

計畫編號：DOH91-DC-1067

衛生署疾病管制局九十一年度委辦研究計畫

台灣地區萊姆病標準實驗室之建立及監測計畫

研究報告

執行機構：高雄醫學大學附設中和紀念醫院

計畫主持人：蔡季君

研究人員： 陳田柏、陳忠仁、顏正賢、蔡文展、盧柏樑、  
林貴香、柯良胤、陳柏志、溫麗萍、陳淑梅

執行期間： 91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

\*\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見\*\*

## 目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
壹、計畫摘要	( 3 )
貳、英文計畫摘要	( 4 )
參、計畫內容	( 5 )
(一) 前言	( 5 )
(二) 實施方法及進行步驟	( 6 )
(三) 計劃成果	( 19 )
(四) 討論	( 27 )
(五) 結論與建議	( 28 )
(六) 重要參考文獻	( 29 )
(七) 萊姆病檢驗統計表	( 33 )

共 ( 33 ) 頁

壹、 計畫摘要：請摘述本計畫之目的與實施方法及關鍵詞

本年度計畫自九十一年一月起至九十一年九月止，血清檢驗以 ELISA 酵素免疫分析法篩檢，完成的檢驗人次合計有 502 人次。計 IgM 陽性有 76 人次 (76/502；15.1%)，IgG 陽性 60 人次(60/502；12%)。這些病人的臨床主訴有發燒 18.7%(86/461)、關節痛 27.3%(126/461)、皮膚紅疹、遊走性紅斑 20.9%(97/465)、肌肉痛 12.1%(56/461)、神經症狀 4.6%(21/461)等，遺漏值 41 人。

酵素免疫分析法呈陽性者再以西方墨點法確認，76 個 IgM 酵素免疫分析法陽性人次中，有 58 人次西方墨點法符合陽性標準；60 個 IgG 陽性人次中，有 11 人次西方墨點法符合陽性標準；IgM 及 IgG 均呈陽性反應者 4 人。本年度共計 65 人次為西方墨點法確認陽性，陽性機率為 13% (65/502)。

其中新增 57 位陽性個案，男性 19 人，女性 38 人。感染地區分布在高雄市的感染者 21 人(21/57；36.8%)，高雄縣佔 6 人(6/57；10.5%)，嘉義縣、雲林縣、澎湖縣各 1 人，其他縣市 25 人(25/57；43.9%)。

南部地區自民國八十六年至今，高醫已發現近達 90 位累計病例，應提醒民眾注意蟲媒傳染病。對不明原因熱、關節炎、神經炎或皮疹，應至專門醫院檢查追蹤。

關鍵詞：萊姆病、酵素免疫分析法、西方墨點法。

英文計畫摘要：請摘述本計畫之目的與實施方法及關鍵詞

From Jan. to Sep. in 2002, we used ELISA kits to screen Lyme disease. In 502 tests, 76 tests were IgM positive and 60 tests were IgG positive. After confirmation with western blot test, 58 were positive IgM western blot, and 11 were positive IgG western blot. 4 cases were both positive in IgM and IgG western blot test. During this period, the total positive rate is 13% (65/502).

After clinical investigation and serologic follow-up, we defined 57 cases with Lyme disease during this period. Among these cases, gender ratio of female to male is 1:2 (19/38). Area distribution covered Kaohsiung city (21 cases), Kaohsiung county (6), Chiayi county (1), YeeLin county (1) and Penghu county (1).

There have been near 90 accumulated cases of Lyme disease in Southern Taiwan from 1997. Both these clinicians and residents in Taiwan should be informed of alert and attention toward such kind of insect-borne infection and its protean manifestations including fever of unknown causes, migratory oligo- or poly-arthritis, fibromyalgia, polyneuropathy and erythema-migrans like rash.

Key Words: Lyme Disease, ELISA, Western Blot.

## 參、計畫內容

### 一、前言

萊姆病在1982年首先被Willy Burgdorferi從 *Ixodes dammini* (現為 *I. scapularis*) 分離出來<sup>1</sup>，至今已有很多的研究報告顯示，*B. burgdorferi sensu lato* 的基因有高度的變異性<sup>2</sup>。目前 *B. burgdorferi sensu lato* 已知至少十種不同的 *Borrelia species* or genomic group，分別為 *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. japonica*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. andersonii*, *B. tanukii*, *B. turdi* and DN127。並不是所有的 *Borrelia species* 對人類都具有致病性，目前僅有 *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* 曾經從患者身上分離出來<sup>4</sup>，且不同的 *Borrelia species* 感染，會引起明顯不同的臨床症狀<sup>3,4</sup>。感染病人有可能演變成長期慢性病患(關節炎或神經病變)，甚至於殘廢。選擇適當的抗生素可以治癒及防止此類慢性病之產生，如何早期診斷，早期治療，實驗室檢測能力的建立是首要之務。

民國1987年六月及九月，台灣發現兩例本土性萊姆病<sup>2,3</sup>。首例北部病人發病，除典型的“慢性遊走性皮膚紅疹”(Erythema chronicum migrans)<sup>7</sup>外，並且併有單側膝關節炎<sup>2</sup>。而第二位病人，曾在左側後肩出現的巴掌大的奇痒之似蕁麻疹且有多處隆起紅色之丘疹，兩三天後完全消失，但約2至3週後，全身多處關節疼痛，且併發肌炎及週邊神經病變，在花蓮輾轉就醫未改善，最後至本院診斷出此病，此時離發病已是兩個多月<sup>3</sup>。

有鑑於南部不斷增多的病例，高醫感染科深切認為建立一系列萊姆病實驗室診斷的能力，刻不容緩。唯有增加臨床診斷的能力，才有辦法進一步了解，此病在台灣地區疾病的全貌及流行盛行率。從臨床表徵看來，皮膚之遊走性紅斑，如能早期予於皮膚切片，培養螺旋菌，則可以確立台灣本土菌種，於流行病學的意義上非常重要。因此本院感染科特組成萊姆病診斷小組，且結合神經科、皮膚科、免疫風濕科等臨床醫師，將臨床上原因不明且高度懷疑之病例，選擇適當的檢驗工具，以求快速的臨床診斷及治療，並長期追蹤其病程之變化及預後。

## 二、實施方法及材料：

1. 檢體收集：由皮膚科、風濕免疫科、神經科、感染科門診或住院病人，由其臨床表徵推測其約略之臨床分期，而採取適當之檢驗。

(1) 血清學檢查：使用 **PBI tube** 收集 **3-4ml 血液**，以酵素免疫分析法當作篩檢，當結果成陽性時，以西方墨點法當作確認試驗。

(2) 皮膚切片檢查：在發生遊走性紅斑的**邊緣部位**(erythema migration)取 **4 x 4 x 6mm<sup>3</sup>** 大小的皮膚切片，將檢體放入無菌的檢體小管(感染內科檢查室提供，分機 6045)，立刻冰凍於-70°C 冰箱，電話通知取回，或送至核醫大樓三樓感染科檢查室。

(3) 收集的時機：在感染 0-4 週內，尚未使用抗生素治療時，可以收集皮膚切片檢體，作聚合酶連鎖反應。IgM 抗體會在 2-8 週後出現，IgG 抗體則會在 8 週後出現。

(4) 血清陰性個案，如臨床仍強烈懷疑，請於一個月後，再追檢血清。

(5) 早期使用有效抗生素，有時會使上述抗體反應消失或變不明顯。

(6) 血清抗體的檢查會發生偽陽性的情形，通常是由於交叉反應造成；例如梅毒、立克次體、牙週病、抗核抗體及類風濕性關節炎等。而會發生偽陰性則可能是因為試劑的靈敏度、抗體的濃度過低(例如抗體與菌體接合，只有少量的游離抗體、患者已經服用抗生素或只產生低量的抗體等等因素)。

## 2. 萊姆病酵素免疫分析法

2.1 目的：用於檢測人體是否受到 *B. burgdorferi sensu stricto* 感染。血清檢體

如果經過酵素免疫分析法(ELISA)陽性反應時，此時需要以西方墨點法作確認試驗。

2.2 原理：使用純化過的 *B. burgdorferi* flagellum 當作抗原，可診斷 *B. burgdorferi*

*sensu lato*，無 strain variation，檢體可使用血清或腦脊髓液，分別檢測病人血清中抗 *B. burgdorferi* 的 IgG 及 IgM。

2.3 內容：

2.3.1 檢體收集的時機：使用 PBI tube 收集 3-4ml 血液，以酵素免疫分析法當作篩檢。

2.3.2 檢體前處理：PBI tube 離心 3000rpm 10 分鐘，取上清液分裝 vial。未當天檢驗之血清(CSF)放-20 冰箱儲存。

2.3.3 試劑之配置：

(2.3.3.1) Dilutes Wash Buffer：( Wash buffer concentrate: D.W. = 1:41 )。

(2.3.3.2) 配製 sample diluent：2D.W. : sample serum = 200N: 1800N: 12N。

(2.3.3.3) 配製 IgM Conjugate buffer: 2D.W.: Conjugate= 100N: 900N: N。

(2.3.3.4) 配製 IgG Conjugate buffer: 2D.W.: Conjugate= 100N: 900N: N。

(2.3.3.5) 配製 Substrate buffer: OPD tablets= 3000N: 1N。

(2.3.3.6) 不同 strips 數目所須之試劑量：

試劑 \ strips 數目	4	6	8	10	12

Sample number	8	16	24	32	40
Wash Buffer	300	300	300	300	300
sample diluent (mL)	18	36	54	72	90
IgM Conjugate (mL)	1	2	3	4	5
IgG Conjugate (mL)	1	2	3	4	5
Substrate (mL)	6	6	9	9	12

#### 2.3.4 檢驗步驟：

(2.3.4.1) 取出 96 antigen wells packet，加入 Sample diluent 當作 blank、pre-dilute specimen (1/200)。

(2.3.4.2) 加入 IgM/ IgG calibrator 1、2、3。seal the plate，放置 120 分鐘 20~25°C。

(2.3.4.3) 以 1X wash buffer 清洗 3 次。

(2.3.4.4) 加入 100ul IgM/ IgG conjugate，放置 60 分鐘 20~25°C。

(2.3.4.5) 以 1X wash buffer 清洗 3 次。

(2.3.4.6) 加入 100ul substrate，放置 30 分鐘 20~25°C。

(2.3.4.7) 加入 100ul stop reagent，如果呈陽性反應，其顏色由黃轉橙。

(2.3.4.8) 在 490nm 測吸光度。

#### 2.3.5 品管：

(2.3.5.1) IgM 標準曲線以 blank、calibrator 1、2、3 的吸光值和校正吸光值(分別為 0、0.450、0.800、1.400) 畫出校正曲線。

(2.3.5.2) IgG 標準曲線以 blank、calibrator 1、2、3 的吸光值和校正吸光



值(分別為 0、0.240、0.600、1.300) 畫出校正曲線。

2.3.6 判讀: IgM+: 0.350~0.450, IgM++: 0.450~0.800, IgM+++ : 0.800~1.400

IgG+ : 0.150~0.240, IgG++ : 0.240~0.600, IgG+++ : 0.600~1.300

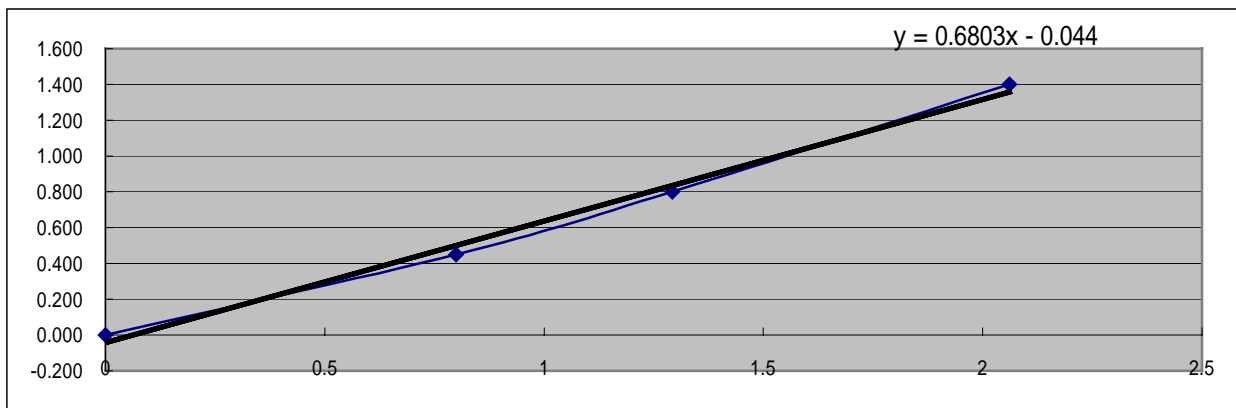
2.3.7 陽性血清學反應需排除: 其他 spirochetal disease(如 syphilis, yaws,

pinta, leptospirosis, relapsing fever, periodontal disease.)、自體免

疫疾病(如 rheumatoid arthritis, ANA positive, SLE)、其他細菌或

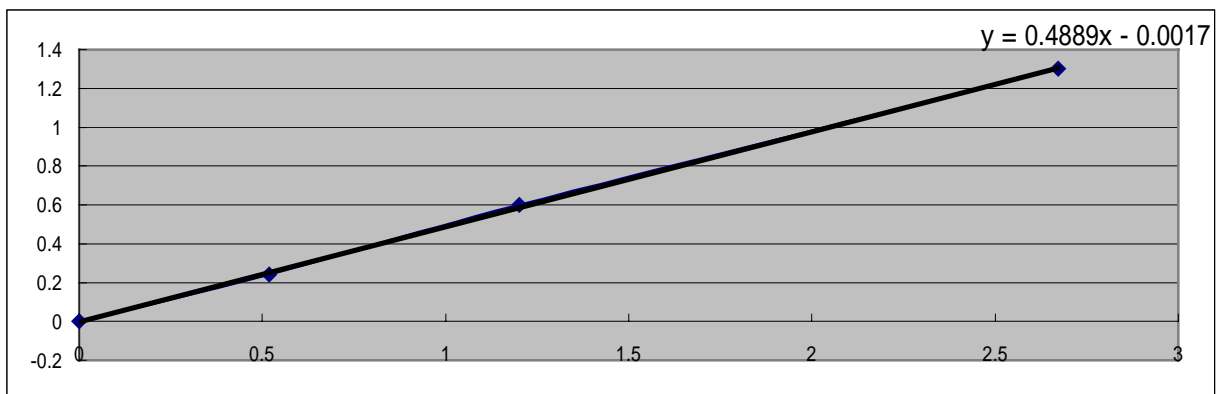
病毒感染(如 Rocky mountain spotted fever, CMV, HIV, EBV)。

附圖: Standard curve of Lyme IgM ELISA test:



說明: x 軸代表實驗操作後 calibrator 1、2、3 所得吸光值; y 軸代表 calibrator 1、2、3 的校正吸光值。

附圖: Standard curve of Lyme IgG ELISA test:



說明：x 軸代表實驗操作後 calibrator 1、2、3 所得吸光值；y 軸代表 calibrator 1、2、3 的校正吸光值。

### 3. 萊姆病西方墨點法檢驗

3.1 目的：作確認試驗。

3.2 原理：*B. burgdorferi sensu stricto* 的 specific protein 經由電泳分開，然後轉印( transblot ) 至 nitrocellulose strips 上，待測血清中若有 *B. burgdorferi* Ab，則會接 strip 上的 *B. burgdorferi* Ag，經由 conjugate 作用 (goat anti-human IgG with alkaline phosphatase)，最後由 substrate( BCIP /NBT)呈色判讀。

3.3 內容：

3.3.1 試劑之配置：

(3.3.1.1) Dilutes Wash Buffer：( Wash buffer concentrate: D.W. = 1:9 )。

(3.3.1.2) 配製 1x wash buffer (10x buffer solution 190ml + distilled water 10ml + 1g wash powder)，可以保存在 4 冰箱 14 天。

(3.3.1.3) 配製 alkaline phosphatase anti-human IgM Conjugate: 1x wash buffer=1:9。一個 test 配 2ml。

(3.3.1.4) 不同 strips 數目所須之試劑量

試劑 \ strips 數目	2	3	4	5	6
Wash Buffer	32	48	64	80	96
Blotting Buffer (mL)	8	12	16	20	24
Blotting Power (g)	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2

Conjugate (uL)	4	6	8	10	12
Substrate (mL)	4	6	8	10	12

### 3.3.2 檢驗步驟：

- (3.3.2.1) 以鑷子小心取出所須之條片，數字朝上置於凹槽中。
- (3.3.2.2) 於各凹槽加入 2mL Diluted wash buffer, RT, 5min; 吸掉 buffer。
- (3.3.2.3) 取出 Antigen stripe，再加入 2ml 1x wash buffer solution，而加入 80ul IgM serum locator in channel 1，20ul negative control，20ul specimen，水平振盪 30 分鐘。
- (3.3.2.4) 吸掉 Blotting buffer，以 2mL Wash buffer 沖洗 3 次，每次各 5 分鐘。
- (3.3.2.5) 加入 2mL alkaline phosphatase conjugate solution。置於旋轉平台上作用 20 分鐘。
- (3.3.2.6) 吸掉 conjugate solution。以 2mL Wash buffer 沖洗 3 次，再用蒸餾水或去離子水 2ml 清洗一次，每次各 5 分鐘。
- (3.3.2.7) 加入 2mL color developing substrate solution。置於旋轉平台上作用 RT，60min。注意需要避光。吸掉 substrate solution。
- (3.3.2.8) 以 2mL Wash buffer 沖洗 1 次，再以 2mL D.W. 沖洗 1 次；晾乾。

### 3.4.3 品管：

Controls	+	+/-
IgG Non reactive control		
IgG Weakly reactive control	41kDa	93kDa, 66kDa, 39kDa, 23kDa, 18kDa
IgG Serum band locator	93kDa, 66kDa, 41kDa, 39kDa, 23kDa, 18kDa	60kDa, 45kDa, 37kDa, 34kDa, 31kDa, 30kDa, 28kDa,

---

IgM Non reactive control	
IgM Weakly reactive control	41kDa
IgM Serum band locator	41kDa, 39kDa, 23kDa,

---

3.4.4 結果判定：*B. burgdorferi sensu stricto* 判讀準則：

---

IgG positive	Any 5 of following 10 bands : 18, 23, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66, 93kDa
IgG negative	少於 5 條 significant <i>B. burgdorferi</i> proteins，若懷疑抗體 尚未出現，必須在 2-4 週後重驗一次。
IgM positive	Any 2 of following 3 bands : 41kDa, 39kDa, 23kDa,
IgM negative	少於 2 條 significant <i>B. burgdorferi</i> proteins，若懷疑抗體 尚未出現，必須在 2-4 週後重驗一次。

---

#### 4. 萊姆病病原菌培養作業流程：

##### 4.1 檢體接收、收集：

各項檢體接收後，需詳細核對檢體上標明之項目與病人之姓名，病歷號碼及檢體是否與所入帳之項目相符合，並注意其運送過程及採檢量是否符合規定。若有不符合處，馬上以電話通知該單位，並填寫檢體退件單(註明不符合的部分)，交由雇員帶回該科室。且要注意其補件情況，若太久未補，需再以電話通知。若一切無誤，則將檢體加以編號，並將病人之基本資料抄寫至記錄本上，且依下列方式處理各項檢體：

##### 4.2 皮膚組織—從游走性紅斑的邊緣部位(erythematic migration)取 4 x 4 x

6mm<sup>3</sup> 大小的皮膚切片，將檢體放入無菌的 sputum 盒，加入少許的 Normal saline，打電話(6045)通知取回，或立刻低溫送至核醫大樓三樓感染科檢查室。

##### 4.3 血液—抽滿綠頭採血管(heparin)，取 1ml 量直接接種至 BSK-H 培養基

中，接種三管，其餘血液進行離心 (1000xg) 10 分鐘後，移除血漿，再離心 (12000xg) 20 分鐘，沉澱物接種至培養基中。

##### 4.3.1 血漿或血清—取 5ml，其中 1ml 量直接接種至 BSK-II 培養基中，接

種三管，其餘離心 (12000g) 20 分鐘，沉澱物接種至培養基中。

##### 4.3.2 腦脊髓液 (CSF) 關節液—各取 3ml，分別取 0.1 至 1.0ml 量接種至

培養基。

#### 4.4 接種步驟：

4.4.1 皮膚組織—將組織週邊以燒紅之刀子側面燙過，燒死週邊可能出現之雜菌，再用冷卻的刀子切開，使組織塊內部裸露，直接接種至含有 6% Rabbit serum 之 modified BSK-II 培養基中。可以先選用 5 cc 培養管，為避免培養時雜菌生長，可於培養基中加入 Rifampin (50mg/L)、Phosphomycin (100mg/L)、Amphotericin B (2.5mg/L)。當培養基出現混濁時，離心下來接種在 25T 的培養皿，使病原菌較易適應培養基之生長環境。

4.4.2 血液—取 10ml 之血液加抗凝血劑 (heparin)，取 1ml 量直接接種至含有 6% Rabbit serum 之 BSK-H 培養基中，接種在三管 5mL 的 culture tube，其餘血液進行離心 (1000g) 10 分鐘後，移除血漿，再離心 (12000g) 20 分鐘，沉澱物接種至培養基中。

4.4.3 血漿或血清—取 5ml，其中 1ml 量直接接種至 BSK-II 培養基中，接種三管，其餘離心 (12000g) 20 分鐘，沉澱物接種至培養基中。

4.4.4 腦脊髓液 (CSF) 關節液—各取 3ml，分別取 0.1 至 1.0ml 量接種至培養基。

4.4.5 培養溫度：36°C。

4.4.6 鏡檢觀察：每週 1 次，採用濕固定法即取一滴菌液於玻片上，再覆上蓋玻片，以暗視野顯微鏡 (dark-field) 放大 400 倍觀察具運動性之螺旋菌，至少觀察六週。

#### 4.5 檢體儲存：

4.5.1 陽性檢體：將含伯疏式螺旋體菌 (*Borrelia burgdorferi*) 之培養液加入 15% 的甘油，分裝置 1.5 cc 無菌 vial，凍至 -70 冰箱內保存。

4.5.2 陰性檢體：在檢驗完畢之後，檢體仍應保留 3 個月後再丟棄。

4.5.3 廢棄物處理：將接觸過檢體之物(如手套、滴管---等)，丟棄於標示有感染性廢棄物之垃圾袋，待工作結束後送至消毒室經高壓滅菌後再丟棄。

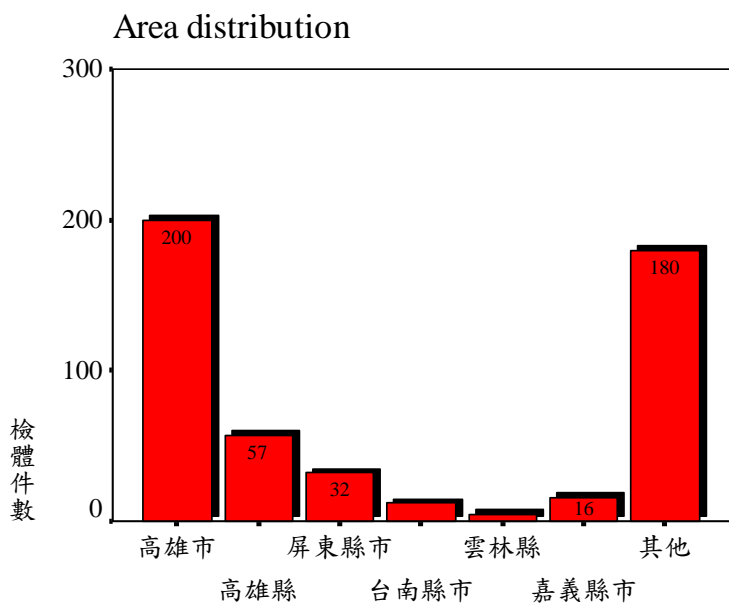
#### 4.5.4 環境整潔：

每週一早上固定打掃工作環境(包含工作台、Laminar Flow、清潔地板)，工作台及 Laminar Flow 於每天工作前需以 75% 酒精噴灑，並以無菌紗布拭淨。每天早上來即打開各工作場所之 UV 燈。每隔一個月定期清理培養箱，並經常注意水盤之水位。

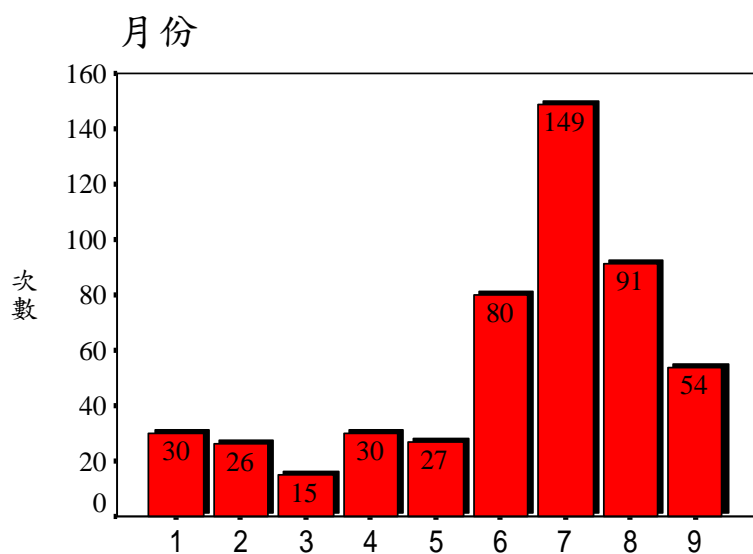
### 三、計劃結果：

(1) 酵素免疫分析法：本年度計劃自九十一年一月起至九十一年九月止，血清檢驗以 DAKO EIA method 篩檢，完成之篩檢人數合計有 502 人次。男性佔 44.4% (223/502)，女性 55.6% (279/502)。

這些病人的來源 39.8% (200/502)來自高雄市，11.4% (57/502)來自高雄縣，6.4% (32/502)來自屏東縣市，2.4% (12/502)來自台南縣市，4.2% (21/502)來自雲林嘉義，其他地區 35.9%(180/502)。

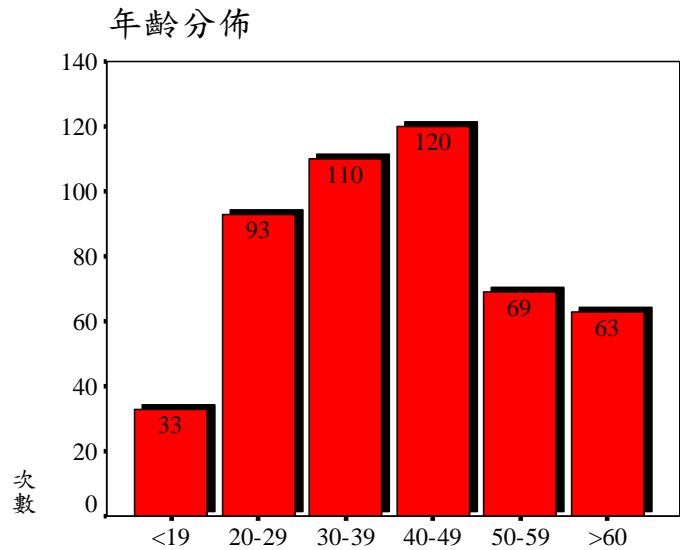


(圖一)



月份 (圖二)





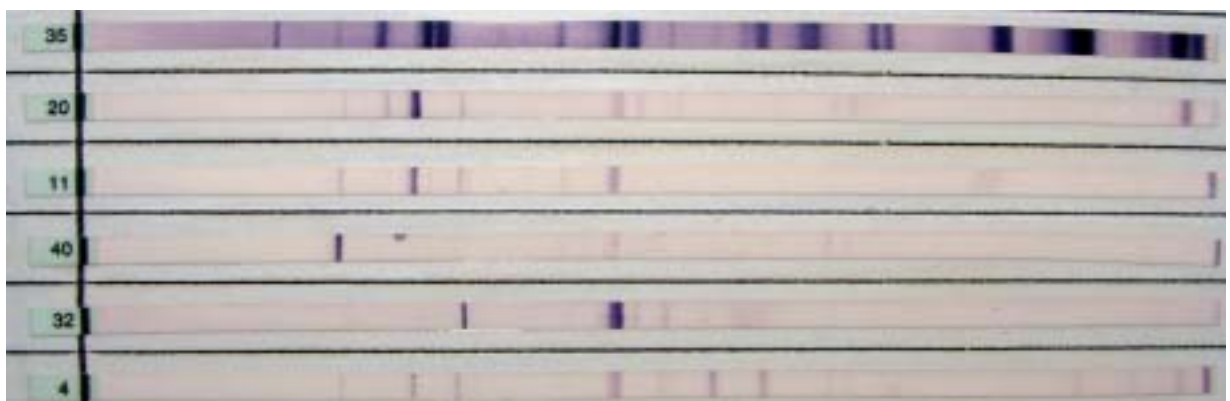
(圖三)

這些病人的臨床主訴有發燒 18.7%(86/461)、關節痛 27.3%(126/461)、皮膚紅疹、遊走性紅斑 20.9%(97/465)、肌肉痛 12.1%(56/461)、神經症狀 4.6%(21/461)等，(因北部地區的檢體較多資料不齊全，故會有遺漏值，統計時會將遺漏值排除計算)。

每月檢驗個案人次如圖二，酵素免疫分析法總計有 76 位 IgM 陽性人次 (76/502；15.1%)，60 位 IgG 陽性人次(60/502；12%)。

(2) ELISA 呈陽性者再以 MRL western blot 確認，76 個 IgM ELISA 陽性人次中，有 58 人次 western blot 符合陽性標準；60 個 IgG ELISA 陽性人次中，有 11 人次 western blot 符合陽性標準。ELISA 及 western blot 均呈陽性反應者 4 人。本年度共計 65 為陽性血清人次。西方墨點法確認陽性機率為 13.7% (65/502)。

(圖四):西方墨點法 IgM:



(圖五):西方墨點法 IgG:



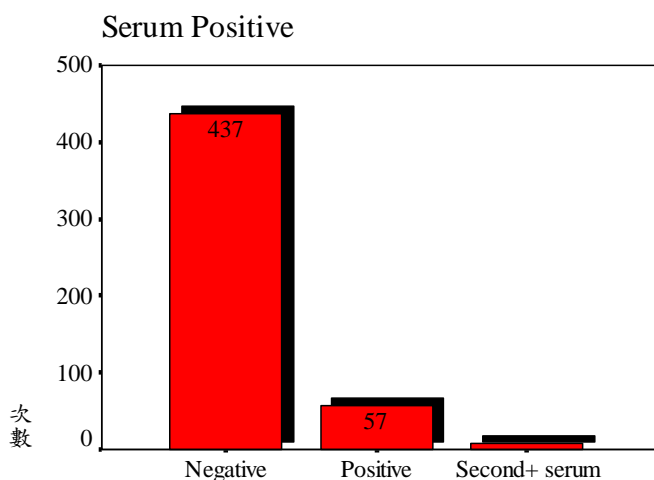
(3)經追蹤血清變化及臨床病例

調查，列入萊姆病確認病例。完成之篩檢人數合計有 502 人次。總計有 65 位確認陽性人次，其中 57 名新增萊姆病確認病例。

這 57 位陽性個案，男性

19 人，女性 38 人。感染地區

分布在高雄市的感染者 21 人(21/57；36.8%)，高雄縣佔 6 人(6/57；10.5%)，嘉義縣、雲林縣、澎湖縣各 1 人，其他地區 25 人(25/57；43.9%)。臨床症狀發燒 33.3%(5/15)；關節炎 66.7%(10/15)；肌肉酸痛 66.7%(10/15)；游走性紅斑 33.3%(5/15)。



Serum Positive

#### 四、結論：

萊姆病的血清學檢查以美國疾病管制中心建議的酵素免疫分析法作篩檢、西方墨點法作為確認方法，酵素免疫分析法靈敏度 94.6%。西方墨點法特異性 98%，因此血清學陽性、配對血清抗體變化對臨床診斷上有很大的幫助。為建立台灣南部地區萊姆病標準的實驗室，今後仍將往抗原鑑定的目標發展，並希望能夠朝在血清陰性的空窗期做快速診斷及成功從人體分離培養萊姆病原 *B. burgdorferi*。

萊姆病臨床上需下述疾病鑑別診斷：立克次體感染（急性病程及症狀相似）、自體免疫疾病（類風濕性關節炎、全身紅斑性狼瘡、自體免疫性甲狀腺炎等）。萊姆病的篩選檢驗因易與其他感染性疾病、自體免疫疾病產生抗體的交叉反應，因此，必需再以西方墨點加以鑑定。我們陽性血清的判讀上採用美國疾病管制中心的診斷標準，並盡量追蹤病例病程變化。

經追蹤血清變化及臨床病例調查，列入萊姆病確認病例。完成之篩檢人數合計有 502 人次。總計有 65 位確認陽性人次，其中 57 名新增萊姆病確認病例。這 57 位陽性個案，男性 19 人，女性 38 人。感染地區分布在高雄市的感染者 21 人(21/57；36.8%)，高雄縣佔 6 人(6/57；10.5%)，嘉義縣、雲林縣、澎湖縣各 1 人，其他地區 25 人(25/57；43.9%)。臨床症狀發燒 33.3%(5/15)；關節炎 66.7%(10/15)；肌肉酸痛 66.7%(10/15)；游走性紅斑 33.3%(5/15)。南部地區自民國八十六年至今，高醫已發現近達 90 位累計病例。

## 五、重要參考文獻：

1. Burgdorfer. W., A G. Barbour, S F. Hayes, J L Benach, E. Grunwaldt and J P Davis: Lyme Disease –a tick borne spirochetosis? *Science* 216: 1317-1319. 1982.
2. Liveris. D., A. Gazumyan and I. Schwartz: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by PCR- restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 589-595. 1995.
3. van Dam A P, H Kuiper. Vos, A. Widjojokusumo, B M de Jough, L Spanjaard, A C Ramselaar, M D Kramer and J Dankert: Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with Distinct clinical manifestation of Lyme borreliosis. *Clinical Infections Disease*. 17: 708-717,1993.
4. Wang G, van Dam A P, Schwartz I, Dankert J: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic epidemiological and clinical implications [review] *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 633-653, 1999 Oct.
5. 疫情監視摘要報導： 萊姆病。 DISK 3, 26: 523-524, 1997.
6. 疫情監視摘要報導： 萊姆病。 DISK 3, 36: 721-722, 1997.
7. 疫情監視摘要報導： 萊姆病。 DISK 4, 18: 322-324, 1998.
8. 疫情監視摘要報導： 萊姆病。 DISK 4, 23: 922, 1998.
9. Afzelius A: Erythema chronicum migrans. *Acta Dermatol Venereol* 2: 120-125, 1921.
10. Kalish R: Lyme disease. *Rheum Dis North Am* 19, 2: 399-425, 1993.
11. Barbour AC: Lyme Disease. In: Hoeprieh PD, Jordan MC, Ronald AR, eds. *Infectious Disease*. 5<sup>th</sup> ed. Lippincott: 1327-32, 1994.
12. Steere AC, Malawista SE, Snyderman DE, et al: Lyme arthritis : an epidemic of oligo-articular arthritis in children and adult in three connecticut communities. *Arth Rheum* 20: 7-17, 1977.

13. Schlesinger PA, Duray PH, Burke BA, et al: Maternal fetal transmission of the Lyme spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Ann Intern Med* 103: 67-68, 1985.
14. MacDonald AB, Benach JL, Burgdorfer W: Stillbirth following maternal Lyme disease *NY State J Med* 87: 615-616, 1987.
15. Markowitz LE, Steere AC, Benach JL, et al: Lyme Disease during pregnancy. *JAMA*. 255 : 3394-3396, 1986.
16. Tugwell. P, Dennis DT, Weinstein A, Wells G, Shea B, Nichel G, Hayward R, Lightfoot R, Backer P, Steere AC: Laboratory Evaluation in the Diagnosis of Lyme Disease. *Annals of Internal Medicine*. 127(12):1109-23, 1997 Dec 15.
17. Ledue TB, Collins MF, Craig WY: New Laboratory Guideline for Serologic Diagnosis of Lyme Disease: Evaluation of the Two-Test protocol. *Journal of Clinical Microbiology*,34(10) : 2343-2350. Oct 1996.
18. Hauser U, Krahl H, Peter H, Fingerle V, Wilske B: Impact of Strain Heterogeneity on Lyme Disease Serology in Europe: Comparison of Enzyme Linked Immunosorbent Assays Using Different Species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato. *Journal of Clinical Microbiology*. 63(2): 427-436 , Feb 1998.
19. Elizabeth SM, Shoop E, Johnson RS: Immunoblot Interpretation Criteria for Serodiagnosis of Early Lyme Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(2): 419-427, Feb 1995.
20. Dressler F., Whalen JA, Reinhardt, BN, and Steere AC. Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease. *Journal of Infectious Diseases*. 167:392-400,1993.
21. Oct 27, 1994. Recommendations for Test Performance and interpretation from the second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. *MMWR*. (31):590-591. August 11, 1995.
22. Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, and Wilske B: Interpretation Criteria for

- Standardized Western Blots for Three European Species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(6): 1433-1444, June 1997.
23. Hansen K, Hindersson P, Pedersen N S: Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum improves Serodiagnosis in Lyme disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 26: 338-346, 1988.
  24. Karlsson M.: Western Immunoblot and flagellum enzyme-linked Immunosorbent assay for Serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 2148-2150, 1990.
  25. Stiernstedt G T, Granstrom M, Hederstedt B, Skoldenberg B: Diagnosis of spirochetal meningitis by enzyme linked Immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in serum and cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 21: 819-825, 1985.
  26. Zoller L, Burkard S, Schafer H: Validity of Western Immunoblot Band Patterns in the Serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 29(1): 174-182, 1991.
  27. Ditton H J, Neuss M, Zoller L. Evidence that *Borrelia burgdorferi* immunodominant proteins p100, p94, and p83 are identical. *FEMS Microbiology Lett*. 94: 217-220, 1992.
  28. Schmidt BL. PCR in Laboratory Diagnosis of Human *Borrelia burgdorferi* Infections. *Clinical Microbiology Review*, p.185-201, Jan. 1997.
  29. Tilton RC, Sand MN, Manak M. The western Immunoblot for Lyme disease: determination of sensitivity, specificity, and interpretive criteria with use of commercially available performance panels. *Clinical Infectious Diseases*. 25 Suppl 1:S31-4, 1997 Jul.
  30. Magnarelli LA, Ijdo JW, Padula SJ, Flavell RA, Fikrig E. Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked Immunosorbent assays with

- recombinant antigens. *J. of clinical microbiology*. 38(5): 1735-9, 2000 May.
31. Schutzer, Steven E, Coyle PK, Reid, Patrick MS, Holland B. *Borrelia burgdorferi* specific immune complexes in acute Lyme disease. *JAMA*, Vol282(20): 1942-1946, 1999 Nov.
  32. Doolittle, W.F. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*. **284**, 2124-2128. (1999).
  33. Tekaia, F. Lazcano, A. and B. Dujon. The genomic tree as revealed from whole proteome comparisons. *Genome Research*. **9**, 550-557. (1999).
  34. Lake, J.A., Jain, R. and Maria C. Rivera. Mix and match in the tree of life. *Science*. **283**, 2027-2028. (1999).

六、萊姆病檢驗結果：九十一年一月至九十一年九月止

月份	1	2	3	4	5	6	7	8	9	總計	
總人次	30	26	15	24	27	80	149	91	54	502	
IgM	ELISA (+)	4	3	2	6	2	11	8	21	9	76
	ELISA (--)	26	23	13	20	25	69	131	70	45	426
IgG	ELISA (+)	1	3	2	2	1	3	21	13	14	60
	ELISA (--)	29	23	13	22	26	77	128	78	40	442
IgM	WB (+)	2	3	2	5	0	7	12	18	9	58
	WB (--)	2	0	0	1	2	4	6	3	0	18
IgG	WB (+)	0	1	1	1	0	0	1	4	3	11
	WB (--)	1	2	1	1	1	3	21	13	14	51
陽性個案	男性	0	0	0	1	1	0	1	1	0	5
	女性	0	0	0	0	3	2	1	1	1	12
新增個案	2	3	2	4	0	6	13	20	7	57	
年齡	0-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20-29	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
	30-39	0	0	0	1	3	0	1	1	0	4
	40-49	0	0	0	0	0	1	0	0	0	6
	50-	0	0	0	0	1	1	0	1	1	7



