

國立臺灣大學微生物學研究所寄生蟲學組

碩士論文

Division of Parasitology
Graduate Institute of Microbiology
National Taiwan University
Master Thesis

隱形眼鏡配戴者其盥洗台及清潔保養液之棘阿米巴
分離及基因分型

18S Ribosomal DNA Typing of *Acanthamoeba* Species
Isolates from Contact Lens Care System and Bathroom
Basin of Contact Lens Wearers



卓巧停

Qiao-Ting Jow

指導教授：蘇霸靄 博士，薛博仁 教授

Advisor: Kua-Eyre Su, Ph.D.

Po-Ren Hsueh, Professor

中華民國 97 年七月

July 2008

摘 要

棘阿米巴 (*Acanthamoeba* spp.) 為營自由生活之阿米巴原蟲，分布的環境範圍極廣。水、土壤和空氣都可以發現他們的蹤跡。具有致病性之棘阿米巴蟲株會造成極嚴重的棘阿米巴角膜炎、肉芽腫性阿米巴腦炎及其他器官感染。本實驗收集了 197 組隱形眼鏡配戴者盥洗台及清潔保養液之檢體作棘阿米巴之培養。此外，也收集了台大醫院自 2006 年 9 月~2008 年 6 月，從患者角膜刮取物所分離出來之棘阿米巴原蟲。所得蟲株並進行 18S rRNA 基因序列分析以確定其基因型。我們從盥洗台分離出 17 株棘阿米巴，從病人角膜刮取物分離出 7 株棘阿米巴；隱形眼鏡盒、生理食鹽水、隱形眼鏡清潔保養液及拋棄式隱形眼鏡則皆未培養出棘阿米巴原蟲。18S rRNA 基因分型之結果顯示：19 株屬 T4 型，3 株為 T3 型，而 2 株為 T6 型。我們所分離出來之棘阿米巴大多屬於 T4 型，此點與國外研究之結果一致的。



Abstract

Acanthamoeba is a free-living protozoan genus found in a wide variety of natural habitats, including water, soil, and air. Pathogenic isolates of *Acanthamoeba* are medically relevant as the causative agent of sight-threatening *Acanthamoeba* keratitis (AK), serious infections of other organs, and fatal granulomatous amebic encephalitis. A total of 197 sets of contact lens care system and bathroom basin samples from contact lens users were cultured for the isolation of *Acanthamoeba*. In addition, *Acanthamoeba* isolates obtained, between September 2006 till June 2008, from cornea scraping of patients suspected of amebic keratitis were also included in this study. Genotype of the isolates were identified by 18S rRNA gene sequence analysis. We obtained 17 *Acanthamoeba* isolates from bathroom basin of contact lens users and 7 isolates from patients with keratitis in National Taiwan University Hospital. *Acanthamoeba* was not detected in contact lens box, normal saline, contact lens care fluid and disposable contact lenses. Among the 24 isolates, 19 were identified as *Rns* genotype T4, 3 were *Rns* genotype T3 and 2 *Rns* genotype T6. Thus most *Acanthamoeba* strain isolated from home water supplies of contact lens users and patients with keratitis in National Taiwan University Hospital belong to *Rns* genotype T4, which agree with findings of similar studies abroad.

目 錄

第一章 前言.....	1
第二章 材料與方法.....	8
一、採檢對象.....	8
二、採檢方法.....	8
三、檢體之培養.....	8
四、核苷酸粹取及聚合酶反應.....	9
五、DNA 定序及親緣分析.....	10
第三章 結果.....	11
一、棘阿米巴之培養.....	11
二、DNA 定序及親緣分析.....	11
第四章 討論.....	13
參考文獻.....	15
圖與附表.....	27
圖一. 棘阿米巴之生活史.....	27
圖二. 棘阿米巴 <i>Rns</i> 中之十二個高度可變區 (expansion segment) 之分布圖.....	28
圖三. ASA.S1 在 <i>Rns</i> 中所在的區域.....	29
圖四. 棘阿米巴之營養體在 100 倍放大倍率下所觀察到的形態.....	30
圖五. 棘阿米巴之囊體在 100 倍放大倍率下所觀察到的形態.....	31
圖六. 油鏡下所觀察到棘阿米巴營養體之形態.....	32
圖七. 油鏡下所觀察到棘阿米巴囊體之形態.....	33
圖八. 培養分離的棘阿米巴蟲株之 DNA, 以 JDP1/2 作為引子所得 <i>Acanthamoeba</i> -specific amplimer S1 (ASA.S1) Region 洋菜糖膠電泳圖.....	34

圖九. Neighbor-joining distance tree based on partial 18S rDNA sequences.35

圖十. Parsimony tree based on partial 18SrDNA sequences.....37

圖十一. 利用 Clustal W 將所得之 T3、T4 型棘阿米巴之 ASA.S1
(*Acanthamoeba*-specific amplimer S1) region 核酸序列與已知
的 DF3 (diagnostic fragment 3) 核酸序列比對.....39

表一. 棘阿米巴之基因型與引起人類疾病，如角膜炎及肉芽腫性腦膜炎
之相關聯性.....41

表二. 本研究參考之 *Rns* 核酸序列及 GeneBank accession numbers.....42

表三. 本研究參考之 DF3 核酸序列及 Gene Bank accession numbers.....43

表四. 本研究分離所得之棘米阿米巴蟲株之核酸序列比對結果.....44

附錄.....45



第一章 前言

棘阿米巴 (*Acanthamoeba* spp.) 為營自由生活之阿米巴原蟲，分布的環境範圍極廣，包括水龍頭、游泳池、瓶裝礦泉水、海水、池塘、污水、淡水湖、鹹水湖、河水、瓶裝蒸餾水、通風設備、水和空氣的接觸面、空調系統、堆肥、土壤、海灘、蔬菜、空氣、外科器具、隱形眼鏡及其保存盒及大氣層等處都曾分離出此原蟲。除此之外，在醫院、血液透析儀、洗眼器、病人的鼻腔、喉嚨、肺組織、皮膚病灶、角膜組織、腦脊髓液、腦組織也曾發現它的蹤跡 (Khan, 2003; Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Schuster & Visvesvara, 2004)。所以在一般健康的人身上可以測得到 anti-*Acanthamoeba* antibodies，而且效價為 1:20 到 1:80，代表著我們常常暴露於這些可能的病原體中而不自知 (Cursons *et al.*, 1980)。

棘阿米巴廣泛存於淡水及海水中 (Culbertson, 1971)；其對酸鹼值的耐受度介於 pH 3.9 到 pH 9.57 間；此蟲在 25-35 °C 的溫度下生長較佳，但實驗證實，在 42 °C 的溫度下，牠仍可於培養基中生長，且致病株更可耐 43 °C 的溫度 (Griffin, 1972)。此外，將其冰凍於 -20 °C 下，三年後仍具有活性 (Culbertson, 1971)。可能由於這些特性，使棘阿米巴能廣存於各種環境中。

棘阿米巴生活史中包含兩種形態：活動之營養體 (active trophozoite) 及呈休眠狀態的囊體 (dormant cyst) (Page, 1967b)。棘阿米巴之營養體，以細菌 (如 *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. 及其他革蘭氏陰性桿菌) 為食物來源 (Page, 1967a; Bottone *et al.*, 1992)。當遇到不適當的環境 例如食物匱乏時，營養體便會囊化 (encyst) 而形成雙層含纖維素囊壁的囊體，囊體較營養體更能抵抗惡劣的環境、氣及其他抗微生物藥劑 (Chang *et al.*, 1985)。當環境有充足的水份及細菌等食物時，囊體便會脫囊 (excyst) 形成營養體繼續其生活史 (Khan, 2006) (圖一)。

棘阿米巴之外形相當特殊，容易辨識。營養體大小介於 20-40 μm ，但會隨著環境中食物的充分與否而改變大小 (Bowers & Korn, 1968; Bovee, 1963)，其形狀扁平而不規則、單核、具有一個大而緻密且位於中心的核仁 (karyosome)，緻密顆粒狀的內質 (endoplasm) 中充滿食物泡及大而明顯的伸縮泡 (contractile vacuole)。以

緩慢的滑行方式運動。棘阿米巴之體表會產生尖細透明能變形的棘狀偽足 (Bowers & Korn, 1968, 1974; Visvesvara & Balamuth, 1975) 。囊體大小約 10-25 μm ，具有雙層囊壁：外層是平滑或具皺摺的外囊壁 (ectocyst wall)；內層是星形、多角形或圓形的內囊壁 (endocyst wall)，有些種類並無內囊臂 (arms) 的構造。

根據 Lee 等 (1985) 之分類法，棘阿米巴在分類學上之地位如下：

原生生物界 (Kingdom Protista)

原生動物亞界 (Subkingdom Protozoa)

肉足鞭毛蟲門 (Phylum Sarcomastigophora)

肉足亞門 (Subphylum Sarcodina)

圓肉足蟲綱 (Class Lobosea)

裸阿米巴亞綱 (Subclass Gymnamoebia)

阿米巴目 (Order Amoebida)

棘阿米巴亞目 (Suborder Acanthopodina)

棘阿米巴科 (Family Acanthamoebidae)

棘阿米巴屬 (Genus *Acanthamoeba*)



以往棘阿米巴的命名是依照發現者、發現的來源及其它的標準來命名。後來經過諸位學者的努力，使得棘阿米巴的分類得以統一。目前傳統的分類法主要是依據 De Jonckheere 與 Page 分別於 1987 及 1988 年修改自 Pussard 及 Pons 1977 年的分類方法 (Visvesvara,1991)。主要將觀察所見之棘阿米巴依其囊體形態分為三群。

第一群

包括下列四種：*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*, *A. tubiashi*。

具有下列特徵：

1. 大的營養體及囊體。
2. 囊體的內壁與外壁間距大。
3. 囊體平均直徑 $\geq 18 \mu\text{m}$ ，且內囊臂 (arms) 少於 6 個--- *A. astronyxis*。
4. 囊體平均直徑 $\geq 25.6 \mu\text{m}$ ，且具有 6-10 個內囊臂 ---*A. comandoni*。
5. 囊體平均直徑 $\geq 25 \mu\text{m}$ ，且具有 12-14 個內囊臂 --- *A. echinulata*。
6. 囊體平均直徑 $\geq 22.6 \mu\text{m}$ --- *A. tubiashi*。

第二群

為最大的一群，包括分布最廣且最常分離出來的棘阿米巴，很多從角膜刮取之檢體、抹片及隱形眼鏡配備中所分離出來的棘阿米巴即屬於此群。包括下列十一種：*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*, *A. hatchetti*, *A. griffin*, *A. triangularis*, *A. divionensis*, *A. pardivionensis*, *A. mauritaniensis*, *A. lugdunensis* 及 *A. quina*。

具有下列特徵：

1. 囊體平均直徑 $< 18 \mu\text{m}$ 。
2. 兩層囊壁緊靠或有很大的間距。
3. 外囊壁或厚或薄，通常呈皺摺或乳頭狀。
4. 內囊壁可能為星形、多角形、三角形，偶爾呈圓形或卵圓形。

其中前四種是在已知會造成角膜炎的五種棘阿米巴的名單之中。

第三群

包括下列五種：*A. culbertsoni*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa*, *A. royreba* 及 *A. lenticulata*，其中第一種已知會造成角膜炎。具有下列特徵：

1. 囊體平均直徑 $< 18 \mu\text{m}$ 。
2. 外囊壁薄，有波紋或無波紋。
3. 內囊壁通常呈圓形，但可能有三到五個角。

棘阿米巴原先被認為對動物及人體不具致病性，直到 1958 年，因其污染了用以培養小兒麻痺病毒 (polio virus) 疫苗的恆河猴腎臟細胞組織培養，而造成實驗動物的死亡，Culbertson 才發現許多株的棘阿米巴會造成實驗動物之急性腦膜炎 (acute meningoencephalitis) (Culbertson *et al.*, 1958, 1959)。其於人體可能造成下列疾病：

1. 肉芽腫性阿米巴腦炎 (granulomatous amoebic encephalitis, GAE)

為伺機性感染，通常發生於身體衰弱或免疫力受抑制的病人 (Martinez, 1985) 包括愛滋病 (AIDS) 患者、糖尿病患者、酒精中毒者及接受放射治療的病人等。其為可致死的感染，與福氏內格里阿米巴 (*Naegleria fowleri*) 所造成的急性原發性阿米巴腦膜腦炎 (primary amoebic meningoencephalitis) 不同，因其為亞急性或慢性腦炎，其營養體及囊體兩者皆可並存於中樞神經系統的組織中，通常會形成肉芽腫 (Martinez, 1985, 1991)。

棘阿米巴之感染方式通常與游泳或暴露於水中無關，推測先自身體其他部位感染，大部份可能由肺、皮膚或黏膜潰瘍等原發病灶轉進血液循環而侵襲腦部。除此之外，近年來的研究發現，嗅覺神經上皮細胞 (olfactory neuroepithelium) 提供了棘阿米巴侵襲中樞神經系統的另一條路徑 (Martinez, 1991; Martinez & Visvesvara, 1997)。

2. 棘阿米巴角膜炎 (*Acanthamoeba keratitis*)：

第一個診斷出的棘阿米巴角膜炎病例是 1973 年發現報告的，患者為一德克薩斯州的牧場工人，其一隻眼睛受到創傷後，可能用被棘阿米巴污染的自來水清洗

眼睛而受感染 (Jones *et al.*, 1975; Visvesvara & Balamuth, 1975)。接著 10 年內僅有 10 個病例報告，但自 1985 年以後病例急速增加。Stehr-Green 等 (1989) 整理 208 個棘阿米巴角膜炎病例，其中大部份 (85%) 是因為配戴隱形眼鏡所造成的感染。

Klink 等 (1993) 以中華倉鼠 (Chinese hamster) 做實驗，發現角膜上皮的損傷會促使棘阿米巴侵入；且除非角膜在暴露於黏附了棘阿米巴的隱形眼鏡前先受傷，否則絕對不會造成棘阿米巴角膜炎。亦即，要造成棘阿米巴角膜炎，角膜擦傷是絕對必要的條件。

不論何種隱形眼鏡，如果超時戴用，或裝配不良，均可引起角膜缺氧，缺氧的角膜因無氧性代謝作用而累積大量的乳酸，使上皮細胞發生水腫，水腫嚴重時乃導致細胞破裂而造成表皮缺損 (丘等, 1987)。實驗發現棘阿米巴可黏附於各種材質的隱形眼鏡上，特別是軟式隱形眼鏡 (John *et al.*, 1989; Larkin *et al.*, 1990)，Beattie *et al.* (2003) 發現相較於沒有配戴過的隱形眼鏡鏡片，棘阿米巴較喜歡黏附在曾配戴過的隱形眼鏡鏡片上。因為用過的隱形眼鏡鏡片含有 mannose，而棘阿米巴之表面具有 mannose binding protein 因此可以專一性的結合。至於非配戴隱形眼鏡者，其感染途徑可能為輕微的角膜創傷，同時帶入環境中的棘阿米巴 (Mergeryan, 1991)。

棘阿米巴角膜炎是一種慢性潰瘍性角膜炎 (Nieder Korn *et al.*, 1999)。症狀包括：流淚、畏光、眼瞼痙攣、刺激感、異物感、視力減損及疼痛。感染嚴重者，角膜潰瘍可能造成穿孔 (Auran *et al.*, 1987; Hirst *et al.*, 1984; Lindquist *et al.*, 1988)，倘若不及早治療則可能導致失明甚至失去眼球 (Key *et al.*, 1980)。因此早期正確診斷、積極且適當地施以局部抗阿米巴藥物治療，有時配合進行角膜移植術 (Awwad *et al.*, 2007) 是非常重要的。

3. 其他：

包括侵犯耳朵 (Jakovljevic & Talis, 1969)、皮膚 (Torno *et al.*, 2000) 等少數報告。

研究發現，相同的蟲株以不同離子濃度之生長基培養，囊體的形態也會有所

不同 (Sawyer, 1971)；此外 Isoenzyme 分析顯示，形態學對於棘阿米巴的分型並非絕對可靠 (Costas & Griffiths, 1980, 1984, 1985; Daggett *et al.*, 1982; De Jonckheere, 1983)。隨著分子生物學技術的進步，Stothard 等 (1998) 提出了利用棘阿米巴的 18 S rRNA 基因 (*Rns*) (表一) 序列來作為分類的依據。依此可將棘阿米巴分為 T1-T15 十五種不同的基因型 (Khan, 2006)。而不同的基因型之間其序列至少有 5% 的差異。Maghsood 等 (2005) 再將 T2 基因型細分為 T2a 及 T2b 兩型。其中半數尚未發現會造成人類的感染，三者與腦炎有關 (T1, T10 及 T12)，四者與角膜炎有關 (T2a, T3, T6 及 T11)，而 T4 與兩種疾病皆有關 (表一)。

利用傳統的分類鑑定，無法得知所得到的蟲株是否具有致病性，如：*A. castellanii* 的蟲株中，有的毒力較強，有的毒力較弱，有的則不具有毒力。而利用棘阿米巴之 18 S rRNA 基因序列來作為分類的依據，則可由所得的基因型來判斷此蟲株是否具有致病性 (表一) (Khan, 2006; Maghsood *et al.*, 2005)。因此近年來，多採用基因分型來作為分類的依據。

真核細胞的 *Rns* (18S rRNA gene) 平均大小為 1,800-1,900 bp，可是棘阿米巴之 *Rns* 在十二個區域有額外增加的鹼基 (圖二) (Gast *et al.*, 1996)。這些區域是 Gunderson 和 Sogin (1986) 在比較 *A. castellanii* 和其它真核生物之 18S rRNA gene sequence 時發現的，他們稱這些區域為 "expansion segment"。以形態學分類的第二群和第三群棘阿米巴之 *Rns* 平均約為 2,300 bp，而形態學中第一群棘阿米巴之 *Rns* 平均則為 2,600-2700 bp (Stothard *et al.*, 1998)。

以形態來分類的三群與以 *Rns* 基因分型的棘阿米巴之間的相關性如下：第一群棘阿米巴之 *Rns* 基因型主要為 T7，T8 及 T9；第二群棘阿米巴之 *Rns* 基因型主要為 T3，T4 及 T11；而第三群棘阿米巴之 *Rns* 基因型則為 T1，T2，T5，T6，T10 和 T12 (Stothard *et al.*, 1998)。

目前台灣作自由生活阿米巴相關研究的有：李 (1994) 自民國八十二年十二月至民國八十三年五月間，於大台北地區對公共場所盥洗台周圍平台採取污水、塵埃等檢體共 186 組，其中 178 例 (95.7%) 檢出有自由生活阿米巴；而 65 例 (35

%) 檢出棘阿米巴。而這 65 例中，第二群佔極大多數 (98.5%)。以及黃 (1994) 針對台北地區土壤及淡水內自由生活性阿米巴之研究。

近視的人口在台灣有逐漸增加的趨勢 (Ko, 1984; 林 等, 2001)。隱形眼鏡自 1957 年開始引進台灣，目前已成為視力矯正常用的方法之一。近年來配戴隱形眼鏡的人數雖然未有正式的統計報告，但從坊間眼鏡店林立的情形來估算，也應不在少數。

隱形眼鏡依據製作材料，大抵可以區分為軟式隱形眼鏡與硬式隱形眼鏡這兩大類。硬式隱形眼鏡主要材質為 polymethylmethacrylate (PMMA)，其優點為：光學性佳、矯正散光效果好、壽命長 (3~5 年)、易清洗、感染率低；而缺點則為：適應期長、異物感較重、滑動度大易移位。軟式隱形眼鏡之主要材質為 hydroxyethylmethacrylate (HEMA)，其優點為：適應期短、戴起來較舒服、穩定性好、間歇性配戴者可以隨時戴用；而缺點為：光學性較差、易破裂、易有沈積物、難清理、壽命短 (1~2 年)、較易引起結膜炎、感染率較高。雖然兩種材質各有其優缺點，不過針對配戴之舒適度而言，軟式隱形眼鏡較舒服，所以在台灣，隱形眼鏡材質主要以軟式隱形眼鏡為主 (林等, 2001; 林等, 2005)。隱形眼鏡配戴者角膜炎的病原以綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 最為主要，其次為黴菌，再其次則為棘阿米巴原蟲 (Fong *et al.*, 2004)。

調查顯示，罹患棘阿米巴角膜炎絕大部分與配戴軟式隱形眼鏡有關 (Stehr-Green *et al.*, 1989)。當配戴隱形眼鏡不當造成角膜上皮受損及隱形眼鏡上污染了棘阿米巴及細菌兩個條件兼具時，便可能造成棘阿米巴角膜炎。而隱形眼鏡上的棘阿米巴，可能來自污染的隱形眼鏡保養液 (Donzis *et al.*, 1987; Seal *et al.*, 1992) 或不潔的手，另外，亦有可能當換戴隱形眼鏡時受盥洗台上灰塵污水所污染。目前台灣棘阿米巴的檢查主要還是有賴於傳統的培養方法，但是以形態學分類較為困難。因此除利用培養法之外，亦探討利用 *Rns* 分析作進一步的基因分型之可行性。本研究收集隱形眼鏡配戴者其盥洗台及清潔保養液，培養棘阿米巴，並進而利用 *Rns* 分析作進一步的基因分型。

第二章 材料與方法

採檢對象

本實驗之研究對象為配戴隱形眼鏡者。配戴長戴型隱形眼鏡者，收集其拋棄液、生理食鹽水、隱形眼鏡保存盒擦拭物及盥洗台擦拭物。配戴拋棄式隱形眼鏡者，則收集其已使用過之拋棄式隱形眼鏡及盥洗台擦拭物。此外，台大醫院 2006 年 9 月~2008 年 6 月，送檢之疑似感染棘阿米巴患者之角膜刮取物，亦一併培養檢查。

一、採檢方法

依受試者所配戴隱形眼鏡的種類，給予適合的採檢管及採檢說明書（附錄一，附錄二）。

二、檢體之培養

將回收到的檢體編號，隱形眼鏡保存盒擦拭物及盥洗台擦拭物分別加入 3 ml 無菌去離子水混合均勻後，連同拋棄液及生理食鹽水等檢體離心後取沉澱物。再將沉澱物接種到塗有大腸桿菌的 Page's ameba saline agar plate (Martinez, 1985) (附錄三) 中央，並標明編號。再將此培養皿置於 30°C 的恆溫箱中培養，從第二天開始，連續觀察七天阿米巴的生長情形 (李, 1994)。以光學顯微鏡 100 倍作整個培養皿初步的觀察。疑似有棘阿米巴生長，則於載玻片上滴一滴 Page's ameba saline，以無菌的塑膠接種環刮取培養基表面產物並與 Page's ameba saline 混合均勻，以 1000 倍的油鏡觀察其細部構造。若連續七天均未觀察到棘阿米巴生長之培養皿，則滅菌後丟棄。



三、核苷酸粹取及聚合酶反應

將培養好的蟲株用棉棒沾取調成懸浮液，離心去上清液，加入 600 μ l lysis buffer (附錄四) 後置於水浴 55°C 40 分鐘，加入 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)，離心 12500 rpm 5 分鐘，留上層液。重複上個步驟一次後，加入 600 μ l isopropanol 和 30 μ l 0.85 % NaCl 置於 -20°C 40 分鐘。將其離心離心 12500 rpm 10 分鐘去上清液，加入 200 μ l 70 % EtOH 清洗兩次，使其乾燥後，加入 60 μ l 無菌二次水使 DNA 溶解。取 DNA solution 來進行 PCR 反應，加入 primer 及 50 mM MgCl₂。PCR cycle 如下: 95°C incubated 7 分鐘，接著 45 個 cycle 的 95°C 1 分鐘、60°C 1 分鐘及 72°C 2 分鐘，最後再 72°C 5 分鐘 (Schroeder *et al.*, 2001)。

本實驗採用 forward primer JDP1 (5'- GGCCCAGATCGTTTACC GTGAA) 及 reverse primer JDP2 (5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA) 來 amplify *Acanthamoeba*-specific amplicon S1 (ASA.S1) region。ASA.S1 region 之大小約為 423~551 bp，位於 18S rRNA 之 936 bp 到 1402 bp 間 (Schroeder *et al.*, 2001) (圖三 A)。此 amplify region 為 18S rRNA 二級結構中的 stems E23-2 到 -30，十二個高度可變區 (expansion segment) 中就佔了三個 (Gast *et al.*,) (圖三 B)。JDP1 primer 可與棘阿米巴 *Rns* 中之 E23-2' 及 E-23-6 結合。本實驗使用 892C primer (5'-GTCAG AGGTG AAA TTCT TGG) 當作 sequencing primer 來 amplify bp1271~bp1383，此 amplify region 包括了部分的 conserved stem 29 及 stem 29-1 全部，stem 29-1 為棘阿米巴 *Rns* 中之十二個高度可變區 (expansion segment) 之一。本實驗便是利用 stem 29-1 作為基因分型的依據 (Schroeder *et al.*, 2001)。

Diagnostic fragment 3 (DF3) encodes *Rns* 中含高度可變區 stem 29-1 (Stothard *et al.*, 1998; Schroeder *et al.* 2001)，先前學者利用 DF3 將其所得之 T3、T4 型棘阿米巴之 *Acanthamoeba*-specific amplicon S1 (ASA.S1) region 進一步再分型，T3 可再細分成五個亞型 (T3/1~T3/5)；T4 則可再細分成十個亞型 (T4/1 ~T4/10) (Booton *et al.*, 2002)。

四、DNA 定序及親緣分析 (Phylogenetic analysis)

將 PCR 產物跑電泳，電泳膠為 2% agarose，在 500 bp 左右有 band 出現的 PCR 產物利用 PCR Clean Up Kit 將 DNA 純化出來。接著加入 892C primer (5'-GTCAG AGGTGAAA TTCTTGG) 送交國立台灣大學附設醫院第二共同研實驗室，進行核酸序列分析。利用 ABI 3730 DNA Analyzer 進行 DNA 定序。利用 Clustal W 軟體將所得的核酸序列與已知的核酸序列 (Stothard *et al.*, 1998) (表二) 進行比對。再以 MEGA 4 軟體 (Molecular Evolution Genetic Analysis software, ver 4; <http://www.megasoftware.net/> developed by S. Kumar *et al.*, Arizona State University, Tempe, AZ)，使用 neighbor joining analysis、Kimura's (1980) two-parameter distance 計算參數、1000 次的 bootstrap 值 (Felsenstein, 1985)，由兩兩基因序列置換的情形來分析建構出所有可能接近真實的親緣樹。也使用 maximum parsimony analysis、1000 次的 bootstrap 值來分析並建構出 parsimony tree。

此外亦利用 Clustal W 將本實驗所得之 T3、T4 型棘阿米巴之 ASA.S1 region 核酸序列與已知的 DF3 核酸序列比對進一步再分型 (Booton *et al.*, 2002) (表三)。

第三章 結 果

一、棘阿米巴之培養

由於各檢體中棘阿米巴生長速度並非相同，於接種後第一天以 100 倍顯微鏡觀察時，有的營養體已佈滿整個培養基，甚至已開始形成囊體，有的仍無棘阿米巴生長（圖四，圖五）。將營養體從培養基轉置於 Page's amoeba saline 中，以油鏡觀察可見到棘阿米巴之偽足表面有尖刺透明的棘狀偽足，顆粒狀的內質內有一至數個明顯的伸縮泡及一個細胞核，大而緻密的核仁位於其中央（圖六）。接種後第三天觀察時，可見到一部份棘阿米巴已形成星形、多角形、或橢圓形的囊體。將囊體從培養基轉置於 Page's amoeba saline 中，以油鏡觀察可見到囊體具有雙層囊壁（圖七）。

研究期間共收集了 168 組長戴型隱形眼鏡配帶者的清潔保養液及盥洗台之檢體及 29 組拋棄式隱形眼鏡配帶者之檢體。其中僅盥洗台擦拭物培養出棘阿米巴，長戴型隱形眼鏡配帶者之檢體有 16 例培養陽性（檢體序號：22、39、50、62、67、71、77、92、100、112、114、118、141、144、151、155），而拋棄式隱形眼鏡者則僅 1 例培養陽性（檢體序號：26）。而拋棄液、隱形眼鏡保存盒擦拭物、生理食鹽水及拋棄式隱形眼鏡鏡片皆未培養出棘阿米巴原蟲。台大醫院 2006 年 9 月~2008 年 6 月，由疑似感染棘阿米巴患者之角膜刮取物作培養則培養出 7 個棘阿米巴蟲株（檢體序號：2390、2412、2628、2720、2782、2835、3265），共培養出 24 個蟲株。另有標準蟲株 *A. castellanii* (ATCC30234) 一株，作為對照組。

二、DNA 定序及親緣分析

將以上 25 株棘阿米巴原蟲，以 JDP1/2 作為 primer 共得 25 個 ASA.S1 PCR 產物（圖八）。檢體序號分別為：22、26、39、50、62、67、71、77、92、100、112、114、118、141、144、151、155、2390、2412、2628、2720、2782、2835、3265 及 *A. castellanii* (ATCC30234)。

Neighbor-joining analysis 以及 maximum parsimony analysis 親緣分析 (圖九、圖十) 顯示。標準株 *A. castellanii* (ATCC30234) 為 T4 型無誤，而此次分離的二十四個蟲株之 *Rns* 多屬 T4 型，共 19 株，其他有兩株 (檢體序號：141、144) 之核酸序列與 T6 型者相似，三株 (檢體序號：26、118、2835) 與 T3 型相似 (表四)。

接著將所分離出來之二十株 T4 蟲株及三株 T3 蟲株之核酸序列與先前學者利用 DF3 將其所得之 T3、T4 型棘阿米巴之 ASA.S1 region 進一步再分型所得之亞型 (Booton *et al.*, 2002) 之核酸序列比對。其中有四個 T4 蟲株 (檢體序號：114、155、2782、3265) 之核酸序列屬於 T4/6 亞型；有三個 T3 蟲株 (檢體序號：26、118、2835) 之核酸序列屬於 T3/4 亞型 (圖十一；表四)。

Rns 屬 T4 型者，來自患者的蟲株 2390 及 2412 與標準株 *A. castellanii* (ATCC30234) 最相近。



第四章 討論

棘阿米巴角膜炎是非常嚴重可威脅視力的眼部感染，而隱形眼鏡配戴者是罹患棘阿米巴角膜炎的高危險群。美國疾病管制局統計一九七三年到一九八六年，棘阿米巴原蟲入侵眼睛的總發生率只有百萬分之一到二。由於棘阿米巴原蟲不屬於法定傳染病所以近年來棘阿米巴感染相關統計較為不易。

2005 年，美國眼力健公司生產的「全能水潤配方多功能保養液」(Complete MoisturePlus Multipurpose Solution)，發生產品受棘阿米巴污染，美國疾病管制中心與食品藥物管理局徹查 35 州與波多黎各，確認 138 個棘狀阿米巴原蟲角膜炎病例、並訪查其中 46 例，發現配戴軟式隱形眼鏡的 36 人中，21 人在發病前一個月使用眼力健 (Advanced Medical Optics, AMO) 全能水潤配方多功能保養液，有 14 人更是只用這款藥水。此為近年來，較為嚴重的棘阿米巴原蟲 outbreak。

國內過去的病例數也非常少，一年可能不到一位病例 (Fong *et al.*, 2004)，但最近幾年來病患有增加之趨勢。就台大醫院而言，1992~1996 年棘阿米巴病例數為 3 例，1997~2001 年病例數為 8 例，到 2002~2006 年病例數增加到 28 例，病例數增加並非環境改變，應該是與隱形眼鏡使用者越來越多有關。

因此有必要去探討隱形眼鏡受棘阿米巴污染的種種可能因素。隨著分子生物學技術的進步，Stothard 等 (1998) 提出了利用棘阿米巴的 18 S rRNA 基因序列作為分類的依據。依此可將棘阿米巴分為十五種不同的基因型，可由所得的基因型來判斷此蟲株是否具有致病性，彌補了無法利用傳統分類鑑定得知所得之蟲株是否具有致病性之缺憾。

由此次的調查研究顯示，197 組隱形眼鏡配戴者其盥洗台及清潔保養液之檢體中，我們從盥洗台檢體分離出 17 株棘阿米巴 (8.6%)，此點與最近國外學者 (Boost *et al.*, 2008) 研究所得的 10% 相似。但隱形眼鏡盒、生理食鹽水、隱形眼鏡清潔保養液及拋棄式隱形眼鏡鏡片皆未培養出棘阿米巴原蟲。

由盥洗台培養出的棘阿米巴原蟲，絕大部分 (79.2%) 屬 T4 基因型；T3 型及 T6 型分別占 12.5% 及 8.3%，此次的調查研究沒有分離出此三型以外之基因型。由先前學者 (Schuster & Visvesvara, 2004) 的研究得知，此三型棘阿米巴皆會造成棘阿米巴角膜炎。因此推測盥洗台上的汗水塵埃是汙染隱形眼鏡盒及保養液甚至鏡片很重要的環境因子。但受檢者所送之其他檢體棘阿米巴培養均為陰性，顯示其使用及保養隱形眼鏡之方式都還正確。

由罹患棘阿米巴角膜炎患者之角膜刮取物培養出之棘阿米巴蟲株共七株，其中六例 (85%) 屬 T4 型，僅一例為 T3 型。由棘阿米巴角膜炎患者所分離出來的大多為 T4 型，此點與最近國外學者 (Booton *et al.*, 2005) 研究所得是一致的。研究發現，環境中之棘阿米巴其主要為 T4 基因型，因此可說明從棘阿米巴角膜炎患者所分離出來之蟲株主要也為 T4 基因型 (Stothard *et al.*, 1998; Booton *et al.*, 2005)。

一般而言由原蟲所引起的健康問題，大部分發生在熱帶及亞熱帶較落後的開發中國家，然而人類的角膜疾病——棘阿米巴角膜炎卻大部分發生在經濟較富裕的已開發工業國，主要就是因為此症與配戴隱形眼鏡有關。棘阿米巴角膜炎是一種容易誤診且不易治療的疾病，因此預防工作便顯得格外重要。Moore 等 (1987) 指出，患者的隱形眼鏡受棘阿米巴汙染者，62% 源自於利用蒸餾水及食鹽自行配製的生理食鹽水；16% 則是利用自來水沖洗隱形眼鏡。此外亦曾從患者的隱形眼鏡盒及保養液中分離出蟲體，因此避免隱形眼鏡系列受環境汙染及嚴格的鏡片衛生要求是預防的最佳方法。

本實驗目前僅止於調查隱形眼鏡配戴者其盥洗台及清潔保養液之棘阿米巴分布情形，並依 18S rRNA 將其分型，及收集到一些臨床蟲株。後續的工作便是繼續收集臨床之棘阿米巴蟲株，再做基因分型與抗生素感受性試驗，以進一步探討其於臨床用藥治療之重要性。

參考文獻

Auran JD, Starr MB, Jakobiec FA, 1987. *Acanthamoeba* keratitis. A review of the literature. *Cornea* 6: 2-26.

Awwad ST, Petroll WM, McCulley JP, Cavanagh HD, 2007. Updates in *Acanthamoeba* keratitis. *Eye Contact Lens* 33: 1-8.

Beattie TK, Tomlinson A, McFadyen AK, Seal DV, Grimason AM, 2003. Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection? *Ophthalmology* 110: 765–771.

Bottone EJ, Madayag RM, Qureshi MN, 1992. *Acanthamoeba* keratitis: synergy between amebic and bacterial cocontaminants in contact lens care systems as a prelude to infection. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 2447-2450.

Booton GC, Kelly DJ, Chu Y-W, Chu YW, Seal DV, Houang E, Lam DSC, Byers TJ, Fuerst PA, 2002. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1621–1625.

Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelly DJ, Fuerst PA, 2005. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1689-93.

Boost M, Cho P, Lai S, Sun WM, 2008. Detection of acanthamoeba in tap water and contact lens cases using polymerase chain reaction. *Optometry and Vision Science* 85: 526-530.

Bovee EC, 1963. Studies concerning the effects of nutrition on morphology of amoeba. II. *Acanthamoeba castellanii* (Douglas) on abundant and starvation quantities. *The American Midland Naturalist* 69: 173-181.

Bowers B, Korn ED , 1968. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. *The Journal of Cell Biology* 39: 95-111.

Bowers B, Korn ED, 1974. Localization of lipophosphoglycan on both sides of *Acanthamoeba* plasma membrane. *The Journal of Cell Biology* 62: 533-540.

Chang JCH, Ossoff SF, Lobe DC, Dorfman MH, Dumais CM, Qualls RG, Johnson JD, 1985. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 1361-1365.

Costas M, Griffith AJ, 1980. The suitability of starch-gel electrophoresis of esterases and acid-phosphatases for the study of *Acanthamoeba* taxonomy. *Archiv für Protistenkunde* 123: 272-279.

Costas M, Griffith AJ, 1984. The esterases and acid-phosphatases of *Acanthamoeba* (Amoebida, Acanthamoebidae). *Protistologica* 20: 27-31.

Costas M, Griffith AJ, 1985. Enzyme composition and the taxonomy of *Acanthamoeba*. *Journal of Protozoology* 32: 604-607.

Culbertson CG, 1971. The pathogenicity of soil amoebas. *Annual Review of Microbiology* 25: 231-254.

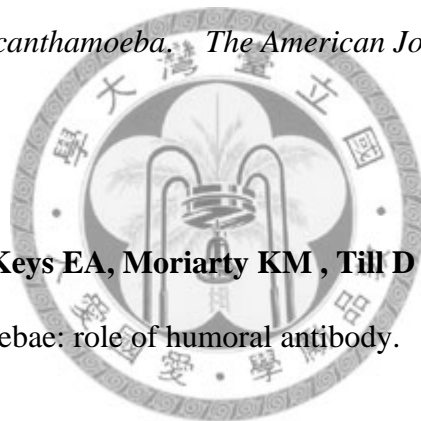
Culbertson CG, Smith JW, Miner JR , 1958. *Acanthamoeba* observation on animal pathogenicity. *Science* 127: 1506.

Culbertson CG, Smith JW, Cohen HK ,Miner JR , 1959. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *The American Journal of Pathology* 35: 185–197.

Cursons RT, Brown TJ, Keys EA, Moriarty KM , Till D , 1980. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infection and Immunity* 29: 401–407.

Daggett PM, Sawyer TK, Nevad TA, 1982. Distribution and possible interrelationships of pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* from aquatic environments. *Microbial Ecology* 8: 371-386.

De Jonckheere JF, 1983. Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *Journal of Protozoology* 30: 701-706.

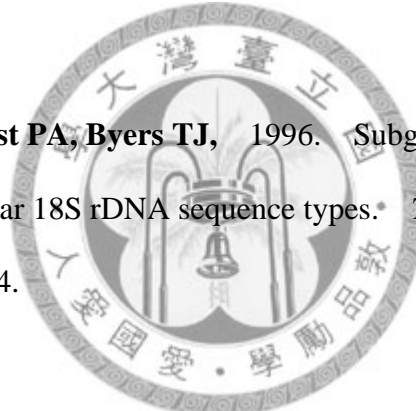


Donzis PB, Mondino BJ, Weissman BA, Bruckner D A, 1987. Microbial contamination of contact lens care systems. *American Journal of Ophthalmology* 104: 325-333.

Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Fong CF, Tseng CH, Hu FR, Wang IJ, Chen WL, Hou YC, 2004. Clinical characteristics of microbial keratitis in a university hospital in Taiwan. *American Journal of Ophthalmology* 137: 329-36.

Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, Byers TJ, 1996. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: Four nuclear 18S rDNA sequence types. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 43: 498-504.



Griffin JL, 1972. Temperature tolerance of pathogenic and non – pathogenic free-living amoebas. *Science* 277: 1174-1179.

Gunderson JH, Sogin ML, 1986. Length variation in eukaryotic rRNA: small subunit rRNA from the protists *Acanthamoeba castellanii* and *Euglena gracilis*. *Gene* 44: 63-70.

Gutell RR, 1994. Collection of small subunit (16 S and 16 S-like) ribosomal RNA structures. *Nucleic Acids Research* 22: 3502-3507.

Hirst LW, Green WR, Merz W, Kaufmann C, Visvesvara GS, Jensen A, Howard M, 1984 Management of *Acanthamoeba* keratitis. A case report and review of the literature. *Ophthalmology* 91: 1105-11.

Jakovljevič R, Talis B, 1969 Recovery of a hartmanelloid ameba in the purulent discharge from a human ear. *The Journal of Protozoology* 16(suppl): 36

John T, Deai D, Sahm D, 1989. Adherence of *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites to unworn soft contact lenses . *American Journal of Ophthalmology* 108: 658-664.

Johnson AM, Fielke R, Christy PE, Robinson B, Baverstock PR, 1990. Small subunit ribosomal RNA evolution in the genus *Acanthamoeba*. *Journal of General Microbiology* 136: 1689-1698.

Jones DB, Visvesvara GS, Rovinson NM, 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. *Transactions of the Ophthalmological Societies of the United Kingdom* 95: 221-232.

Key SN 3rd, Green WR, Willaert E, Stevens AR, Key SN Jr, 1980 Keratitis due to *Acanthamoeba castellanii*. A clinicopathologic case report. *Archives of Ophthalmology* 98: 475-9.

Khan NA , 2003. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbial Pathogenesis* 34: 277–285.

Khan NA, 2006. *Acanthamoeba* : biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews* 30 : 564–595.

Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

Klink F, Alizadeh H, He Y, Mellon JA, Silvany RE, McCulley JP, Niederkorn JY, 1993. The role of contact lenses, trauma, and Langerhans cells in a Chinese hamster model of *Acanthamoeba* keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 34: 1937-44.

Ko LS, 1984. The problem of myopia in Taiwan. *Korean Journal of Ophthalmology* 25: 591-604



Larkin DF, 1991. *Acanthamoeba* keratitis. *International Ophthalmology Clinics* 31: 163-172.

Larkin DF, Kilvington S, Easty DL, 1990. Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria. *The British Journal of Ophthalmology* 7: 133–135.

Lindquist TD, Doughman DJ, Rubenstein JB, Moore JW, Campbell RC, 1988 .
Acanthamoeba-contaminated hydrogel contact lenses. Susceptibility to disinfection. *Cornea* 7: 300-303.

Lee SM, Choi YJ, Chung DL, 1997. Contamination of *Acanthamoeba* in contact lens care system. *Korean Journal of Ophthalmol* 38:531.

Lee JJ, Hutner SH, Bovee EC, 1985. An illustrated guide to the protozoa. *Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas U.S.A*

Maghsood AH, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA, 2005. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology* 54: 755–759.

Marciano-Cabral F, Cabral G, 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 273–307.

Martinez AJ, 1985. Free-Living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Martinez AJ, 1987. Clinical manifestation of free-living amebic infection. In: Rondanelli E.G. (ed). Amphizoic amoebae : human pathology. Piccin, Padua, Italy. PP. 161-177.

Martinez AJ, 1991. Infections of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases* 13: S399–S402.

Martinez AJ, Visvesvara GS, 1991. Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria, Acanthamoeba, and Leptomyxid*. *Clinics in Laboratory Medicine*

11: 861–872.

Martinez AJ & Visvesvara GS, 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 7: 583–598.

Melissa KH , Bret SB , Paul TM , Christopher PS, 2003. Identification of a new *Acanthamoeba* 18S r RNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara,1992 (Lobosea : Acanthamoebidae). *Acta Protozoologica* 42: 325-329.

Mergeryan H, 1991. The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Reviews of Infectious Diseases* 13 Suppl 5: S390-1.

Moore MB, McCulley JP, Newton C, Cobo LM, Foulks GN, O'Day DM, Johns KJ, Driebe WT, Wilson LA, Epstein RJ, 1987 *Acanthamoeba* keratitis. A growing problem in soft and hard contact lens wearers. *Ophthalmology* 94: 1654-61.

Neefs JM, Van de Peer YD, De Rijk P, Chapelle S, De Wachter R, 1993. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Research* 21: 3025-3049.

Nieder Korn JY, Alizadeh H, Leher H, McCulley JP, 1999. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes and infection* 1:437–443.

Page FC, 1967a. Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *The Journal of Protozoology* 14: 499–521.

Page FC, 1967b. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *The Journal of Protozoology* 14: 709–724.

Page FC, 1988. A New Key to Fresh Water and Soil Amoebae. Freshwater Biological Association Scientific Publications, Cumbria, UK.

Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Sawyer T, 1971. *Acanthamoeba griffini* a new species of marine amoeba. *The Journal of Protozoology* 18: 650–654.

Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ, 2001. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1903–1911.

Schuster FL, Visvesvara GS, 2004. Free-living amoebae as opportunistic and nonopportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology* 34: 1001–1027.

Seal D, Stapleton F, Dart J, 1992. Possible environmental sources of *Acanthamoeba* spp in contact lens wearers. *The British Journal of Ophthalmology* 76: 424-427.

Singh BN , Das SR, 1970. Studies on pathogenic and nonpathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order Amoebida. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.Series A: Mathematical and Physical Sciences* 259: 435–476.

Stehr-Green JK, Baily TM, Visvesvara GS, 1989. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *American Journal of Ophthalmology* 107: 331–336.

Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ, 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 45: 45-54.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S , 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.

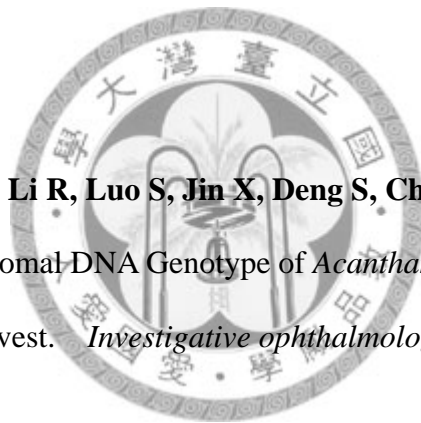
Torno MS Jr, Babapour R, Gurevitch A, Witt MD, 2000. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *Journal of the American Academy of Dermatology* 42:351–354.

Visvesvara GS, 1991. Classification of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases* 13: 369–372.

Visvesvara GS, Balamuth W, 1975. Comparative studies on related free-living and pathogenic amoebae with special reference to *Acanthamoeba*. *The Journal of Protozoology* 22: 245-256.

Visvesvara GS, Martinez AJ, Schuster FL, Leitch GJ, Wallace SV, Sawyer TK Anderson M, 1990. *Leptomyxid amoeba*, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 2750–2756.

Zhang Y, Sun X, Wang Z, Li R, Luo S, Jin X, Deng S, Chen W, 2004. Identification of 18S Ribosomal DNA Genotype of *Acanthamoeba* from Patients with Keratitis in North China Invest. *Investigative ophthalmology & visual science* 45: 1904-1907.



李清真, 1994. 大台北地區公共場所盥洗台伺機性阿米巴—棘阿米巴類之調查研究。國立台灣大學醫學院微生物研究所寄生蟲學組碩士論文。

丘子宏、曾錦華、包麗菊、黃宏仁, 1987. 配戴隱形眼鏡之問題分析. 中華民國眼科醫學會會刊。 26 : 88-91.

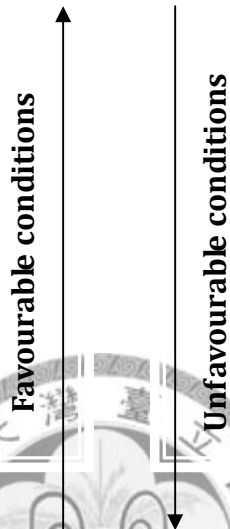
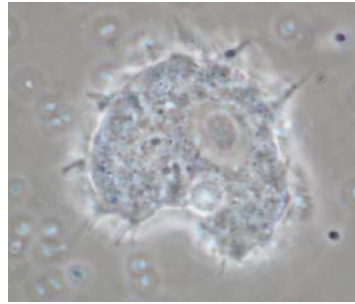
林思源、周文穎、林隆光、潘玟利、施永豐， 2001. 台灣學生隱形眼鏡配戴之狀態—十年之變遷。 中華民國眼科醫學會雜誌 43:320-325.

林耕國、侯鈞賀、楊孟玲、李建興， 2005. 隱形眼鏡。 中華民國眼科醫學會雜誌 44:272-276.

黃國銅， 1994. 針對台北地區土壤及淡水內自由生活性阿米巴之研究。 國立台灣大學醫學院微生物研究所寄生蟲學組碩士論文。



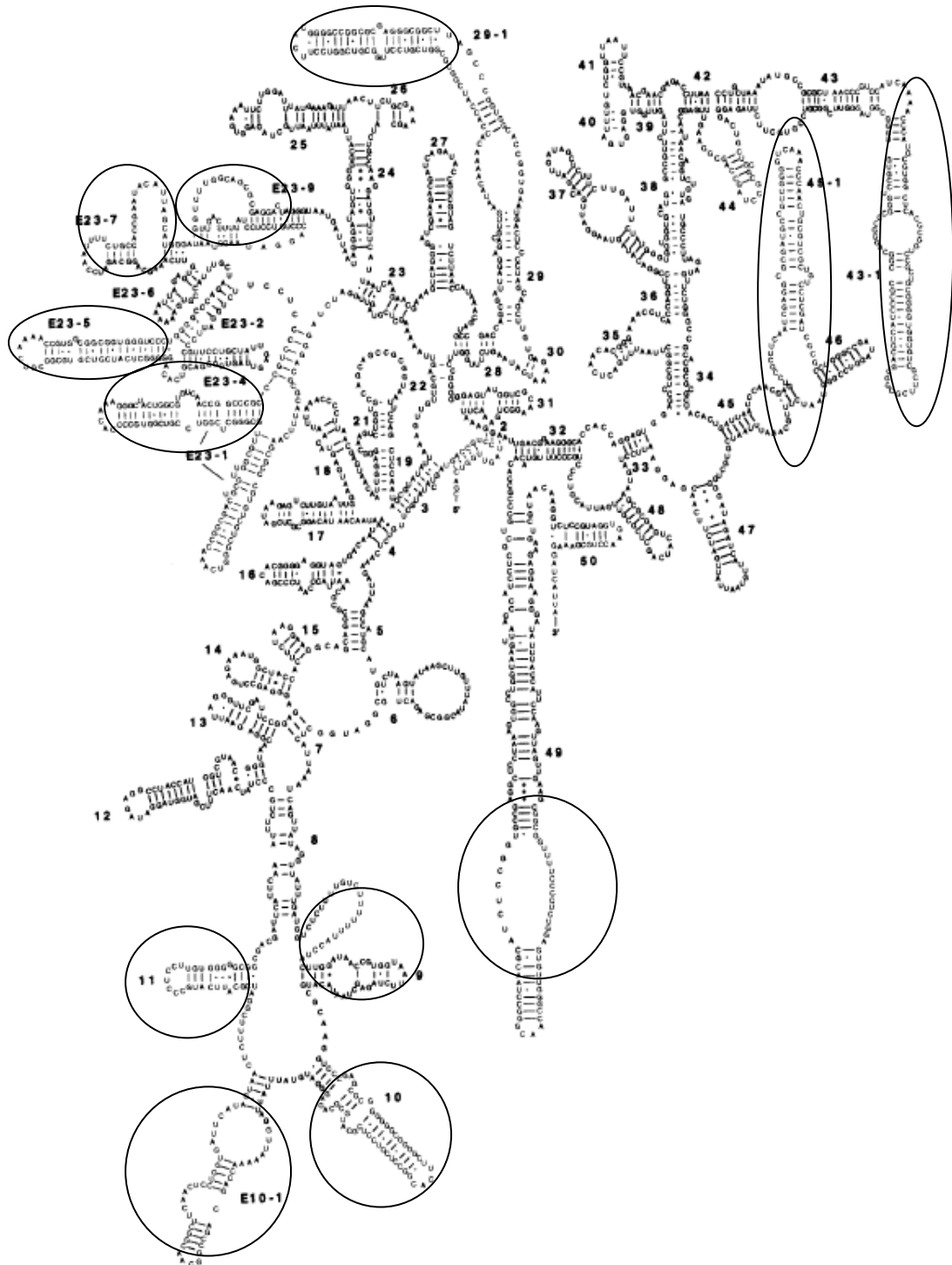
Acanthamoeba trophozoites form



Acanthamoeba cysts form

圖一. 棘阿米巴之生活史

棘阿米巴生活史中包含兩種形態；活動之營養體 (active trophozoite) 及呈休眠狀態的囊體，當遇到不適當的環境 (例如食物被吃完時) 營養體便會囊化 (encyst) 而形成雙層含纖維素囊壁的囊體。

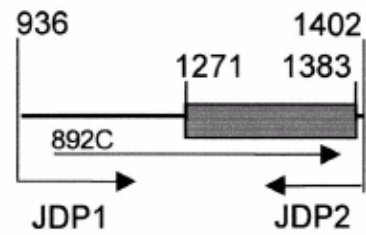


圖二. 棘阿米巴 *Rns* 中之十二個高度可變區 (expansion segment) 之分布圖。

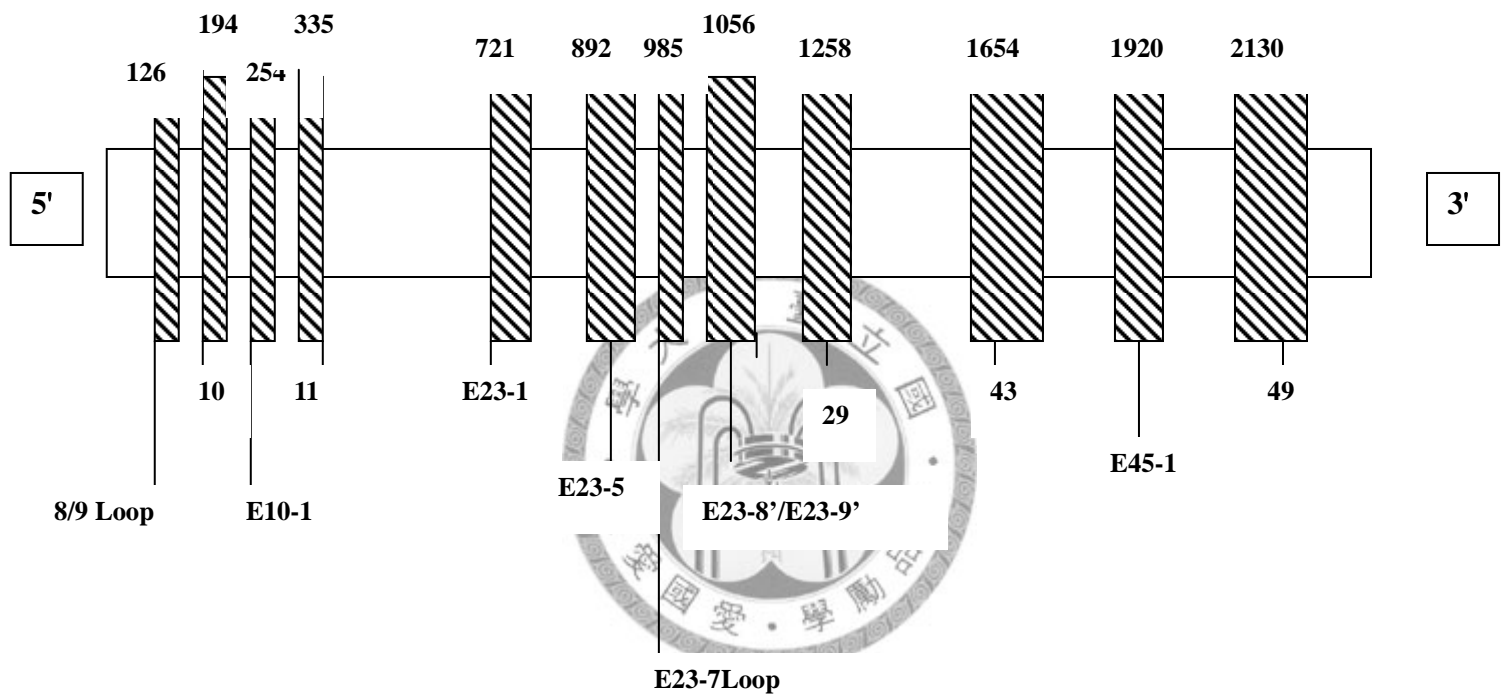
此圖為 Gunderson, Sogin 所繪製 *Acanthamoeba castellanii* 之 18S rRNA 二級結構圖。圈圈區域代表高度可變區 (Stothard *et al.*, 1998)。

A.

Sequenced Region of ASA.S1

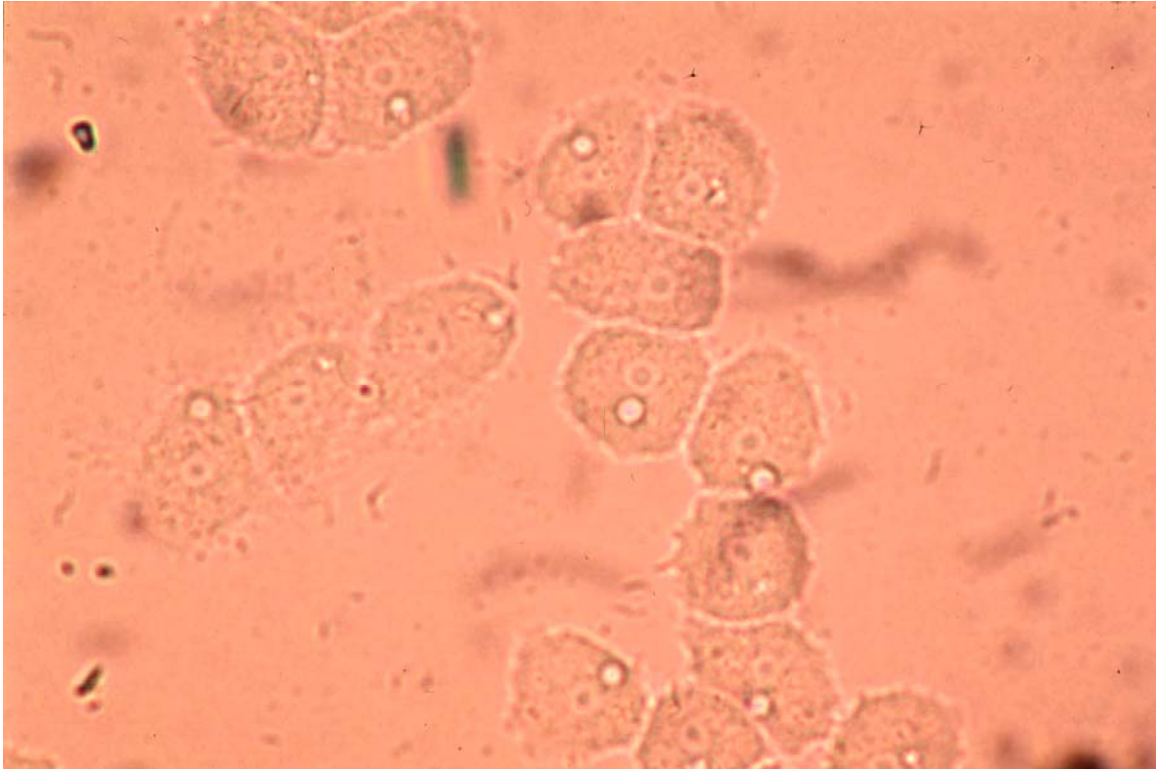


B.



圖三. ASA.S1 在 *Rns* 中所在的區域。

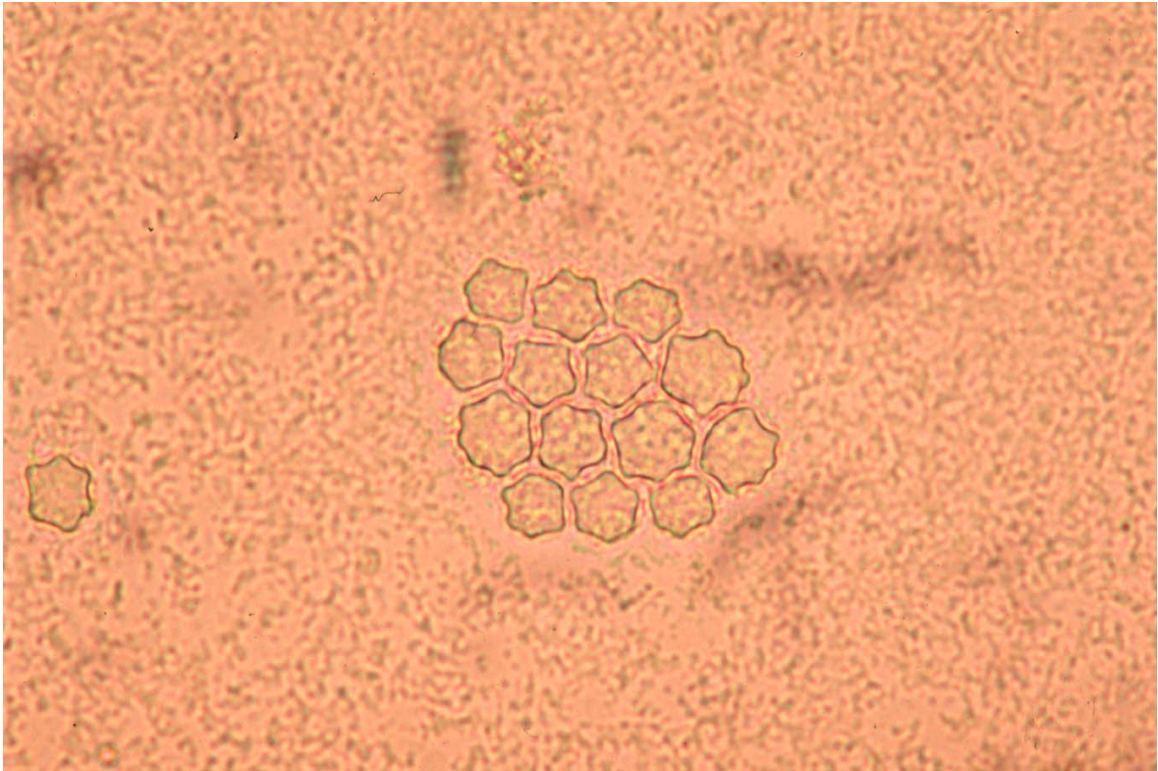
- A. ASA.S1 (*Acanthamoeba*-specific amplimer S1) region, 其大小約為 423~551 bp, 位於 18S rRNA 之 936 bp 到 1402 bp 間 (Schroeder *et al.*, 2001)。 B. ASA.S1 region 為 18S rRNA 二級結構中的 stems E23-2 到 -30, 十二個高度可變區 (expansion segment) 中就佔了三個 (Gast *et al.*, 1996)。



圖四. 棘阿米巴之營養體在 100 倍放大倍率下所觀察到的形態。

檢體接種後第一天，可見到檢體中的棘阿米巴分裂增殖，游離的阿米巴向四周生長。

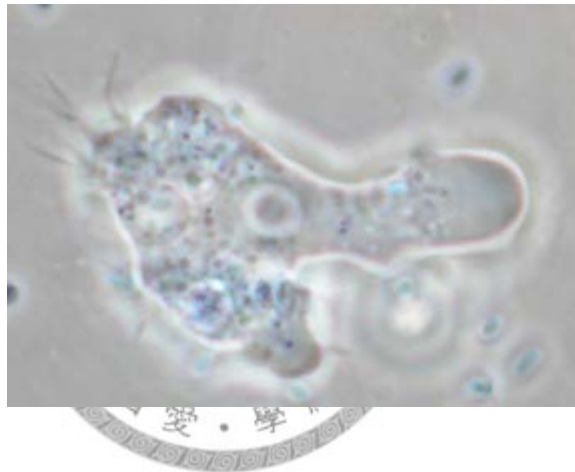
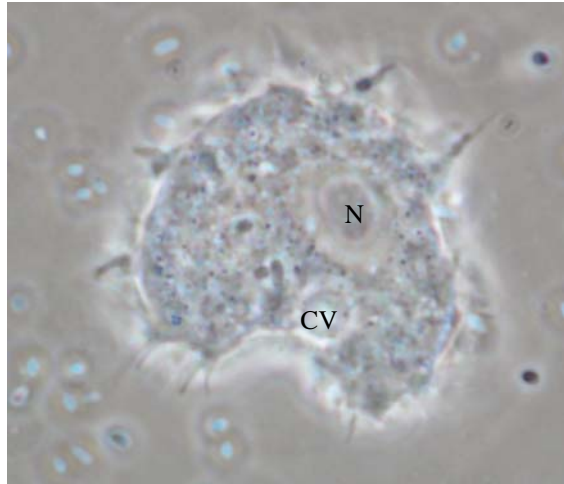




圖五. 棘阿米巴之囊體在 100 倍放大倍率下所觀察到的形態。

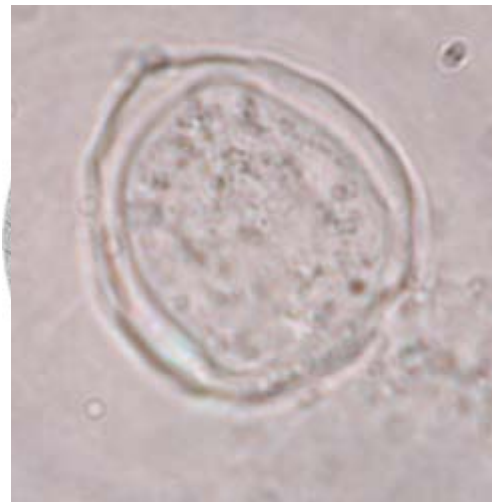
培養後第三天,可見到部分棘阿米巴已變成圓形,進而形成囊體。





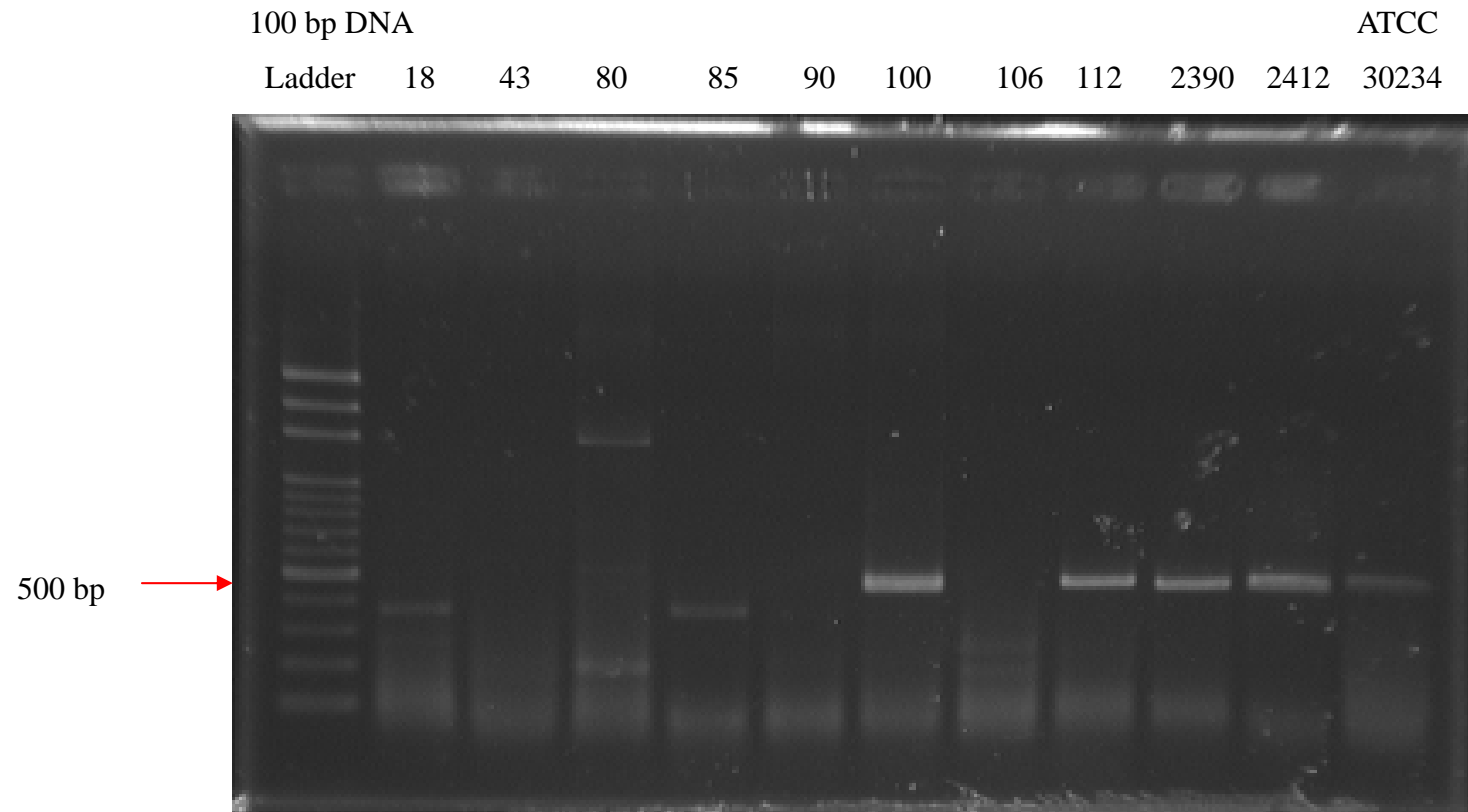
.圖六. 油鏡下所觀察到棘阿米巴營養體之形態 (相位差顯微鏡)。

將棘阿米巴營養體從培養瓊脂轉置於滴有 Page's amoeba saline 的玻片上，待數分鐘後開始作緩慢的變形運動，此時可見到尖銳透明的棘狀偽足 (N 代表核，CV 代表伸縮泡)。



圖七. 油鏡下所觀察到棘阿米巴囊體之形態 (光學顯微鏡)。

將棘阿米巴囊體從培養瓊脂轉置於滴有 Page's amoeba saline 的玻片上，此時可見到其雙層囊壁。

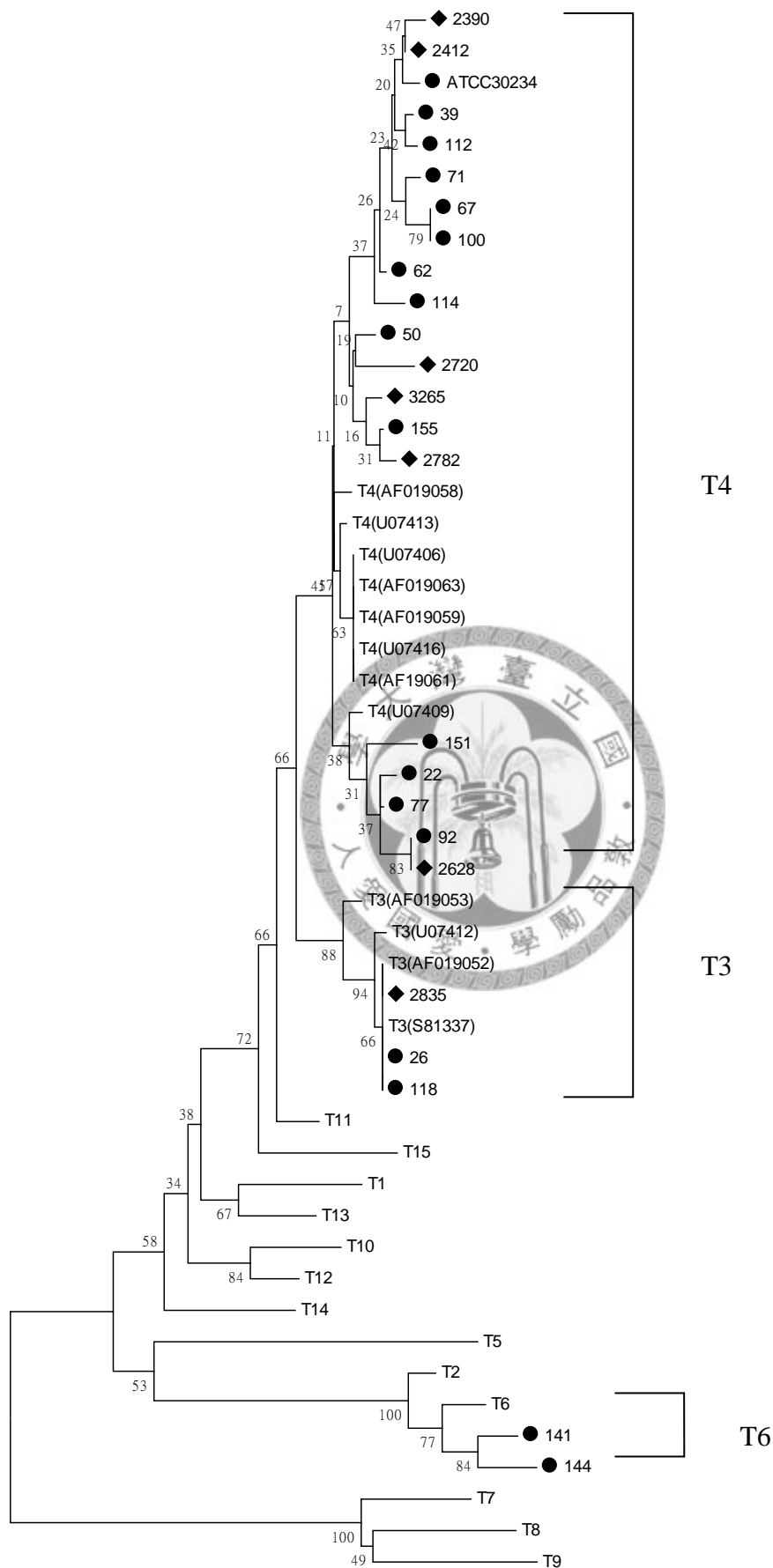


圖八. 培養分離的棘阿米巴蟲株之 DNA，以 JDP1/2 作為引子所得 *Acanthamoeba*-specific amplimer S1 (ASA.S1) Region 洋菜醣膠電泳圖。在 500 bp 出現 band 者即視為陽性。

圖九.. Neighbor-joining distance tree based on partial 18S rDNA sequences

二十五株棘阿米巴中，有兩株蟲體其核酸序列與 T6 之核酸序列相似；有三株蟲體其核酸序列與 T3 之核酸序列相似；其餘二十株蟲體其核酸序列與 T4 之核酸序列相似。



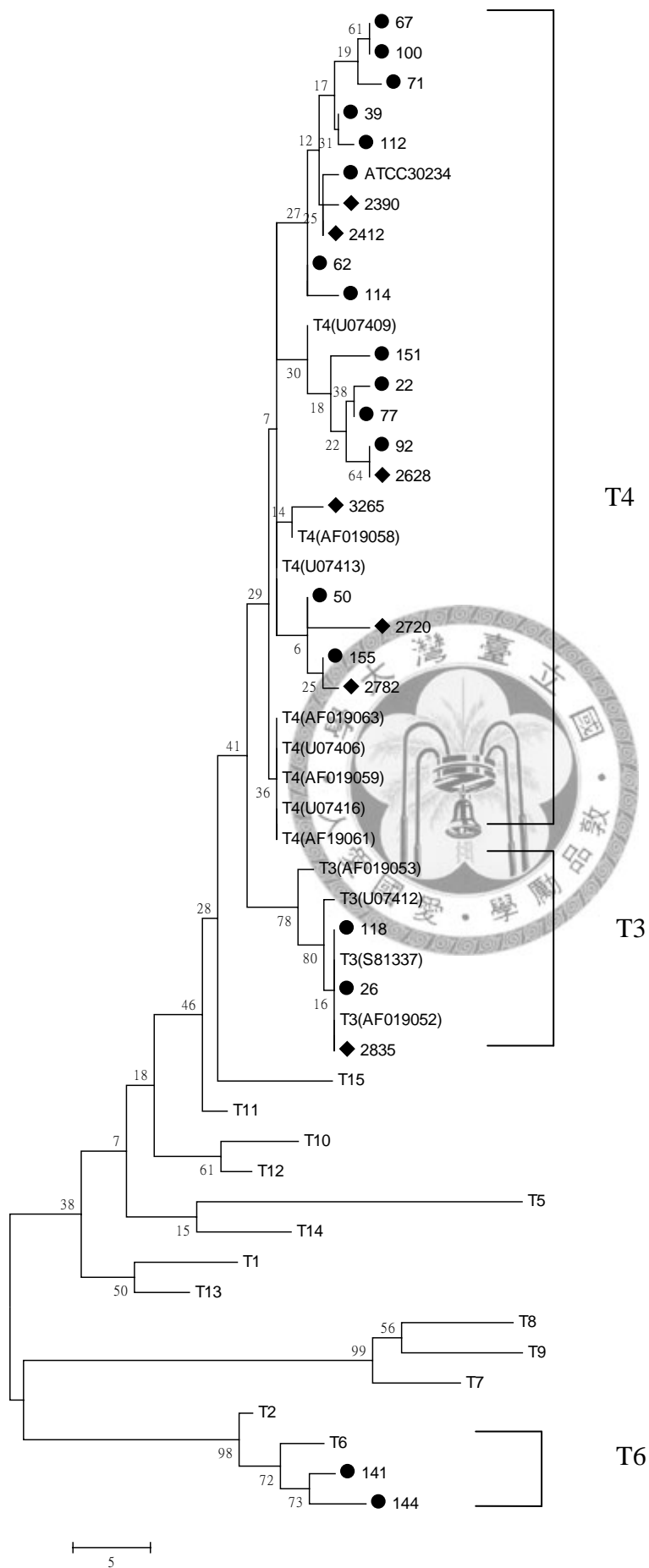


0.005

圖十. Parsimony tree based on partial 18SrDNA sequences

二十五株蟲體中，有兩株蟲體其核酸序列與 T6 之核酸序列相似；有三株蟲體其核酸序列與 T3 之核酸序列相似；其餘二十株蟲體其核酸序列與 T4 之核酸序列相似。





T4/7 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCGTC--GG---TTTC-----GGCCGG--CGCGGGGGTGGCTTAGCCCG-G
50 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCGGT-----TC-----GGC--GGCGCGGGGGCGGCTTAGCCCG-G
62 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCGGT---CTTTC-----GGGGC-CGGCGCGGGGACGGCTTAGCCCG-G
2720 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCGGT-----TCC-----TGC-GGGCCCAGGGGGCGGGTTACCCCG-G
T4/1 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCTCGG---TCCTTACGGGGCCGGGGCGCGGGGGCGGCTTAGCCCG-G
T4/8 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCTCGG---TCCTTACGGGGCCGGGGCGCGGGGGTGGCTTAGCCCG-G
T4/9 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCTCGG---TTTC-----GGCCGGGGTGGCGGGACGGCTTAGCCCG-G
T4/5 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCGGTTGGT---CTTCG---AAAGCCAGCGGCGGGGGCGGCTTAGCCCG-G
T4/3 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCGGTTGGT---CTTCA---AAAGCCAGCGGCGGGGGCGGCTTAGCCCG-G
22 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCGGTTGGT---CTTCA---AAAGCCAGCGGCGGGGGTGGCTTAGCCCG-G
92 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCGGTTGGT---CTTCA---AAAGCCAGCGGCGGGGGTGGCTTAGCCCG-G
97 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCG-TTGGT---CTTCA---AAAGCCAGCGGCGGGGGTGGCTTAGCCCG-G
151 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCG-TTGGT---CTTCA---AAAGCCAGCG-CGGGGTGGCTTAGCCCG-G
2628 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCG-TTGGT---CTTCA---AAAGCCAGCG-CGGGGTGGCTTAGCCCG-G
T4/2 GG--T-GCGGTTCGTCCTTGGCG-TTGGT---CTTCA---AAAGCCAGCG-CGGGGTGGCTTAGCCCG-G
T4/4 GG--T-GCGGCTGTTCTTGGCGTC--GG---TTTC-----GGCCGG--CGCGGGGATGGCTTAGCCCG-G
67 GG--C-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCTGT---CTTTC-----GGGGC-CGGCGCGGGGGCGGCTTAGCCCG-G
39 GG--C-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCTGT---CTTTC-----GGGGC-CGGCGCGGGGGCGGCTTAGCCCG-G
100 GG--C-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCTGT---CTTTC-----GGGGC-CGGCGCGGGGGCGGCTTAGCCCG-G
2390 GG--C-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCGGT---CTTTC-----GGGGC-CGGCGCGGGGGCGGCTTAGCCCG-G
2412 GG--C-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCGGT---CTTTC-----GGGGC-CGGCGCGGGGGCGGCTTAGCCCG-G
ATCC30234 GG--C-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCGGT---CCTTAC--GGGGC-CGGCGCGAGGGCGGCTTAGCCCG-G
71 GG--C-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCTGTGTCCCTTTCAAC-GGGGGCATGGCGCGAGGGCGGTTTAGCCCG-G
112 GG--C-GCGGTTCGTCCTTGGCGTCTGTGTCCCTTTCAAC-GGGGGCATGGCGCGAGGGCGGTTTAGCCCG-G

T4/10 GG--TTGCGGTCGTCCTTGCCGTCTCGG----TTTC-----GGCCGGGGCGCGGGGACGGTTTAGCCCG-G
T4/6 GG--TTGCGGTCGTCCTTGCCGTCTCGG----TTTC-----GGCCGGGGCGCGGGGATGGCTTAGCCCG-G
114 GG--TTGCGGTCGTCCTTGCCGTCTCGG----TTTC-----GGCCGGGGCGCGGGGATGGCTTAGCCCG-G
155 GG--TTGCGGTCGTCCTTGCCGTCTCGG----TTTC-----GGCCGGGGCGCGGGGATGGCTTAGCCCG-G
2782 GG--TTGCGGTCGTCCTTGCCGTCTCGG----TTTC-----GGCCGGGGCGCGGGGATGGCTTAGCCCG-G
3265 GG--TTGCGGTCGTCCTTGCCGTCTCGG----TTTC-----GGCCGGGGCGCGGGGATGGCTTAGCCCG-G
T3/5 CG-ATTGCGGTCGTCCTTGGTG--TCGT---CCACAGCGATGTGGGCGGCATCGGGATGGCTTAGCTCGCA
T3/1 CG-ATTGCGGTCGTCCTTGGTG--TCGC---TCACAAGGC---GGCATC---GGGACGGCTTAGCTCGCA
T3/2 CG-ATTGCGGTCGTCCTTGGTG--TCGC---TCACAAGGC---GGCATC---GGGGCGGCTTAGCTCGCA
T3/3 CGCATTGCGGTCGTCCTTGGTG--TCGC---TCACAAGGC---GGCACC---GGGGCGGCTTAGCTCGCA
T3/4 CGCATTGCGGTCGTCCTTGGTG--TCGC---TCACAAGGC---GGCATCATCGGGACGGCTTAGCTCGCA
26 CGCATTGCGGTCGTCCTTGGTG--TCGC---TCACAAGGC---GGCATCATCGGGACGGCTTAGCTCGCA
118 CGCATTGCGGTCGTCCTTGGTG--TCGC---TCACAAGGC---GGCATCATCGGGACGGCTTAGCTCGCA
2835 CGCATTGCGGTCGTCCTTGGTG--TCGC---TCACAAGGC---GGCATCATCGGGACGGCTTAGCTCGCA

圖十一. 利用 Clustal W 將所得之 T3 、T4 型棘阿米巴之 ASA.S1 (*Acanthamoeba*-specific amplimer S1) region 核酸序列與已知的 DF3 (diagnostic fragment 3) 核酸序列比對。分離出來之二十株 T4 蟲體及三株 T3 蟲體，有四株 T4 蟲體其核酸序列屬於 T4/6 此亞型；有三株 T3 蟲體其核酸序列屬於 T3/4 此亞型。

表一. 棘阿米巴之基因型與引起人類疾病，如角膜炎及肉芽腫性腦膜炎之相關聯性 (Khan, 2006)。

<i>Acanthamoeba</i> genotypes	Human disease association
T1	Encephalitis
†T2a	Keratitis
†T2b–ccap1501/3c-a-like sequences	NA
T3	Keratitis
T4*	Encephalitis, keratitis
T5	NA
T6	Keratitis
T7	NA
T8	NA
T9	NA
T10	Encephalitis
T11	Keratitis
T12	Encephalitis
T13	NA
T14	NA
T15	NA

NA，目前尚未發現其會造成人類的感染。

+，T2 已被證實又可以再細分為 T2a 及 T2b (Maghsood *et al* , 2005)。

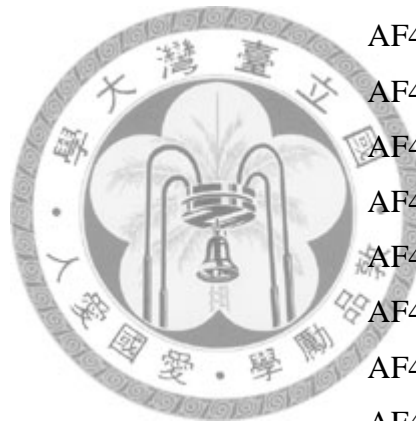
*，其會造成人類角膜炎及肉芽腫性腦膜炎的感染。

表二. 本研究參考之 *Rns* 核酸序列及 GeneBank accession numbers (Stothard *et al.*, 1998)。

Sequence type	Species classification	GenBank accession nuber
T1	<i>Acanthamoeba</i> spp	U07400
T2	<i>A.palestinensis</i>	U07411
T3	<i>A.griffin</i>	U07412
T3	<i>A.griffini</i>	S81337
T3	<i>A.polyphaga</i>	AF019052
T3	<i>A.pearcei</i>	AF019053
T4	<i>A.castellanii</i>	U07413
T4	<i>A.rhysodes</i>	U07406
T4	<i>A.polyphaga</i>	AF019061
T4	<i>A.castellanii</i>	U07416
T4	<i>A.rhysodes</i>	U07406
T4	<i>Acanthamoeba</i> spp	U07409
T4	<i>Acanthamoeba</i> spp	AF019058
T4	<i>Acanthamoeba</i> spp	AF019059
T5	<i>A.lenticulata</i>	U94741
T6	<i>Acanthamoeba</i> spp	AF019063
T7	<i>A.astronyxis</i>	AF019064
T8	<i>A.tubiashi</i>	AF019065
T9	<i>A.comandoni</i>	AF019066
T10	<i>A.culbertsoni</i>	AF019067
T11	<i>A.hatchetti</i>	AF019068
T12	<i>A.healyi</i>	AF019070
T13	<i>Acanthamoeba</i> spp	AF132134
T14	<i>Acanthamoeba</i> spp	AF333607
T15	<i>A.jocobsi</i>	AC080

表三. 本研究參考之DF3核酸序列及Gene Bank accession numbers (Booton *et al.*, 2002)。

Sequence type	Gene Bank accession number
T3/1	AF441800
T3/2	AF441814
T3/3	AF441813
T3/4	AF441806
T3/5	AF441805
T4/1	AF441811
T4/2	AF441807
T4/3	AF441794
T4/4	AF441796
T4/5	AF441795
T4/6	AF441801
T4/7	AF441802
T4/8	AF441799
T4/9	AF441803
T4/10	AF441798



表四. 本研究分離所得之棘米阿米巴蟲株之核酸序列比對結果

檢體序號	檢體來源	<i>Rns</i> genotype/DF3 sequence
ATCC30234	ATCC 標準蟲株	T4
2390	角膜刮取物	T4
2412	角膜刮取物	T4
2628	角膜刮取物	T4
2782	角膜刮取物	T4/6
2720	角膜刮取物	T4
2835	角膜刮取物	T3/4
3265	角膜刮取物	T4/6
22	盥洗台擦拭物	T4
26	盥洗台擦拭物	T3/4
39	盥洗台擦拭物	T4
50	盥洗台擦拭物	T4
62	盥洗台擦拭物	T4
67	盥洗台擦拭物	T4
71	盥洗台擦拭物	T4
77	盥洗台擦拭物	T4
92	盥洗台擦拭物	T4
100	盥洗台擦拭物	T4
112	盥洗台擦拭物	T4
114	盥洗台擦拭物	T4/6
118	盥洗台擦拭物	T3/4
141	盥洗台擦拭物	T6
144	盥洗台擦拭物	T6
151	盥洗台擦拭物	T4
155	盥洗台擦拭物	T4/6

附錄一.

長戴型隱形眼鏡採檢說明書

Hello!大家好~~

我是台大研究所的學生，因為要研究「隱形眼鏡配帶者其清潔保養液及盥洗台之棘阿米巴調查研究」，所以需收集以下的檢體。

標示 **拋棄液** 的試管是用來裝已使用過的隱形眼鏡保存液。

標示 **生理食鹽水** 的試管是用來裝已開封的生理食鹽水，量約到 2 的刻度。

標示 **隱形眼鏡保存盒擦拭物** 的試管請先取試管內的棉棒，用此棉棒沾取保存盒內部，再放回試管，再將蓋子旋緊即可。

標示 **盥洗台擦拭物** 的試管請先取試管內的棉棒，用此棉棒沾取水龍頭及其周圍的水漬、灰塵後再放回試管，再將蓋子旋緊即可。

如果您想知道您的結果，請留下你的 e-mail，我再將結果 e-mail 給您。

e-mail address:

p.s.有任何收集問題歡迎來信詢問!我的 e-mail: r94445205@ntu.edu.tw

最後誠摯的謝謝您的幫忙! <此實驗的結果不提供作商業用途!>



附錄二.

拋棄式隱形眼鏡採檢說明書

Hello!大家好~~

我是台大研究所的學生，因為要研究”隱形眼鏡配帶者其清潔保養液及盥洗台之棘阿米巴調查研究”，所以需收集以下的檢體。

標示 **拋棄式隱形眼鏡** 的試管是用來裝已使用過準備丟棄的隱形眼鏡。

標示 **盥洗台擦拭物** 的試管請先取試管內的棉棒，用此棉棒沾取水龍頭及其周圍的水漬,灰塵後再放回試管,再將蓋子旋緊即可。

如果您想知道您的結果，請留下你的 e-mail ，我再將結果 e-mail 給您。

e-mail address:

p.s.有任何收集問題歡迎來信詢問!我的的 e-mail: r94445205@ntu.edu.tw

最後誠摯的謝謝您的幫忙! <此實驗的結果不提供作商業用途!>



附錄三.

1. Page's ameba saline 之配方如下：

Sodium chloride (NaCl).....	120 mg
Magnesium sulfate (MgSO ₄ .7H ₂ O).....	4 mg
Calcium chloride (CaCl ₂ .2H ₂ O).....	4 mg
Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄).....	142 mg
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄).....	136 mg
Add deionized water to make.....	1000 ml

以上加熱溶解後，分裝到有螺旋帽蓋的瓶子，高壓滅菌 121°C 15分鐘。



2. Page's ameba saline agar之配方如下：

Agar.....	1.5 g
Page's ameba saline	100 ml

於每100 ml的Page's ameba saline中加入1.5 g的agar，加熱溶解後，高壓滅菌 121°C 15分鐘，待冷卻至60°C時，以無菌操作技術倒入無菌的塑膠製培養皿中，倒入過程須注意盡量不要產生氣泡，以免影響觀察，待其凝固後，保存於4°C的冰箱中，約可保存三個月。

3. 大腸桿菌懸浮液之配製：

原保存在固態營養性培養瓊脂的大腸桿菌，於實驗檢體接種前一天種入液態的營養性培養肉湯 (nutrient broth)，置於37°C的恆溫箱中培養，於接種前混和均勻成懸浮液。

營養性培養瓊脂之配方如下：

Nutrient broth.....	100 ml
Sodium chloride (NaCl).....	0.5 g.
Agar.....	2 g

於每100ml的營養性培養肉湯中加入2 g的agar，加熱溶解後，高壓滅菌 121°C 15 分鐘，待冷卻至60°C時，以無菌操作技術倒入無菌的塑膠製培養皿中。



附錄四.

lysis buffer 之之配方如下：

20 mg/ml proteinase K.....	5 μ l
0.85% NaCl.....	20 μ l
0.5 MEDTA.....	50 μ l
10% SDS.....	50 μ l
1M Tris-Cl, pH8.....	10 μ l
H ₂ O.....	865 μ l

