

## 疑似流行性腦脊髓膜炎的病例報告

### 摘 要

通常會被認為感染腦膜炎是以臨床上的症狀，例如發燒、噁心、嘔吐、頸部僵硬和皮膚發疹(紫斑)為基準，而病原學的診斷及確定病例的判別，則是依據由無菌部位分離出腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitidis*)為準，然而採檢前早已投予抗生素治療，或是檢體採檢不正確，導致檢體送達實驗室時細菌已死亡時，往往會造成培養結果為偽陰性的情況，因此利用分子診斷的方法，快速、準確找出病原菌是很重要的。本局南區分局接獲南部某軍醫院通報一疑似流行性腦脊髓膜炎的病例，由於本次個案的血液及腦脊髓液檢體其細菌培養結果為陰性，腦脊髓液做革蘭氏染色，發現革蘭氏陰性球菌的存在，為了釐清感染源，本局昆陽辦公室的細菌實驗室也以 PCR 的方法，在腦脊髓液檢體中偵測出腦膜炎雙球菌核酸(DNA) 的存在，間接證明個案感染流行性腦脊髓膜炎的可能性。此外在醫院通報之初期本分局也對相關之接觸者進行採檢和衛教及環境消毒等防疫措施。

### 前 言

流行性腦脊髓膜炎或稱腦膜炎球菌性腦膜炎(Meningococcal meningitis)是由腦膜炎雙球菌所引起，這是一種快速且猝發的細菌性疾病，百分之八十的病例會有腦膜炎的現象，在兒童及年青人具有較高的致病率(morbidity)及致死率(mortality)。腦膜炎雙球菌是一種小的革蘭氏陰性雙球菌屬(Gram-negative

diplococci) ，生化特性是好氧性(aerobic) ，催化酵素(catalase)及氧化酵素(oxidase)陽性，不具運動性(non-motile) ，具有多醣類的莢膜(polysaccharid capsule)是主要的抗原，並且依此抗原來決定菌種的血清型別〔1〕。目前被發現的共有 13 種血清型別，其中主要的致病血清型有 A、B、C、Y 及 W135，流行的型別也因時間及地域而有不同；百分之九十的病例是由血清型 A、B 或 C 所造成，並且 B 血清型更是佔半數以上〔2〕。腦膜炎雙球菌存在於帶原者的鼻咽腔，大部分都是屬於非致病型(nonpathogenic form)的腦膜炎雙球菌，正常的帶原者會因此而發展出自然的免疫力(natural immunity)，只有少數的宿主會因補體徑路(complement pathway C3, C5-C9)有缺陷而引發敗血症(septicaemia)及腦膜炎〔2〕。它的傳染方式是飛沫傳染，即直接接觸感染者的喉嚨或鼻咽腔分泌物(或呼吸飛沫)而傳染，潛伏期約為 3~4 天。臨床症狀為發燒、劇烈頭痛、噁心、嘔吐、頸部僵直、出血性皮疹、粉紅斑等，此外，也常會有譫妄和昏迷的現象〔3〕。

根據文獻報導細菌性腦膜炎由其血液及腦脊髓液的檢體做細菌培養約 15~25%的結果是陰性〔1〕，可能的原因是採檢前病患早已投予抗生素治療，或是檢體之採檢不正確、運送不當等因素，導致檢體送達實驗室時細菌已死亡，這些情形有時是難以避免的。此外，對於一些難以培養(fastidious)和生長緩慢的微生物，用傳統的培養方法則需花費數天的時間，更是難以達到快速診斷的功效。因此，以非培養菌的確認方式為基準(non-culture-based -confirmation)；即利用快速、準確之分子診斷的方法(molecular diagnostic methods)作為輔助實驗室的檢驗工具是重要且必要的〔4〕。目前，在疑似流行性腦脊髓膜炎（以下簡稱「流腦」）但微生物培養結果是陰性或已投予抗生素治療的情況下，常利用下列方法來快速找出病原菌：(1)偵測抗原(antigen detection)；如 counter immunoelectrophoresis (CIE)、latex agglutination (LA)、coagglutination (COA)、ELISA、radioimmunoassay (RIA) (2)偵測腦膜炎雙球菌的核酸(DNA)；聚合酵素連鎖反應(PCR) (3)細胞激素的分析(cytokine assays)；通常是測量 TNF-alpha (tumor necrosis factor-alpha)和 IL-10 (interleukin-10)在腦脊髓液中的濃度，是一種確認性的檢驗方法(confirmatory test)，可比對 PCR 的結果

〔5, 6〕。其中 PCR 的方法因快速且具高準確性及專一性，同時也容易操作，所以本實驗室也將其納入為檢驗的方法之一。

## 背 景

民國 92 年 12 月 15 日本局南區分局接獲南部某軍醫院通報一疑似流行性腦脊髓膜炎的病例：個案為 21 歲的男性軍人，12 月 12 日下午 2 時 15 分因發燒 39°C 至醫院就診，初步診斷為感冒，12 月 13 日上午 5 時 45 分有嘔吐、頭痛等症狀，上午 8 時許出現意識不清、頸部僵硬，經插管治療送加護病房，初步懷疑個案是感染腦膜炎，同時給予抗生素治療，12 月 15 日院方改診斷為疑似流行性腦脊髓膜炎，12 月 19 日個案病逝。由於該個案的血液及腦脊髓液檢體之細菌培養結果為陰性，所以為了釐清感染原，本局昆陽辦公室的細菌實驗室以 PCR 的方法，在腦脊髓液檢體中偵測出腦膜炎雙球菌核酸(DNA)的存在，間接證明個案感染流腦的可能性。個案生前原服役於台南縣白河內腳鄉營區，12 月 5 日移防至高雄縣鳳山陸軍步兵學校受訓，經訪視調查得知個案曾駐紮的二個營區，其軍官同袍的健康狀況均無異常，所以初步判定可能為單一突發案例，但為防止疫情發生，對個案接觸者共 24 人採集鼻咽腔檢體檢驗，其親密照護者做預防性投藥的處置，及環境衛生的消毒。

## 材料與方法

### 一、疫情調查對象

疑似流行性腦脊髓膜炎的通報個案 1 人及個案接觸者共 24 人。

### 二、檢體採集

- (一) 疑似流行性腦脊髓膜炎的通報個案：採集血液檢體和腦脊髓液。
- (二) 個案接觸者：採集鼻咽腔及血液(需含 Heparin 或 EDTA 等抗凝劑)檢體。
- (三) 所有檢體均需在常溫輸送〔7〕。

### 三、檢體處理及培養

血液檢體以 1:5~1:10 的比例接種於血液培養瓶(TSB) 中，在 35~37°C 含 5~10%的二氧化碳培養箱增菌，培養 14~17 小時後，每天觀察，若培養瓶有混

濁或紅血球溶解情形，立即將其混合均勻取 0.5mL 培養液，次培養 (subculture) 於巧克力培養基，在 35~37°C 含 5~10% 的二氧化碳培養箱增菌，培養 48 小時。否則分別於 14~17 小時、48 小時及第 7 天時，再次培養於巧克力培養基。即使未觀察到混濁情形仍需取少量培養液，次培養 7 日後，血液培養瓶即可依正確程序滅菌銷毀〔7〕。

腦脊髓液體積超過 1mL 則以 2000xg 離心 20 分鐘，吸取大部分上清液，留下約 0.5mL 的液體，經劇烈震盪至少 30 秒重新懸浮沉澱後，取一滴置於經酒精浸潤的載玻片，勿塗開液體待其自然風乾後，過火數次固定，再做革蘭氏染色。另取 1~2 滴懸浮液體接種於巧克力培養基及 BHI 液態培養基備用，培養條件同上述。

採檢之鼻咽深部的細菌性鼻咽拭子，直接塗抹於巧克力培養基上，培養條件同上述〔7〕。

#### 四、鑑定

腦膜炎雙球菌在巧克力培養基上之菌落為直徑約 1mm 凸起、光滑、有光澤、圓形、無色或乳白色略帶灰色之菌落。革蘭氏染色性狀為革蘭氏陰性球菌、咖啡豆狀成雙排列、直徑約 0.6~0.8 $\mu$ m，本菌亦可見於多核白血球細胞內外〔7〕。

#### 五、聚合酵素連鎖反應(PCR)

係根據 Taha M.K. 2000 年所發表的方法進行〔8〕。核酸萃取試驗(DNA extraction)：以商業化的核酸純化套組，萃取腦脊髓液體中腦膜炎雙球菌的核酸後，以此當作PCR反應的模板(template)。引子 (primer)的設計：選擇增幅 *ctrA*、*orf-2* (A)、*siaD* (B)、*siaD* (C)、*siaD* (W135)、*siaD* (Y)等基因，(詳細的引子序列如表一所示)。將製備好的模板取 15 $\mu$ L 與反應溶液混合，最終反應體積為 50 $\mu$ L，反應溶液中含 60mM Tris-HCl (pH 8.8), 17mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM each deoxynucleoside triphosphate, 0.3 $\mu$ M each primer, 1U *Taq* polymerase。反應條件：(1) 變性作用(denaturation)在 94°C 加熱 3 分鐘，(2) 粘合反應(annealing) 在 55°C 反應 30 秒，(3) 增幅作用(polymerization) 在 72°C 反應 20 秒，共一個循環，(4) 92°C、40 秒，55°C 反應 30 秒，72°C 反應 20 秒，共 35 個循環(5)最後一個循環是增幅作用在 72°C 反應 10 分鐘。PCR 最終產物(amplicons)以 2% 洋菜膠跑電泳並以 100 bp DNA Ladder 當作分子量標記。

## 結 果

血液培養結果無細菌生長，腦脊髓液培養無細菌生長，顯示個案與 24 名接觸者之鼻咽、血液檢體檢驗結果均為陰性，但個案的腦脊髓液由聚合酵素連鎖反應則偵測到一段 176bp 的核酸片段，顯示腦膜炎雙球菌核酸檢驗結果為陽性(如圖一所示)。

### 一、一般檢查紀錄

12 月 13 日血液檢查：白血球數目(WBC)=13,700/ $\mu$ L，N/L=79.5/14.2 ( N: neutrophils L: lymphocytes)，血小板數目(Platelet)=259,000/ $\mu$ L，動脈血檢查(Artery Blood Gas ABG)：pH=7.405，PaCO<sub>2</sub>/PaO<sub>2</sub>=27.0/453.8 mmHg，HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>=16.5 mmol/L，O<sub>2</sub>Sat=100%(PCV, FiO<sub>2</sub> 80%)。腦脊髓液檢查：GLU=5mg/dL，Cl<sup>-</sup>=115.4meq/L，TP (Total Protein )=704mg/dL，pH=7。白血球數目=21,888/ $\mu$ L，N/L=96/4，紅血球數目=400/ $\mu$ L。

12 月 15 日血液檢查：白血球數目=19,300/ $\mu$ L，N/L=88.8/3.2，血小板數目(Platelet)=195,000/ $\mu$ L，Anti HCV=negative，HIV=negative，Hbs Ag=negative。腦脊髓液檢查：cryptococcus Ag=negative，meningitidis-5=All negative。革蘭氏染色，結果為革蘭氏陰性球菌(Gram negative coccus)。

12 月 17 日腦脊髓液做細菌及黴菌培養的結果均為陰性。

12 月 18 日血液做細菌培養在需氧及厭氧下結果皆為陰性。

12 月 19 日動脈血檢查(Artery Blood Gas ABG)：pH=7.012，PaCO<sub>2</sub>/PaO<sub>2</sub>=97.4/40.0 mmHg，HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>=24.1 mmol/L，O<sub>2</sub>Sat=49.7%(PCV, FiO<sub>2</sub> 100%)。

### 二、特殊檢查紀錄

12 月 13 日腦部的斷層掃描發現有水腫的現象。

12 月 17 日胸部 X 光發現右肺下葉塌陷，12 月 18 日右肺下葉肺炎，12 月 19 日兩肺已產生肺炎症狀。在整個治療的過程中病患的意識並無清醒的跡象。12 月 19 日當日中午病逝院方診斷死亡原因為 1.急性腦膜炎併中樞衰竭，2.肺炎併

呼吸衰竭，3.上腸胃道出血，4.氣縱隔 (Pneumomediastinum) 併有皮下氣腫 (with subcutaneous emphysema) over neck。

## 討 論

由個案病歷紀錄我們觀察到：1.在腦脊髓液中白血球數目=21888/cumm，比血液中白血球數目=13,700/ $\mu$ l高，顯示出有化膿性腦膜炎的現象而且是因細菌性的感染所造成。2.ABG的數值為評估病患的氧合及有效換氣情形，此乃判斷呼吸衰竭最重要的檢查。個案的PaCO<sub>2</sub>/PaO<sub>2</sub>=97.4/40.0 mmHg，HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>=24.1 mmol/L，PaCO<sub>2</sub>高於50mmHg；PaO<sub>2</sub>低於60mmHg；pH值低於7.35表示有呼吸衰竭及呼吸性酸中毒的現象。3.昏迷指數由七分降為三分。4.在腦脊髓液的檢查中，以乳膠凝集的方法並沒有檢測到*C. neoformans*、*H. influenzae*、*S. pneumoniae*及*N. meningitidis* gr.A/B/C (meningitidis-5)等抗原的存在。而染色鏡檢(如acid-Fast stain、Fungus stain、India Ink)的結果也是陰性，唯獨在革蘭氏染色的抹片上發現佈滿多核型細胞(polymorphonuclear cells)，顯示檢體內有成對的革蘭氏陰性球菌。由於這個重要的證據再加上個案病情快速惡化，不僅讓我們高度懷疑這是腦膜炎雙球菌的感染所引起。後來經南區疴難委員的綜合評論，認為個案是感染革蘭氏陰性球菌的急性細菌性腦膜炎，最可能的感染症是流行性腦脊髓膜炎。當我們又再以PCR的方法，確認腦脊髓液中存在腦膜炎雙球菌的核酸片段時，讓我們更加確信上述的推斷。

本次個案的血液及腦脊髓液檢體其細菌培養結果為陰性，可能是因採檢前已投予抗生素(Lopilexin、Ceftriaxone)治療及檢體以低溫運送所致。腦膜炎雙球菌的帶原率約有5~15%，軍中可能會更高〔3〕，所以對於個案接觸者共24人之鼻咽檢體，檢驗結果為陰性，認為不太合理，推測可能的原因是採集接觸者鼻咽檢體時，由於所用的是一般型採檢器，棉棒太粗不適用於鼻咽採檢，無法採到鼻咽深部的檢體，才會導致所有的檢驗結果皆為陰性。而血液的採檢方式亦有不妥之處，因不含抗凝劑導致血液送到本實驗室時已產生凝固現象無法做細菌培養。再者，於無症狀者的血液中通常都不會檢驗出病原菌，因此除了另有研究，否則並不建議對接觸者採集血液檢體。有鑑於此，本分局於12月23日發函給南部

八縣市衛生局，加強「流行性腦脊髓膜炎檢體之採檢與送驗之正確性」並請轉知所轄衛生所及各醫療院所，以免重蹈覆轍。本分局對此事件的防治措施如下，當接到個案通報疑似流行性腦脊髓膜炎時，即對親密接觸者給予 Rifampin (600mg b.i.d. for 2 days)，作為預防性投藥並將其集中管理及測量體溫，以利疫情的監控。凡個案接觸之物品，以「菌久寧」消毒液稀釋 10 倍消毒之，並根據傳染病防治法第三十九條，經家屬同意將個案遺體運回新竹火化。12 月 25 日經查個案家屬及軍中同袍等接觸者，健康情形均無異狀，此案到此應可結案。

本次 PCR 實驗所選用的引子共有六對，分別是偵測腦膜炎雙球菌屬(species)的 *ctrA* 及血清分型(serogroup)的 *orf-2 (A)*、*siaD (B)*、*siaD (C)*、*siaD (W135)*、*siaD (Y)*等基因。*ctrA* 是腦膜炎雙球菌的一段非常獨特的基因，普遍存於所有的血清型當中，而且變異性小。另外也可使用 *crgA* 基因(conserved regulatory gene)作為篩選之用，此段基因主要是參與菌體吸附(adherence)到標的細胞(target cell)的調節作用。血清分型的方法是利用 multiplex PCR 的技術對 *orf-2 (serogroup A)*、*siaD (serogroup B、C、Y、W135)*基因，同時偵測腦膜炎雙球菌 A、B、C、Y 和 W135 等型別。而 *orf-2 (A)* 基因與 A 型的莢膜生合成(biosynthesis)有關。本次實驗由腦脊髓液中偵測到腦膜炎雙球菌的 *ctrA* 基因，但卻偵測不到 *orf-2* 或 *siaD* 分型基因，推測可能的原因是核酸濃度不足(檢體量太少所致)或是引子濃度略低，導致核酸產物太少以致於在洋菜膠片(agarose gel)上無法觀察到。因為根據 M.-K. Taha(2000)的研究報告，這些引子的專一性(96%)及敏感度(93%)都是非常高的，不論在腦膜炎雙球菌其它血清型別之間或對它種細菌(例如 *N. gonorrhoeae*、*L. monocytogenes*、*Streptococcus pneumoniae*、*N. lactamica*)都不會產生交叉反應(cross-reactivity)〔8〕。

目前以 PCR 的方法偵測腦脊髓液中腦膜炎雙球菌是藉著分析下列基因的存在：(1) *IS1106 (insertion sequence)*基因：Newcombe J. (1996) et al. 的報告〔9〕，在英國的腦膜炎參考實驗室以 *IS1106 (insertion sequence)*基因偵測腦膜炎雙球菌，當做固定的篩選檢驗。(2) 16S and/or 23S rRNA 基因：Kotilainen P. (1998) et al. 的報告〔10〕，在芬蘭利用 Broad-range bacterial PCR 的方法以 16S and/or 23S rRNA 基因偵測腦膜炎雙球菌〔4〕。另外 Atobe J.H. (2000)也

利用 one step Heminestd- PCR 的方法，分析 16S rRNA 基因〔11〕。(3) *ctrA* 及 *siaD* 基因：Stephen J. G. (1999) et al. 利用 Ultrasound-Enhanced Latex Immunoagglutination 合併 *ctrA* 及 *siaD* PCR 的分析方法做為完整的篩選方式〔12〕。Porritt R.J. (2000) et al. 的研究亦是利用分析 *IS1106* 及 *ctrA* 基因的存在當做篩選檢驗，*siaD* PCR 的方法當做血清型別之檢驗。〔13〕Corless C.E. (2001)對細菌性腦膜炎及敗血症病患的研究中，利用 Real-time PCR 的方法，同時診斷會引起腦膜炎的三種病原菌，例如對腦膜炎雙球菌偵測 *ctrA*(capsular transport) 基因，對嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*) 偵測 *bexA* 基因 (capsulation)，此段基因會出現在所有的莢膜型嗜血桿菌中，對肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)偵測 *ply* (pneumolysin)基因，臨床上會產生 hemolysin 的肺炎鏈球菌都具有此段基因。這是一種很方便且準確性高的的診斷模式。(4) *porA* 及 *porB* 基因：Stefanelli P. et al. (2001) 在以血清學的方法無法對侵襲性腦膜炎雙球菌分型的情況下，利用 PCR-RFLP 的方法，分析 *porA* 及 *porB* 基因〔14〕。(5) 16S rDNA 基因：Baethgen L. F. et al. 利用 direct-PCR (DT-PCR)偵測 16S rDNA 基因，主要是偵測一段增幅 600bp 的核酸片段〔15〕。(6)分析 *pilA* 基因的多型性(polymorphism)〔16〕。

由本次的實驗結果及上述的研究報告，充分地顯示出利用非細菌培養的分子診斷方式、在細菌培養結果為陰性的情況下，對輔助病原菌的確認是很重要的。雖然無法完全取代傳統的微生物培養，但是對於找到真正的病原菌，提供正確的病原學診斷，排除偽陰性，讓病患能在早期就得到妥善的治療和對疫情的監測是非常有助益的。

腦膜炎雙球菌的感染侷限於鼻咽其帶原率是 5~15%，正常狀態下是無症狀的，或僅出現類似感冒的上呼吸道感染症，然而在某些情形下卻是會引起肺炎、敗血症和腦膜炎，甚至是猛暴型菌血症(fulminant meningococcal sepsis 簡稱 FMS)，這些症狀的發生與病原菌由非致病性轉變成侵襲性有關係。依據 Deuren M. et al. (2000)的文獻報導，需具備下列的條件 (i)暴露在致病性的菌種當中(ii)能附著在鼻咽腔黏膜上並且繁殖 (colonization)(iii)通過黏膜(iv)存活於血流當中，腦膜炎雙球菌會容易變成侵襲性的疾病〔17〕。為何有些菌種可以在鼻咽腔繁殖有些則否，這是一個值得探討的課題。細菌生長在黏膜細胞的表面及上皮組



織，若上皮組織受到損傷細菌會直接侵襲並在此繁殖，另外物理性的傷害如抽煙或二手煙也會增加帶源者變成侵襲性疾病的危機，壓力和病毒性的感染亦會改變黏膜表面的完整性進而影響局部及全身的免疫力。纖毛(pili) 是主要吸附到黏膜細胞的物質，這些絲狀的醣類蛋白(glycolated protein)會由細菌的表面穿過 capsular polysaccharide 與鼻咽腔細胞(nasopharyngeal cells)上的接受體(如 membrane cofactor protein 或 CD66)結合，如此一來便會有訊息傳遞(signal transduction)到宿主細胞，之後會有巨噬細胞及內皮細胞(endothelial cells)所調控的吞噬作用及細胞激素的產生，宿主會藉著這一連串的免疫反應消滅侵入者。但是腦膜炎雙球菌會產生莢膜及 LOS (lipo-oligosaccharide)阻礙上述的作用，同時這些物質也能保護補體所調控的細菌水解作用(bacteriolysis)和嗜中性白血球(neutrophils) 的吞噬作用，還能躲避 Kupffer cells 及脾臟巨噬細胞的攻擊，這些都是它能存活於血流當中的原因〔17〕。

綜合腦膜炎雙球菌的致病因子(pathogenicity factors)〔1, 2〕:1.莢膜的多醣類(capsular polysaccharide) 2. 含脂-寡醣類的外膜(outer membrane lipo-oligosaccharide)其作用類似內毒素(endotoxin-like)，此細菌的外膜含有百分之五十以上的脂-寡醣類(lipo-oligosaccharide 簡稱 LOS)，類似於革蘭氏陰性菌所產生的多醣類，並含有脂質 A 次組成(lipid A subcomponent)，這種抗原會活化巨噬細胞(macrophage)及釋放腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor, TNF)，TNF 會誘發毒素型的休克(toxic shock)及出血(hemorrhaging)等現象，因此對嚴重的腦膜炎敗血症所引起的休克，此為重要的調控因子。另外 LOS 也能藉由改變血腦障壁(blood-brain barrier)的通透性而讓菌體侵襲至中樞神經系統。3.外膜套(outer membrane proteins 簡稱 OMP) 如 porin，其作用主要是控制水溶性的分子經由具親水、疏水性之雙重外膜進入，腦膜炎球菌的血清型也能依 OMP 的組成差異再做次分型，通常 OMP 型別之不同對宿主的感染力程度亦有異。4.纖毛(pili)它的功能是附著(adherence)到宿主的上皮組織(epithelium)與細菌由非致病性變為具有侵襲性的致病菌有密切的關係。5.免疫球蛋白 A1 蛋白分解酵素(immunoglobulin A1 protease)，腦膜炎雙球菌會製造出 IgA1 蛋白分解酵素來分解宿主分泌的免疫球蛋白 A(IgA)，這個作用會致使細菌對巨噬細胞的吞噬作用(phagocytosis)產生耐受性，進而躲避過補體徑路(complement

pathway) ，繼續存活於宿主體內。

本次的個案我們沒有資料去證明他的免疫系統是否有缺陷或抽煙習慣，而個案的接觸者共 24 人之鼻咽、血液檢體其檢驗結果均為陰性，所以至今仍然不知其感染原從何而來只能判定可能為單一突發案例。為了降低這類疾病的發生率，對於長期處於擁擠空間者(如軍營、養護機構、監獄、托兒所等)，一旦有了疑似案例，則需及早通報適時予以隔離，嚴密監控接觸者的健康狀況，並改善其生活起居地點的通風，如有必要才使用抗生素作為預防性投藥，避免抗生素濫用而產生抗藥性或其他不必要之防疫上的麻煩。另外，需加強通報單位對流行性腦脊髓膜炎檢體之採檢與送驗的正確性，這對及早確認病原菌，快速做好防疫工作是非常重要的。

**誌謝：**感謝國立台南護專許副教授世元對本文章的指正，痾難委員高雄榮民總醫院感染科主任劉永慶醫師對此病例之確認提供寶貴的意見與高雄國軍總醫院班仁知醫師提供個案詳細的病歷資料。

**撰稿者：**曾淑慧<sup>1</sup>、郭莉莉<sup>1</sup>、李珍儀<sup>1</sup>、陳淑怡<sup>1</sup>、黃淑貞<sup>1</sup>、姚淑滿<sup>2</sup>、黃中興<sup>1</sup>、陳春妃<sup>1</sup>、林建州<sup>1</sup>、史守志<sup>1</sup>、徐惠琳<sup>1</sup>、賴星龍<sup>1</sup>

1. 衛生署疾病管制局第四分局
2. 衛生署疾病管制局研究檢驗組

**通訊作者：**郭莉莉，高雄市左營區自由二路 180 號 4 樓，衛生署疾病管制局第四分局。Tel：(07)556-5213。

**參考文獻**

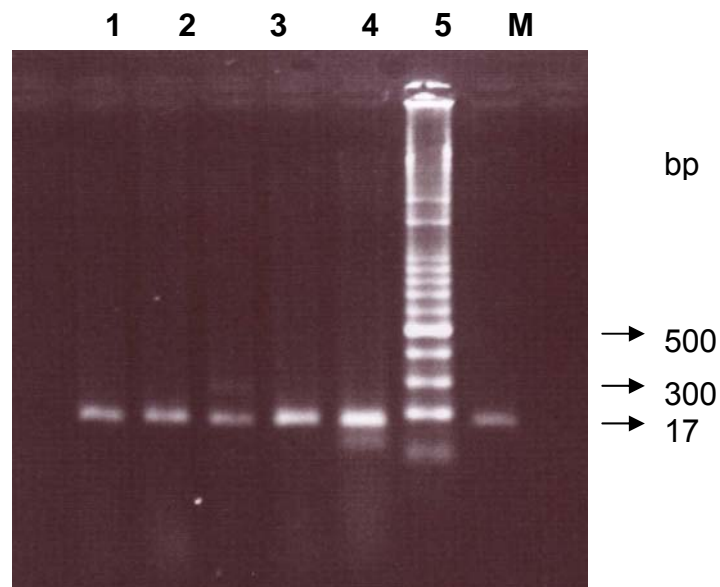
1. Barbara A. B., Norman T. B. and Stephen H. Gillespie. Infectious Disease, 2<sup>th</sup> edition. Blackwell Science Ltd. 2000: p265-272.
2. *Neisseria meningitidis*. Online. Available: [http://www.brown.edu/Courses/Bio\\_160/Projects1999/bmenin/nmenin.html](http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects1999/bmenin/nmenin.html) [ 16 January 2004 ] .
3. 行政院衛生署疾病管制局全球資訊網站流行性腦脊髓膜炎簡介.
4. kotilainen P., Jalava J., Meurman O. et al. Diagnosis of Meningococcal meningitis by broad-range bacterial PCR with cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1998: 36(8): 2205-2209.
5. Richard C.T., Feliciano D., and Raymond W.R. Comparative evaluation of three

- commercial products and counterimmunoelectrophoresis for the detection of antigens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1984; 20(2): 231-234.
6. Lorino G., Angeletti S., Gherardi G. et al. Diagnostic value of cytokine assays in cerebrospinal fluid in culture-negative, polymerase chain reaction-positive bacterial meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(5): 388-92.
  7. 行政院衛生署疾病管制局 檢驗方法標準操作程序手冊 第二版 2002年.
  8. Taha M.K. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(2): 855-857.
  9. Newcombe J., Cartwright K., Palmer W. H. et al. PCR of peripheral blood for diagnosis of Meningococcal disease. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(7): 1937-16404.
  10. Porritt R.J., Mercer J.L., and Munro R. Detection and serogroup determination of *Neisseria meningitidis* in CSF by polymerase chain reaction (PCR). *Pathology.* 2000; 32(1): 42-5.
  11. Atobe J.H., Hirata M.H., Hoshino-Shimizu S. et al. One-step heminested PCR for amplification of *Neisseria meningitidis* DNA in cerebrospinal fluid. *J CLIN Lab Anal.* 2000; 4(4): 139-9.
  12. Gray S.J., Michael A.S., Edward B.K. et al. Ultrasound-enhanced latex immunoagglutination and PCR as complementary methods for non-culture-based confirmation of Meningococcal disease. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(6): 1797-1801.
  13. Corless C.E., Guiver M., Borrow R. et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 35(4): 1553-1558.
  14. Stefanelli P., Fazio C., and Mastrantonio P. Typing of *Neisseria meningitidis* Isolates from patients with invasive disease by molecular analysis of porin genes. *New Microbiol.* 2001; 24(2): 149-55.
  15. Baethgen L.F., Moraes C., Weidlich L. et al. Direct-test PCR for detection of meningococcal DNA and its serogroup characterization: standardization and adaptation for use in public health laboratory. *J Med Microbiol.* 2003; 52(pt 9): 793-9.
  16. Giorgini D., Neassif X. and Taha M.K. Rapid epidemiological characterization of *Neisseria meningitidis* using polymerase chain reaction from biological samplings. *Presse Med.* 1997; 26: 1516-1519.
  17. Deuren M., Petter B. and Jos W. M. van D.M. Update on Meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clinical Microbiology*

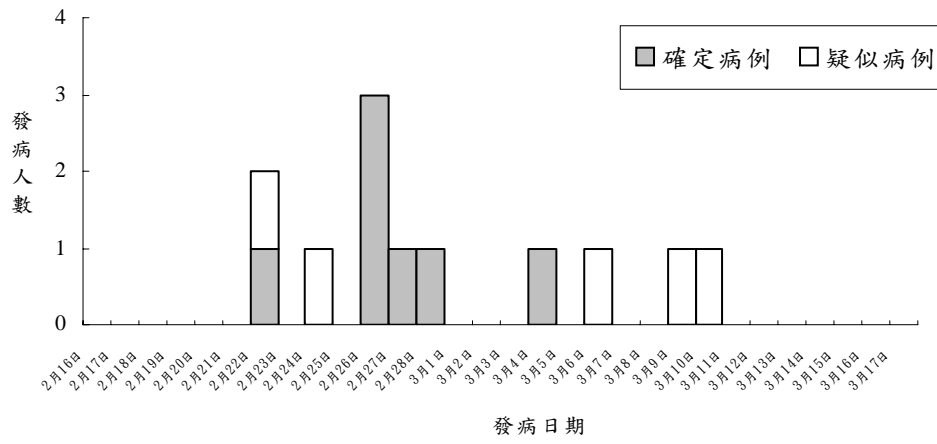
Reviews. 2000: 13(1): 144-166.

表一、本實驗所使用的引子序列

Oligonucleotide	Sequence	Gene amplified (serogroup)	Amplicon length (bp)
98-6	5'-ccagcggattgttgggtgg-3'	<i>ctrA</i>	176
98-10	5'-caggcggccttaataattc-3'		
98-28	5'cgcaataggtgtatatattctcc-3'	<i>orf-2 (A)</i>	400
98-29	5'-cgtaatagttcgtatgccttct-3'		
98-19	5'-ggatcattcagtgtttccacca-3'	<i>siaD (B)</i>	450
98-20	5'-gcatgctggaggaataagcattaa-3'		
98-17	5'-tcaaatgagttgccaatagaagg-3'	<i>siaD (C)</i>	250
98-18	5'-caatcacgattgcccaattgac-3'		
98-32	5'-cagaaagtgagggttccata-3'	<i>siaD (W135)</i>	120
98-33	5'-cacaaccatttcattatagtactgt-3'		
98-34	5'-ctcaaagcgaaggcttggta-3'	<i>siaD (Y)</i>	120
98-35	5'-ctgaagcgtttcattataattgctaa-3'		



圖一、PCR 圖譜



M : 100bp DNA Ladder

Lane1 : *Neisseria meningitidis* A

Lane2 : *Neisseria meningitidis* B

Lane3 : *Neisseria meningitidis* C

Lane4 : *Neisseria meningitidis* W135

Lane5 : *Neisseria meningitidis* Y

Lane6 : 個案CSF檢體