

計畫編號：DOH94-DC-1002

行政院衛生署疾病管制局九十四年度委託科技研究計畫

**台灣地區鉤端螺旋體病盛行率和危險因子調查**

研究報告

執行機構：財團法人佛教慈濟綜合醫院

計畫主持人：王立信

研究人員：陳立光、蔡佩珍

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

	頁碼
封面	
目錄	1
中文摘要	2
英文摘要	3
前言	4-5
材料與方法	6-8
結果與討論	9-13
結論與建議	14
參考文獻	15-16
圖、表	17-22

## 中文摘要

鉤端螺旋體病是一廣佈世界之人畜共通傳染病，主要是經由直接接觸感染動物所排出含有鉤端螺旋體之體液或組織或間接經由污染的土壤或水源而感染。在台灣，因為人類感染後所引發的疾病症狀非常多樣化，常因臨床診斷的忽視，所以鉤端螺旋體病例很少被報導。一般使用的檢測方法，例如顯微凝膠測試 (microscopic agglutination test, MAT)，或偵測免疫球蛋白 M 之酵素免疫吸附測試 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，這些檢驗方法均未被標準化。在本研究計畫中，原先使用之 real-time PCR 並不能準確的診斷出鉤端螺旋體之病源，916 件檢體中僅有 3 位檢測出鉤端螺旋體病源，因此後半年改以蜂巢氏聚合酶鏈鎖反應 (nested-PCR) 直接從疑似鉤端螺旋體病人的尿液、腦脊髓液、血清，或全血鑑定鉤端螺旋菌的結果，藉此 16S 核糖體核糖核酸基因序列已經偵測出鉤端螺旋體菌種。目前自 933 個臨床檢體中鑑定出有 167 個具有感染到鉤端螺旋體 DNA。這些檢測出來的 DNA，利用基因定序後，上網至 NCBI 資料庫比對，發現在花蓮地區流行性的菌種為 *L. borgpetersenii*、*L. interrogans* 和 *L. myeri*，而在台灣較常見的 *L. noguchii* 和 *L. santarosai* 則很少在我們醫院發現，我們也在這些臨床檢體中發現到另有腐生性但不具病原性的 "*biflexa*" 血清型；我們將所有的聚合酶連鎖反應的去氧核糖核酸產物解序，執行菌株親緣分析 (phylogenetic analysis)，顯現有三種基因群落。這些蜂巢氏聚合酶連鎖反應呈陽性的病人表現出結膜發紅、無菌性腦膜炎、感染性心內膜炎或者與其他病原體共同感染。我們的研究顯現鉤端螺旋體病是極為常見的人畜共通傳染病，因此我們需要建立一套適當的診斷和檢驗措施，以協助診斷此一遠被低估的傳染病。因此，若能更深入了解鉤端螺旋體病的診斷及鑑定，建構更完整的資料庫，將有助於未來在臨床或者是作為防疫單位擬定臺灣鉤端螺旋體病防治工作之參考，以達到健康促進與預防醫學的目的。

中文關鍵詞：鉤端螺旋體病、人畜共通傳染病、蜂巢氏聚合酶連鎖反應

## 英文摘要

Leptospirosis is a common zoonosis acquired by exposure to body fluids of infected animals, or to contaminated soil or water. Leptospirosis remains under-reported in Taiwan because of ignorance and the broad spectrum of clinical manifestations. Tests such as the microscopic agglutination test (MAT) or the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of immunoglobulin M are commonly used but have not been standardized. The 16s rDNA gene sequences have been shown to separate *Leptospira* sp. We can not readily detect Leptospiral pathogen by real-time polymerase chain reaction (rt-PCR). In the present study, we report the use of nested-PCR in the identification of leptospires directly from urine, CSF, serum or whole blood of leptospirosis-suspected patients. Out of 933 clinical samples, 167 leptospirosis cases were identified. DNA sequencing was performed of PCR products and then submitted for analysis using NCBI database. The prevalently endemic strains are *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, and *L. myeri*. The number of *L. noguchii* and *L. santarosai*, the most popular strain in Taiwan, are few in our clinical samples. We also found the saprophytic “*biflexa*” group in clinical samples. These PCR-positive patients presented conjunctival suffusion, aseptic meningitis, infective endocarditis, adrenal insufficiency, and/or co-infections with other pathogens. We sequenced all PCR products and performed the phylogenic analysis, showing that there are three different genetic clusters. Our studies highlight under-recognition of the involvement of severe clinical symptoms with leptospirosis and underdiagnosis of leptospirosis in a region of high endemicity. Thus an appropriate surveillance and control measures need to be established.

**Key words:** Leptospirosis, zoonosis, nested PCR

## 一、前言

鈎端螺旋體症是由鈎端螺旋體屬 (genus *Leptospira*) 中具致病性螺旋體病株所引起的急性發熱性疾病。鈎端螺旋體的臨床表態多為非特異性且大多無明顯的臨床症狀，從自限性的發燒到可能致死的多重器官衰竭—黃膽、腎衰竭、肺出血皆可見 (Bharti et al., 2003)。文獻指出非結石性的膽囊炎和急性胰臟炎在鈎端螺旋體症是極罕見的症狀 (Monno and Mizushima, 1993)。恙蟲病(Scrub typhus)在台灣主要是由 *Orientia tsutsugamashi* 所以起之地方性人畜共通傳染病 (Chi et al., 1997; Tsay and Chang, 1998)。而恙蟲病和鈎端螺旋體的合併感染則在2003年第一次被發現 (Wang et al., 2003)。另外文獻之案例指出在野外活動後亦可發現會有鈎端螺旋體、恙蟲病和類鼻疽之複合感染 (Lu and Tseng, 2005)。嚴重之鈎多螺旋體症的死亡率可能會高達22%，然而更重要的問題是本疾病在開發中的國家雖是重要疾病但是在臨床上的診出率卻不高 (Bharti et al., 2003; Levett, 2001)；而因缺乏具廣泛性、高敏感性及快速的實驗室檢測方法確診鈎端螺旋體，故在診斷及治療實質不易。也因為本疾病在臨床症狀的多變性及對本疾病的了解不多，故在台灣的臨床案例報導亦不多。

鈎端螺旋體廣佈世界各地，在熱帶地區的人會比溫帶地區的人有較高的可能性受此病原的感染，但是不論在開發中或是已開發的國家此病都會此病原的存在。本病的發生率因對此病的不熟悉及缺乏有效的檢出方法而被低估。在花蓮對於鈎端螺旋體症的研究是很重要的，不單是因為本病勢花蓮之地方性疾病，且在慈濟綜合醫院每年亦有數百件鈎端螺旋體症的案例發生；這些病人都可見到結膜充血、無菌性腦膜炎、肝腎症候群、急性呼吸窘迫症 (ARDS) 及伴隨出血之嚴重發熱症狀；也因為本疾病在臨床症狀的多變性，故在疾病的初期多會被誤診為無菌性腦膜炎、流行性感冒、肝病或無病因性的發熱等，故對本疾病的確診不單是靠臨床症狀的判斷，實驗室檢驗亦為一重要的參考依據。

臨床上對於鈎端螺旋體的確診需藉由實驗室的檢測。自從1954年鈎端螺旋體藉由抗原的凝集吸附法分類出數種血清型 (Wolff, 1954) 之後數種的檢測方法如顯微凝及法 (MAT) 及酵素結合免疫吸附法 (ELISA) 去偵測免疫球蛋白M-IgM的從在就廣泛的應用在實驗室的檢測 (Pappas et al., 1985; Winslow et al., 1997)。雖然酵素結合免疫

吸附法 (ELISA)所使用的抗原具高度特異性但是卻沒有統一的標準；但現存對於鈎端螺旋體的分類結果仍不是很理想，還是要經過細菌的純化培養。由臨床分離到的菌株縱使在理想的條件下培養，其仍是耗時耗力且結果有時亦不理想。而現在日趨成熟的分生技術不但可以解決此問題也可以區分菌珠的表現型；另外 DNA-DNA 的雜合反應也可以幫助區分超過200多種不同血型型之鈎端螺旋體的菌株 (Perolat et al., 1998; Ramadass et al., 1992; Yasuda, 1987)。而最近的文獻亦指出16S rDNA的基因定序亦可以區分出不同的鈎端螺旋體之菌株 (Hookey et al., 1993; Perolat et al., 1998) and serovars (Postic et al., 2000)。因此聚合酶連鎖反應—Polymerase chain reaction (PCR)在鈎端螺旋體症的早期診斷及血清型的分類上是一大利器。

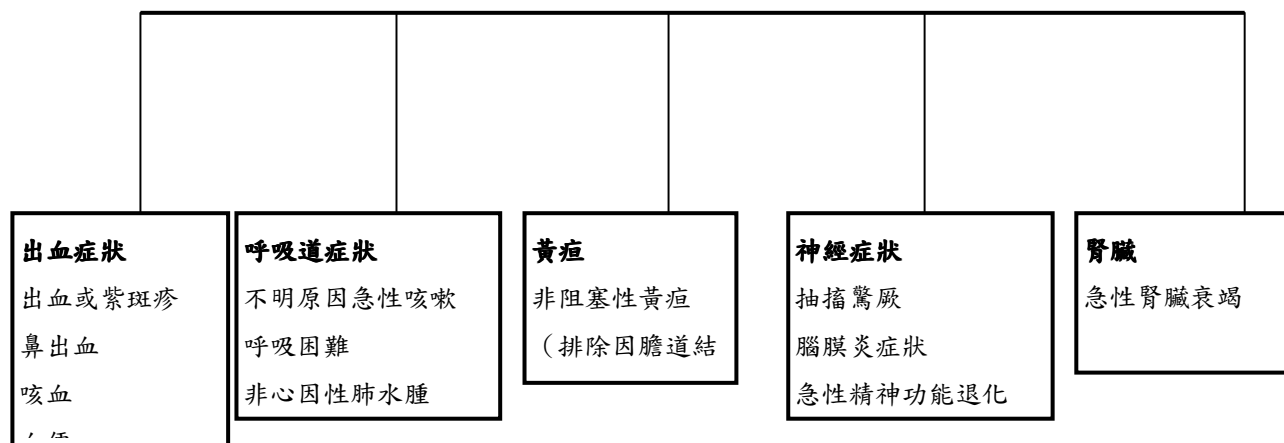
最近基因重組技術的進步，提供本病一個快速且敏感度高的診斷工具。而聚合酶連鎖反應—Polymerase chain reaction (PCR)的應用在病程慢或是難以分離培養之病原體所引起的疾病越來越重要 (Eisenstein, 1990)。因為利用聚合酶連鎖反應—Polymerase chain reaction (PCR)的技術，於少量的臨床檢體中也可以快速且特異性的增幅出鈎端螺旋體的。而核醣體 RNA—rRNA在細菌界中具高度穩定性 (Woese, 1987)。部分核醣體 RNA—rRNA的定序已被大量的分析研究其和核苷酸特徵上的關係(Woese et al., 1985)，因其可幫助細分細菌的分類，包括本病的病原菌 (Paster et al., 1991)。這些資料也可以很準確的區分鈎端螺旋體的 rrs (16S) 基因的核苷酸位置 (Fukunaga et al., 1990)。Merien 等人 (Merien et al., 1992) 曾經發表可以利用增幅出鈎端螺旋體的 rrs (16S) 基因來區分不同種的鈎端螺旋體。為了想看這類型的PCR是否可以成為早期診斷區該疾病的工具，我們使用該方法為主要的檢測工具對疑似有鈎端螺旋體症狀的病人採樣而得的樣本進行檢測。

## 二、 材料與方法

### 研究對象與檢體選取

#### 臨床疑似鈎端螺旋體感染病例

針對臨床上發燒(耳溫 $\geq 38^{\circ}\text{C}$ , 及年齡 $\geq 15$  歲)之病患且合併以下任何一項症狀者：



需採集下列檢體：

- 1.全血(紅頭管一支)5ml, 2.送血清室測鈎端螺旋體急性期IgG、IgM、暗視野檢查。
- 3.含Sodium Citrate全血2支(各5 ml)
- 4.1支送細菌室培養鈎端螺旋體;1支送病毒室進行鈎端螺旋體核酸增幅Nested PCR。
- 尿液20ml, 送細菌室培養鈎端螺旋體、暗視野檢查。
- 全血(紅頭管一支)5ml, 送病毒室測恙蟲病、地方性斑疹傷寒及Q熱之IgG、IgM。
- 全血(綠頭管一支)5ml, 送病毒室測恙蟲病、地方性斑疹傷寒及Q熱之PCR與病原體培養。
- 5.疑似恙蟲病、鈎端螺旋體或漢他病毒者請測PT、aPTT、INR、Bil (T/D)、CRP、Na、K、Cl、Ca、Mg、CBC/DC、GOT/GPT、LDH、CK、CK-MB、amylase、lipase、BUN/Cr、& blood culture、urine culture、CXR, 6.不7.正常之結果須定期追蹤(至少一禮拜一次)
- 8.會診感染科醫師,
- 9.嚴重病患及懷疑恙蟲病或鈎端螺旋體之患者先給予crystal- penicillin 3MU q6h 及 levofloxacin 500mg IVD qd
- 10.有紅疹或eschar請會診皮膚科做皮膚切片
- 11.通知感控護理師(2277、2278)做法定傳染病及症候群通報
- 12.須在二至三禮拜後測恢復期血清
- 13.簽署家屬同意書

## 鈎端螺旋體分離

病人血液檢體三滴或經離心移除雜物之尿液檢體 50 $\mu$ L 種入 EMJH 培養液中，在 30°C 培養箱中培養，每兩週取出在暗視野顯微鏡下觀察鈎端螺旋體之出現及濃度。

## 鈎端螺旋體核酸增幅 Nested PCR (Merien et al., 1992)

1. 檢體種類：含 Sodium Citrate 抗凝劑的血漿、尿液、組織
2. 檢體 DNA 的萃取：遵照 QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini Kit 的操作步驟，流程如下：
  - A. 取 20  $\mu$ l QIAGEN Protease 至 1.5ml 的離心管內
  - B. 加入 200  $\mu$ l 檢體
  - C. 加入 200  $\mu$ l Buffer AL，並於震盪器上震盪 15 秒
  - D. 置於 56°C 的乾浴槽內 10 分鐘
  - E. 加入 200 196-100% Ethanol，並於震盪器上震盪 15 秒
  - F. 將此混合液加至 QIAamp spin column，並以 6000 g (8000 rpm) 離心 1 分鐘
  - G. 倒除過濾液
  - H. 加入 500 1 Buffer AW1，並以 6000 g (8000 rpm) 離心 1 分鐘
  - I. 倒除過濾液
  - J. 加入 500 1 Buffer AW2，並以 6000 g (8000 rpm) 離心 3 分鐘
  - K. 倒除過濾液
  - L. 加入 200 1 Buffer AE，並以 6000 g (8000 rpm) 離心 1 分鐘
  - M. 收集過濾液(DNA)
3. 使用 Roche 的 FastStar 酵素反應試劑套組，依序加入下述試劑：
  - 1<sup>st</sup> run:  
45  $\mu$ l FastStar PCR Master mixture、3 pmol/ $\mu$ l 核酸引子(序列如下)、5  $\mu$ l 檢體 DNA，最終反應體積為 50  $\mu$ l。  
核酸引子序列：Lepto A(GGCGG CGCGT CTTAA ACATG)  
Lepto B (TTCCC CCCAT TGAGC AAGAT T)
  - 2<sup>nd</sup> run:  
45  $\mu$ l FastStar PCR Master mixture、3 pmol/ $\mu$ l 核酸引子(序列如下)、1  $\mu$ l 1<sup>st</sup> run 的 PCR 產物，最終反應體積為 50  $\mu$ l。  
核酸引子序列：Lepto C (CAAGT CAAGC GGAGT AGCAA)  
Lepto D (CTTAA CCTGC TGCCT CCCGT A)
4. PCR 反應進行：使用 MJ PCR 機器(亞醫)，PCR 反應條件為 40 次循環之 95°C/30 秒  $\rightarrow$  55°C/ 30 秒  $\rightarrow$  72°C/ 60 秒。



### **細菌株 Bacterial strains**

6 株標準菌株 *Leptospira* strains, *L. biflexa* serovar Andamana, *L. noguchii* serovar Panama, *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, *L. santarosai* serovar Shermani, *L. bargpetersenii* serovar Ballum, *L. meyeri* serovar Samarng, 均以 homemade EMJH (Faine, 1982) 培養之。這些菌株分別來自 Center for Disease Control (CDC), Taiwan (Taiwan Reference Center), 及 Koninklijk Instituut voor de Tropen (KIT), Amsterdam, The Netherlands。

### **構築質體 Plasmid constructs**

所有質體均保存於 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  中。來自 6 株標準菌株中所增值之 289 bp PCR 產物(16S rDNA)均被選殖入 pT7 blue T-vector (Novagen, Madison, WI), 分別命名為 pPJT, pPJT, pPJT, pPJT, pPJT and pPJT。所有的質體均再經過 DNA 定序確認。

### **DNA 定序**

PCR 產物純化後以 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit ABI PRISM dGTP Terminator 3.0 於 ABI 3730 DNA Analyzer (Applied-Biosystems, Foster City, CA) 進行定序。所獲得之序列以 Gene-Bank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 中 electronic multi-alignment program ([www.toulouse.inra.fr/multalin.html](http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html)) 比對獲知病原菌之種類。

### **親緣分析 (Phylogenetic analysis)**

以所有分析細菌之 16S rRNA gene (16S ribosomal DNA [rDNA]) 基因序列，進一步分析這些序列間的親緣關係。同時以 *Spirochaeta halophila* type strain M88722 之 16S rDNA 序列共同以 Ribosomal Database Project 及 Default substitution matrix (IUB) 比較 (Cole et al., 2005), 可利用 ClustalW 1.82 Figure 程式繪出一張類似親緣關係樹的圖 (Thompson et al., 1994), 以 TreeView (Page, 1996) 顯圖。在其中以 *Spirochaeta halophila* 作為 outgroup。

### **臨床病例分析**

以慈濟醫院鉤端螺旋體病患者臨床病例資料做模型，進行回溯研究和病例對照研究。

### 三、 結果

#### Real-time 聚合酶連鎖反應

本計劃執行之前半年，所有檢體均由臨床病毒實驗室以 real-time 聚合酶連鎖反應檢測臨床檢體，半年中共送件 917 個檢體，然而僅偵測到 3 次檢體中含有鈎端螺旋體 DNA，且其中臨床病毒實驗室又經歷一次嚴重之 DNA 污染，導致所有檢體之聚合酶連鎖反應均為陽性，且經 DNA 序列分析後均為所進行偵測的標準菌株，因此進行 DNA 之去污染後，仍未見以 real-time 聚合酶連鎖反應偵測臨床檢體鈎端螺旋體 DNA 有所改善。

自目前曾廣泛使用於鈎端螺旋體分子診斷之 PCR 引子中(Gravekamp et al., 1993; Kee et al., 1994; Merien et al., 1992; Murgia et al., 1997; Savio et al., 1994; Segers et al., 1992; Woo et al., 1997)，已篩選出一對較能普遍適用之 PCR 引子(Merien et al., 1992)，能廣泛性的適用於自臨床檢體中純化之核酸增幅多數鈎端螺旋體菌種，因此建議使用此對引子以蜂巢氏聚合酶連鎖反應偵測鈎端螺旋體菌種，但是由於病毒實驗室長期以來處理相當多數之臨床檢體進行分子診斷，因此以蜂巢氏聚合酶連鎖反應偵測臨床檢體常出現偽陽性之結果(見期中報告)。故將此臨床檢驗改至不常處理臨床檢體之實驗室中進行分子診斷是下半年研究執行之考量。

#### 蜂巢氏聚合酶連鎖反應放大的專一性及敏感度

為了測試針對鈎端螺旋體設計的引子專一性，除了取六株鈎端螺旋體的標準菌株 DNA 外，還另外選取了其他致病菌種的 DNA，再利用這些引子經過蜂巢氏聚合酶連鎖反應放大 DNA 訊號(圖一)，這六隻已知的鈎端螺旋體標準菌株皆可以產生陽性的訊號(在瓊脂膠中有 290 bp 的訊號)。而其他像大腸桿菌、宋內氏志賀桿菌、沙門氏桿菌、金黃色葡萄球菌、和化膿性鏈球菌這些不含有鈎端螺旋體 DNA 的菌種，經過聚合酶連鎖反應放大後則看不到任何訊號。因此這六隻已知的鈎端螺旋體 DNA 選殖入質體中，並 DNA 定序完成，可用來做陽性控制組。

之前已經利用不同細菌的 DNA 證實此蜂巢氏 PCR 具有很高的敏感性，且可偵測到的 DNA 範圍為 1 ng 到 10 fg (圖二)，因此這個方法大約可以偵測到 4 隻細菌(一隻細

菌約 5 fg)。

### 將從疑似患有勾端螺旋病的病人身上取得的臨床檢體，利用聚合酶連鎖反應放大勾端螺旋體 DNA

花蓮慈濟綜合醫院每年大約會有 100 個疑似為勾端螺旋病的個案。這些個案會出現像結膜充血、無細菌性腦膜炎、肝腎症候群、急性呼吸窘迫症和嚴重的發燒伴隨出血等。從 2005 年 7 月到 2005 年 12 月，總共收取了 933 個疑似勾端螺旋病的案例，這些案例的勾端螺旋體 DNA 利用已知的方法抽取（從病患的血液、血清、尿液和腦脊髓液）。其中有 167（17.9%）個檢體利用聚合酶連鎖反應的方法被檢測出有勾端螺旋體的 DNA（表一）。而這些被檢驗出來的檢體中，在血液中有 69 個（17.1%）檢體檢驗出來勾端螺旋體 DNA，另外也有 91 個尿液（17.8%）的檢體，以及 7 個（53.8%）血清的檢體均被檢驗出，然而在腦脊髓液中則沒有發現到勾端螺旋體 DNA 的存在。

這些檢測出來的 DNA，利用基因定序後，上網至 NCBI 資料庫比對，發現在花蓮地方性的菌種為 *L. borgpetersenii*、*L. interrogans* 和 *L. myeri*（表二及圖三），而在台灣較常見的 *L. noguchii* 和 *L. santarosai* 則很少在我們醫院發現（表二及圖三）。我們也在這些臨床檢體中發現到另有營腐生但不具病原性的 *biflexa* 血清型。

### 臨床徵狀

人類的感染疾病在熱帶地區比在溫帶地區還要來得盛行，但是傳染率不論在已開發或開發中國家都同樣會發生。而如此盛行的原因，就在對於病病的認知不足以及診斷技術不夠快速。因為於花蓮慈濟綜合醫院即發現了上百個勾端螺旋病的病例，花蓮被認為是勾端螺旋病的盛行區域，因此研究花蓮地區的勾端螺旋病就更顯重要了。而這些患有勾端螺旋病的病人其症狀有結膜充血(conjunctival suffusion)、無菌性腦膜炎、肝腎症候群、急性呼吸窘迫症候群以及嚴重的發燒伴隨出血。但是很多沒有症狀的病人直到最近才被診斷出來。令人驚訝的是我們發現到有一大群的病人呈現有類似感冒的症狀，包括發高燒和黃疸，而利用聚合酶連鎖反應的方式偵測到其中部份的病人有 16S *Leptospira* DNA 的存在。基因定序我們所放大的片段時，也證實了其偵測到的確實為 *Leptospira* spp.。

現在亦發現到有更多的病人在感染 *Leptospira* 時，也同時有其他病原菌的感染，像

是恙蟲病、沙門桿菌病、大腸桿菌敗血症、克雷伯氏肺炎桿菌肝膿瘍、金黃色葡萄球菌引起的心內膜炎或是骨髓炎及關節炎、蜂窩性組織炎或壞死性肌膜炎或是鏈球菌引起毒性休克症候群、隱球菌腦膜炎、黴菌血症或念珠菌食道炎、像是結核性腦膜炎和脊椎結核或皮膚結核的肺外結核、非結核分枝桿菌感染、帶狀疱疹、出血性或散播型帶狀疱疹、單純疱疹的復發或疱疹性腦炎、更甚有細菌性腦膜炎的併發。

其他會伴隨晚期併發症像是腦神經方面的外展神經麻痺、顏面神經麻痺、聽力喪失、以及心房顫動、第一度房室傳導障礙或是病狀房室症候群等的心律不整，以及腸胃道出血和食道鏡脈曲張破裂、肝腦病變、自發性細菌性腹膜炎等和肝硬化有關的併發症，或是肝腎症候群、尿路結石、膽結石合併膽囊炎、胰臟炎、第一型糖尿病、腹瀉，急性腹症合併內出血、腸胃道動脈阻塞、剝離性主動脈瘤、細菌性動脈瘤、續發性高血壓、肝門靜脈栓塞、深部靜脈栓塞、腎毒症、蜘蛛膜下出血、硬腦膜下出血、小腦出血、左心房栓塞合併大脑梗塞。眼科併發症包括白內障、青光眼及葡萄膜炎等。影響心臟方面可能會像心肌炎，或是急性心肌梗塞合併充血性心衰竭。

在罕見情形中，有的會表現誤診為性的肝臟假性腫瘤，或是其他惡性腫瘤像是肺癌，大腸癌，白血病和HIV共同感染也會抑制細胞免疫以及引起CD4細胞數目降低。令人振奮的發現還有，許多自體免疫疾病如紅癍性狼瘡、類風濕性關節炎及Behcet's disease，均可能與勾端螺旋病有關。簡言之，勾端螺旋病的臨床表徵就像是萊姆病與晚期梅毒的結合。

有趣的是，病人自己或過去一起長大之玩伴常有曾得顏面神經麻痺、單側耳聾、後天性鬥雞眼、心律不整、甲狀腺腫等，都提供診斷鉤端螺旋體感染之線索。

### 利用 290 bps 的 16S rDNA 基因分析親緣關係

過去的文獻已顯示即使各個勾端螺旋體之間的 16S rDNA 基因序列相當的相似，但仍可利用 16S rDNA 的基因序列將不同種的勾端螺旋體區分出來(Postic et al., 2000)。在 167 個經由聚合酶連鎖反應証實具有 *Leptospira* 感染的臨床檢體中，將含有 289 個核苷酸的 16S rDNA 基因利用 NJ tree 的方式分析其親緣關係 (圖四)。經由定序分析顯示，依據勾端螺旋體 16S rDNA 的 66 至 355 位點，可再將之細分為 *Spirochaetaceae* 以及 *Leptospiraceae*。

#### 四、討論

人類鉤端螺旋體症之感染在各地區皆有發生 (Bharti et al., 2003; Levett, 2001; Vinetz, 2001), 在牧場及屠宰場工作之相關人員被認為是感染鉤端螺旋體症之高危險族群, 而以乳牛場工作人員之風險最高 (Black et al., 2001), 1982年, 在非洲索馬利亞調查105個健康民眾及107個感染血吸蟲的病患, 其血清盛行率分別為37%及64%, 主要感染之血清型為Bratislava (Cacciapuoti et al., 1982)。1986年所做之調查, 發現乳牛場工作人員感染之血清型以Hardjo為主 (Onyemelukwe, 1993; Waitkins, 1986)。1993年在印度所做的調查, 主要感染之血清群為Autumnalis (Ratnam et al., 1993)。同年, Onyemelukwe針對奈及利亞地區, 而主要感染之血清型為Canicola (Onyemelukwe, 1993)。Holk等回顧1970年至1996年丹麥地區鉤端螺旋體症之病例, 發現主要感染之血清型為Icterohaemorrhagiae及Sejore (Holk et al., 2000)。在台灣首次觀察到「納莉」颱風過後病例區集的現象 (Yang et al., 2001)。

台灣地區1968年之報告指出主要感染之血清型為Canicola及Icterohaemorrhagiae等兩種 (Fresh et al., 1968)。1970年之報告調查台中縣霧社發祥村, 主要感染之血清群為 Javanica及 Hebdomadis兩種。1981年林等人以快速顯微凝集試驗檢測血清, 發現主要感染之血清型為 Grippotyphosa、Autumnalis、Pomona及Icterohaemorrhagiae。台灣人的病例報告自1996年起再度受到臨床醫師的重視 (Yang et al., 1997; Yang et al., 2001)。1997年高等人之調查發現, 其中有3名感染之血清型為 Shermani。1998年大量普查時發現台灣盛行感染之血清型以 Shermani最高。由上述調查可知, 鉤端螺旋體症在台灣地區亦相當普及。

花蓮慈濟醫學中心自2004年1月至6月已通報118例疑似鉤端感染病例, 其中44例經衛生署疾病管制局以MAT法確診, 相較以前平均每年通報84例, 確診13例, 有明顯增加的趨勢; 目前自933個臨床檢體中鑑定出有167個具有感染到鉤端螺旋體DNA。本研究的結果顯示所收集之病患檢體中主要是出現: *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, and *L. myeri*。然而以往台灣所熟知常見之*L. noguchii*及*L. santarosai*在我們所收集的檢體中較少見。而且我們也發現有甫生細菌種類“*biflexa*”出現於臨床檢體中; 許多案例在使用正確的抗生素(Penicillin G)治療後效果很好, 這些結果將

提供防疫單位作為適時調整預防與控制鉤端螺旋體病防疫工作之參考。

主持人與協同主持人在臨床病人中看到許多疑似鉤端螺旋體感染的患者，多有結膜充血及灰指甲 (onychomycosis)。除了臨床症狀完全符合鉤端螺旋體感染，而經以針對鉤端螺旋體之抗生素治療，亦常產生戲劇性的優良效果。另外也有部分病人檢體來自台灣西部，包括台北、桃園、雲林、台南等地。長期以來，醫界一直誤以為鉤端螺旋體感染是一種急性感染症，其症狀在暴露病源之後經二至三十天的潛伏期而發病。事實上，絕大部分的鉤端螺旋體感染均為慢性疾病之再復發，這點可以鉤端螺旋體感染發病的引發因子(triggering event)說明。

臨床診斷鉤端螺旋體感染，最重要的是病史詢問必須包括暴露史(exposure history)，如高危險職業：農夫，例如種水稻、種菜，使用雞糞或市售有機肥作肥料，礦工，下水道維修人員，養殖業，屠宰業，漁業工作人員，傳統市場工作人員，廚師，獸醫，軍人，資源回收等。或曾有接觸脊椎動物（無論死活）、其排泄物或所污染的泥土或水之病史。這些包括寵物，如狗、鳥、魚、金錢鼠；以前養過豬，養雞養鴨養鵝，養筆鼠；幼童常去菜園玩耍。更重要的卻是，鉤端螺旋體感染都有引發因子(triggering event)，例如最近一個月內曾有皮肉傷，或數月前(通常是發病三個月前)曾受撞擊，無論是跌倒、車禍、打架或墜馬，甚至近期(通常是一兩週內)的手術也可能引發鉤端螺旋體感染發作。

由於鉤端螺旋體病常會合併其他感染，使得臨床醫師很容易誤診此病。當培養長出細菌、黴菌時，絕大部分醫師會放棄原先鉤端螺旋體病之診斷。當病毒或結核的診斷確立時，臨床醫師也常以為這就是最後的答案。使用青黴素治療無效時，大部分醫師也難相信鉤端螺旋體病仍然存在病人身上。事實上，單純疱疹復發或巨細胞病毒感染再活化，都常是鉤端螺旋體病治療失敗的原因。

因國內目前各大醫學中心及疾管局並未建立可信的實驗室診斷方法，本院已成功建立國內唯一能以分子診斷鉤端螺旋體之標準實驗室，並持續突破自臨床檢體培養出臨床菌株，對本國診斷鉤端螺旋體感染症有重大突破，也使本醫學中心又有一項醫療水準達到領先全國的地位。

## 五、結論與建議

本研究的結果顯示所收集之病患檢體中主要是出現：*L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, and *L. myeri*。然而以往台灣所熟知常見之*L. noguchii* 及*L. santarosai*在我們所收集的檢體中較少見。而且我們也發現有腐生細菌種類“*biflexa*”出現於臨床檢體中。顯見東台灣鈎端螺旋體之優勢種相較於先前之研究不同，這都顯示在建立檢驗方法的同時，必須顧及流行性菌株的存在。

由於目前針對鈎端螺旋體之臨床檢驗主要是以血清學為多，然而一旦篩檢菌種菌種類中不包含流行性菌株種類時，則檢驗結果則會有偽陰性之結果出現。由於目前我們自數對目前曾廣泛使用於鈎端螺旋體分子診斷之PCR引子中(Gravekamp et al., 1993; Kee et al., 1994; Merien et al., 1992; Murgia et al., 1997; Savio et al., 1994; Segers et al., 1992; Woo et al., 1997)，已篩選出一對較能普遍適用之PCR引子(Merien et al., 1992)，能廣泛性的適用於自臨床檢體中純化之核酸增幅多數鈎端螺旋體菌種，因此建議使用此對引子用於偵測床檢體之鈎端螺旋體菌種將是可以改善臨床鑑定及診斷。

人類的感染其症狀多呈現有類似感冒的症狀，包括發高燒和黃疸、結膜充血(conjunctival suffusion)、無菌性腦膜炎、肝腎症候群、急性呼吸窘迫症候群以及嚴重的發燒伴隨出血。亦發現到感染 *Leptospira* 同時也有其他病原菌的感染或伴隨晚期併發症像是腦神經方面的缺失、眼科併發症、以及心律不整、自發性細菌性腹膜炎等和肝硬化有關的併發症。許多自體免疫疾病如紅癍性狼瘡、類風濕性關節炎及 Behcet's disease，均可能與鈎端螺旋病有關。此外，顏面神經麻痺、單側耳聾、後天性鬥雞眼、心律不整、甲狀腺腫等，都提供診斷鈎端螺旋體感染之線索。簡言之，鈎端螺旋病的臨床表徵之危險因子就像是萊姆病與晚期梅毒的結合。

我們的研究顯現迫切需要建立一套適當的診斷和檢驗措施，以協助診斷高度流行的鈎端螺旋體病。因此，若能更深入了解鈎端螺旋體病的診斷及鑑定，建構更完整的資料庫，將有助於未來在臨床或者是作為防疫單位擬定鈎端螺旋體病防治工作之參考，以達到健康促進與預防醫學的目的。我們期待鈎端螺旋體病的進一步研究，將可解答醫學上的諸多盲點。

## 六、参考文献

- Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E., and Vinetz, J. M. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3, 757-771.
- Black, P. F., Corney, B. G., Smythe, L. D., Dohnt, M. F., Norris, M. A., and Symonds, M. L. (2001). Prevalence of antibodies of *Leptospira* serovars in beef cattle in central Queensland. *Aust Vet J* 79, 344-348.
- Cacciapuoti, B., Nuti, M., Pinto, A., and Sabrie, A. M. (1982). Human leptospirosis in Somalia: a serological survey. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76, 178-182.
- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., McGarrell, D. M., Garrity, G. M., and Tiedje, J. M. (2005). The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 33, D294-296.
- Faine, S. (1982). Guidelines for the control of leptospirosis, W. H. Organization, ed. (Geneva, World Health Organization).
- Gravekamp, C., Van de Kemp, H., Franzen, M., Carrington, D., Schoone, G. J., Van Eys, G. J., Everard, C. O., Hartskeerl, R. A., and Terpstra, W. J. (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 139, 1691-1700.
- Holk, K., Nielsen, S. V., and Ronne, T. (2000). Human leptospirosis in Denmark 1970-1996: an epidemiological and clinical study. *Scand J Infect Dis* 32, 533-538.
- Kee, S. H., Kim, I. S., Choi, M. S., and Chang, W. H. (1994). Detection of leptospiral DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 32, 1035-1039.
- Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14, 296-326.
- Merien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., and Saint Girons, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 30, 2219-2224.
- Murgia, R., Riquelme, N., Baranton, G., and Cinco, M. (1997). Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospira occurring in water. *FEMS Microbiol Lett* 148, 27-34.
- Onyemelukwe, N. F. (1993). A serological survey for leptospirosis in the Enugu area of eastern Nigeria among people at occupational risk. *J Trop Med Hyg* 96, 301-304.
- Page, R. D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12, 357-358.
- Postic, D., Riquelme-Sertour, N., Merien, F., Perolat, P., and Baranton, G. (2000). Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res Microbiol* 151, 333-341.
- Ratnam, S., Everard, C. O., Alex, J. C., Suresh, B., and Thangaraju, P. (1993). Prevalence of leptospiral agglutinins among conservancy workers in Madras City, India. *J Trop Med Hyg* 96,



41-45.

Savio, M. L., Rossi, C., Fusi, P., Tagliabue, S., and Pacciarini, M. L. (1994). Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J Clin Microbiol* 32, 935-941.

Segers, R. P., van Gestel, J. A., van Eys, G. J., van der Zeijst, B. A., and Gaastra, W. (1992). Presence of putative sphingomyelinase genes among members of the family Leptospiraceae. *Infect Immun* 60, 1707-1710.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

Vinetz, J. M. (2001). Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 14, 527-538.

Waitkins, S. A. (1986). Leptospirosis in man, British Isles: 1984. *Br Med J (Clin Res Ed)* 292, 1324.

Woo, T. H., Smythe, L. D., Symonds, M. L., Norris, M. A., Dohnt, M. F., and Patel, B. K. (1997). Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett* 150, 9-18.

Yang, C. W., Pan, M. J., Wu, M. S., Chen, Y. M., Tsen, Y. T., Lin, C. L., Wu, C. H., and Huang, C. C. (1997). Leptospirosis: an ignored cause of acute renal failure in Taiwan. *Am J Kidney Dis* 30, 840-845.

Yang, C. W., Wu, M. S., and Pan, M. J. (2001). Leptospirosis renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 16 Suppl 5, 73-77.

## 七、圖、表

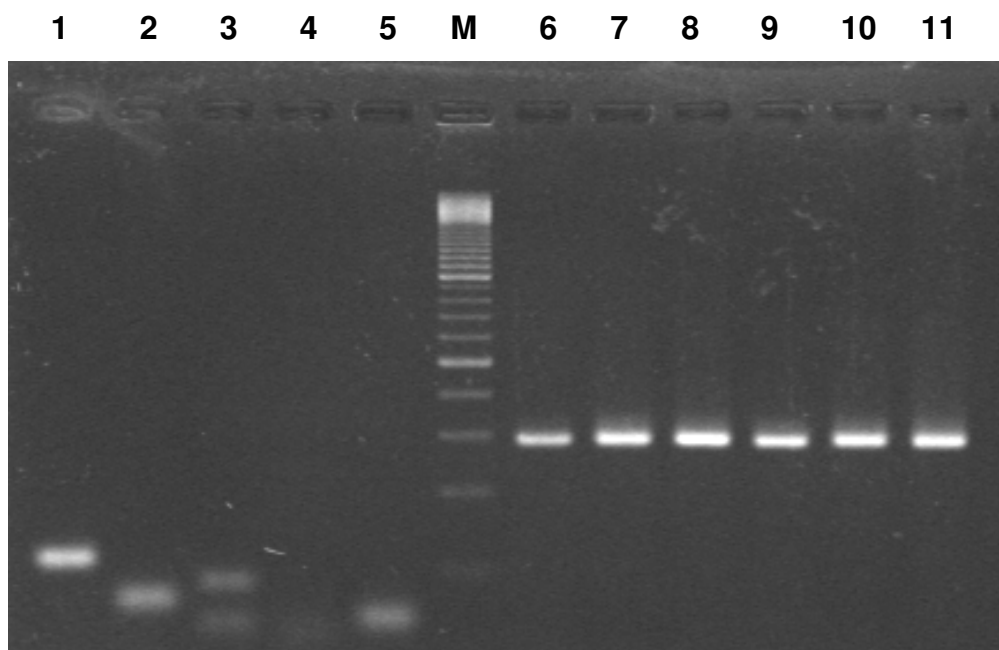
Table I

Specimen	Sample (%)	PCR positive (%)
Blood	404 (43.3)	69 (17.1)
Urine	510 (54.7)	91 (17.8)
Serum	13 (1.4)	7 (53.8)
CSF	6 (0.6)	0 (0.0)
Total	933 (100)	167 (17.9)

Table II

<b>Strains</b>	<b>No.</b>	<b>Serovar</b>	<b>No.</b>
<i>L. biflexa</i>	10	<i>L. biflexa</i> strain PatocIT	10
<i>L. borgpetersenii</i>	81	<i>L. borgpetersenii</i> serovar Ballum	81
<i>L. fainei</i>	1	<i>L. fainei</i> serovar Hurstbridge strain BUT 6	1
<i>L. interrogans</i>	37	<i>L. interrogans</i> serovar Bratislava	5
		<i>L. interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae	3
		<i>L. interrogans</i> serovar lai str.	11
		<i>L. interrogans</i> serovar Pyrogenes	5
		<i>L. interrogans</i> strain 48/95	13
<i>L. meyeri</i>	23	<i>L. meyeri</i> strain Sofia 874	18
		<i>L. meyeri</i> strain Veldrat Semarang 173	5
<i>L. noguchii</i>	7	<i>L. noguchii</i> serovar Panama strain CZ214K	1
		<i>L. noguchii</i> strain LT796	6
<i>L. parva</i>	5	<i>L. parva</i> strain H	5
<i>L. santarosai</i>	3	<i>L. santarosai</i> serovar Georgia clone L025	2
		<i>L. santarosai</i> serovar Shermani strain 1342KT	1

Fig. 1



Lane 1: *Escherachia coli*  
Lane 2: *Shigella sonnei*  
Lane 3: *Salmonella* spp.  
Lane 4: *Staphylococcus aureus*  
Lane 5: *Streptococcus pyogenes*  
M: 100 bp DNA ladder marker

Lane 6: *L. biflexa* serovar Andamana  
Lane 7: *L. interrogans* serovar icterohaermorrhagiae  
Lane 8: *L. noguchii* serovar Panama  
Lane 9: *L. santarosai* serovar Shermani  
Lane 10: *L. barigpetersenii* serovar Ballum  
Lane 11: *L. meyeri* serovar Samarng

Fig. 2

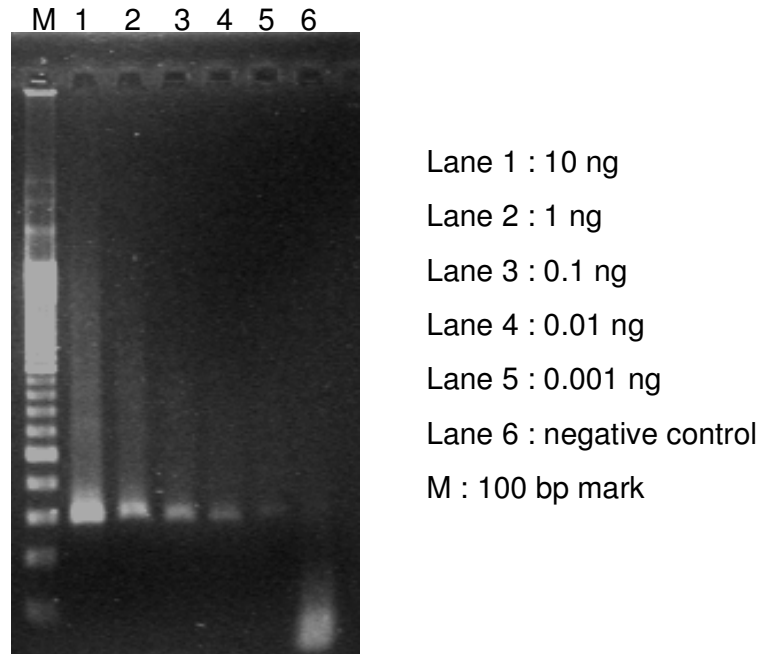
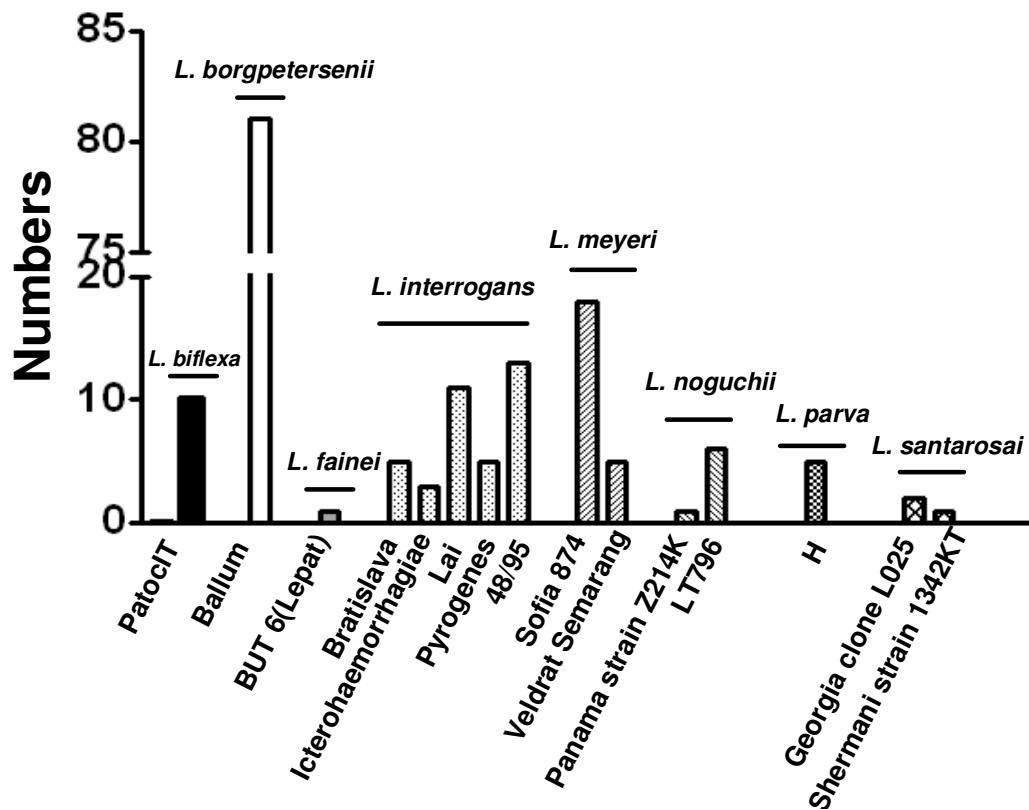
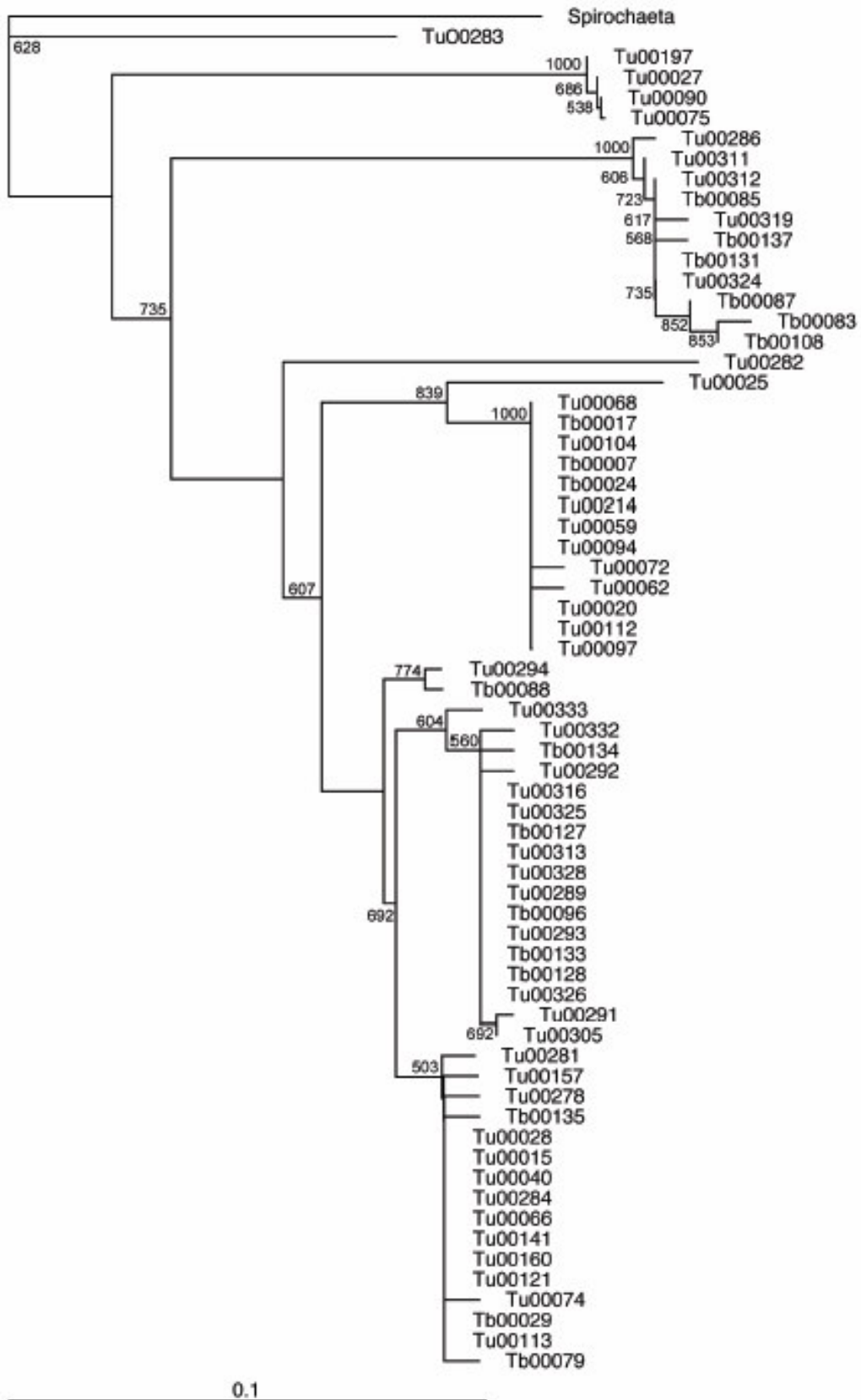


Fig. 3



**Fig 3. A schematic diagram of clinical strain distribution.** To determine the of PCR results, the sequences of PCR products were then submitted for analysis using NCBI database. The most abundant strain is *L. borgpetersenii* Ballum.

Fig. 4



**Fig 4. Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences of the 66 Leptospira strains.** The operational taxonomic units labeled as Tu and Tb stands for each of the Leptospira strains isolated from urine or blood. The rDNA sequence of *Spirochaeta halophila* type strain M88722 was used as the outgroup. The tree was inferred by the neighbor-joining (NJ) method using ClustalW. Bootstrap values above 500 from 1000 resampling were shown for each internal node. The scale bar represents 0.1 nucleotide substitution per position.