



# 傳染病解剖檢驗報告－創傷弧菌感染案例

王昱嵐<sup>1</sup>、蔡金來<sup>1</sup>、潘志信<sup>2</sup>、張瑞炘<sup>1</sup>、江春雪<sup>1</sup>、吳和生<sup>1</sup>

- 1.衛生署疾病管制局研究檢驗中心
- 2.法務部法醫研究所

## 摘要

創傷弧菌感染能引發迅速發展之病程與高死亡率，發生感染症之高危險群為免疫系統不健全者，特別是慢性肝病、長期酗酒、或血色素沉著症等患者。本局細菌實驗室接獲一起疑似傳染病死亡解剖個案的檢體 11 件，該名個案於發病當日就醫後病情急遽惡化死亡，為釐清該名個案是否有任何與病程進展相關的細菌性感染，本實驗室鑑定分析其中的分離菌，結果在個案心臟血拭子發現唯一生長之菌種，為革蘭氏陰性彎曲弧形菌，個案腦膜拭子、心包膜水拭子、與肋膜水拭子中亦分離到同型態的菌落，再經生化套組與傳統生化反應特性等鑑定，確認此分離菌為創傷弧菌。疑似傳染病之解剖檢體採用適當並且嚴謹的無菌採檢技術，可以有效的減少最主要的影響或混淆結果判讀的因素即檢體污染，而在適當的時間點採集適當的檢體則可以避免體內菌叢大量進入血液或檢體造成多重細菌生長的干擾；如此能有效的調查分析由細菌引起之病程快速如創傷弧菌的感染病例，並提供正確而有意義的細菌學檢驗結果。

關鍵字：創傷弧菌，敗血症，解剖個案，生化鑑定

- 西元 2008 年 11 月 10 日受理
- 西元 2009 年 4 月 30 日接受刊載
- 通訊作者：江春雪
- 聯絡地址：台北市南港區昆陽街 161 號
- e-mail: cschiang10@cdc.gov.tw

## 前言

創傷弧菌(*Vibrio vulnificus*)是一種嗜鹽性革蘭氏陰性、呈弧形彎曲之桿菌，適合生長於溫暖的海水，在港灣附近之海洋環境分布廣泛，因而感染大部分發生在太平洋沿岸、美洲、歐洲等沿海國家[1]。台灣第一個由創傷弧菌引起的感染症在 1985 年的高雄地區被發現後，臨床上陸續診斷出多起病例，近幾年來的感染情形則有顯著增加的趨勢，病例多發生在南台灣，累計有超過 200 例以上的報告，因感染所引發的嚴重病情與迅速發展的病程等特性，自病例被報告以來，此相關議題就頗受台灣臨床感染醫師的注意[2-4]。感染創傷弧菌引起的臨床病癥主要有兩種，一為原發性敗血症(primary septicemia)，感染途徑主要為生食或食入未煮熟之含有創傷弧菌的海鮮，如魚蝦、生蠔等，感染後 16 小時內發病，病人會出現發熱、寒顫、噁心、嘔吐、下痢、皮膚病變、下肢皮膚疼痛、壞死性潰瘍及敗血症休克等症狀，死亡率高達 50%，其中大部分病人在住院 48 小時以內死亡；另一種病症為傷口感染(wound infection)，由傷口接觸到受污染的海水、海鮮、或被蝦、蟹螯傷而感染，在 12 小時內感染部位皮膚會發生紅、腫、水泡現象，之後出現壞死性筋膜炎，此時需要抗生素以及外科手術治療，將潰爛部份挖掉，甚至需截肢以遏阻傷口惡化，更嚴重者會發展成次發性敗血症(secondary septicemia)，死亡率約為 24% [5-7]。

創傷弧菌感染症的危險因子為患者之免疫系統不健全，通常在慢性病患特別是肝功能不全、肝硬化、長期酗酒、糖尿病、慢性腎病、血色素沉著症等患者特別容易發生嚴重之感染病症，這些感染者 50% 以上同時伴隨有生食海鮮，或短期內曾暴露於海產、海水等接觸史 [5,8]。文獻上有許多關於其致病機轉的研究，雖然有研究者提出創傷弧菌的莢膜與創傷弧菌在血液中由運鐵蛋白及乳鐵蛋白攝取出鐵離子之作用為其主要的致病原因，然而，在創傷弧菌感染症中，真正的致



病機轉與致病因子所扮演的角色仍不十分清楚，許多文獻的研究甚至指向不同的結論[6,9,10]。台灣醫師 Chuang YC 等人積極研究各種藥物對此感染症的療效，證實 cefotaxime 與 minocycline 之合併抗生素療法效果良好，且已為國際上公認與採用[11,12]。由於其感染之病程迅速與高死亡率，重要與有效的防治策略應該包括，屬於帶有危險因子之慢性疾病患者應避免接觸可能之感染源，臨床上即時正確的診斷，以及積極的抗生素、外科與支持性治療等。

本局細菌實驗室於 2007 年 9 月 3 日接獲一起疑似傳染病死亡解剖個案檢體，該名個案為一居住於台中縣大雅鄉之 54 歲男性，8 月 22 日發病當日至醫院急診主訴雙腳疼痛，隨後即因病況惡化轉院治療，至急診時已意識喪失，並於到院後 3 小時因心肺腎衰竭死亡。醫院檢驗結果顯示個案有肺浸潤、橫紋肌溶解、腎衰竭、高血鉀、發炎指標上升等現象，並在 8 月 28 日於個案血液檢體檢出霍亂弧菌；本局於 8 月 31 日進行個案之解剖與採檢。為釐清該名個案是否有任何與病程進展快速相關的細菌性感染，本實驗室針對其解剖檢體，利用細菌分離培養與各式菌種鑑定方法檢驗分析其出現的分離菌，同時也於此篇報告中說明討論有關解剖檢體之採檢特性以及實驗室檢驗程序以提供醫師與防疫人員參考。

## 材料與方法

### 檢體：

個案的解剖檢體共 11 件，包括腦膜拭子、肺拭子、心臟血拭子、心包膜水拭子、肋膜拭子、膽汁拭子、小腸拭子、大腸拭子、肺組織塊、以及嗜氧血瓶與厭氧血瓶。實驗室於收件後隨即進行各項檢驗。

### 細菌分離培養：

將收到的拭子檢體依檢體性質選擇適當之分離培養基接種(表

1), 包括 BAP(blood agar plate)、Chocolate agar、MacConky sorbitol agar、SS agar、TCBS agar、anaerobic BAP 與 PEA 等；組織檢體置於無菌緩衝溶液中先以研磨棒磨碎，再取適量研磨液依檢體特性選擇適當之分離培養基接種；血瓶檢體於收件當日先進行一次直接接種培養後，將血瓶置於 BACTEC 9050(BD, NJ, USA)血瓶培養箱培養並觀測其生長與否，需觀察 7 至 10 天，此期間一有生長跡象即取樣接種於分離培養基，如果觀測期間無生長跡象，最終於結果報告前仍需再進行一次接種培養以確認。BAP 與 Chocolate agar 置於 37°C 與 5% CO<sub>2</sub> 的環境培養，MacConky sorbitol agar、SS agar、TCBS agar 於 37°C 培養，anaerobic BAP 與 PEA 置於以厭氧產氣包製造之厭氧缸環境中 37°C 培養；Chocolate agar 及 anaerobic BAP 與 PEA 培養與觀察 48 小時以上，其餘培養基培養 18-24 小時。

**表一、個案檢體接種與分離培養使用之培養基<sup>a</sup>**

個案檢體種類	培養基 b					
	BAP	M-S	SS	TCBS	Chocolate	ana.BAP/PEA
腦膜拭子	✓	✓			✓	✓
肺拭子	✓	✓			✓	
心臟血拭子	✓	✓		✓	✓	
心包膜水拭子	✓	✓		✓	✓	
肋膜水拭子	✓	✓		✓	✓	
膽汁拭子	✓	✓		✓		
小腸拭子	✓	✓	✓	✓		
大腸拭子	✓	✓	✓	✓		
肺組織	✓	✓			✓	
嗜氧血瓶	✓	✓		✓	✓	
厭氧血瓶	✓			✓	✓	✓

a 個案檢體依檢體特性接種培養在不同分離培養目的之培養基。

b BAP : blood agar plate, M-S : MacConky sorbitol agar, SS : Salmonella Shigella agar, TCBS : thiosulfate citrate bile salts sucrose agar, Chocolate : chocolate agar, ana. BAP/PEA : anaerobic blood agar plate and anaerobic phenylethyl alcohol agar。

## 菌落型態觀察與細菌革蘭氏染色觀察：

先觀察培養基上菌落型態之種類、分布與比例等，以及個別菌落



的型態特徵，包括形狀、大小、顏色、表面及邊緣特徵、與溶血特性等，接著挑選培養基上不同菌落型態的細菌進行革蘭氏染色觀察與次培養以進行後續的鑑定。如果培養盤生長滿菌落無法計算菌落數時，挑選主要生長的菌落型態鑑定，僅出現數個菌落的菌落型態不予挑選；如果菌落僅生長在第一區或第二區，或數量為可計算時，不同型態的菌落都予以挑選鑑定，但如果其中有多種僅生長一兩個菌落的型態，則視為污染菌不予鑑定。革蘭氏染色使用 Gram-Hucker's Stain Solution(武藤化學，東京都，日本)試劑組，取適量細菌做成抹片並固定後，於油鏡下觀察細菌的染色結果。

#### **細菌生化鑑定：**

革蘭氏染色陽性的分離菌先進行 catalase 試驗，catalase 陽性者再進行 coagulase 試驗。革蘭氏陰性的分離菌先進行 oxidase 試驗。依據細菌的革蘭氏染色特性與上述之初步生化特性試驗結果，選用適當的生化檢測套組進行鑑定，原則上先使用 Vitek(bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)與 Phoenix(BD)自動生化鑑定儀及其對應試劑套組進行菌種的鑑定，如果遇到臨床上少見的特殊菌或在鑑定儀中的生化反應不典型之分離菌，再選用能更細分類菌種的商品化套組鑑定之。鑑別菌種後，針對具有臨床意義之致病性分離菌為確認其檢驗結果，進行該菌之傳統生化特性試驗或其他有助於確認鑑定的檢驗項目，在此個案中即進行其創傷弧菌分離菌之耐鹽性、相關生化反應試驗(表 3)。

#### **細菌 16S rDNA 鑑定：**

重要病原菌、臨床少見之特殊菌、或生化反應特性不典型之分離菌亦進行 16S rDNA 定序分析以確認鑑定結果。16S rDNA 菌種鑑定使用 MicroSeq(Applied Biosystems, CA, USA)試劑套組進行之，先以 QIAamp DNA mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)純化待測菌 DNA，再進行 RCR 反應增幅其 16S 基因，總反應體積為 30  $\mu$ L 的反應中含有

2X master mix 15  $\mu$ L, 待測 DNA 模板 5  $\mu$ L, 及無菌水 10  $\mu$ L。以 Biometra PCR 反應儀進行以下反應：95°C 10 分鐘, 35 個循環之 95°C 30 秒、60°C 30 秒、及 72°C 45 秒, 最後 72°C 10 分鐘。反應完成以跑膠方式確認其增幅片段無誤, 將產物送廠商進行定序, 得到 16S 的基因序列後, 以 MicroSeq ID Analysis Software 2.0(Applied Biosystems)與 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析比對鑑定結果。

## 結果

### 菌落型態與革蘭氏染色觀察：

觀察檢體接種與分離培養後培養基上菌落的型態特性, 以及革蘭氏染色後顯微鏡下之細菌外觀特徵, 可以協助菌種的判別與鑑定; 觀察菌落的生長情形, 包括型態的種類、分布、與比例, 則可能幫助判斷鑑定之菌種的臨床意義。菌落生長情形之觀察如表 2 所示, 個案腦膜拭子、心臟血拭子、與膽汁拭子分離培養基上的所有菌落型態相同, 心包膜水拭子與肋膜水拭子分離培養基上的菌落生長亦單純, 各只有兩種菌落型態, 以上培養盤上的菌落型態皆予以挑選進行鑑定; 至於其他檢體, 包括血瓶的分離培養基上, 皆是多種菌落型態生長滿培養盤的情形, 僅挑選主要的菌落型態進行鑑定。腦膜拭子、心臟血拭子、心包膜水拭子、與肋膜水拭子的 BAP 培養基上都有出現棕褐色、型態呈平滑乳脂狀、及具有 $\beta$ -溶血特性的菌落, 膽汁拭子培養基上的菌落特徵則明顯不同, 為乳白色不溶血之單一型態菌落。針對挑選的細菌進行革蘭氏染色觀察, 大多的分離菌屬於革蘭氏陰性桿菌, 其中腦膜拭子、心臟血拭子、心包膜水拭子與肋膜水拭子的分離菌中都有著彎曲弧形之短桿陰性菌; 少數的分離菌屬於革蘭氏陽性球菌, 包括由肺拭子、肺組織、心包膜拭子、與嗜氧及厭氧血瓶等檢體中挑選的菌落。



## 分離菌之鑑定：

針對上述挑選的分離菌進行菌種之鑑定結果列於表 2，由腦膜拭子與心臟血拭子培養出之相同菌落型態的分離菌皆鑑定為 *Vibrio vulnificus*，由心包膜水拭子與肋膜水拭子培養出之與其具有相同菌落型態的分離菌亦鑑定為 *Vibrio vulnificus*，膽汁拭子培養基上之單純菌落則鑑定為 *Escherichia coli*。嗜氧與厭氧血瓶的分離培養基上，並未觀察到疑似 *Vibrio vulnificus* 菌落，其生長的主要菌落型態經鑑定為人體內之正常菌叢，心包膜水拭子與肋膜水拭子之另一挑選之分離菌，以及其他檢體的分離菌經鑑定亦屬於體內之正常菌叢，不具有臨床意義之致病性。

表二、個案檢體細菌分離與鑑定之檢驗結果<sup>a</sup>

個案檢體	細菌分離與鑑定	
	菌落生長情形	分離菌鑑定為
腦膜拭子	約 50 個菌落生長，所有菌落型態相同	<b><i>Vibrio vulnificus</i></b>
肺拭子	菌落生長滿培養盤，兩種主要菌落型態，另有少數其他菌落型態 <sup>b</sup>	<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus spp.</i>
心臟血拭子	約 20 個菌落生長，所有菌落型態相同	<b><i>Vibrio vulnificus</i></b>
心包膜水拭子	約 10 個菌落生長，兩種菌落型態	<i>Vibrio vulnificus</i> <i>Streptococcus spp.</i>
肋膜水拭子	約 40 個菌落生長，兩種菌落型態	<i>Vibrio vulnificus</i> <i>Escherichia coli</i>
膽汁拭子	約 200 個菌落生長，所有菌落型態相同	<b><i>Escherichia coli</i></b>
小腸拭子	菌落生長滿培養盤，兩種主要菌落型態	<i>Escherichia coli</i> <b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>
大腸拭子	菌落生長滿培養盤，兩種主要菌落型態	<i>Escherichia coli</i> <b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>
肺組織	菌落生長滿培養盤，兩種主要菌落型態，另有少數其他菌落型態 <sup>b</sup>	<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
嗜氧血瓶	菌落生長滿培養盤，三種主要菌落型態	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
厭氧血瓶	菌落生長滿培養盤，三種主要菌落型態	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus spp.</i>

a 挑選培養基上不同型態的菌落進行鑑定：所有菌落型態相同、與僅有兩種菌落型態者，皆予以挑選與鑑定；菌落生長滿培養盤無法計算生長之菌落數時，挑選主要生長的菌落型態，菌落僅出現數個的菌落型態不予挑選與鑑定。

b 少數菌落型態之分離菌為 *Streptococcus spp.*

## 創傷弧菌分離株之鑑定：

個案檢體經細菌分離與鑑定後，由其心臟血拭子分離到 *Vibrio vulnificus*，且為唯一生長之菌種，其他檢體中也有分離出 *Vibrio vulnificus*，此為具有臨床意義之有致病性的分離菌，為確認檢驗結果，進行該菌種之傳統生化的特性試驗，以及其他有助於確認鑑定的檢驗項目。結果如表 3 所示，分離菌在 TCBS 培養基上為綠色中等大小呈平滑狀之菌落，在 BAP 培養基上為棕褐色平滑乳脂狀菌落，並具有β-溶血特性，其 oxidase 試驗陽性，Viteck 生化檢測套組鑑定為 *Vibrio vulnificus* 94%，Phoenix 檢測套組鑑定為 *Vibrio vulnificus* 99%，16S rDNA 細菌鑑定為 *Vibrio vulnificus* 99%，耐鹽性試驗中該分離菌在 0% NaCl 不生長，在 6% NaCl 生長，其他鑑定相關的反應特性有 lysine decarboxylase 陽性、arginine dihydrolase 陰性等；結果顯示個案檢體中此型態的分離菌確認鑑定為 *Vibrio vulnificus*。

**表三、個案創傷弧菌分離株之鑑定與結果<sup>a</sup>**

觀察與試驗	觀察與反應
菌落型態-TCBS	中等大小(2-4 mm)，綠色，平滑狀
菌落型態-BAP	中等大小(2-4 mm)，棕褐色，平滑乳脂狀
溶血特性	β-hemolysis
革蘭氏染色	陰性弧形彎曲桿菌
oxidase	陽性
Viteck	<i>Vibrio vulnificus</i> 94%
Phoenix	<i>Vibrio vulnificus</i> 99%
16S rDNA	<i>Vibrio vulnificus</i> 99%
耐鹽性	生長：3% NaCl，6% NaCl 不生長：0% NaCl，8% NaCl
傳統生化特性	陽性：ONPG，indole，motility，lysine，glucose，maltose 陰性：H <sub>2</sub> S，VP，citrate，ornithine，arginine，urea，malonate，adonitol，arabinose，inositol，rhamnose，sorbitol，sucrose

<sup>a</sup> 針對具有臨床意義之致病性分離菌，進行相關之確認試驗。





## 討 論

創傷弧菌感染症好發於慢性肝病與免疫力低落的病人，於此類病人引發嚴重病症的機會比一般人高八十倍。台灣為慢性肝病之盛行區，且四面環海漁業發達，因此接觸感染的機會大增，對於屬於高危險群，又有接觸史之病患，若有特殊皮膚表徵或敗血症時，應懷疑此感染症之可能。實驗室檢驗使用 BAP 與 TCBS 培養基可以有效分離培養創傷弧菌，其在 TCBS 培養基上為綠色中等大小平滑乳脂狀型態菌落，在 BAP 上有 $\beta$ 溶血反應，oxidase 反應陽性，在 0% 與 8% 鹽水不生長，VP、sucrose 與 arabinose 反應為陰性，indole、motility 與 lysine 反應為陽性等，利用其生化反應特性則可以準確的鑑定之，以此提供即時正確之檢驗結果。

Morris JA 等人曾研究探討解剖檢體之細菌學檢驗結果的病因判定原則，以及其所能提供的臨床意義與價值[13]。研究中分析 5000 例解剖個案之細菌檢驗報告，提出由這些檢體中檢出的細菌可能來自四種情況，一、這些檢出菌代表體內真正之感染與致病菌，二、這些細菌在病患生前由於非死因性之分布侵襲到該組織或器官檢體，三、解剖前細菌由黏膜表面進入血液或組織中(postmortem translocation)，四、採檢時檢體污染到了這些細菌。其研究顯示檢驗結果中最主要的干擾或混淆判讀的因素通常是檢體的污染，同時亦發現即使是解剖檢體，如果有採用適當並且嚴謹的無菌採檢技術，包括嚴格遵守無菌流程、徹底消毒器具、更換採檢器具避免交叉汙染等，仍是可以有效減少污染菌的出現；另外在適當的時間點即個案死亡後 24 小時內，或解剖前個案保存於 4°C 環境，如此採集適當保存的檢體可以避免體內菌叢大量進入血液或檢體造成多重細菌生長的干擾。血液或腦脊液檢體中，只有單一種病原菌生長的情形下，其極可能屬於體內真正的感染，應被視為可能的病原，而加以深入的鑑定與確認，最終在判定其確實的臨床意義時，則需同時有臨床病史以及組織學病理變化檢查吻

合之證據。然而如果解剖檢體中有多重菌種的生長，病因判定被認為是困難的。研究認為經由適當的分析或判別一些干擾的因素，解剖檢體之細菌學檢驗是可以提供正確而有意義的檢驗結果，或有效的調查分析由細菌引起之感染症[13,14]。

此傳染病解剖個案，檢體經本實驗室細菌分離與鑑定確認檢出創傷弧菌，且為其心臟血拭子檢體中唯一生長之菌種，在其腦膜拭子、心包膜水拭子、與肋膜水拭子中亦檢出此菌，至於個案嗜氧與厭氧血瓶之培養基上為多重菌種生長，未檢出創傷弧菌，可能體內菌叢大量進入血液中或檢體受到污染，影響了致病菌的分離。此個案為酒癮者，平時有至海邊以撿拾海螺的零工維生，發病而就醫的當日病程迅速進展至死亡，有橫紋肌溶解症與急性腎衰竭症狀，並且個案的肝臟硬化，生前有海產、海水等接觸史，因此個案可能感染創傷弧菌，引發急遽與嚴重之病情，且配合其臨床症狀，應可據以判定其死因和創傷弧菌之相關性，至於檢體中其他的檢出菌判斷屬於體內之正常菌叢，並無臨床有意義之致病性。

## 參考文獻

1. Shapiro RL, Altekuse S, Hutwagner L, et al. The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States. *J Infect Dis* 1998; 178:752-9.
2. Hsueh PR, Lin CY, Tang HJ, et al. *Vibrio vulnificus* in Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1363-8.
3. Tsai WC, Liu YC, Yen MY, et al. *Vibrio vulnificus* infection: experience of thirteen cases in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 1998; 31:46-50.
4. Chuang YC, Yuan CY, Liu CY, et al. *Vibrio vulnificus* infection in Taiwan: report of 28 cases and review of clinical manifestations and treatment. *Clin Infect Dis* 1992; 15:271-6.



5. Chiang SR, Chuang YC. *Vibrio vulnificus* infection: clinical manifestations, pathogenesis, and antimicrobial therapy. *J Microbiol Immunol* 2003; 36:81-8.
6. Strom MS, Paranjpye RN. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect* 2000; 2:177-88.
7. Chuang YC, Young C, Chen CW. *Vibrio vulnificus* infection. *Scand J Infect* 1989; 21:721-6.
8. Haq SM, Dayal HH. Chronic liver disease and consumption of raw oysters: a potential lethal combination-a review of *Vibrio vulnificus* septicemia. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:1195-9.
9. Gulig PA, Bourdage KL, Starks AM. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *J Microbiol* 2005; 43:118-31.
10. Wright AC, Simpson LM, Oliver JD. Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infect Immun* 1981; 34:503-7.
11. Chuang YC, Liu JW, Ko WC, et al. *In vitro* synergism between cefotaxime and minocycline against *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2214-7.
12. Chuang YC, Ko WC, Wang ST, et al. Minocycline and cefotaxime in the treatment of experimental murine *Vibrio vulnificus* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1319-22.
13. Morris JA, Harrison LM, Partridge SM. Postmortem bacteriology: a re-evaluation. *J Clin Pathol* 2006; 59:1-9.
14. Arnestad M, Vege A, Rognum TO. Evaluation of diagnostic tools applied in the examination of sudden unexpected deaths in infancy and early childhood. *Forensic Science International* 2002; 125:262-8.