553)	(+)	(+)	V1	(-)	(-)
VHm10 (8938)	(+)	(+)	V4	1/16	(-)
VHm11 (5081)	(-)	(-)	(-)	1/8	1/2
VHm12 (7585)	(+)	(+)	V1	(-)	(-)
VHm13 (3771)	(+)	(+)	V1	(-)	(-)
VHm14 (4078)	(+)	(+)	V1	(-)	1
VHm15 (6541)	(+)	(+)	V1	(-)	(-)
VHm16 (6640)	(+)	(+)	V1	1/8	(-)
VHm17 (7681)	(+)	(+)	V1	1/16	(-)

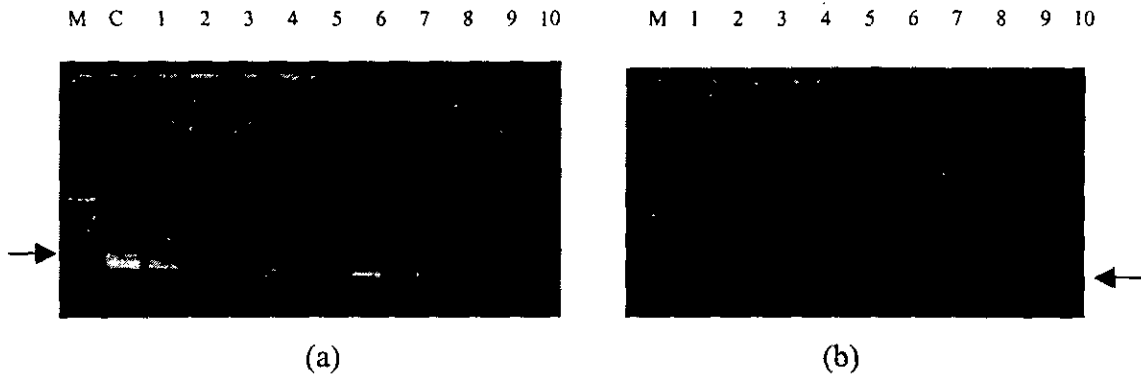
表二：腦膜炎菌株特性分析。

＋：有反應，－：無反應



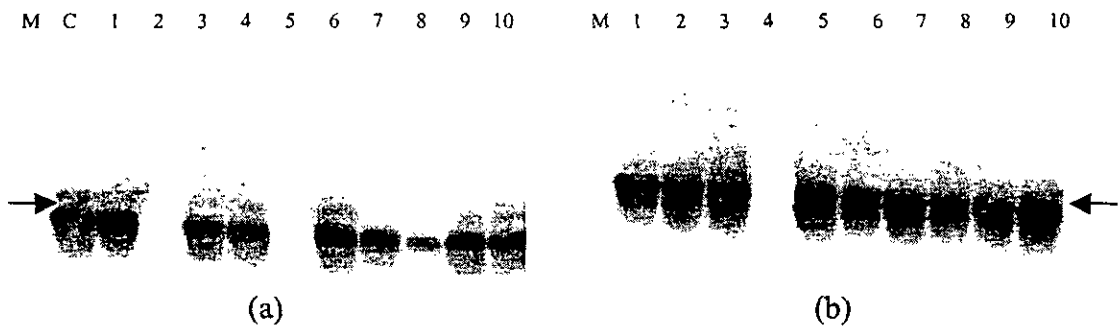
圖一：收集自蔡總的部分腦膜炎菌株菌質體型電泳圖。

M：分子量標記:Erwinia SW2' Lane 1：VHm7' Lane 2：VHm10' Lane 3：VHm9' Lane 4：VHm14' Lane 5：VHm14' Lane 6：VHm11' Lane 7：VHm1' Lane 8：VHm5°



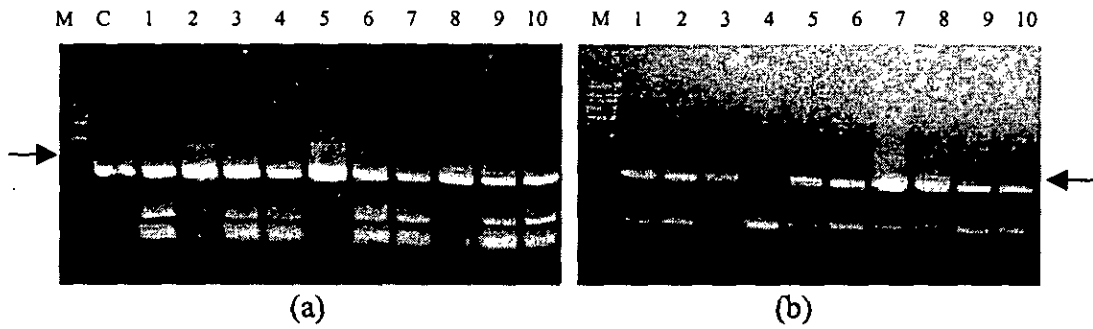
圖二：克雷白氏腦膜炎分離菌株 *FimH* 基因的分布電泳圖。

利用 *fimH* 引子組作 PCR 分析，增幅出約 730 bp 的片段如箭頭所示。M：DNA 大小標準溶液，C：正控制組：攜帶 *fimH* 基因的質體，(a) Lanes 1~3：長庚分離株 CG25、CG28、CG43，Lanes 4~10：榮總分離株 VHm1~7。(b) Lanes 1~10：榮總分離株 VHm6~17



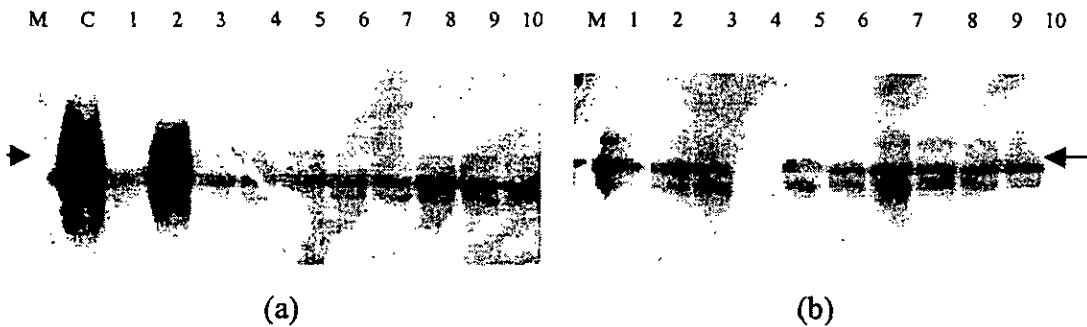
圖三：南方雜交墨點法確認 *FimH* 基因的分布。

將上述 0.8% 洋菜電泳膠分開的 PCR 產物轉印到硝化纖維膜，與 Dig-*fimH* 探針雜交結果。M：DNA 大小標準溶液，C：正控制組：攜帶 *fimH* 基因的質體，(a) Lanes 1~3：長庚分離株 CG25、CG28、CG43，Lanes 4~10：榮總分離株 VHm1~7。(b) Lanes 1~10：榮總分離株 VHm6~17



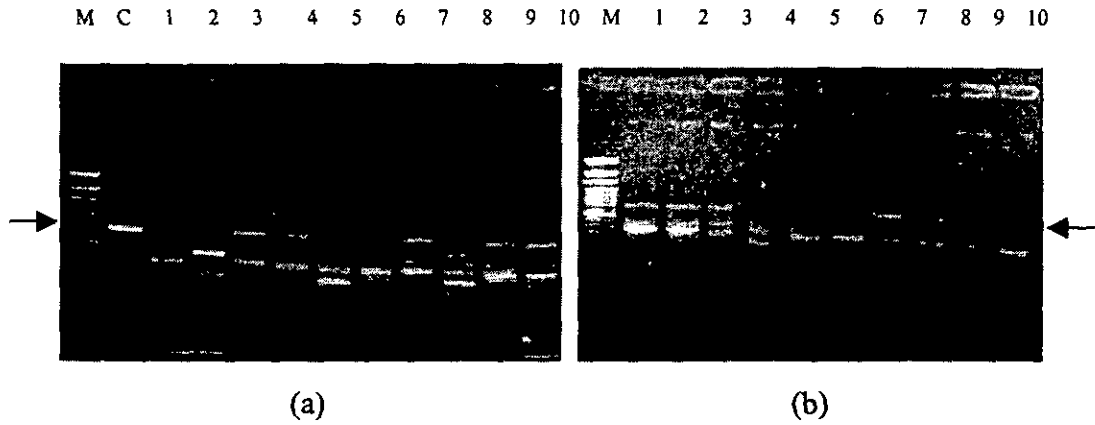
圖四：克雷白氏腦膜炎分離菌株 *MrkD* 基因的分布電泳圖。

利用 *mrkD* 引子組作 PCR 分析，增幅出 700 bp 的片段如箭頭所示。M：DNA 大小標準溶液，C：正控制組：攜帶 *mrkD* 基因的質體，(a) Lanes 1~3：長庚分離株 CG25、CG28、CG43，Lanes 4~10：榮總分離株 VHm1~7。(b) Lanes 1~10：榮總分離株 VHm6~17



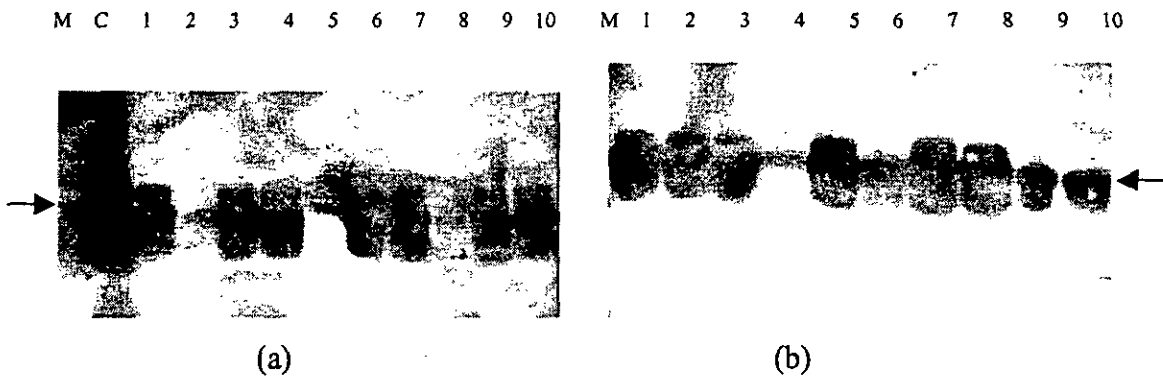
圖五：南方雜交墨點法確認 *MrkD* 基因的分布。

將上述經 0.8% 洋菜電泳膠分開的 PCR 產物轉印到硝化纖維膜，與 Dig-*MrkD* 探針雜交結果。M：DNA 大小標準溶液，C：正控制組：攜帶 *mrkD* 基因的質體，(a) Lanes 1~3：長庚分離株 CG25、CG28、CG43，Lane 4~10：榮總分離株 VHm1~7。(b) Lanes 1~10：榮總分離株 VHm6~17



圖六：克雷白氏腦膜炎分離菌株 *IalK* 基因的分布電泳圖。

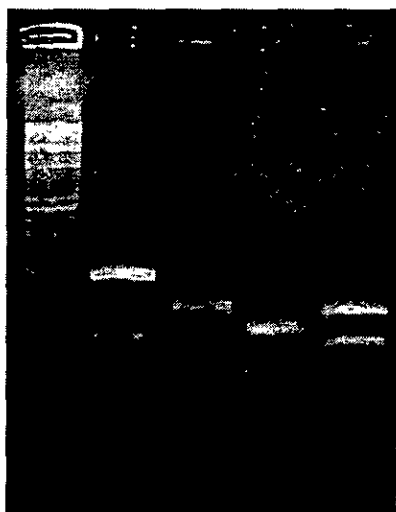
利用 *ialK* 引子組作 PCR 分析，增幅出約 750 bp 的片段如箭頭所示。M：DNA 大小標準溶液，C：正控制組：攜帶 *ialK* 基因的質體，(a) Lanes 1~Lane3：長庚分離株 CG25、CG28、CG43，Lanes 4~10：榮總分離株 VHm1~7。(b) Lanes 1~10：榮總分離株 VHm6~17



圖七：南方雜交墨點法確認 *IalK* 基因的分布。

將上述經 0.8 % 洋菜電泳膠分離的 PCR 產物轉印到硝化纖維膜，Dig-*ialK* 探針雜交結果。M：DNA 大小標準溶液，C：正控制組：攜帶 *ialK* 基因的質體，(a) Lanes 1~3：長庚分離株 CG25、CG28、CG43，Lanes 4~10：榮總分離株 VHm1~7。(b) Lanes 1~10：榮總分離株 VHm6~17

M V1 V2 V3 V4



圖八：第三型黏附蛋白 MrkD 基因 RFLP 分析。

經由PCR得到的mrkD產物，以Sau3A1限制酶切割後在2%洋菜膠電泳分析結果。M：DNA大小標準溶液，Lanes 1-4：V1,V2,V3,V4代表不同*mrkD*基因型





圖十：腦膜炎菌株黏附細胞株活性測試

