

計畫編號：DOH98-DC-2018

行政院衛生署疾病管制局九十八年度科技研究發展計畫

臺灣地區弓形蟲診斷系統建置及高危險族群之
流行病學應用

研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：嵇達德

研究人員：江亭誼、郭明珠、李京倫、詹志文

執行期間：98年1月1日至97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	(2)
摘要	(3)
前言	(5)
材料與方法	(9)
結果	(13)
討論	(16)
結論與建議	(20)
計畫重要研究成果及具體建議	(21)
參考文獻	(22)
圖表	(24)

摘要

弓形蟲症(toxoplasmosis)是由剛地弓形蟲(*Toxoplasma gondii*)所引起之人畜共通傳染病，分佈於世界各地，各國血清盛行率不一，在英國約20-40%，法國80-90%，美國50-60%，而台灣尚無詳細的盛行率報告。我們因此建立了弓形蟲症的血清學(EIA)診斷檢測方法並發展了B1基因Nested PCR及RE基因real-time PCR加以輔助，其敏感度可達0.6 parasite/ml。在62位醫院通報疑似病患的血清檢體中，發現13位(28%)為IgM抗體陽性、49位(73%)為IgG抗體陽性。病患在IgG抗體陽性及陰性之男女比例相近。IgG陽性病患年齡則以31-40歲最高(20人)，其次為21-30歲(11人)及41-50歲(10人)。以RE real-time PCR進一步分析，發現五位陽性病患，皆為男性，並已由B1 Nested PCR確認。其中IgM及IgG陽性者只有1位，其他4位皆為IgG陽性且效價皆大於194。只有一位之臨床症狀為視網膜脈絡膜炎，其他4位則有暈眩、發燒及肌肉無力等症狀。有三位年齡介於31-40歲之間，只有一位養狗，病例分佈於北中南各區。我們已與捐血中心合作，逐年收集台灣地區健康捐血人之血清及血液檢體進行弓形蟲診斷篩檢，以了解國人弓形蟲症的流行病學現況，提供本局後續疾病診斷或制定相關防治政策之參考。

關鍵詞：弓形蟲症、盛行率、real-time PCR、Nested PCR、血清學、EIA

英文摘要

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by *Toxoplasma gondii* in worldwide. The seroprevalences of toxoplasmosis varied in different countries, about 20-40% in UK, 80-90% in France, 50-60% in USA. However, there is no seroprevalences reported in Taiwan. We therefore established the serological (EIA) methods for toxoplasmosis diagnosis and RE gene real-time PCR which sensitivity could be less than to 0.6 parasite/ml. Sixty two suspected patients referred by hospitals were found 13 (28%) IgM antibody positive and 49 (73%) IgG antibody positive. Case numbers of IgG antibody positive and negative patients were equal in sex ratio. Age of IgG antibody positive patients was most in 31-40 years-old (20) and then 21-30 (11) and 41-50 (10). Further diagnosed by RE real-time PCR, we found 5 positive patients who were all male and all confirmed by B1 Nested PC. In those patients only one patient was both IgM and IgG positive, the rest were only IgG positive and titers were all more than 1:194. Only one patient has choroiditis , the others showed dizziness, fever and strength weakness in muscle. Three patients age were between 31 and 40. One had dog. They were separated around Taiwan geographically. We also collaborated with blood donor centers to collect bloods and sera from health donors in order to understand the epidemiology of toxoplasmosis and to help Taiwan CDC making the future diagnoses and prevention policy.

Keyword: toxoplasmosis, prevalence, real-time PCR, Nested-PCR, serology, EIA

前言

弓形蟲症 (Toxoplasmosis) 是由剛地弓形蟲 (*Toxoplasma gondii*)，感染所引起的一種全球性分佈性的人畜共通傳染病。盛行率與地理分佈、社會經濟的狀況及飲食習性有密切相關。剛地弓形蟲幾乎可感染所有的溫血動物，但在不同的物種會引起不同的臨床症狀，通常以慢性或不顯性感染為主，然而一旦宿主免疫功能低下時，則極有可能產生嚴重的急性弓形蟲症，甚至造成死亡。孕婦在懷孕期間感染弓形蟲，則有可能經胎盤垂直傳播給胎兒，造成先天性弓形蟲症 (Congenital Toxoplasmosis)，損害胚胎發育，影響胎兒腦部發育，嚴重者導致畸胎甚至死亡。弓形蟲有三種型態：卵囊體(oocyst)可抵抗外界環境，速殖子(tachyzoite)可在宿主中快速增殖，慢殖子 (bradyzoite) 不活躍存在宿主組織的囊體(cyst)中。生活史可分為兩個時期，分別為在貓科動物中進行的有性世代，每天產生數百萬個卵囊體隨糞便排放到體外，並可能污染土壤，是其最終宿主；中間宿主包含人在內的多種哺乳動物則進行無性世代，當卵囊體或囊體被動物食入後會轉形為速殖子快速增殖，在受宿主免疫系統抑制後會侵入宿主細胞轉形成慢殖子，再形成囊體，若宿主可維持其免疫力及不破壞囊體的完整性，則囊體可持續終身存在於宿主組織中而不發病。人類感染弓形蟲的途徑包括經口感染、先天性感染、輸血感染及器官移植等，一般免疫力正常人感染弓形蟲

時，通常沒有特異症狀的產生，使得感染者不易發覺。但若是發生在免疫不全的病患或是孕婦則會造成致死性的影響與胎兒畸胎或腦部發育的影響。流行病學調查顯示，在美國 12 歲以上民眾的感染率約為 22.5%。整個歐美地區估計約有 16%至 40%的人口受到弓形蟲感染，特別是美國中南部及歐洲大陸感染率可達 50%至 80%之間；法國巴黎則有高達 84%的孕婦抗體檢查為 IgG 陽性，美國紐約則為 32%，英國倫敦則有 22% [1]。墨西哥的健康捐血人的血清陽性率，可因不同地理區域而介於 7.4-29%之間 [2, 3]；而埃及捐血人的血清陽性率更高達 59.6% [4]。台灣目前尚無國人整體性的弓形蟲盛行率報告，只有一些零星的血清學調查及病例報告，在 HIV 病患的血清陽性率為 10.2% [5]，在原住民則介於 19.4-26.7%，在外勞族群則介於 11.3-42.6% [6]。根據 2006 年陽明大學蔡洪又欽等人未發表結果顯示懷孕婦女的抗體 IgG 陽性的比率約為 10%（疾病管制局研究報告摘要），與 1985 年 Yu, JC 所調查的 10.2% [7] 並無差異。由於上述調查及病例報告皆屬於特殊族群，結果無法代表台灣一般住民的現況，因此無法提足夠的參考資料供作弓形蟲症防治。

依臨床表徵，弓形蟲可區分為五種感染的類型：1. 免疫不全病患的感染及復發。2. 孕婦的感染。3. 胎兒先天性感染。4. 具免疫力病患的感染。5. 眼睛的感染。每一種類型弓形蟲感染的診斷及解釋方法皆有所不同，須

選擇適當的診斷方式。目前已有許多診斷方法應用於弓形蟲症的診斷，如抗體血清學檢驗、特殊基因序列的聚合酶鏈鎖反應(PCR)、弓形蟲抗原組織染色及弓形蟲的蟲體分離等方法。抗體血清學檢驗常用的方法有 Sabin-Feldman 染劑試驗(Dye Test)，乳膠凝集試驗(Latex Agglutination Test)、免疫瓊膠擴散法(AGID)、間接血球凝集測試(Indirect Hemoagglutination Test)、間接免疫螢光試驗(Indirect Fluorescent Antibody Test)、以及酵素結合免疫吸附法(IFA)等[8]。上述診斷方法以檢測抗體為主，利用 IgG 與 IgM 的表現來偵測弓形蟲症的感染情形，IgG 陽性反應代表過去感染弓形蟲症的情形，常被應用於血清流行病學調查上；IgM 則出現在感染的初期，具有較高的先期診斷價值，但 IgM 效價有時可維持一段較長的時期及難以掌握時效性是其缺點。同時，IgG 的效價高低與宿主本身有關，IgM 的檢驗在人體診斷上，會受自身的類風濕因子(Rheumatoid factor, RF)及抗細胞核抗體(Antinuclear antibodies, ANA)的交叉反應干擾而影響診斷的準確性[8,9]。所以目前診斷方式已逐漸朝向同時檢驗抗體及抗原的發展方向。

許多針對弓形蟲特殊基因檢測的分子生物學方法已陸續被發展出來，特別是聚合酶鏈鎖反應(PCR)的診斷方式。Burg 等人以及 Novati 等人利用弓形蟲的 B1 基因作為 PCR 增幅偵測的標的，因 B1 基因在弓形蟲體內有

大約 30 個拷貝，檢驗獲致不錯的效果[10]。此外，repeated element (RE) 基因在弓形蟲體內有大約 200-300 個拷貝，若以此基因發展 nested or real-time PCR 應可提升檢驗時的敏感性。因此，本實驗將建立弓形蟲 B1 及 RE 基因的分生生物學技術，偵測檢體中的弓形蟲，以釐清病患是否真為急性期感染，做為後續治療的依據。

本年度研究將先分析 2 年來各醫院所通報的弓形蟲檢體，並與台灣北中南東 6 區的捐血中心合作(先以台北捐血中心試行)，預計採取臺灣地區捐血人之血液檢體進行弓形蟲診斷篩檢，以評估台灣一般健康國人的弓形蟲感染現況。確診為急性期感染弓形蟲症之患者，將再利用 PCR 及 ELISA 技術予以追蹤分析，以了解感染過程中之弓形蟲特異性抗體與蟲體出現或消長情形，以供瞭解弓形蟲症在醫學上感染特徵。此外瞭解捐血者弓形蟲的感染情況,亦可為醫療安全用血提供進一步保障。

材料與方法

材料

1. 檢體來源

逐年蒐集台灣地區不同族群之血液檢體：第一年以現有國內弓形蟲通報檢體評估診斷系統，同時以隨機抽樣方式蒐集血液基金會之捐血人檢體進行篩檢。第二年以孕婦為研究對象，探討弓蟲特異性抗體在此族群之陽性率，著重於孕婦懷孕期間遭弓形蟲感染所造成的先天性弓蟲症，經由確診為急性期感染弓形蟲症之患者，予以追蹤分析孕婦血液檢體。第三年以免疫不全或低下者，包括 HIV/AIDS 患者、腫瘤病患及器官移植者之血液或組織檢體進行檢測及評估診斷系統。

2. DNA 萃取：

將所收集的200 μ l全血樣本，使用DNA Mini Kit (Qiagen)進行DNA萃取，萃取方式參照其所建議之步驟流程。

3. 弓形蟲(*Toxoplasma gondii*)之標準蟲株培養系統

- 非洲綠猴腎細胞 (VERO) 培養：配製細胞生長液包括90%DMEM培養液、10%的胎牛血清、青鏈黴素各200 U /mL，以5.6%NaHCO₃，調整至pH7.2。於37°C之 CO₂培養箱內培養2日可長成單層，2~3日進行繼代
- 弓形蟲感染細胞：將RH-88(ATCC 50838)株約 1.7×10^5 個弓形蟲滋養體接種

4. 建立弓形蟲之免疫檢測系統

以市售二組 Toxoplasma IgG/IgM (BioMerieux Vitek)(ABBOT)血清抗體診斷套組檢測血清抗體，並依廠商說明使用。在血清中檢出特異性 IgM 較具臨床意義，只檢出 IgG 則不能排除過去曾感染但已治療痊癒的情況，需做二次採檢確認。同時搭配 IgG-avidity 進行檢測。The test results were interpreted as follows: for IgG, ≥ 10 IU ml⁻¹ was positive, 8–10 IU ml⁻¹ was equivocal and < 8 IU ml⁻¹ was negative; and for IgM, > 0.65 IU ml⁻¹ was positive and < 0.55 IU ml⁻¹ was equivocal. The avidity index allows specimen classification as low (avidity index < 0.2 indicating an acute infection), borderline (avidity index 0.20– 0.25) or high (avidity index > 0.25) avidity. A high-avidity index excludes primary infection within the previous 16 weeks.

5. Sabin-Feldman 染劑測試 (dye test)

將長好 VERO 細胞感染弓形蟲滋養體並培養於含有 2% 胎牛血清之 DMEM 培養基中，於 37°C，5% CO₂ 培養 48–72 小時後回收弓形蟲滋養體。將回收之弓形蟲經 5 μm 濾膜過濾 (Whatman International, Maidstone, UK)，並離心濃縮到 2×10^6 滋養體/ml。將含 50% accessory factor 及 2×10^6 滋養體/ml 之弓懸浮液加入病人或對照組血清，在 96 孔平底培養盤(Costar Corning)中進行 1/2 連續稀釋後，培養於 37°C，1 小時後加入 methylene blue，

以相位差顯微鏡讀取效價(titres)，以毒殺 50%弓形蟲滋養體為最後稀釋濃度。

6. 建立弓形蟲Nested PCR檢測系統

弓形蟲症為世界性分佈，因血清學檢查不能排除過去曾感染但已治療痊癒的情況，因此巢式Nested PCR可提供最方便而且敏感的檢驗方法[11, 12]。本實驗將針對弓形蟲的B1基因設計引子對，如下：

外引子：5'-CCTTTGAATCCCAAGCAAAACATGAG-3'

5'-GCGAGCCAAGACATCCATTGCTGA-3'

內引子：5'-GTGATAGTATCGAAAGGTAT-3'

5'-ACTCTCTCTCAAATGTTTCCT-3'

反應週期： 94°C , 3分鐘；94°C, 30秒; 65°C, 45秒; 72°C, 1 分鐘—15週期；

94°C, 20秒; 53°C, 30秒; 72°C, 30秒—35週期；72°C, 5分鐘

未來可針對repeated element (RE)基因建立之PCR的檢測系統。

7. 建立弓形蟲Real-time PCR檢測系統

針對弓形蟲的B1及RE基因設計引子（primer）與探針及條件如下：

B1基因

5'-GGAGGACTGGCAACCTGGTGTCG-3'

5'-TTGTTTCACCCGGACCGTTTAGCAG-3'

YAK-CGGAAATAGAAAGCCATGAGGCACTCC-3'

RE基因

5'-AGGCGAGGGTGAGGATGA-3'

5'-TCGTCTCGTCTGGATCGAAT-3'

YAK-GCCGGAAACATCTTCTCCCTCTCC-3'

PCR反應總體積為50 µl，其組成內容物分別為：弓形蟲DNA template

(2 μ l); 1 \times 聚合酶連鎖反應緩衝液; 鎂離子 (1.5 mM); 正股與反股引子 (各0.3 μ M); dNTP (200 μ M); Super-Therm polymerase (1 unit)。PCR增幅條件先予以94 $^{\circ}$ C 10分鐘後, 另以94 $^{\circ}$ C 1分鐘、55 $^{\circ}$ C 20秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒, 進行32次反應, 最後在72 $^{\circ}$ C作用5 分鐘。前述引子增幅弓形蟲B1及RE基因產物預期大小分為101 bp及114 bp之DNA片段。

8. 建立高危險族群之弓形蟲感染篩檢平台

建立孕婦及免疫不全者之適當的採檢流程, 取得適合的檢體並做後續處理, 以提供實驗室做適當的弓形蟲檢驗。病患的病例及相關資料需加彙整, 做為未來流行病學研究之參考。

結果

弓形蟲症通報病患之血清學分析

台灣自 96 年 10 月正式將弓形蟲症列為我國第四類法定傳染病，所有醫院通報的弓形蟲症疑似病患，皆應採檢送疾病管制局檢驗確認。本研究共收集 96 年 11 月至 98 年 8 月底之通報個案且排除未送檢血液檢體之個案，只可以完成抗體檢驗及病原檢驗者才納入分析，總計 62 件。以 VIDAS IgG 及 IgM 試劑做弓形蟲血清學檢驗，其中 13 位(28%)為 IgM 抗體陽性、49 位(73%)為 IgG 抗體陽性及 13 位(28%)為兩者抗體皆陰性 (表一)。44 位為 IgG 或/和 IgM 抗體陽性病患 21 天後重新採檢進行第二次追蹤，其中只有 1 位(2.3%) IgG 抗體效價有兩倍以上上升和 5 位(11.4%) IgG 有稍為明顯的增加，因此認為是急性期的弓形蟲感染。由第一次送件之檢體發現所有 13 位 IgM 抗體陽性病患之 IgG 抗體亦皆為陽性(100%)，另外 36 位病患為 IgG 抗體陽性而 IgM 抗體陰性(表二)。而送檢病患 IgG 抗體陽性及陰性之男女比例並無明顯差異(表三)。IgG 抗體陽性病患年齡的分部則以 31-40 歲最高(20 人)，其次為 21-30 歲(11 人)及 41-50 歲(10 人)(表四)。

由於在臨床上可將弓形蟲症感染族群分為五類: 1. 免疫正常之病患、2. 懷孕婦女、3. 免疫低下者、4. 先天性弓形蟲症病患及 5. 眼睛感染者。因此我們也針對這些族群建立診斷流程(如圖一)，做為後續診斷的依據。

弓形蟲純培養與 B1 Nested-及 RE real-time PCR 技術之建立

我們已由美國 ATCC 菌種中心進口 *Toxoplasma gondii* RH88 strain 並成功感染綠猴腎細胞株(VERO cells)，以進行純培養繼代，做後續研究及檢驗方法建立之材料與流行病學研究之參考株。弓形蟲細胞呈彎月狀為 VERO cells 的絕對細胞內寄生蟲。我們並選擇弓形蟲的 B1 基因做為 nested PCR 之標的，因為其 genome 中具有 35 個 copies，較易增幅，以提高敏感性到達 0.6 parasite/ml。Real-time PCR 的基因標的則選擇 RE 基因，在弓形蟲 genome 中可達上百個基因 copies。為能更貼近臨床檢體，我們將純培養的弓形蟲 spike 到陰性血液中，再以此陰性血液做連續稀釋後抽取 DNA 做實驗，以評估血液的存在與否對本系統偵測弓形蟲影響之關係。結果顯示 RE real-time PCR 方法對弓形蟲的稀釋度仍有很好的線性關係，不受血液的影響，limitation 可達 0.6 parasite/ml 以下(圖二)($R^2=0.998$)。B1 Nested PCR 及 RE real-time PCR 在高敏感度上差異不大，但因 RE real-time PCR 操作較為簡便且不易污染，之後將先以 RE real-time PCR 做流行病學篩檢後，再以 B1 Nested PCR 確認做為篩檢模式。

弓形蟲症 PCR 陽性病患之分析

我們進一步以 RE real-time PCR 分析所收集 62 位醫院通報的病患血液檢體，以了解其 parasitemia 的狀況，結果發現五位陽性病患，並以 B1 Nested

PCR 確認，其中 IgM 及 IgG 陽性者只有 1 位，其他 4 位皆為 IgG 陽性，IgG 效價皆大於 194 (表五及六)。有三位進行第二次採檢，但 IgM 及 IgG 的效價差異不大。有趣的是這五位陽性病患皆為男性。只有一位之臨床症狀為視網膜脈絡膜炎，其他 4 位皆有發燒及肌肉無力的症狀。有三位年齡介於 31-40 歲之間，只有一位養狗，病例分佈於北中南各區。有三位病患 parasitemia 介於 20-50 parasites/ml，另兩位則為 0.12 及 0.16 parasite/ml。

台灣健康捐血人弓形蟲血清盛行率調查

本計畫之 IRB 已於今年 10 月初通過本局 IRB 審查委員會審議，並已行文台北捐血中心並獲同意協助健康捐血人血清與血液之收集和問卷填寫(如表)，將於 12 月初收集約 500 份檢體進行血清盛行率調查。確認此採檢流程後，會再與全國其他 5 區之捐血中心連繫後發文，請其同意協助健康捐血人血清與血液之收集和問卷填寫，以利後續全國性之盛行率調查。

討論

弓形蟲症通報病患之血清學分析

台灣自 96 年 10 月正式將弓形蟲症列為我國第四類法定傳染病後，因弓形蟲症過去在不同的感染族群的檢驗不易，並患亦常不配合檢驗，一般醫院較少進行此疾病之通報，所以至今醫院通報的數量仍然偏低，第二次採檢確認的比率只有 44/62 (78%)。因此，我們也針對 1. 免疫正常之病患、2. 懷孕婦女、3. 免疫低下者、4. 先天性弓形蟲症病患及 5. 眼睛感染者等五類族群，並與英國國家弓形蟲參考實驗室主持人 Edward Guy 討論後建立診斷流程(如圖一) [8]，做為後續診斷的依據，並希望加強宣導，提高醫院的送檢率，強化弓形蟲症研究的能力，以進一步了解弓形蟲症在台灣現況與流行病學資料，已協助後續的疾病防治。

本研究已收集 62 位醫院通報的病患血清檢體，以 VIDAS IgG 及 IgM 試劑做弓形蟲血清學檢驗，有 13 位為 IgM 抗體陽性、49 位為 IgG 抗體陽性 (表一)，其中 44 位為 IgG 或/和 IgM 抗體陽性病患 21 天後重新採檢進行第二次追蹤，其中只有 1 位 IgG 抗體效價有兩倍以上上升和 5 位(11.4%)有稍為明顯的增加。這顯示一般醫院送檢時，許多病患已是處於急性期的後期，或是治療後造成 IgG 的成熟延後所致，因此後續效價有上升不明顯 [13]；此外這是否為國人感染弓形蟲症所產生的特性，還需收及更多的資料

分析，才能有更進一步的了解。由於 IgM 出現偽陽性已被報告[14]，如果據此判定患者為急性期感染，容易誤加以治療，特別是孕婦影響尤大。因此，已有許多論文指出需加做 IgG avidity test 以區分患者真為急性期感染或是誤判所致[13, 14]。

有 36 位病患為 IgG 抗體陽性而 IgM 抗體陰性(表二)，顯示其可能為過去感染。而送檢病患 IgG 抗體陽性及陰性之男女比例並無明顯差異(表三)，顯示醫院收檢及送件並無 bias，國人得到弓形蟲症的比例一致。但病患感染的年齡層較屬於青壯年人以 31-40 歲最高(20 人)，其次為 21-30 歲(11 人)及 41-50 歲(10 人)(表四)，這些年齡層的人口多屬於勞動能力最高的階層而婦女則多屬於可懷孕的婦女，因此如何加強防治工作應為當務之急。

弓形蟲純培養與 Nested-及 real-time PCR 技術之建立

弓形蟲感染症是嚴重危害人類健康的人畜共通傳染病，臨床表現缺乏特異性，且多為慢性或隱性感染，同時病原體又不易檢測，因此建立快速、準確的實驗室診斷方法尤為重要。因此，我們並選擇弓形蟲的 B1 基因做為 nested PCR 之標的，因為其 genome 中具有 35 個 copies，較易增幅，以提高敏感性到達 0.6 parasite/ml。Real-time PCR 的基因標的則選擇 RE 基因，在弓形蟲 genome 中可達上百個基因 copies。我們並評估血液的存在與否對本系統偵測弓形蟲影響之關係，結果顯示 RE real-time PCR 方法對弓形蟲

的稀釋度仍有很好的線性關係，不受血液的影響，limitation 可達 0.6 parasite/ml 以下(圖二) ($R^2=0.998$)，這與其他的文獻報告相近[15]。在 62 個醫院通報的疑似檢體中，可測得 5 個 (8.1%) 弓形蟲陽性檢體，可能是因為 real-time PCR 產物片段只有 114 bp 較易增幅，再配上 TaqMan 螢光探針非常敏感所致。然而 B1 Nested PCR 及 RE real-time PCR 在高敏感度上差異不大，這可能是因為 B1 Nested PCR 產物片段只有 101 bp，又經過兩次增幅亦很敏感之故，但因 RE real-time PCR 操作較為簡便且不易汙染，較是何做為後續做流行病學篩檢的方法。

弓形蟲症 PCR 陽性病患之分析

62 位醫院通報的病患血液檢體，以 RE real-time PCR 分析發現有五位為陽性病患，並皆可以被 B1 Nested PCR 確認，顯示病患血中確有蟲體存在並確實感染弓形蟲症。病患地理分佈於北中南各區。然而，其中 IgM 及 IgG 陽性者只有 1 位，其他 4 位皆為 IgG 陽性，IgG 效價皆大於 194 (表五及六)，可能的原因為病患已過急性期，但血中仍含有弓形蟲，已有報告指出無症狀帶原者之蟲血症可達一年以上[2]，或是在重新感染不同型別的弓形蟲，而直接誘導出較高的 IgG 效價但仍有蟲血症 [16]。由於通報及 IgG 陽性患者男女的比例幾乎各半，但有趣的是這五位陽性病患皆為男性，是否是男性較易有蟲血症或是蟲血症時間較長，目前尚無相關報告，尚待進

一步的研究。臨床症狀為視網膜脈絡膜炎的患者 IgM 及 IgG 皆為陽性，符合急性期的定義，但其 parasitemia 很低為 0.12 parasite/ml。其他 4 位皆有發燒及肌肉無力的症狀。病患中只有一位疫調有養狗，其他 IgG 及 PCR 陽性患者病則普遍未填資料，當然有關其教育程度及飲食習慣等疫調也常無資料，因此會影響病患流行病學資料的收集，而減少了未來疾病房致可供參考的依據。

台灣健康捐血人弓形蟲血清盛行率調查之檢討

本計畫提出前已於去(97)年先行與台北捐血中心溝通以其常規檢驗後之剩餘血液檢體進行後續血清學與 PCR 檢驗。所以只需使用「血液用途變更同意書」即可，並於今年 2 月提請本局 3 月之 IRB 審查委員會審議，期間部分審查委員不同意使用捐中之「血液用途變更同意書」，認為應使「受試者同意書」，經說明無效後，再與台北捐血中心協調並獲同意將其「受試者血液使用變更同意書」修改為「血液用途變更暨受試者說明同意書」後再提請本局 IRB 審查委員會複審，後因部分審查委員公務繁忙無法立刻審議，期間亦煩請業務同仁催請審議。但至今年 10 月初通過本局 IRB 審查委員會審議，我們才具以行文台北捐血中心進行後續之發文與協調收檢工作。由於非醫院單位之「受試者同意書」模式可能與我們不同，因此在後續 IRB 審查委員會審議時可能會造成差異，而造成研究時程的延遲。若能

於前一年先提出計畫 IRB 經審查委員會審議，待通過後再提出此研究計畫，未來應較能掌握研究時程。

結論與建議

我們已建立弓形蟲症的血清學診斷方法及 B1 基因 Nested PCR 及 RE 基因 real-time PCR 檢測，敏感度可達 0.6 parasite/ml。到目前醫院通報疑似病患的 IgM 抗體陽性率為 28%、IgG 為 73%。病患之男女比例相近，IgG 陽性病患年齡則以 31-40 歲最高，病例散佈台灣各地。有五位為 RE real-time PCR 陽性病患，皆為男性，並已由 B1 Nested PCR 確認，IgG 陽性效價皆大於 194。只有一位之臨床症狀為視網膜脈絡膜炎，其他 4 位則有暈眩、發燒及肌肉無力等症狀。將與捐血中心合作，收集台灣捐血人之血清及血液檢體進行弓形蟲診斷篩檢，以了解國人弓形蟲症的流行病學現況。

建議未來將加強疑似病患的再採檢率以提昇檢驗的準確性及強化疫調以提供更多流病資料，提供後續疾病診斷或制定相關防治政策之參考。建議能於前一年先提出計畫 IRB 經審查委員會審議，待通過後再提出此研究計畫，未來應較能掌握研究時程。

計畫重要研究成果及具體建議

建立弓形蟲症的血清學診斷方法及 real-time PCR 檢測。到目前醫院通報疑似病患的 IgM 抗體陽性率為 28%、IgG 為 73%，男女比例相近，IgG 陽性病患年齡則以 31-40 歲最高，病例散佈台灣各地。有五位為 RE real-time PCR 陽性病患，皆為男性，並已由 B1 Nested PCR 確認，IgG 陽性效價皆大於 194，臨床症狀有視網膜脈絡膜炎、暈眩、發燒及肌肉無力等。將與捐血中心合作，收集台灣捐血人之血清及血液檢體進行弓形蟲診斷篩檢，以了解國人弓形蟲症的流行病學現況。

建議未來將加強疑似病患的的再採檢率以提昇檢驗的準確性及強化疫調以提供更多流病資料，提供後續疾病診斷或制定相關防治政策之參考。RE real-time PCR 陽性病患，皆為男性，需再加深入研究。建議能於前一年先提出計畫 IRB 經審查委員會審議，待通過後再提出此研究計畫，未來應較能掌握研究時程。

參考文獻

1. Dubey JP, Beattie CP. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988
2. Galván Ramirez ML, Covarrubias X, Rodríguez R, Troyo R, Alfaro N, Correa D. *Toxoplasma gondii* antibodies in Mexican blood donors. *Transfusion*. 2005. 45:281-282.
3. Alvarado-Esquivel C, Mercado-Suarez MF, Rodríguez-Briones A, Fallad-Torres L, Ayala-Ayala JO, Nevarez-Piedra LJ, Duran-Morales E, Estrada-Martínez S, Liesenfeld O, Márquez-Conde JA, Martínez-García SA. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in healthy blood donors of Durango, Mexico. *BMC Infect Dis*. 2007. 7:75.
4. Elsheikha HM, Azab MS, Abousamra NK, Rahbar MH, Elghannam DM, Raafat D. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* antibodies among asymptomatic blood donors in Egypt. *Parasitol Res*. 2009. 104(6):1471-1476.
5. Hung CC, Chen MY, Hsieh SM, Hsiao CF, Sheng WH, Chang SC. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection and incidence of toxoplasma encephalitis in non-haemophiliac HIV-1-infected adults in Taiwan. *Int J STD AIDS*. 2005. 16:302-306.
6. Fan CK, Su KE, Wu GH, Chiou HY. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection among two mountain aboriginal populations and Southeast Asian laborers in Taiwan. *J Parasitol*. 2002. 88:411-414.
7. Yu JC. A seroepidemiological study on *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women and neonates in Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 1985. 84:286-295.
8. Montoya JG (2002) Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J. Infect. Dis*. 185 Suppl 1, p S73-S82.
9. Wilson M, Remington JS, Clavet C et al. (1997) Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. The FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group. *J. Clin. Microbiol*. 35, p 3112-3115.
10. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, & Boothroyd JC (1989) Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol*. 27, p 1787-1792
11. Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Barandika J, Garcia-Perez AL.. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Veterinary Parasitology*, 2001; 102:17-27.
12. Petersen F, Edvinsson B, Lundgren B, Benfield T, and Evengard B. 2006. Diagnosis of pulmonary infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised HIV-positive patients by real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006; 25, 401–404.
13. Petersen E, Borobio MV, Guy E, Liesenfeld O, Meroni V, Naessens A, Spranzi E, Thulliez P. European multicenter study of the LIAISON automated diagnostic system for determination of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG

avidity index. *J Clin Microbiol.* 2005. 43:1570-1574.

14. Iqbal J, Khalid N. Detection of acute *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by IgG avidity and PCR analysis. *J Med Microbiol.* 2007. 56:1495-1499.

15. Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suárez-Mutis M, Fernandes O, Britto C. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Res.* 2007. 101:619-625.

16. Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis.* 2009. 199:280-285.

Table 1. Comparison of IgM and IgG seroprevalence between two sample collections.

First sample collection (n= 62)		
	IgM	IgG
positive	13	49
equivocal	0	0
negative	49	13

Second sample collection (n=44)		
	IgM	IgG
positive	13	44
equivocal	18	18
negative	34	0

Table 2. Comparison of IgM and IgG seroprevalence from first sample collection (n= 62).

IgG result	No. (%) of samples with IgM result		
	Positive (n=13)	Equivocal (n=0)	Negative (n= 49)
Positive (49)	13(100)	0(0.0)	36 (73.5)
Equivocal (0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Negative (13)	0(0.0)	0(0.0)	13 (25.5)

Table 3. Comparison of IgG seroprevalence by sex.

IgG-EIA	Sex		Total No.
	female	male	
-	8	5	13
+	24	25	19
Total No.	32	30	62

Table 4. Toxoplasma (IgG) seroprevalence in different age groups.

Age group		IgG Positive		IgG Negative	
Age	No.	N	%	N	%
0-10	5	3	60.0	2	40.0
11-20	3	3	100	0	0
21-30	11	9	81.9	2	18.1
31-40	20	15	75.0	5	25.0
41-50	10	9	90.0	1	10.0
51-60	5	3	60.0	2	40.0
61-	8	7	87.5	1	12.5
Total No.	62	49	79.0	13	21.0

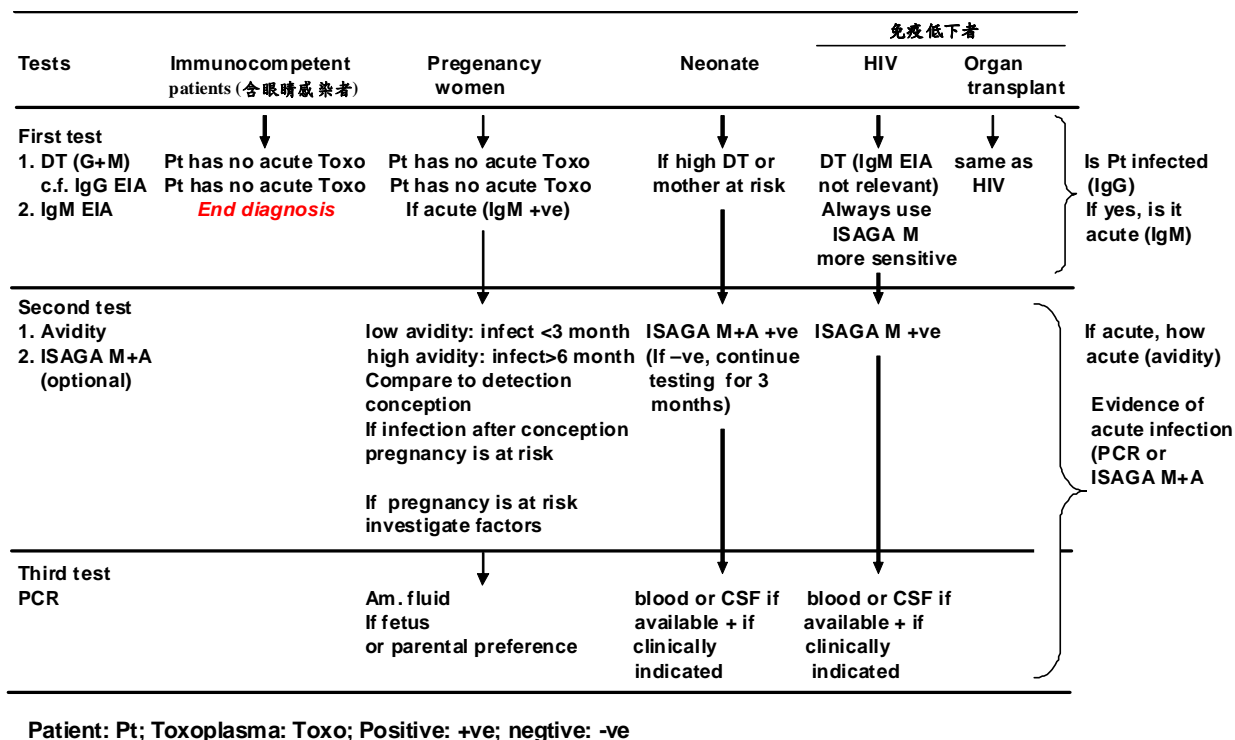


Figure 1. 弓形蟲症診斷流程.

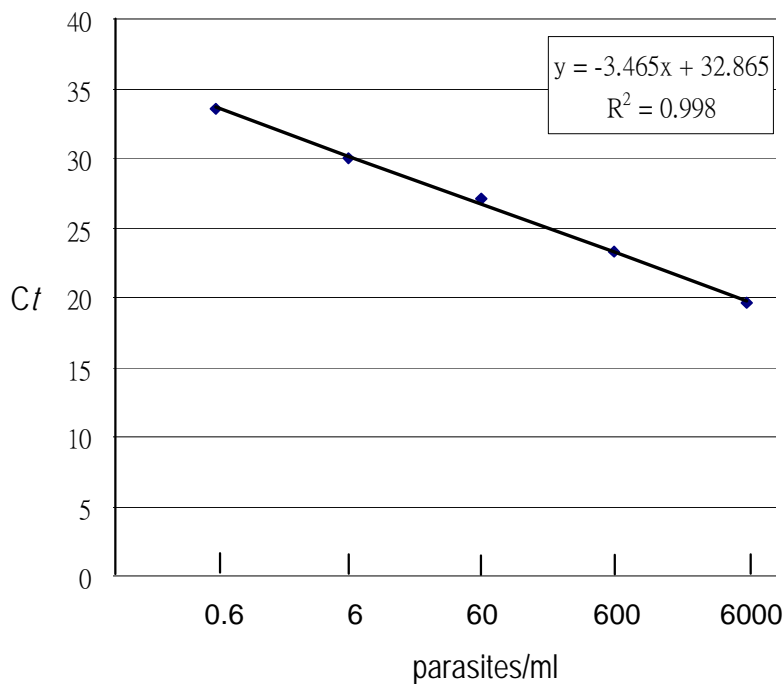


Figure 2. Plot of the real-time PCR standard curve of the RE gene.

Table 5. Comparison of EIA test and real-time PCR assay from first sample collection (n= 62).

Real-timePCR	EIA				total
	acute/primary infection(<2ms)	past infection(>4ms)	undecided for primary or past infection	negative	
-	6	36	2	13	57
+	1	2	2	0	5
total	7	38	4	13	62

採取96年11月至98年10月通報檢體62位，分別進行real time PCR病原檢測及血清學檢驗：real-timePCR陽性者有1位為acute/primary infection(<2 months)，IgG titer高於300 uI/ml，2位為past infection，其中1位IgG titer高於300 uI/ml，餘2位雖僅有一採血清檢體(無法分辨)，但其IgG titer皆高於300 uI/ml。

Table 6. Characteristics of five patients with PCR positive.

Case	Sex	history of animal contact	Symptoms	Age	Habitats	1 st EIA-IgG	1 st EIA-IgM	2 ^{ed} EIA-IgG	2 ^{ed} EIA-IgM	RE PCR	real-time B1 PCR	nested Insect number (parasite/ml)
A	Male	NA	Serpiginous choroiditis	32	高雄市	520	0.98	405	0.64	+	+	0.12
B	Male	NA	Fever	74	台中縣	>300	0.04	NA	NA	+	+	0.16
C	Male	NA	Dizziness	57	嘉義縣	>300	0.08	NA	NA	+	+	28.66
D	Male	Dog	Fever, Strength weakness	34	新竹縣	>300	0.09	>300	0.11	+	+	20.44
E	Male	NA	Fever, Strength weakness	38	台北縣	194	0.04	195	0.04	+	+	48.08

The test results were interpreted as follows: for IgG, ≥ 10 IU ml⁻¹ was positive, 8–10 IU ml⁻¹ was equivocal and < 8 IU ml⁻¹ was negative; and for IgM, > 0.65 IU ml⁻¹ was positive and < 0.55 IU ml⁻¹ was equivocal.

