

計畫編號：DOH92-DC-1056

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

隱孢子蟲症及環孢子蟲症之實驗診斷
Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis and cyclosporiasis

研究報告

執行機構：國防大學國防醫學院寄生蟲及熱帶醫學科

計畫主持人：李忠信

研究人員：蘇筱雯、徐維敏

執行期間：92年01月01日至92年12月31日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

頁 碼

封面

目錄

中文摘要 (1)

英文摘要 (2)

本文

一、前言 (3)

二、材料與方法 (5)

三、結果 (7)

四、討論 (8)

五、結論與建議 (8)

六、參考文獻 (8)

七、圖 (11)

共 (13) 頁

中文摘要：

關鍵詞：環孢子蟲，隱孢子蟲，及時聚合酵素連鎖反應方法，新興傳染病

近十年內，世界各地陸續爆發隱孢子蟲症及環孢子蟲症，使得寄生原蟲隱孢子蟲 *Cryptosporidium parvum* 與環孢子蟲 *Cyclospora cayetanensis* 成為人類重要新興致病原。這兩種新興傳染病在免疫力正常個體造成急性腹瀉，而對免疫缺損患者會引發更嚴重之病症，甚至危及生命。研究上述爆發事件，結果顯示隱孢子蟲與環孢子蟲均可經由飲水或食物等途徑傳播給人，這兩種原蟲已成為「旅遊者腹瀉」的重要致病原，造成威脅全球人類健康的一大問題。本計畫之目的即為建立一套系統化之實驗診斷方法，以有效監控並處理此類傳染疾病。主要是發展「及時聚合酵素連鎖反應方法」(Real-Time PCR)，以提高診斷之專一性與敏感性，運用此方法，經檢測河水及糞便檢體，少數樣本呈現存在環孢子蟲 *Cyclospora cayetanensis* 之陽性反應，此結果尚在進一步查驗中。及時聚合酵素連鎖反應方法能夠檢測出水、食物或臨床檢體中存在之微量感染原，達到既快速又準確的診斷效率，以提供臨床醫療人員迅速處置的可靠依據，的確是監控此類新興傳染病之最佳利器。

英文摘要(Abstract) :

Keyword: *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, Real-time PCR, Emerging infection

In recent ten years, the outbreaks of cryptosporidiosis and cyclosporiasis have been occurred all over the world. As a consequence, *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetnensis* have become important emerging pathogens. The two protozoan parasites cause acute diarrhea in immunocompetent individuals, and result in very severe disease in immunocompromised patients. Human beings are infected by having drinking water and foods contaminated with the two pathogens. It has thus been an important problem for human health. This project was designed to establish an effective method for diagnosing the parasite infections in order to monitor and control the emerging diseases. To improve the sensitivity and specificity of diagnosis, real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) was utilized. Samples of river water and stool were tested. A few of them showed a positive response for *Cyclospora cayetnensis*. Further study is being performed to check the result. Real-time PCR can detect trace parasites present in the water, foods, and clinical samples. It permits a rapid and reliable diagnosis, and offers a better alternative for monitoring the emerging infectious diseases.

本文：

一、 前言

隱孢子蟲症及環孢子蟲症在人類分別是由寄生原蟲 *Cryptosporidium parvum* 與 *Cyclospora cayetanensis* 感染所致。1993 年，在美國 Milwaukee 暴發一次嚴重的隱孢子蟲症流行，40 萬 3 千人受到感染發病，超過 1 百人因此死亡(1)；而環孢子蟲症亦於 1990 至 1999 年間，在美國及加拿大各地陸續發生多起區域性流行(2)。這兩種新興傳染病因而日益受到重視。

隱孢子蟲 *C. parvum* 是一腸道寄生原蟲，可同時感染人及其他動物，目前已知有兩種不同之基因型存在(3)，其中「嗜人型」僅被發現於人體，而「人畜共通型」則可寄生於牛、鼠、人和其他哺乳動物。隱孢子蟲對人之感染，已被確認為急性腸胃炎之一致病因(多見於孩童)，常造成持續性水瀉，伴隨腹痛、嘔吐、食欲不振等症狀，某些患者尚會出現體重明顯減輕、發燒或咳嗽之症候，這些病症在免疫力正常之病人可自行緩解，但對免疫缺損病患(如後天免疫不全症候群或接受免疫抑制劑治療)，此寄生蟲可能侵犯膽道、胰臟或呼吸系統等腸道外器官，造成更嚴重之症狀，甚至危及生命(4)。隱孢子蟲 *C. parvum* 分佈全世界各地，對人之傳染途徑可經由人、動物、飲水及食物等方式(5)，此寄生蟲亦是造成「旅遊者腹瀉」之一重要

致病原(6)，所以隱孢子蟲症已儼然成為威脅人類健康的一大問題。

環孢子蟲 *C. cayetanensis* 亦是腸道寄生原蟲，但截至目前人是其唯一已知之宿主(2)。環孢子蟲對人之感染如同隱孢子蟲，主要是造成水瀉等腸道症狀，對免疫缺損病患雖無致命危險，但常引發非常嚴重之慢性腹瀉，需要長時期的治療(2)。最早的環孢子蟲症病例報告可溯自 1977 年(7)，不過對於此寄生蟲之確認命名一直到 1994 年才確立(8)，環孢子蟲 *C. cayetanensis* 主要分佈於熱帶及亞熱帶地區，但世界各地皆有病例發生，對人之傳染途徑可經由飲水及食物等方式(2)，例如：1996 年在美國及加拿大發生的多起暴發事件，禍首即是從瓜地馬拉進口之山莓(raspberries) (9)。此寄生蟲目前已被列為造成「旅遊者腹瀉」重要致病原之一(6)，與隱孢子蟲一樣成為威脅人類健康的一大問題。

在台灣，對隱孢子蟲症及環孢子蟲症之病例報告並不多見，推測大概有許多被當成普通的腹瀉而忽略了，1985 年台北榮民總醫院小兒部曾對隱孢子蟲症作過調查，發現當時之發生率為 2.8% (10)，可見應有這類的感染存在。無論如何，隱孢子蟲症及環孢子蟲症已成為全球公共衛生問題重要的一環，又台灣地處亞熱帶，近年來國人出國求學、經商、旅遊及外籍人士

來台均與日俱增，再加上未來若農產品大量進口，這些因素都將增加對這類新興原蟲感染的機會，為有效監控並處理此類傳染疾病，建立一精確之實驗診斷方法實為當務之急。

本計畫之主要目標即是建立一套系統化之實驗診斷方法，以有效鑑別隱孢子蟲及環孢子蟲的卵囊體。「及時聚合酵素連鎖反應方法」(Real-Time PCR)，提供快速、準確又敏感的診斷效率，已經成功地應用於臨床樣本中感染原之偵測(11, 12)。本計畫即針對隱孢子蟲及環孢子蟲之 18S 核醣體核醣核酸基因，設計具有種別專一性的引子(primers)及探針(probes)，這些探針結合螢光以便偵測，可達到既快速又準確之診斷結果(13, 14)，以提供臨床醫療人員迅速處置的可靠依據，並作為流行病學研究之最佳利器。

二、材料與方法

1. 隱孢子蟲及環孢子蟲樣本收集：

參考樣本：由美國 Scientific Device Laboratory (SDL)公司購得隱孢子蟲參考樣本。

臨床樣本：感謝三軍總醫院臨床病理科盧章智主任及小兒科王志堅主任惠賜病人之糞便檢體，共分析 134 病例。

水源樣本：共收集新竹尖石及中部武陵、埔里等地之河水進行檢測。

2. 自水及糞便檢體中純化寄生蟲之去氧核醣核酸(DNA)：

以 QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) 純化 DNA，取 1.2 ml ASL 與適量檢體混合，在水浴鍋內以 95 °C 加熱 5 分鐘，以 12000 rpm 離心 1 分鐘。取 1 ml 上清液加入新的微離心管，放入 1 片 InhibitEX tablet，以震盪器混合均勻後以 12000 rpm 離心 5 分鐘。取上清液到新的微離心管，再以 12000 rpm 離心 2 分鐘，取上清液 200 µl 到新的微離心管，加入 15 µl Proteinase K 混合均勻，再加入 200 µl Buffer AL，以 12000 rpm 離心 1 分鐘，放在水浴鍋中以 70 °C 加熱 10 分鐘，再以 12000 rpm 離心 1 分鐘。加入 200 µl 95% 酒精，以 12000 rpm 離心 1 分鐘，取上清液加入 QIAamp spin column，以 12000 rpm 離心 1 分鐘，換新的 column，加 500 µl AW I Buffer，以 12000 rpm 離心 1 分鐘，換新的 column，再加入 500 µl AW II Buffer，以 12000 rpm 離心 2 分鐘，將廢液倒掉，再以 12000 rpm 離心 1 分鐘，加入 AE Buffer 200 µl 靜置 2 分鐘之後，以 12000 rpm 離心 2 分鐘，將所收集的 DNA 移至新的微離心管，貯放在 -20 °C 冰箱。

3. 及時聚合酵素連鎖反應方法(Real-Time PCR)：

在一總體積 25 微升的反應中，加入適量的檢體去氧核醣核酸，一對基因引子(primers)，適量的種別專一性 TaqMan 探針(probes)，PCR 通用緩衝液混合物，以及 5 單位的 AmpliTaq Gold 去氧核醣核酸合成酵素。及時聚合酵素連鎖反應在 ABI 7700 序列偵測器上進行，一開始 95⁰C、10 分鐘一個循環，以活化 AmpliTaq Gold 去氧核醣核酸合成酵素，緊接著 95⁰C、15 秒，60⁰C、1 分鐘重複四十個循環後，進行結果分析(13，14)。

三、結果

此計畫主要是依據 Fontaine M (13)及 Varma M (14)等人所發展之及時聚合酵素連鎖反應方法，運用 TaqMan 探針系統，分別偵測隱孢子蟲及環孢子蟲之 18S 核醣體核醣核酸基因，分別增殖出 140 及 83 鹼基之產物，對於檢體中僅存在 1-5 個卵囊體仍可檢出，呈現高度敏感性。應用此項技術對新竹尖石及中部武陵、埔里等地之河水進行隨機抽樣檢測，發現新竹尖石一份水檢體對環孢子蟲 *C. cayetanensis* 呈現陽性反應；此外，於 134 份糞便樣本中，亦有 5 份檢體疑似有環孢子蟲 *C. cayetanensis* 之存在，其循環閾限值 (Ct)皆在 20 左右(圖 1)。

四、討論

環孢子蟲 *C. cayetanensis* 是最近才被報導的新興寄生原蟲，此次應用及時聚合酵素連鎖反應方法，偵測出野外河水及病人糞便檢體疑似有此寄生蟲之存在，自然必需謹慎，目前正在進一步查驗中。因為 *C. cayetanensis* 與其他種類的環孢子蟲及另一屬 *Eimeria* 具有密切親緣關係，其基因序列呈現高相似度(94-96%)，所以必需先排除這些因素造成的交叉反應。

五、結論與建議

1. 及時聚合酵素連鎖反應方法(Real-Time PCR)提供快速、準確又敏感的診斷效率，的確是監控新興傳染病之最佳利器之一。
2. 應用此項技術偵測出野外河水及病人糞便檢體疑似有此寄生蟲之存在，其敏感性較傳統染色法優異。
3. 建議以及時聚合酵素連鎖反應方法作為檢測水、食物及臨床檢體的首要篩檢技術，確實達到監控此等新興寄生蟲症之感染。

六、參考文獻

1. MacKenzie W, Neil M, Hoxie M, Proctor M, Gradus M, Blair K, Peterson D, Kazmierczak J, Addidd D, Fox K, Rose J, Davis J: A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* 1994;331:161-167.

2. Herwaldt BL: *Cyclospora cayetanensis*: a review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. *Clin Infect Dis* 2000;31:1040-1057.
3. Sulaiman IM, Xiao L, Yang C, Escalante L, More A, Beard AC, Arrowood MJ, Lal, A: Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg. Infect. Dis.* 1998;4:681-685.
4. Arrowood MJ: Diagnosis. In: Fayer, R. (Ed) *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* (pp 43-64). 1997;Boca Raton, FL: CRC Press.
5. Casemore DP, Wright SE, Coop RL: Cryptosporidiosis-human and animal epidemiology. In: Fayer, R. (Ed) *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* (pp 65-92). 1997;Boca Raton, FL: CRC Press.
6. Okhuysen PC: Traveler's diarrhea due to intestinal protozoa. *Clin Infect Dis* 2001;33:110-114.
7. Ashford RW: Occurrence of an undescribed coccidian in man in Papua New Guinea. *Ann Trop Med Parasitol* 1979;73:497-500.
8. Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR: A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. *J Parasitol* 1994;80:625-629.

9. Herwaldt BL, Ackers ML, The Cyclospora Working Group: An outbreak in 1996 of cyclosporiasis associated with imported raspberries. *N Engl J Med* 1997;336:1548-1556.
10. 吳子聰, 羅中興, 丁綺文等: 兒童隱孢子蟲症 臺灣醫誌 1987;86:884-889.
11. Ballard AL, Fry NK, Chan L, Surman SB, Lee JV, Harrison TG, Towner KJ: Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:4215-4218.
12. Lin M-H, Chen T-C, Kuo T-T, Tseng C-C, Tseng C-P: Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2000;38:4121-4125.
13. Fontaine M, Guillot E: An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. *J Microbiol Methods* 2003;54:29-36.
14. Varma M, Hester JD, Schaefer FW, Ware MW, Lindquist HDA: Detection of *Cyclospora cayentanensis* using a quantitative real-time PCR assay. *J Microbiol Methods* 2003;53:27-36.

七、圖

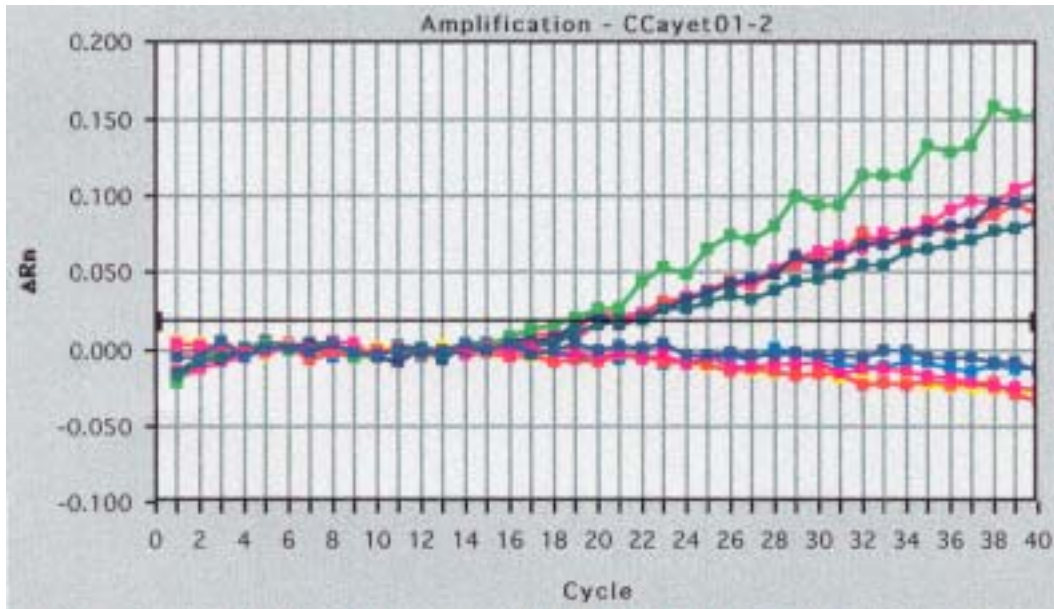


圖 1、運用及時聚合酵素連鎖反應方法偵測環孢子蟲 18S rRNA 片段的激增圖表。黑線表示此一實驗結果的臨界值，係依據實驗中的無模板控制組的結果而定。無模板控制組是以藍色、深藍色及粉紅色顯示並且位於臨界值的下方。臨床病人糞便檢體萃取之核醣核酸經過 20 個循環之後開始產生顯著的差異，其中 5 個檢體的 ΔR_n 值逐漸上升且高於臨界值，另外 2 個檢體（紅色及黃色）仍然與無模板控制組一樣低於臨界值。