

計畫編號：DOH94-DC-2031

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

鉤端螺旋體病與貓抓病檢驗方法之研發

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局

計畫主持人：邱詩惠

研究人員：林佳慧、凌宜珮、陳宗佑、周振英

執行期間：94年1月1日至94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

目錄	頁次
中文摘要	3
英文摘要	4
前言	5
材料與方法	7
結果	11
討論	15
結論與建議	17
參考文獻	18
圖	20

摘要

關鍵詞：鉤端螺旋體病、顯微凝集試驗、貓抓病、間接螢光抗體測定

自 2005 年 1 月起至 2005 年 10 月止，收到各醫院送檢共 3373 個疑似鉤端螺旋體病病例，共檢驗 3966 個血清和 726 個尿液。其中 68 個 (1.71%) 血清抗體為陽性 (顯微凝集試驗抗體力價大於等於 400 倍)，男性 60 人、女性 8 人。腦脊髓液抗體檢查及尿液 PCR 檢測均為陰性。感染的血清型以 Shermani 最多 (46 個檢體)，其次才是 Javanica 血清型 (18 個檢體)，Canicola 血清型 (6 個檢體)，Poi 血清型 (5 個檢體)，Bataviae 血清型 (5 個檢體)，Pomona 血清型 (3 個檢體)，Tarassovi 血清型 (2 個檢體)，Bratislava (2 個檢體)，Copenhageni 血清型 (1 個檢體)，Lyme 血清型 (1 個檢體)，及 Australis 血清型 (1 個檢體)。陽性血清之幾何平均抗體力價為 772.8 倍。貓抓病部分共收到各醫院送檢 120 個疑似個案。其中有 35 人抗體測定為陽性 (抗體力價大於等於 64 倍)，陽性比例為 29.17%，幾何平均抗體力價為 274.3 倍。抗體陽性病患中男性 21 名，女性 14 名。

Abstract

Keywords: leptospirosis, MAT, Cat Scratch Disease, indirect immunofluorescence assay

A total of 3996 sera, 726 urine, and 2 CSF specimens collected from 3373 leptospirosis-suspected patients were examined during January to October, 2005. Among the 3373 patients, 68 (1.71%) were antibody positive (titer \geq 1:400) by Microscopic agglutination test (MAT). In addition, all urine and CSF samples were negative for leptospiral DNA by polymerase chain reaction (PCR). Antibody reacted to the dominant serovars were as follow: Shermani (46 sera), Javanica (18era), Canicola (6 sera), Poi (5 sera), Bataviae (5 sera), Pomona (3 sera), Tarassovi (2 sera), Bratislava (2 sera), Copenhageni (1 sera), Lyme (1 sera), and Australis (1 sera). The geometric mean MAT titer was 1: 772.8. As for Cat scratch disease, a total of 191 sera specimens collected from 120 suspected patients were examined for *Bartonella henselae* antibody detection (by indirect fluorescence antibody assay, IFA). Thirty five of 120 (29.17%) showed antibody positive (titer \geq 1:64). The geometric mean IFA titer was 1:274.3.

前言

鉤端螺旋體病一直是全球重要人畜共通傳染病，主要藉由動物的尿液染給人。過去鉤端螺旋體病經常受到忽略，歸納其主要原因為感染者臨床表癥差異大，從不顯性感染到致死性肝腎衰竭、呼吸器官或多重器官衰竭皆有可能發生；而且易與其他疾病如：感冒、上呼吸道感染、不明熱、無菌性腦膜炎、病毒性肝炎等混淆而誤診。另外，還須與漢他病毒感染、立克次體感染和登革熱及發癢出血熱做鑑別診斷。由於初期症狀與感冒十分類似，所以常被誤診為其他感染症而延誤病情。這幾年在國內醫師、學者及本局的宣導下，本病才逐漸獲得重視，臨床疑似病例數增加。

貓抓病和鉤端螺旋體均不屬於法定傳染病，過去也同樣受到忽視。貓抓病多半是引起良性的局部淋巴腺炎，因為大多會自行緩解而容易被病人及醫生所忽略，但在免疫功能不全的患者如：愛滋病、器官移植、癌症等患者，卻會引起較嚴重的併發症，甚至死亡。台灣近年來的調查中發現：疑似貓抓病患者血清陽性率達 37.7%；家貓 *Bartonella henselae* 調查結果中，其抗原分離率為 20.6%。雖然該調查的資料尚無法找出台灣疑似患者感染貓抓病的潛在危險因子，但是貓抓病的診斷及監測仍有其必要性。

由於逐年暴增的送檢檢體量（89 年四至十二月檢體數為 189 件，90 年度 1137 件，91 年度 1266 件，92 年度 1076 件，93 年累計到九月共有 1740 件），已遠超過目前實驗室人力及設備所能負擔的檢驗量。本計畫目的在於維持良好、穩定一致的檢驗服務品質，繼續強化本局鈎端螺旋體與貓抓病參考實驗室，也才能夠為台灣鈎端螺旋體病與貓抓病之實驗室監測工作，提供更多更寶貴的資料。

材料與方法

● 鉤端螺旋體檢驗

檢體來源

符合「法定及新興傳染病（含疑似病例）通報系統」與「新感染症症候群監視通報系統」之通報定義者，將符合採檢檢體送至實驗室。

檢體採檢要項

1. 病原分離：
 - a、血液檢體：發病七日內及未投藥前，可使用含抗凝劑之無菌空針採取血樣檢體，請使用 heparin 或 EDTA 抗凝血劑，勿用 sodium citrate 抗凝劑。
 - b、尿液檢體：採取中段尿液 10 毫升，必須加上 0.5 毫升一莫耳濃度 phosphate buffer (pH 7.4)，調整酸鹼度。未投藥前尿液檢體較易培養出螺旋體。
 - c、腦脊髓液：發病 5 至 10 天內採取 0.5 毫升腦脊髓液。
2. 抗體檢測：使用無菌空針採取血樣（全血 5 毫升或血清 3 毫升）。
3. 檢體需以冷藏方式儘速送抵檢驗實驗室。

病原性鉤端螺旋體培養鑑定

1. 實驗室依據送驗檢體防疫資料，僅對於感染初期約一星期內及未投藥前之檢體進行病原分離培養。
2. 分離材料及方法：在 EMJH 液體培養基(Bacto Leptospira Medium Base EMJH, No.0794, Difco, Michigan, USA 及 Enrichment) 添加 5-fluorouracil (100-300 µg/mL) 以抑制雜菌生長，將接種後之培養基置於 28-30 之培養箱中。
3. 每週 1 次以暗視野顯微鏡檢查，至少觀察 8 周，觀察是否分離出鉤端螺旋體。
4. 病原體鑑定：包含基因型 (PCR)、血清型、血清群等鑑定。

鉤端螺旋體抗體檢驗

1. 腦脊髓液直接進行顯微凝集試驗 (microscopic agglutination test; MAT)，血清則先以 Lepto Lateral Flow 檢驗套組篩檢，1+以上陽性反

應，才進行 MAT 檢驗。

a、與內對照帶比較判讀：無檢驗帶者為陰性，檢驗帶較淺者為 1+，檢驗帶與內對照帶相同者為 2+，檢驗帶比內對照帶深者為 3+。

2. MAT 檢驗：選用的抗原為 *australis*、*canicola*、*pomona*、*icterohaemorrhagiae*、*lyme*、*pyrogenes*、*javanica*、*tarassovi*、*panama*、*bataviae*、*autumnalis* 及 *shermani* 等 12 個血清群（含 20 個血清型）。

a、血清型篩檢：含 PBS（phosphate buffered saline）對照、陰性對照與陽性對照血清，各取 0.025 mL 分別與 20 個鉤端螺旋體血清型抗原，以等量體積反應。欲測試血清以 PBS 稀釋 50 倍，分別與 20 個鉤端螺旋體血清型抗原各 0.025 mL，於微量培養盤各個小格中小反應。用保鮮膜蓋住培養盤，放入 37 保溫箱中半小時，依序從小格中吸取 0.003 mL，以暗視野顯微鏡觀察菌體凝集情形。以 100 倍判讀，在視野下 50% 菌體凝集者判定為陽性。

b、血清型力價判別：陽性血清型才需進行此項檢驗。將欲測力價之血清以 PBS 稀釋 50 倍，連續稀釋至 6,400 倍。添加等量陽性血清型抗原，反應後於暗視野顯微鏡下觀察，於 50% 菌體凝集之血清稀釋倍數即為該血清抗體力價。

c、實驗室判定標準中，單次血清抗體力價 $\geq 400X$ ，為可能病例；急性期與緩解期兩次血清抗體力價有四倍以上差距，為確定病例。

核酸增幅偵測法

1. 所有尿液均進行核酸增幅法。其他檢體則由實驗室依據送驗檢體防疫資料，僅對於感染初期約一星期內及未投藥前之檢體進行病原分離培養。
2. 檢體採用 G1/G2 引子組進行檢測，疑似鉤端螺旋體培養鑑定使用 *flaB*-typing 方法。

(1) G1/G2 引子組針對病原性鉤端螺旋體增幅，產物大小為 285-bp。

G1: 5'CTGAATCGCTGTATAAACT3'; G2: 5'GGAAAACAAATGGTC
GGAAG3'

(2) *flaB*-typing⁽²³⁾

flaB-F: CTCACCGTTCTCTAA AGTTCA AC; *flaB*-R: TGAATTCGGCA

TATTTGCC

● 貓抓病檢驗

檢體來源

接受「法定及新興傳染病（含疑似病例）通報系統」與「新感染症症候群監視通報系統」送檢檢體，將符合採檢檢體送至實驗室。

檢體採檢要項

1. 病原分離：
 - a、血液檢體：疑似病患未投藥前，可使用含 EDTA 抗凝劑之無菌空針採取血樣檢體。
 - b、淋巴結檢體：無菌方式抽取淋巴液或淋巴結生檢組織，投藥前檢體較易培養出病原體。
2. 抗體檢測：使用無菌空針採取血樣（全血 5 毫升或血清 3 毫升）。
3. 檢體需以冷藏方式儘速送抵檢驗實驗室。

貓抓病病原體培養

1. 由實驗室依據送驗檢體防疫資料，僅對於感染初期約一星期內及未投藥前之檢體進行病原分離培養。
2. 將 1.5 mL 的血液置於塑膠的 EDTA 抗凝採血管中，於 -30°C 或 -70°C 冰凍數天至數週，再將這些管子的離心得到的沈澱塗佈在含有 5% 新鮮兔血的 heart infusion 平版培養基上，於潮濕且有 5% CO₂ 的 35°C 環境中培養數週，通常菌落的生長需 2-4 週才能生成。
3. 實驗室結果判定：依據培養六周後，是否分離出病原體，病原體經由聚合酶鏈鎖反應檢測陽性且經核酸序列分析確認。

貓抓病抗體檢驗

1. 以間接螢光抗體法 (Indirect Immunofluorescence Assay, IFA) 檢測 IgG 其抗體，抗體力價呈 64 倍以上者判為陽性。
2. 分別以 *B. henselae* ATCC 49882 菌株（第一型）及美國分離株 U4（第二型）作為抗原。
3. 將疑似貓抓病病患血清稀釋 32 倍，以 10% 脫脂乳進行 2 倍連續稀釋至

512 倍。將稀釋後的血清依序加於抗原盤上，37 °C 下作用 40 分鐘。以 PBS 潤洗 5 分鐘後，加入螢光標定之二次抗體 (FITC-Goat IgG anti-human IgG)，於 37 °C 下作用 40 分鐘後，以 PBS 潤洗 5 分鐘，再以二次蒸餾水潤洗 5 分鐘後，以螢光顯微鏡觀察判定力價。

貓抓病病原體核酸增幅偵測法

1. 檢體則由實驗室依據送驗檢體防疫資料，僅對於疑似感染貓抓病病患之全血、與血清分離之紅血球或純培養之菌落，抽取 DNA，進行核酸增幅檢驗。
2. 核酸抽取使用 Qiagen DNA purification kit。
3. 有兩種方法均針對 16S rRNA 基因增幅。
 - a、以 16SF : AGAGTTTGATCCTGG(CT)TCAG ; 16SR : CTTTACGCCCA(AG)TA A(AT)TCCG 引子進行增幅。增幅出 512 b.p.的核酸產物，再以其他引子進行增幅，區別 *B. henselae* 第一型及第二型。

第一型：16SF 引子與 BH1 : CCGATAAATCTTTCTCCCTAA
第二型：16SF 引子與 BH2 : CCGATAAATCTTTCTCCAAAT
 - b、16S-23S rRNA intergenic region 進行增幅，增幅產物依不同種別有所不同。使用引子 BSSPF : CTCTTTCTTCAG ATGATGATCC 與 BSSPR : AAC AACTGAGC TACAGCCCT。 *B. bacilliformis*: 202 bp ; *B. clarridgeiae*: 145 bp ; *B. elizabethae*: 232 bp ; *B. henselae*: 163 bp ; *B. quintana*: 148 bp ; *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*: 251 bp
4. 聚合酶鏈鎖反應檢測 (PCR) 陽性且經核酸序列分析確認者。

結果

統計自 2005 年 1 月起至 2005 年 10 月止，共收到各醫院送檢共 3377 個疑似病例，共檢驗 3966 個血清檢體，726 個尿液檢體，534 個血液檢體和 5 個其他檢體。其中 68 個疑似病例血清抗體檢查為確定陽性(抗體力價大於等於 400 倍)，陽性比例為 1.71%，154 個疑似病例血清抗體檢查為疑陽性(抗體力價 100 倍及 200 倍)；3717 個疑似病例血清抗體檢查為陰性【如圖 2】尿液 PCR 檢測均為陰性。患者年齡分佈在 21 至 90 歲之間，陽性男性 60 人、女性 8 人，所感染的陽性血清型以 shermani 居多(46 個檢體)，其次才是 javanica 血清型(18 個檢體)，canicola 血清型(6 個檢體)，poi 血清型(5 個檢體)，bataviae 血清型(5 個檢體)，pomona 血清型(3 個檢體)，tarassovi 血清型(2 個檢體)，bratislava(2 個檢體)，copenhageni 血清型(1 個檢體)，lyme 血清型(1 個檢體)，及 australis 血清型(1 個檢體)。抗體陽性血清之抗體力價 100 倍共 44 件，200 倍共 71 件，400 倍共 72 件，800 倍共 52 件，1600 倍共 24 件，3200 倍共 15 件，6400 倍共 3 件，12800 倍共 2 件；抗體力價幾何平均為 772.8 倍。

本實驗室 2005 年 1 月收到疑似病例血清檢體 264 件，血液檢體

31 件，尿液檢體 46 件，其他檢體 2 件（抗體陽性 0 件）；2 月收到疑似病例血清檢體 223 件，血液檢體 34 件，尿液檢體 39 件，其他檢體 1 件（抗體陽性 5 件）；3 月收到疑似病例血清檢體 281 件，血液檢體 26 件，尿液檢體 43 件（抗體陽性 1 件）；4 月收到疑似病例血清檢體 286 件，血液檢體 24 件，尿液檢體 44 件（抗體陽性 1 件）；5 月收到疑似病例血清檢體 390 件，血液檢體 47 件，尿液檢體 61 件（抗體陽性 1 件）；6 月收到疑似病例血清檢體 454 件，血液檢體 64 件，尿液檢體 75 件（抗體陽性 20 件）；7 月收到疑似病例血清檢體 486 件，血液檢體 42 件，尿液檢體 74 件，其他檢體 1 件（抗體陽性 12 件）；8 月收到疑似病例血清檢體 656 件，血液檢體 104 件，尿液檢體 147 件（抗體陽性 14 件）；9 月收到疑似病例血清檢體 463 件，血液檢體 79 件，尿液檢體 87 件，其他檢體 1 件（抗體陽性 9 件）；10 月收到疑似病例血清檢體 463 件，血液檢體 83 件，尿液檢體 110 件（抗體陽性 6 件）。

抗體陽性病患居住地以台北居多(15 名)，次為屏東(10 名)，高雄(7 名)，台中(7 名)，台南(4 名)，花蓮，台東(3 名)，桃園(3 名)，雲林(3 名)，南投(2 名)，新竹(2 名)，宜蘭(1 名)，基隆(1 名)，彰化(1 名)，不明(5 名)，其餘全省均有零星個案。患者症狀以發燒居

多，次為急性腎功能不全、黃疸、血小板減少、腹痛、肌肉痛、出血傾向、呼吸障礙、意識不清、頭痛、肝脾腫大、結膜充血、腦膜炎、橫紋肌溶解等，不過有 24 名疑陽性患者和 13 名陽性患者症狀不明(送驗單位未填寫)。

在貓抓病檢驗結果方面，本實驗室自 2005 年 1 月起至 2005 年 10 月止，共收到各醫院送檢共 120 個疑似病例；共檢驗 240 個檢體，包含 49 個全血檢體及 191 個血清檢體，全血檢體做抗體測定(IFA)及抗原檢查(PCR)，而血清檢體僅做抗體測定。其中有 35 個病例抗體測定為陽性（抗體力價大於等於 64 倍），陽性比例為 29.17%；抗原檢查均為陰性。病患年齡為 1-70 歲；男性 21 名、女性 14 名；居住地方以台北最多（10 名），次為台中（4 名）、再次為桃園（4 名），高雄（3 名），台南、屏東、彰化、新竹（各 2 名），台東、宜蘭、花蓮、苗栗、雲林、嘉義(各 1 名)。

本實驗室 94 年 1 月起始收到疑似病例檢體 6 件；2 月收到疑似病例檢體 9 件；3 月收到疑似病例檢體 5 件；4 月收到疑似病例檢體 14 件（抗體陽性 1 件）；5 月收到疑似病例檢體 21 件（抗體陽性 3 件）；6 月收到疑似病例檢體 25 件（抗體陽性 2 件）；7 月收到疑似病例檢體 24 件(抗體陽性 5 件)；8 月收到疑似病例檢體 48 件(抗

體陽性 5 件)；9 月收到疑似病例檢體 28 件 (抗體陽性 5 件)；10 月收到疑似病例檢體 38 件 (抗體陽性 3 件)；。抗體陽性力價 128 倍 5 件；256 倍 23 件；> 256 倍 4 件；512 倍 2 件；> 1024 倍 1 件；幾何平均力價為 274.3 倍。

討論

在鈎端螺旋體病方面，目前鈎端螺旋體病之實驗室診斷，還是以血清學顯微凝集法為國際認定之“黃金準則”。在急性期（發病一周內）血清抗體尚未大量產生，必須輔以相隔十四天之配對血清變化情形，或是靠菌種分離輔以 PCR 檢驗。然而顯微凝集法之檢驗需耗費大量人力、時間，且相當困難，不易推行於一般實驗室。對於接受全國送來的防疫檢體，本計畫乃開發更快速的檢驗方法與研擬研判標準，以服務病患達到治療與防治之目標。分析近六年的鈎端螺旋體病抗體監測結果，經評估認為，適度調整實驗室檢驗顯微凝集法使用之血清型組，將現行之 21 個菌篩檢菌株之群組修改為 13 個群組，陽性檢出率並未受到影響，因此將建議例行檢驗篩檢菌株群組縮減為 13 個。一般認為 PCR 為最迅速且敏感的檢驗方法，不過目前廣為使用的個引子組，應用上均有所限制。其中以 16s RNA 基因序列所設計之引子組，靈敏度雖高，但無法區別非病原株與病原株，使結果研判更為困難，往往造成困擾；因此實驗室選擇爭議較少的 G1/G2 引子組與 flaB 基因序列之設計之引子組，作為血清學判斷與病原分離之輔助檢驗。對於本年度病原分離與 PCR 檢驗結果成陰性反應，因與檢體中菌體含量、核酸品質與感染之免

應反應日程影響極大，顯示顯示檢體採檢仍有改進之空間。

本研究分析台灣鉤端螺旋體病發現，90%的通報個案，並無任何血清背景值。為有效運用人力與試劑使檢驗發揮最大效能，對於未能於急性期採檢之檢體，單次血清抗體檢驗即可進行結果研判。於急性期內採檢之患者，則維持兩次採檢之研判程序。

此外，在貓抓病方面並未分離出任何貓抓病病原，核酸偵測亦為陰性反應，因此未來將繼續加強病原分離與核酸偵測檢驗。

結論與建議

由於台灣氣候高溫多雨，十分適合鼠媒的繁殖，拜全球化的趨勢與交通運輸之便，人畜共通傳染病在全球各地發生情形激增。需要鑑別的疾病與個案數正急速增加，雖然鉤端螺旋體病與貓抓病並非法定傳染病，但在農務、地下道工務與長期動物接觸之工作者有較高之感染風險。因此建立一套快速且完整的診斷系統，對於診斷鑑別鉤端螺旋體病與貓抓病，除了對病患的治療，對防治工作也是極為重要。

參考文獻

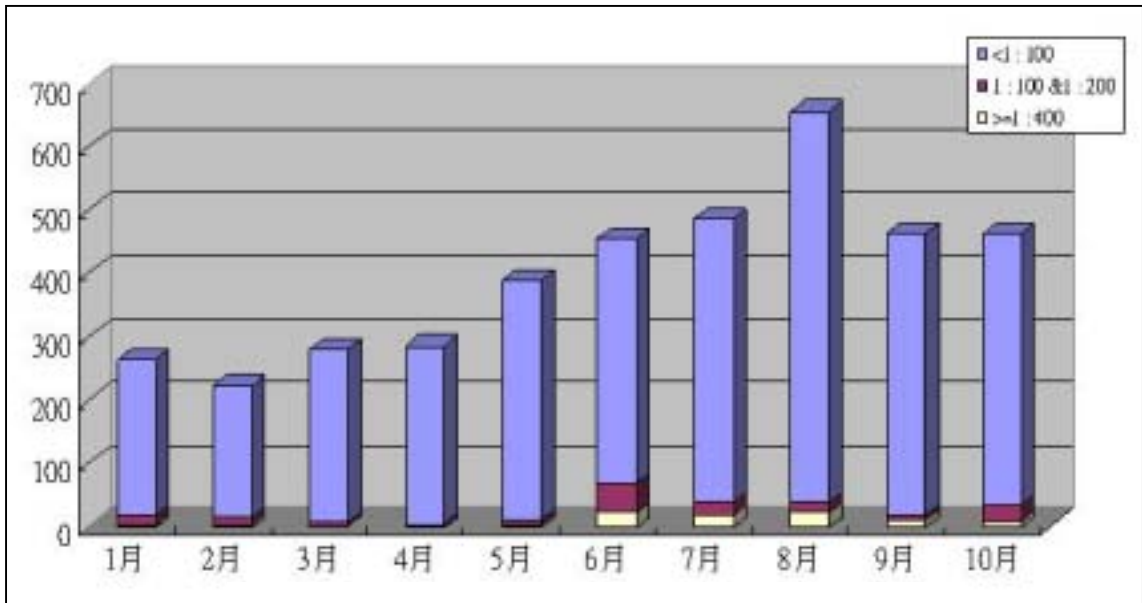
1. Bereswill S, Hinkelmann S, Kist M, Sander A. 1999. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the *ribC* gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. J Clin Microbiol 37:3159-66.
2. Everard COR, Edwards CN, Everard J D, et al. 1995. A twelve- year study of leptospirosis on Barbados. Europ J. Epidemiol. 11:311-320.
3. Johnson G., Ayers M., McClure SCC., Richardson SE., Tellier. 2003. Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for human by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*). J Clin Microbiol 41(3): 1069-1072.
4. Kawabata H, Dancel LA, Villanueva SYAM, Yanagihara Y, Koizumi N, Watanabe H. 2001. *flaB*-polymerase chain reaction (*flaB*-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. Microbiol immunol 45:491-496.
5. Lee SC, Fung CP, Lee N, & Shieh WB. 1998. Cat-scratch disease caused by *Bartonella henselae*: the first case report in Taiwan. J Formos Med Assoc 97:569-572.
6. Matar GM, Koehler JE, Malcolm G, Lambert-Fair MA, Tappero J, Hunter SB, Swaminathan B. 1999. Identification of *Bartonella* species directly in clinical specimens by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment. J Clin Microbiol 37:4045-4047.
7. Matar GM, Swaminathan B, Hunter SB, Slater LN, Welch DF. 1993. Polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis of a fragment of the ribosomal operon from *Rochalimaea* specie for subtyping. J Clin Microbiol 31:1730-1734.
8. Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC. 1995.

Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. J Clin Microbiol. 33:1797-803.

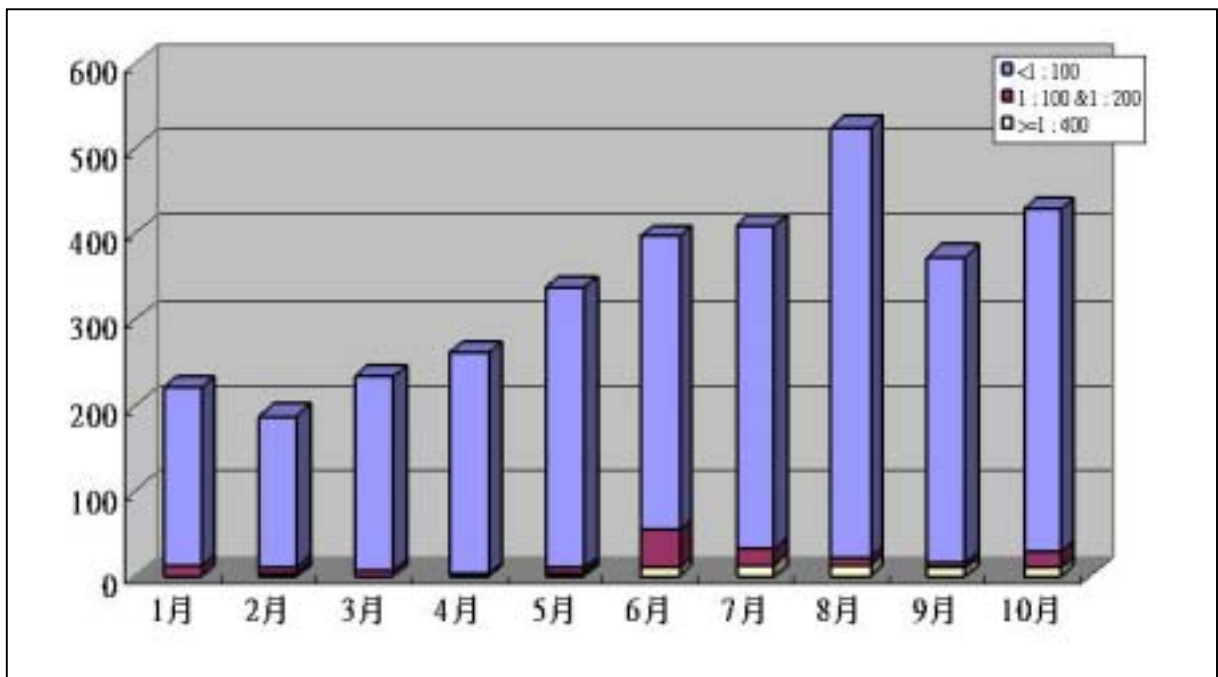
9. Smits HL et al. 2001. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. Clin Diag Lab Immunol. 8: 166-9.

圖表

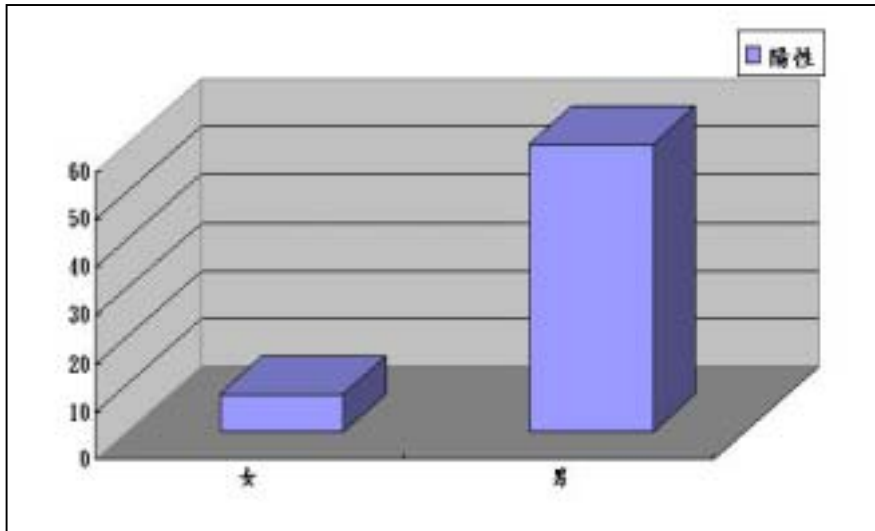
圖一 鈎端螺旋體病血清抗體檢驗結果



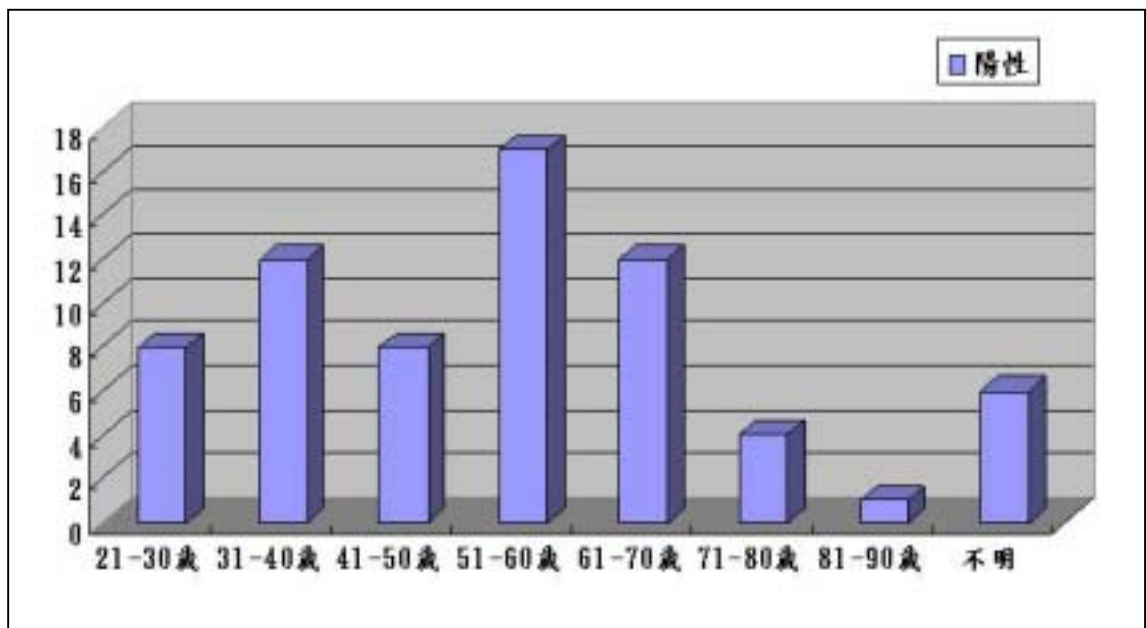
圖二 鈎端螺旋體病病例抗體檢驗結果



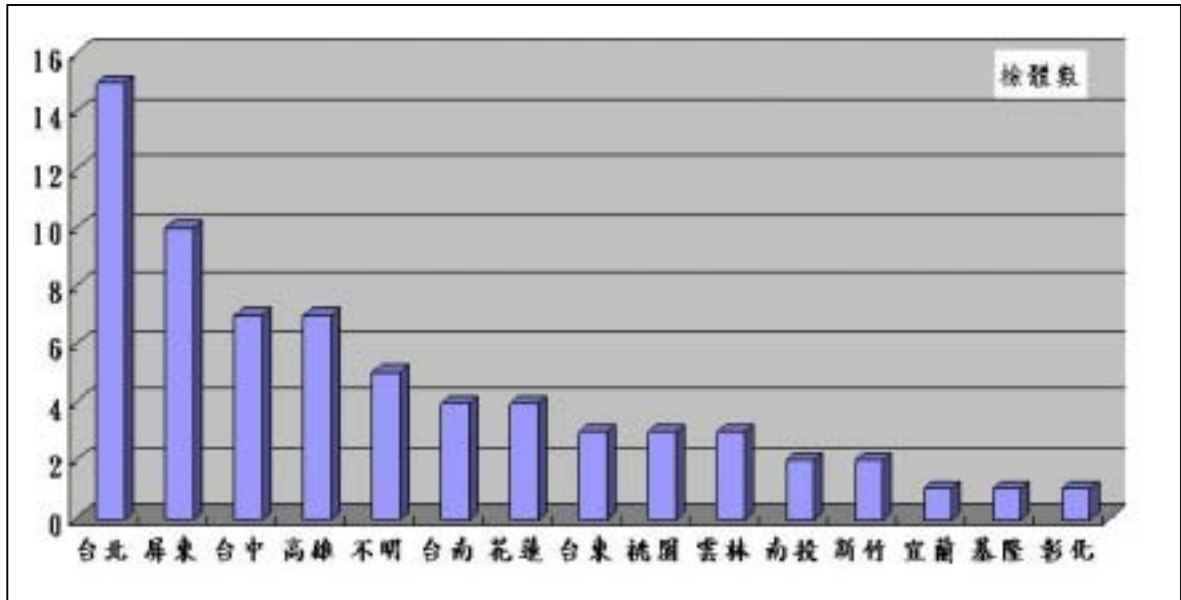
圖三 鉤端螺旋體病陽性病患性別分布



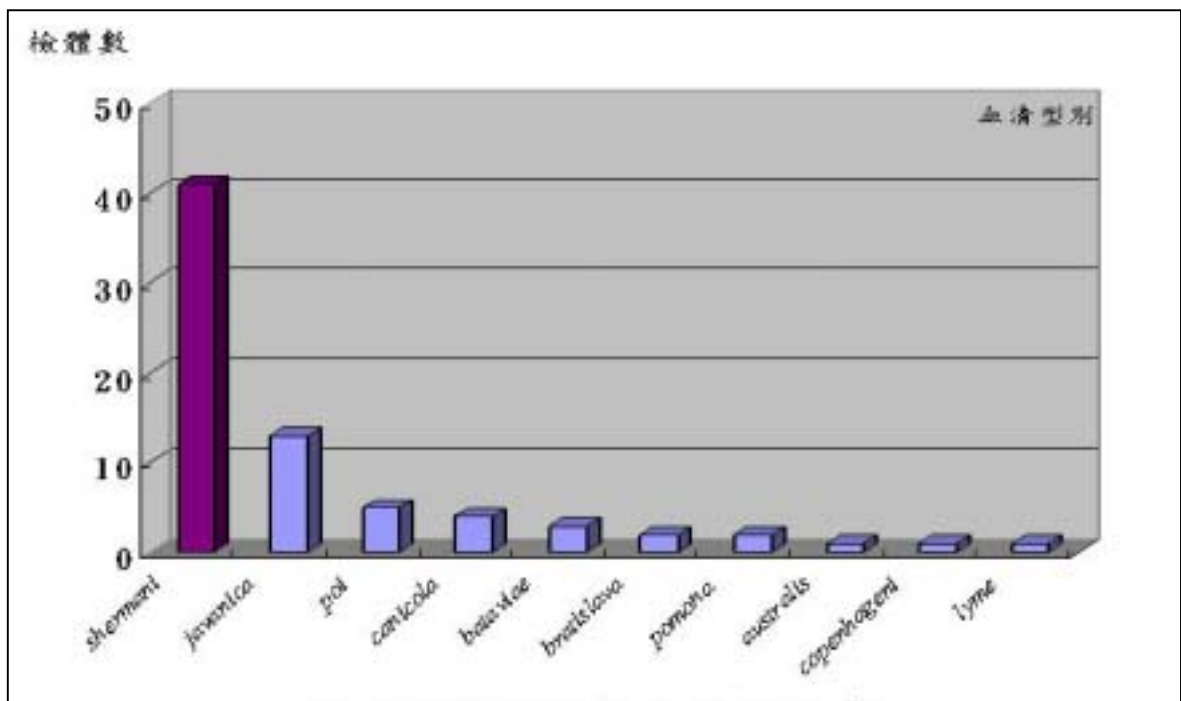
圖四 鉤端螺旋體病病患年齡分布



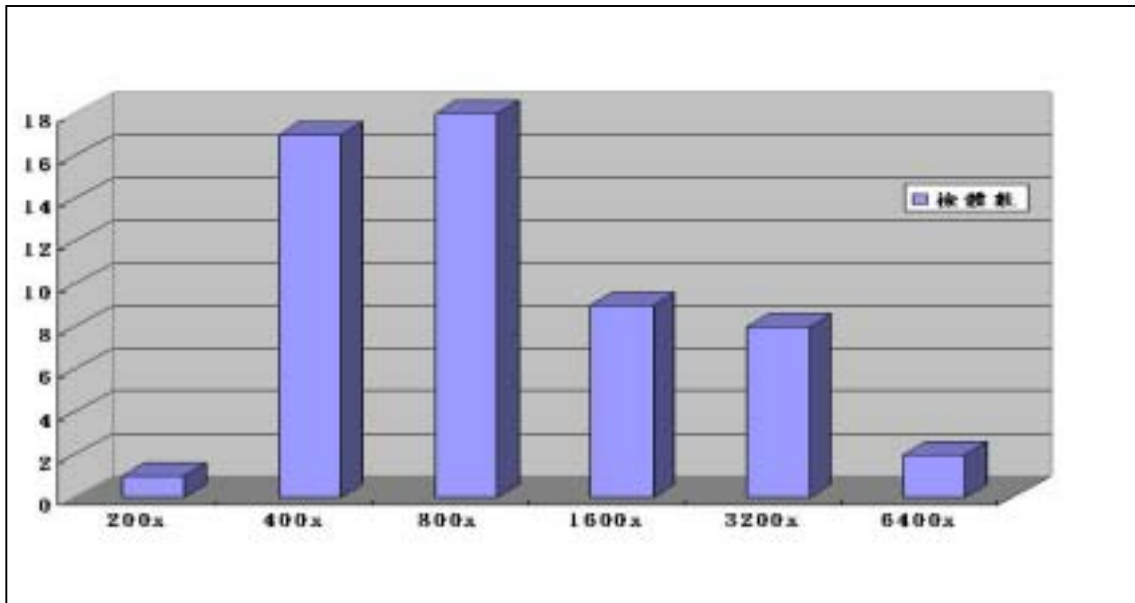
圖五 鈎端螺旋體病病居住地分布



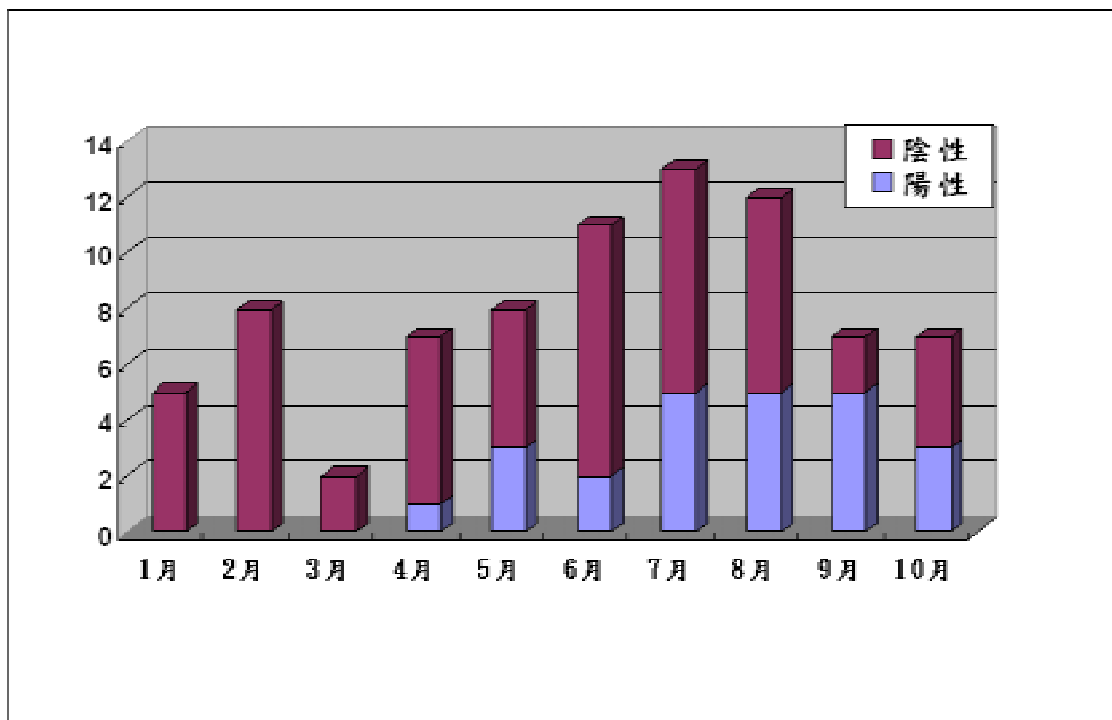
圖六 鈎端螺旋體病陽性血清型分布



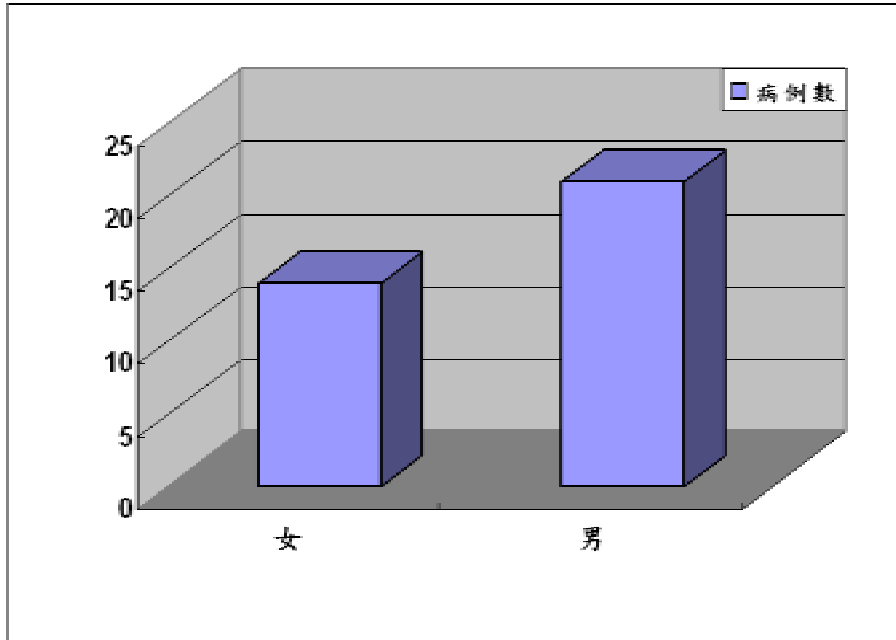
圖七 鉤端螺旋體病陽性抗體力價分布



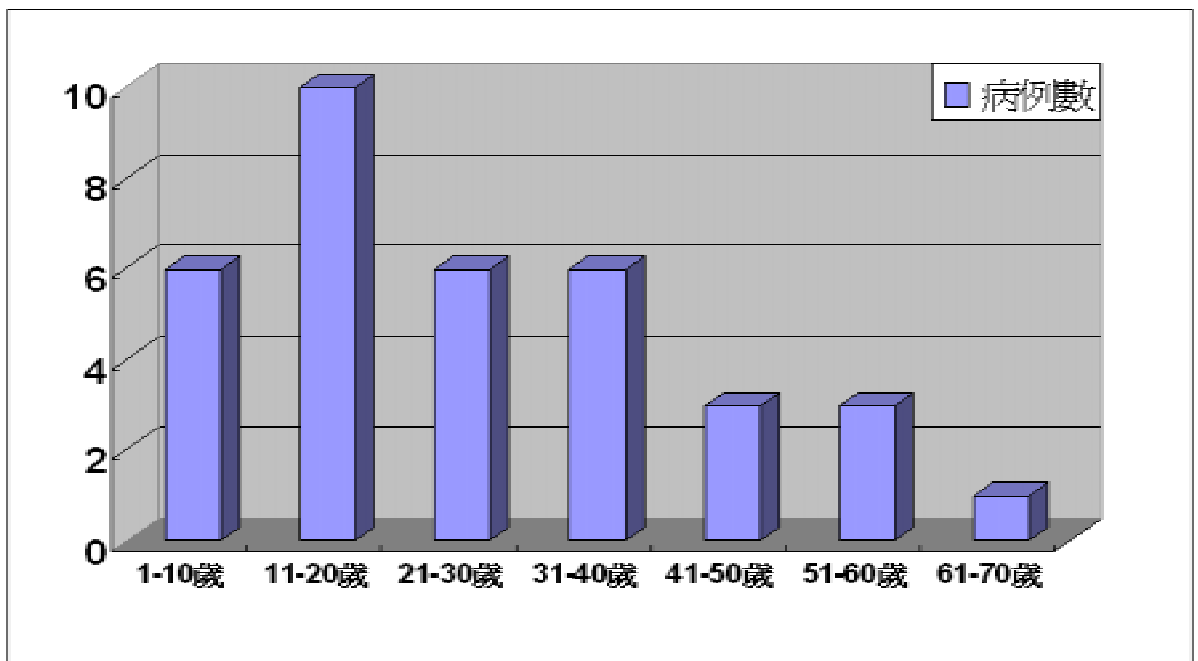
圖八 貓抓病抗體檢驗結果



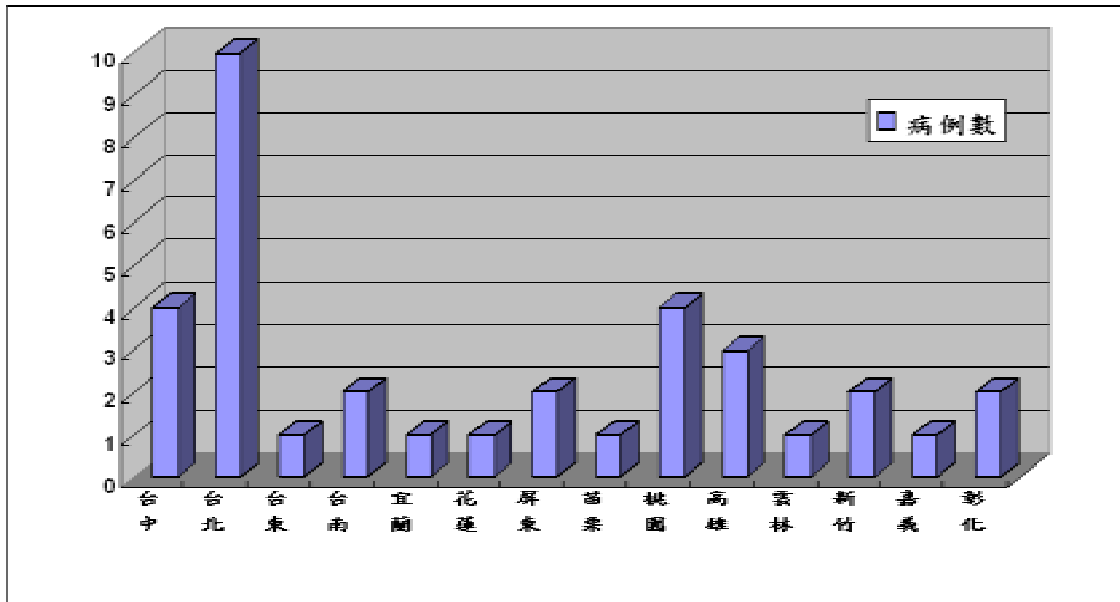
圖九 貓抓病陽性病患性別分布



圖十 貓抓病陽性病患年齡分布



圖十一 貓抓病陽性病患居住地分布



圖十二 貓抓病陽性抗體力價分布

