

## 退伍軍人桿菌檢測方法

蘇勳璧、鄭麗容、周振英

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

退伍軍人病是一種急性細菌性疾病，會引起兩種流行病學上完全不同的臨床症狀，即退伍軍人病（**Legionnaires' disease**）及龐提亞克熱（**Pontiac fever**）。此兩種疾病開始時皆有下列共同明顯症狀：厭食、身體不適、肌痛與頭痛等。但退伍軍人病病程比龐提亞克熱嚴重，其差別在退伍軍人病通常在 1 天內會快速發燒且伴隨畏寒，出現乾咳、腹痛及下痢等症狀。體溫通常高達 39.0~40.5°C，患者胸部 X 光會出現肺部堅質化且會擴散至肺兩側，最後則出現呼吸衰竭。死亡率可高達 15%，若患者免疫能力有障礙，死亡率會更高。龐提亞克熱則不會引起肺炎或死亡，病人通常在 1 週內會自癒。此菌潛伏期在退伍軍人病約 2~10 天，在龐提亞克熱約 24~48 小時，尙未證明人與人之間會互相感染。根據調查肺炎病例中約 1-5%是由退伍軍人桿菌所引起(2,7,11)。美國疾病管制局每年約有 8,000 至 18,000 個退伍軍人症報告個案(7,11)，國內退伍軍人病報告病例 90 年 1366 件，確定病例 40 件，確定病例發生率 2.93%；91 年報告病例 1693 件，確定病例 72 件，確定病例發生率 4.25%；92 年報告病例 1758 件，確定病例 109 件，確定病例發生率 6.20%(4)。日本厚生勞動省在 2003 年公佈預防退伍軍人症相關必要措施之技術指導方針中指出，退伍軍人症所引起肺炎感染病狀，並無法僅靠症狀與其他肺炎鑑別，其病程發展迅速，培養不易且耗時，醫療機關常因診斷延誤，無法給予病患適當處置，可能造成病患死亡或病危(10)。目前國內能成功培養退伍軍人桿菌的醫療單位寥寥可數，致使此症的通報病例或診斷病例被低估，為提昇國內退伍軍人桿菌的檢驗診斷能力，乃整理本局研究檢驗中心累積數年之精湛檢驗技術和實驗心得，與國內微生物界分享。

退伍軍人桿菌屬 (*Legionella*), 包括嗜肺性退伍軍人桿菌 (*Legionella pneumophila*) 及其他退伍軍人桿菌種 (*Legionella species*), 目前至少有 48 species 及 70 種血清型已被確認。造成人類肺炎的退伍軍人桿菌屬 90% 以上為 *Legionella pneumophila*, 其又分為 15 種血清型, 以第一型最為普遍。退伍軍人桿菌屬的鑑定可利用微生物培養法、乳膠凝集試驗、直接螢光抗體試驗等方法鑑定, 鑑定流程如附圖, 所有操作工作須在生物安全等級 2 級 (Biosafety Level 2) 環境下進行。

檢查退伍軍人桿菌屬檢體, 可採集痰液、肋膜液、肺部組織、呼吸道抽出液、支氣管洗液、尿液和血清等, 須注意的是須在病患使用抗生素前收集檢體。痰液、肋膜液、肺部組織、呼吸道抽出液、支氣管洗液可做微生物培養, 尿液和血清不適合做培養, 尿液可以酵素免疫檢驗法測定抗原, 血清可以間接螢光抗體檢驗法測定抗體。因呼吸道檢體雜菌很多, 常造成競爭性抑制, 故為避免過度污染, 檢體應以低溫 (4°C) 保存運送。

痰與其他呼吸道分泌物須先均質化, 可加適量無菌去離子水, 再加十數顆無菌玻璃珠(視痰體積及黏稠度而增減)震盪至完全打散, 各取 0.01 ml 接種到 buffered charcoal-yeast extract agar (BCYE) 篩選性培養基。另外, 為使更容易分離出退伍軍人菌, 常將痰檢體先進行酸處理(目的在殺死大部份的雜菌), 取 0.2 M KCl-HCl (pH 2.0) 溶液 2.0 ml 置入 15 ml 無菌離心管中, 加入檢體 0.5 ml 振盪混合, 處理 3~4 分鐘, 經等量鹼(KOH)中和為 pH 6.9 後各取 0.01 ml(視痰濃度適度增減接種量)接種到 BCYE 篩選性培養基。

微生物培養法: 將前處理後檢體, 取適量接種至BCYE篩選性培養基, 此培養基含yeast extract、charcoal、iron、L-cysteine及三種抗生素 PNV(Polymyxin B, Natamycin, Vancomycin), 培養基成份如附錄。培養基的pH值非常重要, 宜在 6.9±0.5, 否則退伍軍人菌生長不佳, 將降低分離率。將培養基置於 37°C, 2.5~5.0% CO<sub>2</sub>, 及相對濕度 60~90% 條件下培養 7 至 14 天。退伍軍人桿菌生長緩慢, 約需 3~5 天才可觀察到, 菌落圓形平

滑、藍白色（或藍灰、藍綠、藍紅）半透明、邊緣完整、具毛玻璃外觀、輕度隆起、需氧、無莢膜、不產孢子，長約 1.5~2  $\mu\text{m}$ 、寬約 0.3~0.9  $\mu\text{m}$  的桿菌。在人體組織或體液中呈瘦短型，但在培養基中生長可達 20  $\mu\text{m}$  長。隨著菌落老化，呈中央微白邊緣淡紫色虹光，以接種環挑取，呈黏稠狀。退伍軍人菌於 4°C 保存下約可存活至少一週，於冷凍下則可存活更久，在波長 365 nm 的紫外燈下觀察，部份退伍軍人菌株會產生藍白色自發性螢光，如 *L. bozemanni*, *L. dumoffi*, *L. cherrii*, *L. gormanii*, *L. tucsonensis*, *L. anisa*；某些菌株則產生紅色自發性螢光，如 *L. rubrilucens*, *L. erythraea*。退伍軍人桿菌屬的生化特性為 catalase 試驗弱陽性，oxidase 試驗弱陽性；Hippurate 水解試驗，*L. pneumophila* 為陽性，其他 *Legionella species* 大多陰性。退伍軍人桿菌為革蘭氏陰性桿菌，在顯微鏡下為短胖型、較老的菌會成長短不一的長絲型。

**L-cysteine 生長需求試驗：**檢體接種後第一天及每隔一天觀察，挑選可疑菌落繼續接種 BCYE 鑑定培養基（含 L-cysteine 及不含 L-cysteine），作 L-cysteine 需求試驗（註：不含 L-cysteine 之培養基可用血液培養基替代）；若含 L-cysteine 的 BCYE 培養基可生長而不含 L-cysteine 的培養基不生長，則可能是退伍軍人菌屬。挑取菌株再做進一步鑑定(1,3,8,9)。

**乳膠凝集試驗（Legionella Latex Agglutination Test）：**使用市售乳膠凝集試劑。觀察凝集結果以判定血清型別。已吸附抗體的藍色乳膠粒子會與特定的退伍軍人菌細胞壁作用產生肉眼可見的凝集現象，藉此原理針對主要的病源性退伍軍人菌提供簡單而快速的篩檢。由 BCYE 篩選性培養基分離出之疑似菌落，經 L-cysteine 需求試驗陽性且革蘭氏染色陰性桿菌確認菌株，進行乳膠凝集試驗（亦可乳膠凝集試驗後再確認）。若藍色乳膠粒子在一分鐘內凝集且對照乳膠（control latex）的圓圈內無凝集反應即判為陽性，若一分鐘以上仍沒有凝集反應且維持均勻藍色懸浮液，即判為陰性。陽性結果表示

所偵測的菌落含有該種血清型抗原。品管試驗須在例行檢驗之前進行：陽性對照菌液必須在一分鐘內產生凝集反應；陰性對照菌液在一分鐘以上必須不可以有凝集反應。若control latex產生凝集現象，則表示此菌會造成自我凝集，反應結果無法判定。若有粒狀或絲狀反應則陽性判定以反應試劑的藍色背景可以見到明顯清澈為標準。

若品管結果不符則該試劑不可再使用。當菌落呈絲狀黏稠不易打散時，適合進行試管乳膠凝集試驗法，將數顆相似菌落以接種環移入 0.4ml 生理食鹽水中，劇烈振盪打散後再進行乳膠凝集試驗。

操作乳膠凝集試驗時須注意，試劑使用時不可以讓瓶口接觸到檢體，以避免造成污染。陽性結果時須再確認 L-cysteine 需求試驗陽性且為革蘭氏染色陰性桿菌(註：有些別的菌種也會造成凝集現象)。根據本局所使用之市售乳膠凝集試驗試劑(Oxoid)，陰性反應只表示所測試菌株非 *L. pneumophila* serogroup 1、*L. pneumophila* serogroup 2-14、*L. longbeachae* 1 and 2、*L. bozemanii* 1 and 2、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、*L. jordanis*、*L. micdadei*、*L. anisa*。不代表一定不是 *Legionella* species。*L. pneumophila* serogroup 1 與 *L. pneumophila* serogroup 9 可能產生交叉反應；如果 *L. pneumophila* serogroup 1 及 2-14 試劑都有凝集現象，則應考慮此交叉反應的可能性。已知偶而會產生交叉反應的 *Legionella* 菌株有 *L. parisiensis*, *L. Sainthelensi*, *L. steigerwaltii*, *L. tusconensis*, *L. gratiana*, *L. cincinatiensis*(5)。乳膠凝集試驗只能大致確認檢出菌株為退伍軍人菌，除了 *L. pneumophila* serogroup 1 外，無法細分其血清型，需再使用直接免疫螢光抗體檢驗法來確認該菌之血清型別。

直接免疫螢光抗體檢驗法 (Direct Immuno-Fluorescent Antibody Test, DFA)：抗原先固定於玻片上，再加入少量與抗原有專一性之 FITC 抗體。抗原會與抗體結合，形成抗原-抗體複合體。在螢光顯微鏡下，可見到亮黃綠色桿狀的退伍軍人菌。藉此原理針對主要的病源性退伍軍人菌提供簡單而快

速的篩檢。適用病患痰檢體(sputum)、肺組織(lung tissues)、氣管抽取液(transtracheal aspirates)、支氣管清洗液(bronchial washings)、胸膜液(pleural fluids)、人體及環境分離株。

培養分離之菌株的抹片製作 將48小時培養菌加在1% 中性福馬林(neutral formalin)中，製成濃度為McFarland No.1的懸浮液(約 $3 \times 10^8$  cfu/mL)。螢光染色專用的玻片上每個圓圈中滴入菌液。吸去多餘菌液，自然風乾並過火固定。

痰檢體、氣管抽取液、支氣管清洗液等抹片製作:選擇檢體之黏稠部份，以接種環在螢光專用玻片上圓圈中製成圓形抹片，自然風乾並過火固定。以10%中性福馬林處理10分鐘固定檢體。將玻片放入濕潤盒中避免福馬林蒸發。倒掉福馬林，並以裝有蒸餾水之洗瓶輕輕沖洗玻片並自然風乾。製備對照組抗原：將對照組抗原劇烈搖晃混勻後，滴於螢光染色專用的玻片圓圈內，吸去多餘抗原，自然風乾並過火固定。可與檢體或菌株抹片同時製作。

螢光抗體染色：先以多價抗體及陰性對照組抗體進行檢體之篩選。再以合適之單一抗體檢驗其中多價抗體篩選為陽性反應(同時陰性對照組抗體篩選為陰性反應)之檢體。將相同之多價或單一抗體共軛物(polyvalent conjugate)滴至每個檢體及相對應之對照組抗原，每個檢體都要做一個陰性對照(將陰性對照組抗體共軛物滴至檢體)。放入濕潤盒中於室溫(20~25°C)染色作用20分鐘，注意不同專一性抗體不可混淆。取出玻片輕敲除去多餘之抗體，用PBS輕輕沖洗，放入PBS中浸泡10分鐘。用蒸餾水沖洗，風乾。加一滴mounting medium，蓋上蓋玻片。以螢光顯微鏡鏡檢，先用低倍(10 X)物鏡選擇可見到病原體之視野，再轉至高倍(40 X)物鏡進行快速篩檢。由鏡檢中可見到退伍軍人菌為單一桿狀，或是周圍有強烈染色但是中心為黑色之絲狀物，可再以100X油鏡確認結果。

## 觀察到病原體細胞壁之螢光染色強度

強度	細胞壁之染色定義
4+	細菌被染上非常耀眼之黃綠色
3+	亮黃綠色
2+	可觀察到，但是有點模糊之染色
1+	可觀察到，但是很微弱之染色
-	沒有任何細胞出現黃綠色，但是可能出現黃褐色之背景值

細胞培養分離之結果如呈現典型之形狀，同時出現非常亮之螢光（3+~4+），則認定為陽性結果。操作時須注意每個檢體都要同時進行陰性對照組，才能確定陽性結果確實具有血清學上之專一性。勿二度冷凍/解凍任何試劑及檢體。重複的冷凍/解凍會破壞抗體活性。也請勿使用會自動除霜之冰箱保存檢體及試劑。對照組抗原主要是用來鑑定抗體是否保有良好之品質。任何一種對照組抗原，以同種抗體染色後，都應該出現4+強度之染色結果，如果無法得到此結果，該次檢驗即不具有任何效力。如有需要，也可以同時進行其他種類之對照組。

對於臨床檢體而言，可依下列要件評估並記錄檢驗結果：

記錄結果

每片抹片出現 ≥ 25個強度為3+~4+之典型桿菌 陽性螢光

每片抹片強度為3+~4+典型桿菌之數目小於25個 記錄出現螢光之桿菌數

抹片上無任何出現強度為3+~4+典型桿菌 陰性螢光

(意指:以專一抗體或是陰性對照組抗體染色，而出現強烈螢光之非典型形狀細菌，或是染色小於2+之任何細菌)

陽性螢光之結果應該記錄為退伍軍人菌陽性(*Legionella positive*)。

退伍軍人菌之直接螢光抗體檢驗系統在臨床檢體(痰檢體、氣管抽取液、支氣管清洗液等)方面僅用於檢驗。對於下呼吸道取出之檢體，組織及白血球可能會出現自動螢光(*autofluorescent*)。其他種類之細菌如葡萄球菌(*Staphylococci*)、耐瑟氏菌(*Neisseria*)及鏈球菌(*Streptococci*)等也可能會因為原來就已先感染用於製造抗體的兔子，而導致兔子之血清內存在抗體，因此導致這些細菌出現螢光；或者由於 IgG 與位在細菌之細胞壁上的成份(如 *protein A*) 之間的作用，也可能導致非特異性螢光之產生。已知 *Pseudomonas Florescence* 在 *Legionella* 抗體染色下會出現強烈之螢光(12)，因此為了要排除此種偽陽性之出現，必須要對於 *Legionella* 菌之形態及其染色特性相當了解。如有可能，陽性結果之檢體，應該再以傳統之病原體分離方法及生化技術加以鑑定。在下呼吸道取出液檢體中存在之 *Legionella* 菌數目相當少，因此在觀察結果時，至少要搜尋抹片 5 分鐘以上仍不見任何 *Legionella* 菌，才能夠宣稱檢體為陰性。

以此系統檢驗得到為陰性結果之檢體，僅表示檢體內無本系統所篩檢之 *Legionella* 菌種類，但並不排除檢體內可能存在其他本系統篩檢項目以外之 *Legionella* 菌。

不同種類之 *Legionella* 菌可能會有交叉作用出現，但不一定是交互出現。此反應可能發生在細菌體或是發生在鞭毛。如果出現在細菌體，則通常不會超過 2+ 強度。每個視野下總會有少數細菌因為異種抗原之因素而出現較強之反應(3+ ~ 4+)。當有新的血清型或是種類被鑑定時，則會有更多交叉反應出現(6)。Polyclone 抗體較會有交叉作用出現，使用 monoclonal 抗體較少出現交叉作用，可以得到更正確的血清分型結果。

菌種保存：經鑑定之新鮮菌株，以有冷凍保存溶液之保存試管保存(Protect)。取一整個接種環菌量之菌落置於保存液中，混合均勻後，靜

置 30 秒，將冷凍保存液吸出，隨後旋緊試管蓋子，放入-70°C 保存，並做詳細的菌種保存記錄。為長期保存亦可做冷凍乾燥保存。

退伍軍人病之符合臨床症狀病例，經下列之一實驗室診斷確定(2,7)：

1. 由肺組織、呼吸道分泌物、胸膜液、血液或其他正常無菌的部位，分離出退伍軍人桿菌 (*Legionella*)。
2. 直接免疫螢光抗體試驗，在肺組織、呼吸道分泌物或胸膜液檢驗出嗜肺性退伍軍人桿菌 (*L. pneumophila*)。
3. 以間接免疫螢光抗體試驗檢測血清抗體效價，恢復期(4~12 週)比發病初期效價有四倍以上增加，且 $\geq 128$ 。
4. 以酵素免疫分析法或放射免疫分析法檢驗出尿中有退伍軍人桿菌之抗原。

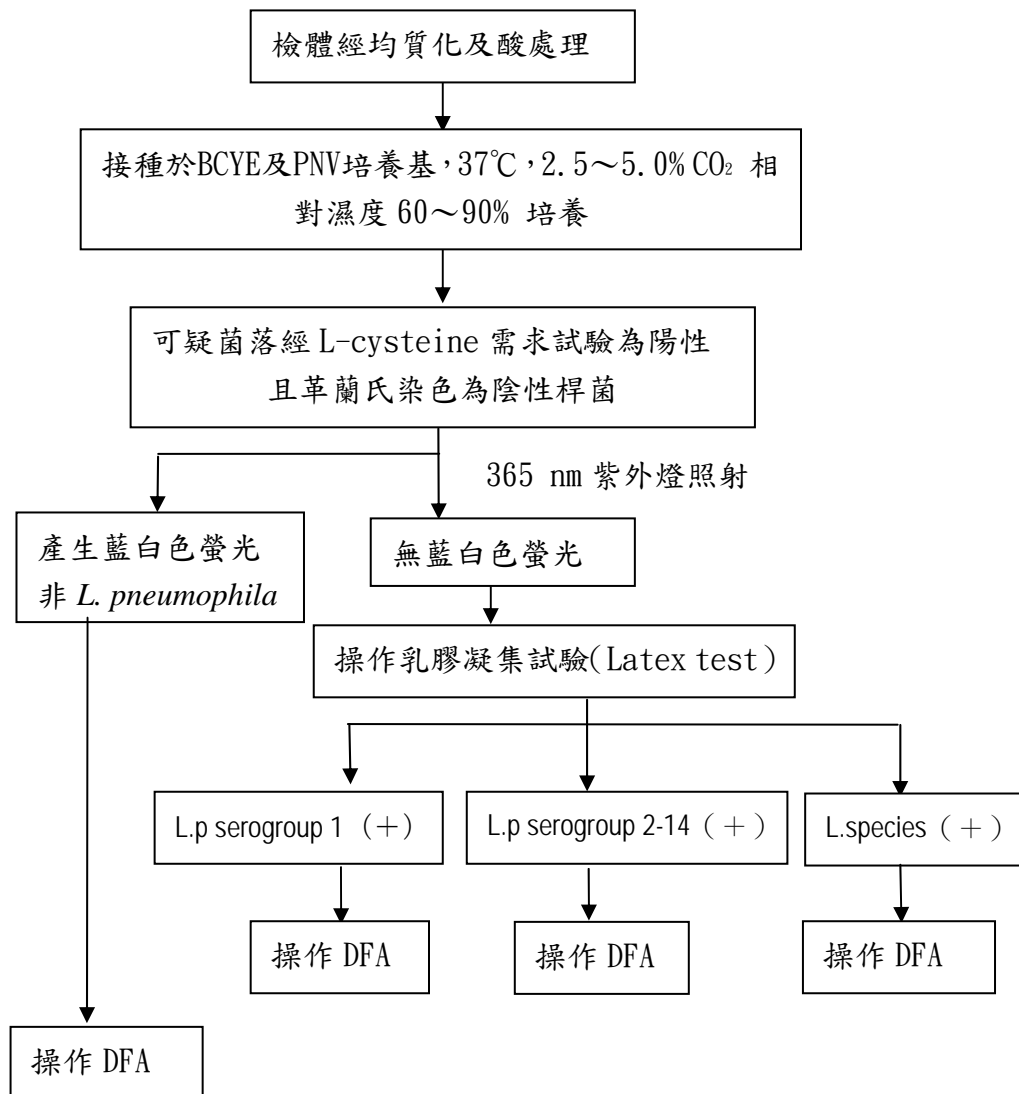
#### 參考文獻

1. 蔡文城。2000。實用臨床微生物診斷學。第九版。九州圖書文物有限公司。臺北。臺灣。
2. 衛生署疾病管制局，傳染病防治工作手冊，94 年。
3. 衛生署疾病管制局，檢驗方法標準操作程序手冊，91 年。
4. 衛生署疾病管制局，台灣地區傳染病統計暨監視年報，93 年。
5. Oxoid 操作說明書, Legionella Latex Test。
6. Zeus Scientific 操作手冊, Legionella DFA Test System。
7. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev. 2002; 15:506-26.
8. Benenson AS. 1990. Control of communicable diseases in man. 15th Ed. American Public Health Association.
9. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, et al: Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. N Engl J Med. 1977; 297:1189-97.
10. <http://www.hourei.mhlw.jp/%7Ehourei/html/hourei/contents.html>



11. Edelstein PH, Cidneiotto NP. Legionella pneumophila ( Legionnaires' disease ) . In Mandell/Douglas/ Bennett Eds. 2005. Principles and practice of infectious diseases. 6rd ed. New York.
12. Cherry WB, Pittman B, Harris PP, et al: Detection of Legionnaires'Disease bacteria by direct Immunofluorescent Staining. J Clin Microbiol. 1978; 8:329-38.

圖、退伍軍人病病原菌分離與鑑定流程圖



附錄：

BCYE 篩選培養基（含半胱氨酸 L-cysteine 及抗生素 PNV）

(1) 配方：每 1 公升含量

Yeast Extract	10.0 g
Charcoal	1.5 g
ACES Buffer	10.0 g
Ferric Pyrophosphate	0.25 g
Alpha-Ketoglutarate	1.0 g
Agar	15.0 g
L-cysteine（滅菌後加入）	0.4 g
PNV Supplement（滅菌後加入）	
內含量 Polymyxin B	79,200 IU/l
Natamycin	200 mg/l
Vancomycin	3 mg/l

(2) 配製 500ml BCYE 篩選培養基：

稱取 19.0 g BCYE agar (REMEL) 溶於 500 ml 蒸餾水中，加熱攪拌完全溶解後於 121°C 高壓滅菌 15 分鐘，滅菌後放在 50~55°C 恆溫水槽中，冷卻至 50~55°C，於無菌操作箱中加 1 瓶 L-cysteine growth supplement（含 0.2 g L-cysteine-HCl）(MS35, MAST Group Ltd.)，以 3ml 無菌溶解後加入，加 1 瓶 PNV supplement（含 Polymyxin B 39,600IU、Natamycin 100mg、Vancomycin 1.5mg）(SV37, MAST Group Ltd.)，PNV 先以 5 ml 50% methanol 溶解後加入，以攪拌子攪拌均勻後，測 pH 值，以 2 N KOH 或 1 N HCl 調整為 pH 6.9±0.05，倒入平板約 3mm 厚度。

BCYE 鑑定培養基（含半胱氨酸 L-cysteine）

配方同 BCYE 篩選培養基，但不含抗生素 PNV。

配製法亦同 BCYE 篩選培養基。