

計畫編號：DOH92-DC-2027

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

計畫名稱：退伍軍人症的PCR檢查法的確立及大量迅速檢查的建立

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：周振英

研究人員：李智隆、鄭麗容、陳英彥、姚淑滿、江美嫻

執行期間： 92年1月1日至92年12月31日

目 錄

	頁 碼
封面	(1)
目錄	(2)
壹、摘要	
中文摘要	(3-4)
英文摘要	(5-6)
貳、本文	
(一)、前言	(7-9)
(二)、材料與方法	(10-11)
(三)、結 果	(12)
(四)、討 論	(13-14)
(五)、結論與建議	(15)
(六)、參考文獻	(16-17)
參、圖表	(18-25)

摘要：

中文摘要

目前的退伍軍人症檢查法包括培養法、血清抗體法及尿中抗原法。培養法因檢體及退伍軍人菌的特殊性並不容易。血清抗體法則因抗體上昇的時間上的問題，並不適於臨床迅速診斷；尿中抗原法迅速簡單，但出現時間上尚有研究餘地且只限於 *L.pneumophila* sg1 之檢測。綜述上面方法不需要有菌體及時間要求迅速性而言，PCR 法是最適的選擇。

本研究將外國各實驗室發表之 PCR 法所使用之 Primers,包括 Lp 為基因不明核酸序列, Lmip 為 macrophage infectivity potentialer encode 24KD surface protein，及 16S rRNA gene 的特異性片段 LEG，測試各種條件及利用退伍軍人菌屬各菌種菌株共 11 株，及其他臨床重要菌株共 12 種加以測試，欲找出其最適反應條件及特異性。

結果獲得屬特異性及種特異性 Primers，在設定的反應條件下，安定反應得到反應物,並且具有特異性可直接使用於臨床檢體上。依此結果，今後之檢驗項目除了上述一般檢驗方法外同時加上 PCR 法可增強檢驗之可信度。

同樣採用 16S rRNA gene primers 的 real-time PCR 法被檢討，這是利用 Light-Cycle assay 方法，可以更微量及迅速檢出退伍軍人菌。今後，一般 PCR 法及 real-time PCR 法的相補應用，可期待退伍軍人症的檢出有更突破性的發展。

英文摘要：

Current laboratory diagnostic methods for Legionellosis include bacteria isolation or culture method, paired serum antibody assay, urinary antigen detection, and polymerase chain reaction (PCR) method. The culture method is quite difficult to perform because of the properties of *Legionella* genus, while the antibody titer detection involves a rather long rising time of several weeks, which makes the method unpractical and not suitable for clinical diagnosis. The detection of antigen in urine is basically a good method for its simplicity and fastness, but its use is limited to detect *L. pneumophila* serogroup 1 only. The PCR method needs no bacterium particles and can be carried out swiftly. It seems to be the best choice of laboratory methods so far.

In this study, we acquired several primers reported previously by other laboratories. They include Lp, which is a gene of unknown nucleic acids; Lmip, the so-called macrophage infectivity potential, encode 24-KD surface protein; and LEG, a special nucleotide sector of 16S rRNA. To test the accuracy of their claims and application to clinical samples, we made use of 11 species of *Legionella* genus and 31 species of other clinical important pathogens.

In our findings, Lmip has species specificity for *L. pneumophila* and

LEG has genus specificity for *Legionella*. In each case we obtained the expected bands only when *Legionella* species was assayed but not any of the other pathogens. Our results suggest that PCR with anyone of the tested primers can all be used to diagnose and confirm Legionellosis.

Recently, a new real-time PCR kit using the same primer of 16S rRNA has been developed and become available on the market. This kit employs a light-cycle assay and is able to rapidly detect Legionellosis with small volume to deal with. From now on, this real-time PCR will certainly complement the regular PCR and hopefully result in a breakthrough development in Legionellosis diagnosis.

本文

(一) 前言 (Introduction)

在 1976 年 7 月 21~24 日，美國賓州退伍軍人協會在費城的 Bullevue-Stratford Hotel，集會慶祝美國獨立 200 週年紀念，在會後發生包括參加者及附近居民共 221 人集體感染肺炎，造成 34 人死亡的重大事件。

其後，在美國 CDC 的盡力調查，於 1977 年由 McDad J. E. 分離出菌株，1979 年 Brenner D. J. 命名為 *Legionella pneumophila*。1968 年，美國密西根州 Pontiac 衛生局的職員 100 人中 95 人，及來訪者 39 人共計 134 人，集體發生熱性疾患，並未造成任何死亡，但原因不明。直到發現 *Legionella pneumophila* 以後的 1981 年，才由 Kaufmann 確認其原因菌亦為該菌，是一種不至於導致肺炎的另一種 Legionellosis 的病型，稱為 Pontiac fever。這兩種不同性狀的病態，其發生原因皆由 *Legionella pneumophila* 及其同屬其他菌種經由水氣或飛沫吸入人體而引起。

爾後，各國陸續報告病例，目前在美國退伍軍人症肺炎佔全部社區性肺炎的 2~10%，在歐洲亦推定為 3~10%，地中海地區更高達 8~22%，而鄰國的日本則約為 2%。

台灣是一個高度親水環境的國家，不論是溫泉、噴水池或是水療，並且地處熱帶，冷氣、水塔、游泳池已成為生活環境之一，因此這些水環境受污染所造成的水氣很有可能成為退伍軍人症的媒介，必須加以重視並防止其發生。

退伍軍人菌 生長於土壤及水中，適宜溫度為 35~40°C，在自然界中，一般以原生動物為宿主，進入人體中是屬於一種細胞內寄生菌，在細胞內繁殖。

到目前為止，共有 45 菌種被發現，其中 26 菌種對人體有病原性，其病型有肺炎型的 *Legionella pneumonia*，及非肺炎型的 Pontiac fever。肺炎型大多為 *L. pneumophila* 所引起，其他 *L. micdadei*，*L. bozemanii*，*L. dumoffii* 亦常被分離，特別是 *L. pneumophila*，共有 16 血清型，Legionellosis 的病例中，*L. pneumophila* 佔 85%，而單獨 serotype 1，就又佔其中的 90%。至於 Pontiac fever，到目前為止，曾經有過集體感染的症例，包括 *L. pneumophila* serotype 1 及 serotype 2、*L. micdadei* 及 *L. feeleii*。

退伍軍人菌，一般為革蘭氏陰性短桿菌，有極性鞭毛及線毛，但不具莢膜或芽孢、好氣性，但對醣類幾乎都不發酵，利用胺基酸，因其生化學性狀陽性反應項目少，利用表現形質鑑定困

難。一般診斷上，除了菌種培養以外，大都是利用血清之間接螢光抗體法(Indirect Fluorescent Antibody technique : IFA)，及尿液之酵素免疫測定法(Enzyme Immunoassay : EIA)，但是從時間上及檢出率都無法達到理想，目前聚合酶鏈鎖反應法(Polymerase Chain Reaction: PCR)的進步及改良，期待能解決上述的問題。

(二) 材料與方法 (Material and Method):

1. primers

Primer LEG 是取自 16S rRNA gene, Lpm 及 Lmip 是取自 macrophage infectivity potentiator (mip) gene, 而 Lp 是取自 chromosome DNA, 其序列如表 1。

2. 菌株

退伍軍人菌屬使用常見致病性菌株 *L. pneumophila* serogroup 1~6 及其他菌種共 11 株, 如表 2。

一般細菌則使用呼吸道常見致病性菌種及他菌種共 37 株, 如表 3。

3. 細菌培養

退伍軍人菌培養, 各菌株由保存的 -70°C 領凍櫃取出, 接種於 BCYE 培養基, 置於 37°C 、5% CO_2 培養箱, 培養 3 天。其他菌種之菌株接種於血液培養基, 37°C 、24 小時後, 刮下菌落, 抽取 DNA, DNA 抽取使用 Kit, 依說明書操作。

4. PCR 反應條件之設定

PCR 測試時, 其反應條件依 GC% 計算, 設定為 94°C 加熱 5 分鐘後, 以 94°C 、30 秒解離 (denature), 51°C 、30 秒粘合 (annealing), 然後 72°C 、30 秒延伸 (elongation), 共計以 40 cycles 來增幅, 而後

再置於 72°C 10 分鐘後，以完成整個過程，最後以 1.5% 濃度之洋菜膠來檢查其結果。

(三) 結果 (Result):

- (1) 使用退伍軍人菌株之測試結果。如表 4 及圖一所示。LEG 的兩套配列所組合成的四組 primers 即 225A-705B, 225A-854B, 448A-705B, 448A-854B, 在上述反應條件下所有菌種正確地得到 480bp, 629bp, 257b 及 406bp 的 Band, 亦即顯示對 *Legionella* 菌屬有專一性。Lpm 及 Lmip 同樣在 PCR 結果, 在 *L. pneumophila* Sg1~6 的 6 種血清型都得到所預期之 630bp 及 650bp 之 Band, 但是對 *Legionella* 屬的其他菌種則不產生 Bands。顯示其只對 *L. pneumophila* 有種特異性, 而 LP primers 則有不確定之 Bands 產生, 故證明其專一性不足, 從以後的實驗中予以排除。
- (2) 使用上述 primers 再對 *Legionella* 菌屬以外之 12 種類的菌屬菌種用同樣反應條件進行 PCR, 檢測其專一性。其結果如圖二, 圖三, 圖四, 圖五, 圖六所示, 只有以 *Legionella* 為 positive control 的 PCR 有 Band 產生, 可以證明這些 primer 對 *Legionella* 的專一性。

(四) 討論:

退伍軍人菌經常由水氣、浮塵以及吞嚥而進入氣道，特別是高齡者或易感染宿主會引起機會性感染。並且在院內感染的比率，退伍軍人菌佔有很高的比率，這是醫院環境及醫療處置時器械等的直接間接所引起。

至於健康人在大量污染水氣的暴露下亦有受感染而發病的可能，因此空調的冷卻水塔，水滴，以及溫泉，長時間循環浴槽等都可成為傳染場所。台灣水資源豐富，人口密集，空氣溼熱，空調使用率高，噴泉及溫泉到處存在。對退伍軍人症的發生不加以重視、警戒，是對國民健康有很大的威脅。

目前台灣的退伍軍人症肺炎檢出率比一般先進國家低，固然有許多因素。但是對此症的認識及檢查方法的改進確有進一步努力的餘地。目前檢查方法當然以菌種培養為最重要依據，但已如前述，此菌的特性上培養困難，檢出率低而且在台灣檢體來源都為喀痰，與歐美之氣管沖洗液比較其檢出率大有不同，而目前最主要的是靠血清抗體價的判定，雖有助診斷，但是並無助於臨床上的需要。一般上在臨床上最被推崇的是尿液檢查法，迅速而且特異性相當高，雖然還有些抗原持續性及敏感性的問題存在，另

外就是檢測對象限制於 *L. pneumophila* SgI 為最大難點。因此 PCR 法被視為是能解決以上不適宜困難的方法。

本實驗結果證明出上述 primers 在特異性上並無問題，但是敏感性卻未能得到保證，因為目前所採取之檢體除尿液外，包括血清及喀痰。血清在菌體培養及菌種檢出上是非常困難，但改用血液時，本菌的菌血症期間很短，而且菌量也可能不多。直接由血液進行 PCR 法，敏感度不夠。另一方面的喀痰，雖然上述 primers 的專一性可以排除其他雜菌而不形成 Band。但同樣困難點在此菌的數量上與其他雜菌相比數量少，雖可以先行把檢體用加熱或強酸去除雜菌但處理後之菌量可能過少，與培養法同樣檢出困難，此次用喀痰直接測定也沒有成功，因次在敏感度上改良上有改進的必要。而且在研究中發現 *L. pneumophila* 的 primers 檢測對象的 16S rRNA 之 DNA copy 數總共只有三個，比一般細菌更為少數，更增加 PCR 法增幅的困難度。

(五) 結論與建議

本研究的結果顯示，所測試的 primers 有極高的特異性，使用於直接檢出 *Legionella* 是沒有問題，但是檢測對象的血液及喀痰，因本菌之特徵，如菌血症期間及菌量問題，其敏感度尚有改進的餘地，惟目前檢測方法及技能的進步，如最近的 Real-time RT-PCR 法，不但是直接測定 m-RNA，可以排除使用 genomone 中 primers 對象的 16S rDNA copy 數的影響，而且 neal-time PCR 更只要微量的檢體，因此同樣的以 16S rRNA primers 為對象的 *Legionella* RT-PCR kit，可能能解決敏感度的問題，來突破 PCR 法的困難點，是今後測試的對象。

縱上所述，有罹患退伍軍人菌肺炎可能時，在投藥前除進行喀痰及採血取得檢體外，先施行尿抗原檢查法，先切確認 *L. pneumophila* Sg1 之可能性，因為此血清型菌種佔全部退伍軍人菌肺炎之 70% 以上，尿液陽性者立即可得到診斷，否則等待 PCR 結果及培養之有無來補強及證實感染與否。但是目前的 PCR 法無法直接判定血清型別，還是要取得菌株後才能決定，由配列來比對的方法也已開發。

(六) 參考文獻

1. 藪内英子: Legionella. 醫學細菌學 Vol.2 1999 菜根出版社 東京 p366~422
2. 吉田真一, 柳 雄介: 戸田新細菌學 32ed. 2002 南山堂 東京 p.408
3. Saito,A. ,N.Arakaki, T.Shinzato et al : Evaluation of kits for detection of soluble antigens of *Legionella* in urine for diagnosis of *Legionella* infection. 日本厚生省新興再興感染症研究事業報告書 2000 p.5~9
4. 山本啓之: *Legionella* 属細菌の生態及病原因子. 1999 日本臨床微生物学雜誌 Vol.9, No.2 p.184~190
5. Yamamoto H. : Detection and identification of *Legionella* species by PCR 1992 感染症 日本臨床 50 卷 1992 年特別号 p.394~399
6. Wellinghausen,N., O.Landt and U.Reischel.2002 : Rapid Detection and Simultaneous Differentiation of *Legionella* spp. and *L. pneumophila* in Potable Water Sample and Respiratory Specimens by LightCycle PCR. p.45~57 in F.Cockerill(ed.), Rapid Cycle Real-Time PCR---Methods and Application. Springer London
7. Marshall P. and C.Lemieux : The I-Ceu 1 endonuclease recognizes a sequence of 19 basespair and preferentially cleaves the coding strand of the *Chlamydomonas moewusii* chloroplast large subunit rRNA gene. Nucleic Acids Research. 1992. Vol.23, 23:6401~6407

8. Stewart,T.C. and S.G.Isabelle: Bacterial genomics. 1994 FEMS Microbiology Review, 14: 139~160
9. 潘子明: 台灣地區與世界各地退伍軍人症之流行概況 衛生署預防醫學研究所 1998 p.55~100

參、圖表

表一

LEG: LRG 225A LEG 448A LEG 705B LEG 854B	5' AAG ATT AGC CTG CGT CCG AT 3' 5' GAG GGT TGA TAG GTT AAG AGC 3' 5' CTG GTG TTC CTT CCG ATC 3' 5' CGG TCA ACT TAT CGC GTT TGC T 3'
Lmip Lmip L 920 Lmip R 1548 Lpm 1 Lpm 2	5' GCT ACA GAC AAG GAT AAG TTG 3' 5' GTT TTG TAT GAC TTT AAT TCA 3' 5' GGT GAC TGC GGC TGT TAT GG 3' 5' GGC CAA TAG GTC CGC CAA CG 3'
Lp Lp A Lp B	5' GTC ATG AGG AAT CTC GCT G 3' 5' CTG GCT TCT TCC AGC TTC A 3'

表二 退伍軍人菌屬之菌株

1. <i>L.pneumophila</i> serogroup 1	ATCC 33152
2. <i>L.pneumophila</i> serogroup 2	ATCC 33154
3. <i>L.pneumophila</i> serogroup 3	ATCC 33155
4. <i>L.pneumophila</i> serogroup 4	ATCC 33156
5. <i>L.pneumophila</i> serogroup 5	ATCC 33216
6. <i>L.pneumophila</i> serogroup 6	ATCC 33215
7. <i>L.bozemanii</i>	ATCC 33217
8. <i>L.micdadei</i>	ATCC 33218
9. <i>L.dumoffii</i>	ATCC 33279
10. <i>L.longbeachae</i>	ATCC 33462
11. <i>L.anisa</i>	ATCC 35292

表三 使用菌株

1. <i>Nisseria meningitides</i>	20. <i>E.coli</i> (LT)
2. <i>Bordella pertusis</i>	21. <i>E.coli</i> (JM109, transfer)
3. <i>Haemophilus influenza</i>	22. <i>E.coli</i> (K12)
4. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	23. <i>Shigella boydii</i>
5. <i>Streptococcus pyogene</i>	24. <i>Shigella flexnerii</i>
6. <i>E.coli</i> (type strain)	25. <i>Shigella sonnei</i>
7. <i>Enteroaggregative E.coli</i>	26. <i>Shigella dysenteriae</i>
8. <i>Enteroaggregative E.coli</i>	27. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
9. <i>Diffuse adhesive E.coli</i>	28. <i>Staphylococcus intermedius</i>
10. <i>Adhesive E.coli</i>	29. <i>Staphylococcus aureus</i>
11. <i>Localized adhesive E.coli</i>	30. <i>Staphylococcus caitis</i>
12. <i>E.coli</i> (VT 1)	31. <i>Staphylococcus cohnii</i>
13. <i>E.coli</i> (VT 2)	32. <i>Staphylococcus epidermitis</i>
14. <i>E.coli</i> (O157)	33. <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
15. <i>E.coli</i> (ST,LT)	34. <i>Staphylococcus sciuri</i>
16. <i>E.coli</i> (ST,LT)	35. <i>Staphylococcus simulans</i>
17. <i>E.coli</i> (ST)	36. <i>Staphylococcus warnei</i>
18. <i>E.coli</i> (ST)	37. <i>Staphylococcus xylosus</i>
19. <i>E.coli</i> (LT)	

表四

Primer 菌名	225A & 705B	225A & 854B	448A & 705B	448A & 854B	Lpm1 & Lpm2	LpA & LpB	Lmipr & LmipL
<i>Legionella Pneumophila</i> serogroup 1	+	+	+	+	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 2	+	+	+	+	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 3	+	+	+	+	+	+	+
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 4	+	+	+	+	+	-	+
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 5	+	+	+	+	+	-	+
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 6	+	+	+	+	+	+	+
<i>Legionella bozemanii</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Legionella micdadei</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Legionella dumoffii</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Legionella longbeachae</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Legionella</i>	+	+	+	+	-	-	-

圖一

設出七組 primers 如下：

(I) 225A + 705B \Rightarrow 480bp (base pair)

(II) 225A + 854B \Rightarrow 629bp

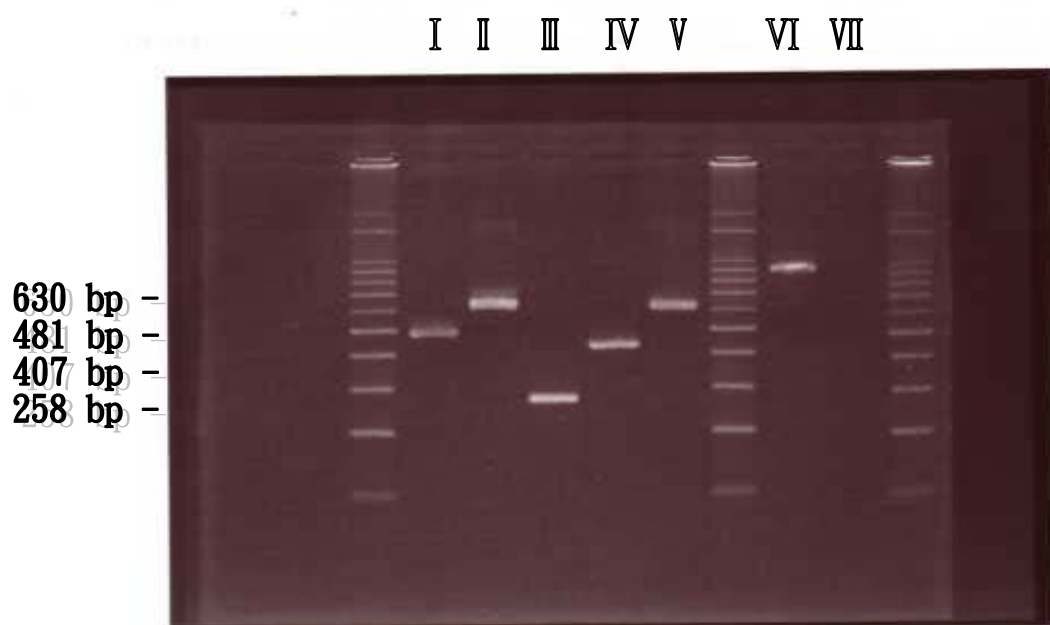
(III) 448A + 705B \Rightarrow 257bp

(IV) 448A + 854B \Rightarrow 406bp

(V) Lpm1 + Lpm2 \Rightarrow 630bp

(VI) LpA + LpB \Rightarrow 800bp

(VII) LmipR1548 + LmipL920 \Rightarrow 650bp (61°C \rightarrow 51°C)



表五

Lane:	
M	100 bp DNA ladder
1	Negative control
2 (ATCC 33156)	Positive control
3	<i>Haemophilus influenzae.</i>
4	GABHS
5	<i>Neisseria meningitidis.</i>
6	<i>Bordetella pertussis.</i>
7	<i>Streptococcus pneumoniae.</i>
8	<i>E. coli</i> O157
9	<i>Shigella boydii</i>
10	<i>E. coli</i> Localized adhesive.
11	<i>E. coli</i> adhesive
12	<i>E. coli</i> diffusive
13	<i>E. coli</i>
14	<i>Staphylococcus. saprophyticus.</i>

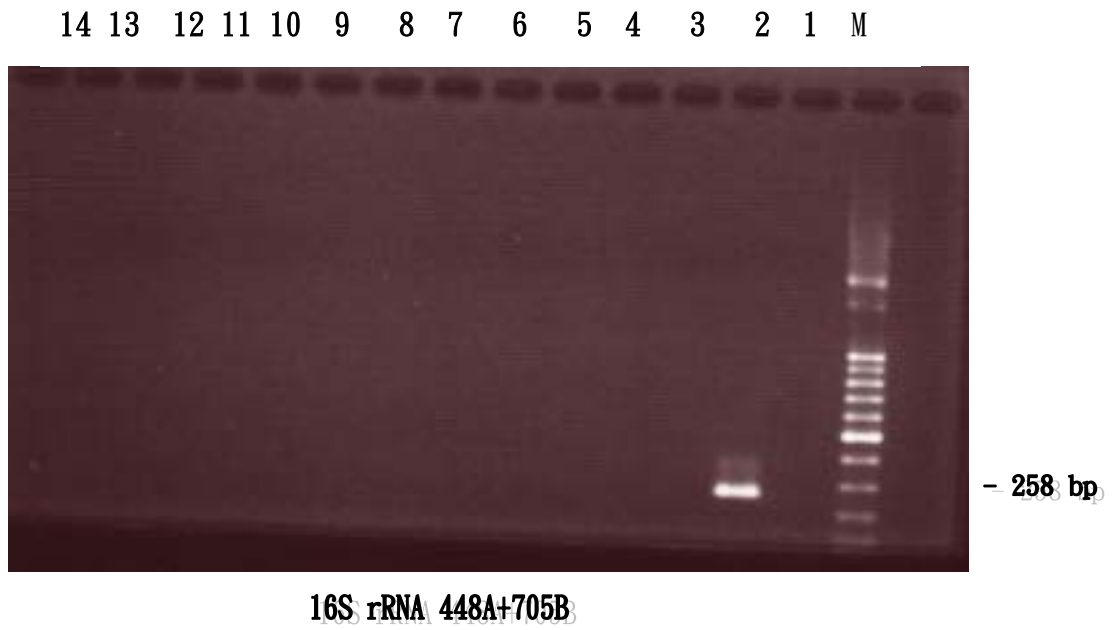
圖二



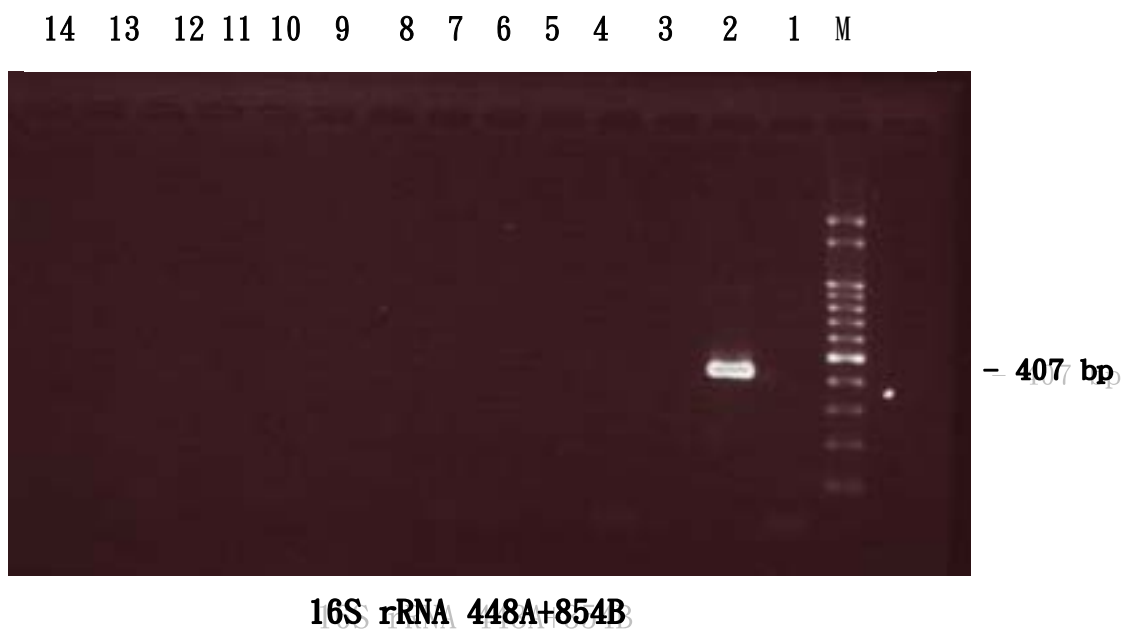
圖三



圖四



圖五



圖六

