

霍亂弧菌之實驗室診斷

黃文貴 林椿欽 張玲君 劉永慶

高雄榮民總醫院微生物科

一、前言

弧菌種係革蘭氏陰性桿菌，其大小直徑為 0.5 ~ 0.8 μm ，長為 1.4 ~ 2.6 μm ，菌體呈正直或微彎逗點狀，常藉末端鞭毛之作用進行直線或螺旋形運動。本菌不會形成芽胞，其細胞壁及表面結構與其他革蘭氏陰性桿菌相似，而其 DNA 中鳥糞嘌呤及胞核嘧啶之含量 (G + C) 約佔 38-51 %；對營養需求簡單，如霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*) 及副血性弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 能生長於常規使用之細菌培養基中；對酸性及乾燥環境忍受性低，且偏愛鹼性環境 (pH8.0-9.5)；兼性厭氧菌，但於需氧環境下生長最佳；除梅氏弧菌 (*V. metschnikovii*) 外，所有的菌種皆具有氧化酶，並能醱酵葡萄糖，部份菌種並能產生氣體；鈉離子能促進生長，而且部份菌種是屬嗜鹽性 (halophilic) 菌；這菌屬包含超過 30 個菌種，其中有 12 個菌種對人有致病性或由臨床檢體中被分離出。

弧菌中多數菌種能自由生活於海水或鹽水內；所以，弧菌病易發生於沿海地區；當水溫增高時，利於弧菌繁殖；在夏秋季之間，病例最多，且大部份是食用被弧菌污染的海產物及飲水。傷口及全身性感染通常是發生於與水接觸後。於表一列

出人類臨床檢體可能分離之弧菌菌種。

二、檢體收集、運送及儲存

如果要成功的將霍亂弧菌分離出來，臨床醫師需要與微生物實驗室密切的配合；送檢體前事先通知實驗室準備弧菌分離用培養基，並於開始給予藥物治療前收集檢體。運送用培養基有 Cary-Blair 及鹼性蛋白胨水 (alkaline-peptone water, pH8.4-9.2, APW)。檢體可以為腹瀉糞便 (如為霍亂病患，會呈現洗米水樣)，但是要特別注意使用便盆收集時，可能會因交叉污染而造成偽陽性培養結果；故直腸拭子是個較佳的檢體。若醫院或診所一時無法取得運送用培養基，亦可使用吸水性佳的紙片吸附糞便檢體，並置於密封塑膠袋中，迅速送至實驗室進行培養。所有檢體皆以室溫運送即可，不須冷藏。弧菌屬之細菌對於乾燥環境耐受性不佳，而且是公共衛生的重要分離指標菌種，故建議要使用鹼性蛋白胨水或 tellurite-taurocholate-peptone broth 等增菌培養液，以提昇分離率，並於孵育 6 至 8 小時後，必需次培養於分離用培養基上，以避免其他雜菌過度生長。

三、培養及分離

由腹瀉病患糞便中分離出霍亂弧菌，

表一 人類臨床檢體可能分離之弧菌菌種

菌 種	在人之臨床檢體出現			
	腸 內		腸 外	
<i>V.alginolyticus</i>	+		+	+
<i>V.carchariae</i>	-		+	
<i>V.cholerae</i>				
Serogroup O1	+	+	+	+
Serogroup O139	+	+	+	+
Non-O1, Non-O139	+	+	+	+
<i>V.cincinnatiensis</i>	-		+	
<i>V.damsela</i>	-		+	+
<i>V.fluvialis</i>	+	+	-	
<i>V.furnissii</i>	+	+	-	
<i>V.hollisae</i>	+	+	-	
<i>V.metschnikovii</i>	-		+	
<i>V.mimicus</i>	+	+	+	
<i>V.paraahaemolyticus</i>	+	+	+	+
<i>V.vulnificus</i>	+		+	+

是實驗室協助確認霍亂感染病例的重要檢驗工作。硫代硫酸鹽—枸橼酸鹽—膽鹽—蔗糖瓊脂 (thiosulfate-citrate- bile salts-sucrose agar, TCBS) 是分離糞便檢體中弧菌最佳的培養基，所有對人類具有病原性的弧菌菌種除何氏弧菌 (*V.hollisae*) 外，皆可以於此培養基上生長良好。霍亂弧菌於 TCBS 瓊脂平板上培養 18-24 小時後，呈現約 4mm 大小、平滑、黃色、中心不透明，但週圍呈現透明狀菌落。常見與人類感染有關弧菌菌種菌落在 TCBS 培養基菌落特徵及生長情形，請參考表二。由於並非所有的弧菌菌種皆可於 MacConkey 瓊脂平板上生長良好，故並不被建議使用；但是當有生長時，則因不發酵乳糖而呈無色的菌落。霍亂弧菌及魚病弧菌 (*V.damsela*)

可於 5 % 脫纖維綿羊血液瓊脂平板上產生 β 型溶血現象，但由於此培養基不具選擇性，故並不適用糞便檢體分離用。含 MUG 的改良式 taurocholate-tellurite-gelatin 瓊脂平板，最近有被報告可以取代 TCBS 瓊脂平板，來分離及快速的鑑別弧菌屬。目前大多數實驗室並未將 TCBS 瓊脂平板列入常規糞便培養使用，除非病人有洗米水樣嚴重腹瀉或生食海產物的記錄，以符合經濟效益。

四、鑑定

弧菌科 (*Vibrionaceae*) 裏包括 *Vibrio* , *Aeromonas* , *Plesiomonas* 及 *Photobacterium* 等菌，於表三中將其各別生化特性做比較。快速的鑑定出霍亂弧菌是流行病學上及防疫上非常重要的工

表二 *Vibrio* 菌種在 TCBS 之特性

細菌	在 TCBS (%)		生長狀況
	綠色	黃色	
<i>V.cholerae</i>	0	100	佳
<i>V.mimicus</i>	100	0	佳
<i>V.metschnikovii</i>	0	100	可能減少
<i>V.hollisae</i>	100	0	很差
<i>V.damsela</i>	95	5	在 36 °C 生長減少
<i>V.fluvialis</i>	0	100	佳
<i>V.furnissii</i>	0	100	佳
<i>V.alginolyticus</i>	0	100	佳
<i>V.parahaemolyticus</i>	99	1	佳
<i>V.vulnificus</i>	90	10	佳
<i>V.carchariae</i>	0	100	佳
<i>V.cincinnatiensis</i>	0	100	很差
Marine vibrios (海水弧菌)	不定	不定	不定

作，於 TCBS 瓊脂平板上的黃色菌落及 MacConkey 瓊脂平板上無色菌落，大量接種次培養於不具選擇性 5 % 脫纖維綿羊血液瓊脂平板上，孵育 5 ~ 8 小時後，進行氧化酶試驗，以避免試驗結果誤判；當呈現陽性反應時，可以快速的與腸內細菌屬區分開來。而霍亂弧菌的重要生化反應詳列於表四。

霍亂弧菌血清型 O1，對於弧菌抑制劑 O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine) 俱有感受性。但最近由於此菌逐漸對抗微生物製劑 SXT (trimethoprim sulfamethoxazole) 產生抗藥性，同時對 O/129 的抗藥性也相對增加；而血清型 O139 對於 O/129

表四 霍亂弧菌的重要生化反應

生化種類	反應	生化種類	反應
Oxidase	+	Indole	+
Nitrate	+	Urea	-
Motility	+	Ornithine	+
Catalase	+	Lysine	+
Arginine	-	KIA	K/A
VP	-	TSLA	A/A
Citrate	-	MR	+

則與生俱有抗藥性；所以這個鑑定方法已逐漸不俱價值。就如其他的弧菌菌種一樣，霍亂弧菌於添加 1 % 的氯化鈉培養基是可以生長的更好；但是霍亂弧菌與擬似弧菌 (*V. mimicus*) 可以於不含氯化

表三 霍亂弧菌與其他菌種之區別

試 驗	結 果					
	<i>V. cholerae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Other <i>Vibrio</i> spp. ^a	<i>Enterobacteriaceae</i>	
Oxidase	+	+	+	+ ^b	-	
String test	+	- / + ^c	-	+ / -	-	
Acid from mannitol	+	+	-	+ / -	+ / -	
Acid from sucrose	+	+	-	+ / -	+ / -	
Lysine decarboxylase	+	-	+	+ / -	+ / -	
Arginine dihydrolase	-	+	+	+ / -	+	
Ornithine decarboxylase	+	-	+	+ / -	+ / -	
Growth in 6% NaCl	+	-	-	- ^d	-	
mol% G+C	47-49	58-62	51	38-51	38-60	

a 非霍亂弧菌之弧菌種

b 除梅氏弧菌 (*V. metschnikovii*) 外

c + / - , 陽性 / 陰性 結果, 依菌種別不同

d 疑似弧菌 (*V. mimicus*) 除外

表五 具臨床意義之弧菌種以 8 個主要的區分試驗分為 6 個菌種

Test	結 果											
	Group 1		Group 2,	Group 3,	Group 4,	Group 5			Group 6			
	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissi</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. carchariae</i>
Growth in nutrient broth:												
With no NaCl added	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
With 1% NaCl added	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase			-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate → nitrite			-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
myo-Inositol fermentation	-	-	v	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase					-	+	+	+	-	-	-	-
Lysine decarboxylase					-				+	+	+	+
Ornithine decarboxylase					-							

+ , 大部份為陽性 ; - , 大部份為陰性 ; v , 每株間不同

鈉的培養基中生長，而與其他弧菌種區別開來。表五列出臨床常見 12 種弧菌菌種的重要區分試驗。

改良式 CAMP 試驗是以具其他性溶血素 (beta-lysin) 的金黃色葡萄球菌，以點狀方式接種於含 5 % 脫纖維綿羊血液瓊脂平板中，然後在 9 至 10mm 距離處以同樣方式接種測試菌株；經孵育 18 ~ 20 小時後觀察。霍亂弧菌 O1 艾托型 (El Tor) 和 O139 孟加拉型 (Bengal) 可於兩者之間產生，寬度為 2-3mm 之橄欖球或香腸狀的明顯溶血區，此加成溶血現象 (synergistic lytic phenomenon) 為陽性反應。反之，霍亂弧菌 O1 傳統型和 O2 ~ O138 血清型皆呈現弱溶血的陰性反應。這方法可以協助檢驗單位沒有霍亂弧菌血清分型抗血清時，簡單且快速的輔助鑑定俱有地方性流行病學意義的菌株。

霍亂弧菌的抗原性主要是菌體表面的脂多醣抗原，也就是對熱不穩定的 O 抗原，共有 O1 ~ O139 的血清型，其中以血清型 O1、O139 是與地方性流行病有密切的關係。至於纖毛抗原 (H 抗原) 亦同時存在著，但是由於所有的弧菌菌種都存有共同的 H epitope，所以此抗原對於弧菌菌種的血清分型沒有利用的價值。霍亂弧菌的主要確認試驗是以多價 O-group 1 抗血清及 O-group 139 抗血清進行凝集試驗。亦可使用菌懸浮液置於顯微鏡下觀察其活潑的運動性；當加入抗血清時，則會產生免疫抑制其運動性，並且產生凝集現象。當分離菌株呈現氧化酶陽性反應，而且與上列抗血清產生凝集現

象時，實驗室就可以初步假設性的報告霍亂弧菌血清型 O1 或 O139 被分離；然後再將菌株送交衛生主管機關的參考實驗室做確認及腸毒素 (cholera toxin, CT) 產生的測定。在公共衛生上有意義的分離菌株是霍亂弧菌血清型 O1 或 O139，而且會產生腸毒素的細菌，參考表六。霍亂弧菌血清型 O1 群，依其抗原型式可分為三種次血清型，分別為稻葉型 (Inaba)、小川型 (Ogawa) 及彥島型 (Hikojima)；生物學型則分為 Classical 及 El Tor 二型，根據 VP 反應，polymyxin B 感受性及雞紅血球凝集試驗等來區別此二型，其反應請參考表七。通常霍亂弧菌血清型 O2-O138 菌株是不產生腸毒素，也不會造成流行性的腹瀉。霍亂弧菌血清型 O139 是於 1992 年 10 月在東印度被發現，並於 1993 年初傳至鄰國孟加拉而爆發流行。此菌原是歸類於霍亂弧菌血清型 non-O1，但後來被證實為新的流行性病菌株而命名為霍亂弧菌血清型 O139 或孟加拉 (Bengal) 型，而霍亂弧菌血清型 non-O1，non-O139 的腸道外感染，大多發生於免疫機能不全的病患。故弧菌屬的分類以表八來說明：

表六 霍亂弧菌之血清群、血清型、生物型及產腸毒素說明

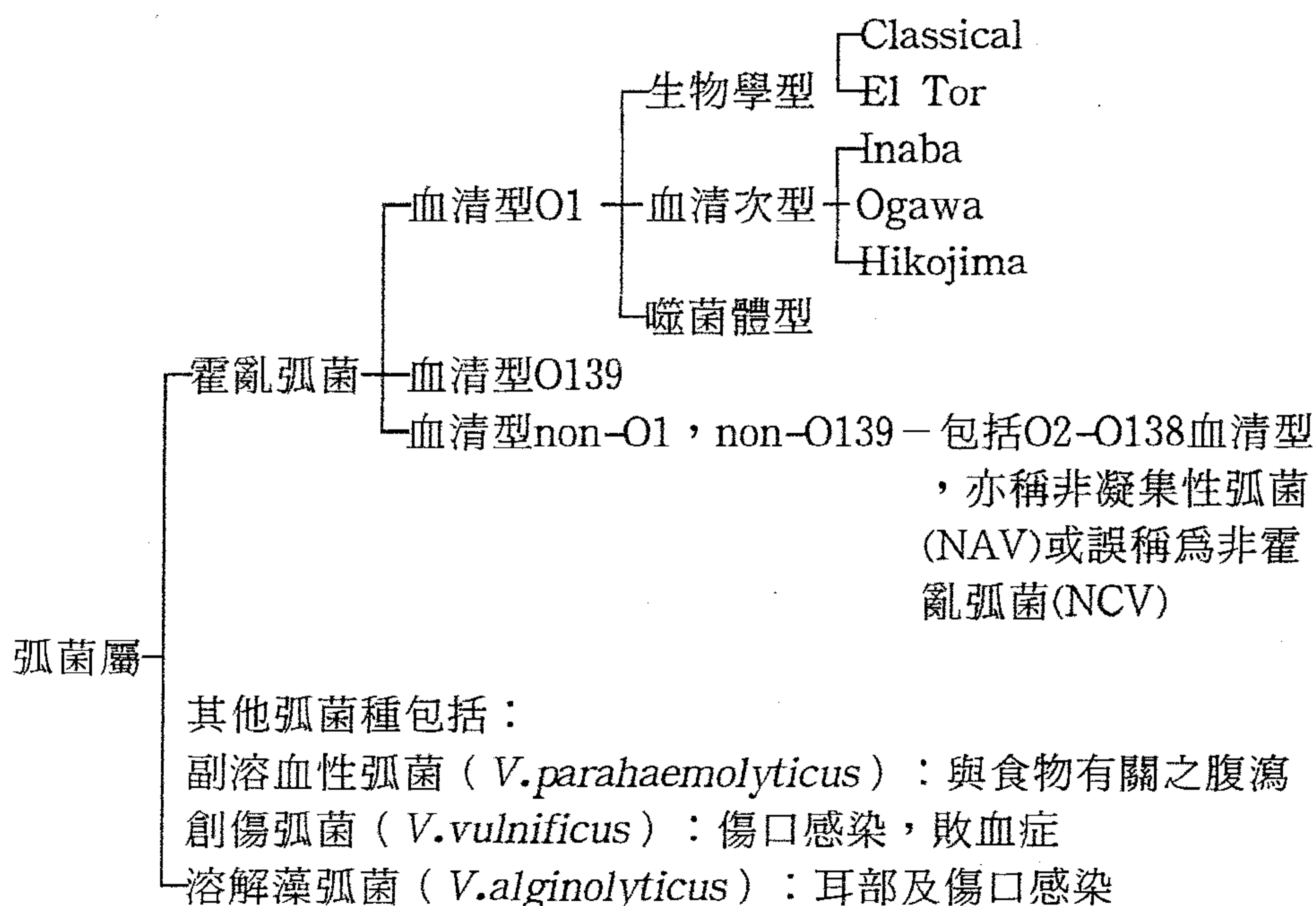
Serogroup	CT production (%)	Epidemic spread	Serological subtypes (no.)	Biotypes (no.)
O1	> 95(+)*	Yes	3 (Inaba, Ogawa, Hikojima)	2 (classical, El Tor)
O139	> 95(+)	Yes	None	1
O2-O138	> 95(-)	No	None	1

* + , 陽性 ; - , 陰性

表七 霍亂弧菌血清 O1 之傳統與艾托生物型之區別

試 驗	生 物 型 結 果	
	傳 統 型	艾托型 (El Tor)
Hemolysis	-	(+)
Agglutination of chicken erythrocytes	-	+
Voges-Proskauer	-	+
Inhibition by polymyxin B (50-U disk)	+	-
Lysis by		
Classical IV bacteriophage (305)	+	-
FK bacteriophage (451)	+	-

表八 弧菌屬分類



五、腸毒素測定

被具有腸毒素的霍亂弧菌感染，是造成患者嚴重腹瀉的主要原因。此毒素係複式多蛋白性，由 1 個 A 次單位及 5 個 B 次單位組成；B 次單位 (subunit) 功能是将毒素接合到腸表皮的 GM₁ 神經節感受體 (ganglioside receptor) 上；A 次單位則是經由 B 次單位的協助後，進入腸細胞內後將增加環腺苷酸單磷酸鹽 (cyclic AMP) 的量，而抑制鈉離子的吸收，並引起氯化物、鉀離子及重碳酸鹽之分泌量增加並且排至腸腔中，結果造成病患嚴重腹瀉、脫水及電解質不平衡。

傳統的毒素偵測可以 Y-1 adrenal cells 或 Chinese hamster kidney cells 做組織培養的毒性中和試驗。目前已有商業化產品，利用酵素免疫分析法，以純化的 GM₁ 神經節感受體當做捕捉分子 (capture molecule)，以偵測大腸桿菌及霍亂弧菌血清 O1 腸毒素的存在。亦有利用乳膠凝集試劑組 (VET, RPIA, Oxoid, USA) 來測霍亂弧菌腸毒素，其敏感性及特異性與酵素免疫分析法比較分別達 97 % 及 100 %，這些商業化產品可以提供快速偵測腸毒素的遺傳表現型 (phenotypic express) 存在。

應用聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 及核酸探針 (DNA probes) 來偵測腸毒素的 ctx 基因存在技術亦被發展出來。其偵測結果與 GM₁ 酵素免疫分析法非常的吻合。此方法適合進行大量的篩選分離菌株，在很多的特殊研究實驗室目前皆已採用，故此

技術可能會取代遺傳表現型分析法。

六、藥物感受性試驗

雖然治療霍亂時最重要的是迅速的經由靜脈注射及口服的補充體液及電解質，但是抗微生物製劑的合併使用將可以縮短病程，並且明顯減少體液輸入的量。雖然霍亂弧菌對 tetracycline, ampicillin, chloramphenicol, erythromycin 及 ciprofloxacin 等藥物具感受性；但在東非地區由於具抗藥性菌株很常見，及群突發病例產生時，對於分離菌株進行藥物感受性試驗是絕對必需的。試驗方法與其他革蘭氏陰性桿菌相同，可以採用紙錠—瓊脂擴散法或連續稀釋法皆可。

七、結論

霍亂弧菌的感染患者，大多是於流行區內飲用未經煮沸的生水或生吃海產、水產養殖物如甲魚及牛蛙等，而引起嚴重的腹瀉。由於台灣本土性霍亂弧菌血清型 O139 產腸毒素菌株已被分離出，各大醫院實驗室的醫檢師及臨床醫師必需對它提高警覺，並將此菌列入診斷腹瀉時的考慮。

霍亂係為我國衛生主管機關規定為法定傳染病，若由病患檢體中分離出此菌，應迅速對病患採取腸道隔離措施，並儘速通知衛生單位前來採樣及進行流行病學的調查，以找出傳染媒介和人、時、地等資料，並依調查結果擬定防治計劃。

加強教育民衆有關洗手及水、食物烹調習慣和重要性，隨時注意飲食及居家環境衛生，乃是預防霍亂感染最佳的方法。

參考文獻

1. Kaper JB, Morris JG, Levine MM: Cholera. Clin Microbiol Rev 1995;8:48-86.
2. Albert MJ, Siddique AK, Islam MS, et al: Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. Lancet 1993;341:704.
3. CDC. Imported cholera associated with a newly described toxigenic *Vibrio cholerae* O139 strain-California, 1993. MMWR 1993;42:501-3.
4. Morris JG Jr: *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *Vibrio cholerae* and Cholera. American Society for Microbiology, Washington DC 1994:95-102.
5. Tanja P, Patricia IF, Orjan O, et al: Molecular subtyping of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 causing epidemic cholera in India and Bangladesh, 1992-1993. J Infect Dis 1995; 171:122-7.
6. Boyce TG, Mintz ED, Greene KD, et al: *Vibrio Cholerae* O139 Bengal infections among tourists to southeast Asia: an intercontinental foodborn outbreak. J infect Dis 1995; 172:1401-4.
7. Lesmana M, Albert MJ, Subekti D, et al: Simple differentiation of *Vibrio cholerae* O139 from *V. cholerae* O1 and non-O1, non-O139 by modified CAMP test. J Clin Microbiol 1996;34:1038-40.