

計畫編號：DOH94-DC-2024

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

建立鼠咬熱病原念珠狀鏈桿菌診斷技術(II)

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：潘銘正、江奇璇、凌宜珮

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	9
討論	10
結論與建議	11
參考文獻	12
圖表	
表一、港埠捕捉鼠隻血清抗體陽性分析	15

摘要

鼠咬熱為罕見的人畜共通傳染病，主要藉由帶菌大鼠咬傷或食入鼠類糞尿污染的食物與飲水而感染。受念珠狀鏈桿菌感染者，通常會有發燒、頭痛、畏寒、肌肉痛等感冒類似症狀，並無明顯的特殊症狀可供鑑別。根據國外文獻報告，未使用抗生素治療由念珠狀鏈桿菌感染者，則有 13% 的死亡率。因此開發念珠狀鏈桿菌的檢驗方法與調查台灣感染現況乃十分重要。本研究的目標在於建立念珠狀鏈桿菌分離鑑定方法及血清檢測方法。本實驗室建立一套利用血清檢測法，成功建立酵素連結免疫吸附法。血清抗體陽性調查結果，台灣鼠群體中有 58.2% 的血清抗體陽性率，顯示台灣鼠群中帶有此重要之傳染病原，應加以重視念珠狀鏈桿菌對台灣居民健康威脅的可能性。未來將需深入進行流行病學之監測調查工作，對防治鼠咬熱極為重要。

關鍵詞：鼠咬熱、人畜共通傳染病、念珠狀鏈桿菌

Abstract

Keywords: rat bite fever, zoonosis, *Streptobacillus moniliformis*

Rat bite fever is one of rare zoonosis caused by *Streptobacillus moniliformis* that can be acquired through the bite or scratch of a rodent or the ingestion of food or water contaminated with rat feces or urine. The clinical syndrome is characterized by flu-like symptoms including fever, chills, headaches, and muscle pain that has easily been confused with other disease. The mortality rate could reach up to 13% cases if been untreated. Therefore, developing diagnostic method for *S. moniliformis* infection and current surveillance in Taiwan are much more important. The objectives of this research were conducted to develop a standardized isolation and molecular diagnosis procedure and serology detection methods. In this study, we reported the development of an enzyme-linked immunosorbent assay that can be used to detect *S. moniliformis* infection in blood samples of rodents. The results showed the overall seroprevalence prevalence of *S. moniliformis* infections in rodents were 56%. The research results highlight the potential health threat of the residents in Taiwan, through close rodent contacts. Therefore, more epidemiological investigations will be executed to achieve the better control of rat bite fever infections in Taiwan.

前言

鼠咬熱是念珠狀鏈桿菌 (*Streptobacillus moniliformis*) 或小螺旋菌 (*Spirillum minus*), 這兩種不同的細菌引起症狀類似的人畜共通傳染病。病原存在於鼠類的口腔中, 據國外文獻指出 10% 至 100% 健康的實驗用鼠, 野生鼠則有 50% 至 100%, 口腔有念珠狀鏈桿菌。除了大鼠以外, 小鼠、松鼠、沙鼠與某些以野外鼠為食的動物, 都可能帶菌 (Valverde CR et al, 2002 ; Glaser C et al, 2000 ; Rand MS. 2002)。本菌通常藉由動物咬傷、抓傷或是傷口經舔舐而侵入人體, 或是食入受鼠類糞尿污染的食物或飲水而感染 (Fisk J)。在 1927 年 Haverhill 爆發大規模的感染, 起因於牛乳受到念珠狀鏈桿菌的污染; 英國在 1983 年也有牛奶受污染而爆發流行。除此之外則是零星散發的感染 (Wullenweber M 1995)。

鼠咬熱臨床症狀因感染病原的不同而有些許差異, 念珠狀桿菌通常在入侵 2 到 10 天出現感冒的症狀, 如發燒、頭痛、畏寒、肌肉痛、虛弱等; 2 至 4 天四肢出現斑丘狀紅疹, 膝蓋與髖關節出現關節炎也是常見的症狀。有些個案傷口附近的淋巴結會有腫脹的現象。通常在兩個禮拜情況會好轉, 少數則會持續數月, 若不治療則有 13% 的死亡率 (Berger C et al, 2001 ; Rand MS. 2002)。小螺旋菌

的潛伏期較長，通常則是 10 天後會有持續數天的發燒、傷口與附近的淋巴結腫大、症狀持續較久、少見關節炎，而皮膚斑丘狀紅疹較輕微；未治療之死亡率達 6% 至 10% (Rand MS. 2002)。雖然本病在國外屬於少見之疾病，加上念珠狀鏈桿菌培養條件特殊，無法以市售鑑定套組鑑定，小螺旋菌更無法以人工培養基分離(Rand MS. 2002)，因此臨床上常被忽略；而國內更未重視此疾病。由於國內超過 10% 的萊姆病通報病例，主訴症狀與鼠咬熱類似，國外則有 25% 的鼠咬熱患者其梅毒血清抗體成假陽性反應，因此國內有此診斷服務之需求。本計畫擬利用血清抗體檢測與分子生物學檢測等實驗室診斷技術，建立鼠咬熱念珠狀鏈桿菌診斷參考實驗室。

材料與方法

(一) 菌株來源：由美國 ATCC 收集念珠狀鏈桿菌參考菌株。

(二) 檢體採集：人體臨床檢體方面，採取有發燒、淋巴結腫大且於感染初期（發病約一星期內）之血液檢體。鼠類檢體方面，採取血清與咽喉拭子。

(三) 菌株分離與培養：將咽喉拭子浸泡於含 20% 馬血清培養液中，於 5% CO₂ 的 37°C 環境中培養。隔夜移至 20% 馬血清培養基，至少培養七天。

(四) 核酸萃取：咽喉拭子浸泡亦以 13,000 x g 離心 5 分鐘後，除去上清液，加入 200 μL 溶解液；血液檢體以 DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) 抽取及純化細菌核酸。純化後的 DNA 則冰存於 -80 待用。

(五) 核酸增幅與瓊脂膠體分析：根據 16S rRNA 基因序列設計之 PCR 引子組進行核酸增幅。PCR 反應容積為 50 μL。反應初始以 94 變性反應 5 分鐘，再以 94 30 秒、62.5 1.5 分鐘、68 2 分鐘，進行 30 個循環，最後以 72 做聚合延長反應 10 分鐘，最後降溫至 4。將所得產物純化後，以限制酵素 Bfa 進行進一步的切割，以 4% agarose gel 電泳分析確認。BR4:5'-GCTTAACACATGCAAAT

CTA-3' (forward); BR5: 5'-ACTCTATGCCGGGAATGA-3' (reverse)

(六) 蛋白質萃取與純化：以馬血清培養基大量增殖參考菌株 ATCC 14647，以超音波擊碎器擊碎，測得蛋白質濃度後，分裝及存放於冷凍庫備用。

(七) ELISA 檢測法：以棋盤法將蛋白質抗原被覆於 96 孔 ELISA 盤，檢測其最適抗原、抗體與二級抗體反應濃度。以 coating buffer(15 mM Na₂CO₃，35 mM NaHCO₃，pH 9.6)稀釋抗原，以 100 μL 被覆 ELISA 盤。經過 4 被覆隔夜，以 PBST 洗去未結合在 ELISA 盤的抗原。加入 100 μL 阻隔液(4% BSA, 0.1% sodium azide)，置於 37 恆溫箱感作 3 小時後洗去。使用時以稀釋液稀釋檢體，每個 well 分別加入 100 μL 於 37 恆溫箱感作 30 分鐘後，以 PBST 清洗 3 次。隨後加入稀釋之 100 μL 標識 HRP 之山羊抗鼠 IgG/IgM 結合抗體，於 37 恆溫箱感作 30 分鐘後，以 PBST 清洗 3 次。加入 TMB 呈色液 100 μL，室溫避光反應 10 分鐘，旋即加入終止液 100 μL。最後使用 ELISA 判讀儀以波長 450 nm 偵測 O.D.值。

結果

在製備 ELISA 與標準化方面，以 9 隻實驗室飼養之鼠檢體與經抽樣 14 隻野外捕獲鼠檢體在 1 ng/L , 10 ng/L , 100 ng/L , 1 µg/L , 10 µg/L , 100 µg/L , 1 mg/L 序列稀釋之菌體蛋白濃度中，找出最適被覆濃度為 100 µg/L , 抗體反應濃度為 500 倍稀釋，二級抗體 5000 倍稀釋，其 cut-off point value 為 0.158。本研究調查發現，以便利採樣方式收集 94 年港埠鼠類之檢體共計 79 支血清，其血清陽性盛行率為 58.2%。在其因子之變相分析方面（表一），錢鼠的血清檢體抗體陽性率明顯的低於鬼鼠、溝鼠與小黃腹鼠（陽性率分別為 11.1%、40.0%、65.6%和 75.0%）。在採集地區方面，高雄地區鼠類血清陽性率最低，與其他地區有顯著之差異。至於採集之港埠別、性別與採集時是否有跳蚤，並未與血清陽性檢出與否有相關。

測試針對 16s RNA 基因序列設計之專一性引子，偵測念珠狀鏈桿菌核酸分子之特異性與靈敏度方面，將標準 DNA 樣定量序列稀釋，其偵測靈敏度達到 1 pg。

在檢測 42 個人淋巴結生檢組織檢體與 30 個人體血液檢體結果方面，並未於檢體中偵測到任何念珠狀鏈桿菌核酸反應，亦未能於血液檢體分離到念珠狀鏈桿菌。

討論

念珠狀鏈桿菌所引起的鼠咬熱，原本屬於較為罕見之人處共通傳染病。由於念珠狀鏈桿菌培養需求較為特殊，需要較高的培養溼度，初代分離培養的養分需求嚴苛，其生長速度緩慢，需要持續觀察一週以上，因此容易被臨床與檢驗室所忽略。因此近來發展出以 PCR 快速偵測的診斷方法。一般認為 PCR 偵測核酸反應是敏感性很高的偵測方法，在本實驗室測試結果雖然對標準之 DNA 樣品之偵測極限可達 1 pg，而對於細菌性疾病之臨床檢體則受限於念珠狀鏈桿菌在血液中菌量極少，又僅以少量血液檢體進行核酸萃取而更增損耗，另外檢體品質可能因免疫反應之日程而影響血中菌體濃度。在偵測淋巴生檢組織檢體方面，可能與人體淋巴生檢組織檢體業已經過福馬林固定與石蠟包埋處理，福馬林造成 DNA 結構破壞，使 PCR 反應無法增幅菌體核酸。正因如此，檢體分離培養法診斷仍是目前作為是否感染此病之實驗室檢驗研判黃金標準。

根據台灣本島鼠類念珠狀鏈桿菌帶菌率與血清抗體盛行率的初步調查結果，顯示台灣鼠群中應帶有此重要之傳染病原，應加以重視念珠狀鏈桿菌引起之鼠咬熱對台灣居民健康之威脅性，未來仍需進一步的深入進行鼠類流行病學監測調查，方有更清楚的瞭解。

結論與建議

由於台灣氣候高溫多雨十分適合鼠媒繁殖，適應力強的鼠類易藉船舶運輸之便將病原引入本地，加上寵物飼養風氣日盛，所飼養之動物種類多樣化，對於人畜共通傳染病發生的壓力比以往更甚。建立一套完整的鼠咬熱檢驗系統，精進其檢驗技術與結果研判能力，將有助於鼠咬熱患者的治療與疾病防治。

參考文獻

1. Berger C, Altwegg M, Meyer A, Nadal D. 2001. Broad range polymerase chain reaction for diagnosis of rat-bite fever caused by *Streptobacillus moniliformis*. *Pediatr Infect Dis J* 20: 1181-1182.
2. Bergmans AM, Schellekens JF, van Embden JD, Schouls LM. 1996. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. *J Clin Microbiol.* 34:254-62.
3. Boot R, Bakker RH, Thuis H, Veenema JL, De Hoog H. 1993. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for monitoring rodent colonies for *Streptobacillus moniliformis* antibodies. *Lab Anim.* 27:350-7.
4. Boot R, Oosterhuis A, Thuis HC. 2002. PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*. *Lab Anim.* 36:200-8.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2005. Fatal rat-bite fever--Florida and Washington, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 53:1198-202.
6. Fisk J. CMPT Connections Case Study—6:1 Spring 2002. Our Case of Rat-Bite Fever Could be Termed “Rat-Lick Fever”!
http://www.interchange.ubc.ca/cmpt/connections_pdffiles/rat_lick-feverconnections_6202.pdf
7. Glaser C, Lewis P, Wong S. 2000. Pet-, animal-, and vector-borne infections. *Pediatr Rev.* 21: 219-232.
8. Goldenberger D, Kunzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M. 1997. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol.* 35 : 2733-2739.

9. Hoover RB, Pikuta EV, Bej AK, Marsic D, Whitman WB, Tang J, Krader P. 2003. *Spirochaeta americana* sp. nov., a new haloalkaliphilic, obligately anaerobic spirochaete isolated from soda Mono Lake in California. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53: 815-821.
10. Koneman EW, et al. Miscellaneous fastidious Gram-negative bacilli. 1997. In; Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, eds. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.* 414-416.
11. Maruyama S, Nakamura S, Kabeya H, Tanaka S, Sakai T, Katsube Y. 2000. Prevalence of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* and the 16s rRNA gene types of *Bartonella henselae* among pet cats in Japan. *J Vet Med Sci.* 62: 273-279.
12. Ojukwu IC, Christy C. 2002. Rat-bite fever in children: case report and review. *Scand J Infect Dis* 34: 477.
13. Rand MS. 2002. ZOOBOTIC DISEASES OF LABORATORY RODENTS AND RABBITS (Risk Category 1).
<http://128.196.155.29/uac/Zoonotic%20Diseases%20of%20rodents.doc>
14. Valverde CR, Lowenstine LJ, Young CE, Tarara RP, Roberts JA. 2002. Spontaneous rat bite fever in non-human primates: a review of two cases. *J Med Primatol.* 31: 345-349.
15. van Nood E, Peters SH. 2005. Rat-bite fever. *Neth J Med.* 63:319-21.
16. Wullenweber M. 1995. *Streptobacillus moniliformis*--a zoonotic pathogen. Taxonomic considerations, host species, diagnosis, therapy, geographical distribution. *Lab Anim.* 29:1-15.

圖表

表一、港埠捕捉鼠隻血清抗體陽性分析

變項	總隻數	血清抗體陽性
鼠種		
小黃腹鼠	4	3(75.0)
鬼鼠	5	2(40.0)
溝鼠	61	40(65.6%)
錢鼠	9	1(11.1%)
地區別		
台中	16	10(62.5%)
宜蘭	7	6(85.70%)
屏東	5	4(80.0%)
桃園	8	4(50.0%)
高雄	11	0(0.0%)
基隆	8	4(50.0%)
雲林	24	18(75.0%)
港埠別		
空港	10	4(40.0%)
海港	69	42(60.9%)
性別		
雄	34	20(58.8%)
雌	45	26(57.8%)
跳蚤		
有跳蚤	20	9(45.0%)
無跳蚤	59	37(62.7%)