

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000207

衛生福利部疾病管制署 103 年科技研究計畫

人畜共通披衣菌及黴漿菌之檢驗及流行病學研究

年度研究報告

執行機構：行政院衛生福利部疾病管制署

計畫主持人：李淑英

研究人員：李淑英、林芷羽、陳國緯、廖美惠

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

計畫摘要	1
一、中文摘要.....	1
二、Abstract.....	3
本文	5
一、前言	5
二、材料與方法	9
三、結果.....	17
四、討論.....	20
五、結論與建議	23
七、參考文獻.....	25
八、圖與表.....	28
附錄一：圖表目錄.....	35

計畫摘要

一、中文摘要

關鍵詞：人畜共通、披衣菌、肺炎披衣菌、鸚鵡熱、黴漿菌、血清診斷技術、分子診斷技術、參考實驗室、流行病學

人畜共通傳染病儼然已成為全球持續性的威脅。目前粗估有超過150個已知的人畜共通傳染病。一些新的人畜共通傳染病，包括SARS、禽流感，H1N1豬流感，非典型肺炎，愛滋病毒，依波拉病毒和尼帕病毒感染，均嚴重威脅人類及動物生命並廣泛引起恐慌。在細菌性人畜共通傳染病中，披衣菌和黴漿菌也是其中重要病原。

本計畫為期五年（103-107年），計畫之總目標為建立披衣菌及黴漿菌之標準檢驗流程，並針對國內高危險族群及爆發流行案例進行檢驗，以瞭解國內流行概況及防治策略擬定之參考。實施方法為建立披衣菌及黴漿菌之培養分離、血清學及分子檢驗之標準檢驗流程，並針對本局疫情調查收集之相關檢體進行檢驗，以釐清疫情並瞭解國內流行概況。建立披衣菌及黴漿菌肺炎菌之血清學及PCR檢驗方法。收集市售血清學檢驗試劑（MIF，EIA，ELISA）及文獻發表相關資料，參酌美國CDC採行及推薦之方法，以所收級的檢體進行測試，篩選出具專一性及敏感性之檢測方法。由Genebank和發表的文獻，收集披衣菌及黴漿菌之序列資料基因資料，設計專一性引子並篩選出特異性片段核酸探針，以建立快速PCR檢驗方法。完成標準檢驗流程。建立快速檢測披衣菌及黴漿菌菌之real-time -PCR和LAMP檢驗方法。我們的主要進展有三：**第一**、篩選培養基，發展黴漿菌培養方

法。**第二**、比較披衣菌多種血清學檢驗方法並測試及評估新穎披衣菌檢驗方法。**第三**、整理國內黴漿菌肺炎血清流行病學資料。

我們將致力於建立披衣菌及黴漿菌參考實驗室。相關型別資料將回饋給臨床醫師，合作持續分型並與臨床及流病資料整合建立資料庫。國際上持續建立合作關係，交換型別資訊或提供訓練。希望藉由持續努力瞭解病原可能傳播流行及特定高抗藥性株系崛起之情形。

二、Abstract

keywords : zoonosis, *Chlamydia* spp., *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Mycoplasma* spp., serological diagnostic methods, molecular diagnostic methods, reference laboratory, epidemiology

Zoonotic infectious diseases has become continuous global threat. Approximately more than 150 zoonotic infectious diseases are identified. Some of them such as SARS, avian flu, H1N1 swine flu, atypical pneumonia, HIV, Ebola and Nipa viruses have posed severe threat to human and livestock and arouse widespread panic. Among the bacterial zoonotic pathogens, *Chlamydia* and *Mycoplasma* are important pathogens.

The infection and epidemiological studies of *M. pneumoniae* lack standardized, rapid and specific diagnosis methods. Culture of *M. pneumoniae* is difficult. Accurate diagnosis depends on serological combined with molecular detection methods. Serological method was judged by the detection of the elevation of anti-mycoplasmal IgG/IgM/IgA. Molecular detection was done by employing real-time PCR technique to detect DNA of the *M. pneumoniae* pathogen. Molecular diagnosis has the advantages of high sensitivity and rapidity.

The aim of this 5-year study (2014-2018) is to establish the standardized diagnostic methods for *Chlamydia* spp. and *Mycoplasma* spp. These methods will then be used for the diagnosis of cases in outbreak setting as well as in high-risk groups, so as to understand the epidemiology of *M. pneumoniae* in Taiwan and elaborate control strategy. Specific approach will be to develop culture, serological and molecular diagnostic methods for *Chlamydia* spp. and *Mycoplasma* spp. For serological methods, commercial kits (MIF, EIA, ELISA) and published methods will be evaluated and compared for their sensitivity and specificity. For molecular methods, primer and probe will be designed to develop real-time PCR and Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) rapid diagnostic methods.

Our major findings can be summarized into three points: **Firstly**, we screened various mycoplasma culture media and developed culture method. **Secondly**, we compared different serological diagnostic methods for *Chlamydia spp.* and evaluated novel methods. **Thirdly**, we analyzed the serological epidemiology data of *Mycoplasma pneumonia*.

We will establish the relevant reference laboratories in Taiwan. Our research results and typing data will be feedback to clinicians for refining their therapy regimen and collaborate to establish databases integrating typing results with clinical and epidemiological data, and provide research findings to control divisions for fine-tuning of their control strategies. Our continuous efforts will eventually help to identify crucial points for disease intervention and display our strength and commitment in global participation and international collaboration. Such continuous efforts will help to understand the epidemiology as well as the evolution mechanisms of some high resistant clones.

本文

一、前言

黴漿菌屬於柔膜菌綱 (Mollicutes)，於人類身上感染或發現的黴漿菌為 Mycoplasmataceae 科，此科中含有兩屬，一為黴漿菌屬 *Mycoplasma*，另一為尿漿菌屬 *Ureaplasma*^{1, 2}。除了缺少細胞壁之特徵外，此類細菌的細胞非常小 ($0.3 \times 0.8 \mu\text{m}$)，有著細菌當中最小的遺傳基因組³，並且需要吸收固醇類的物質以維持細胞膜功能及生長⁴。

肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma pneumoniae*) 已證實為引起原發性非典型肺炎的主因，此菌通常存在於人體上，如咽喉及上呼吸道等，屬於自然菌叢，但數目很少，一旦數量增加便會造成疾病。黴漿菌肺炎為世界性、無季節性、感染率高，藉飛沫傳播，也常造成社區型感染。此病主要為學齡兒童和年輕人較易感染，約 5 歲-20 歲之間，常是肺炎主因。其潛伏期及感染期皆長，約 1-3 星期不等。得病初期，肺炎黴漿菌引起輕度上呼吸道疾病（微燒、乾咳）2 週以上；10% 有下呼吸道症狀：氣管炎、支氣管炎、肺炎（原發性非典型肺炎），狀似感冒；等浸潤消退後 1~4 星期，病情就會大幅改善。此病發生死亡的機率很低，除非是病人體弱或免疫不佳等所導致的心臟衰竭^{5, 6}。治療上，常用四環黴素或紅黴素治療²。目前一般仍然沿用非典型肺炎的名稱來描述不是肺炎雙球菌感染所引起的肺炎。非典型肺炎與典型細菌性肺炎最大的不同在於病患沒有毒性病容 (toxic sign)，特別是呼吸不會有呼吸急促 (tachypnea)、喂嘆音 (grunting)、鼻翼煽動 (nasal flaring) 的現象。黴漿菌肺炎是非典型肺炎最重要的原因，其他的病原還包括了肺炎披衣菌、鸚鵡熱披衣菌、退伍軍人病菌與各種病毒⁷。

由於黴漿菌缺乏細胞壁，無法使用抑制細胞壁合成的抗生素，如青黴素或頭孢菌素等藥物進行治療。一般而言，可使用巨環類 (macrolides) 抗生

素如紅黴素或四環黴素 (tetracycline) 有效地治療肺炎黴漿菌。近年來，相關期刊研究報告指出，亞洲地區已發現逐漸出現巨環類抗生素的抗藥性問題，特別是日本及中國大陸的資料顯示，已有高達 90% 抗藥性比例出現^{8, 9}，而台灣目前也發現具有 20~30% 的抗藥性菌株比例存在¹⁰；相反的，歐美國家的抗藥性菌株比例仍然偏低 (<3%)^{11, 12}。肺炎黴漿菌產生巨環類抗生素的抗藥性主要是由於 23S rRNA 基因上發生點突變所致。於基因位點 2063 或 2064 位置發生 A→G/C 的置換造成高程度抗藥性，而於位點 2617 發生 G→C 或 C→A 的突變則有較低程度的抗藥性產生^{13, 14}。目前已發展出 Real-time PCR 方法可快速偵測產生上述點突變的抗藥性菌株，有利於臨床上即時調整投藥策略及監控抗藥菌株分布情形¹²。

黴漿菌是屬於高敏感性及高挑剔性的微生物，目前仍無一種培養基配方可適用於所有種類之黴漿菌生長，因此於實驗室中進行培養及分離通常較複雜且困難。一般需要使用蛋白質基礎的培養基，並添加 10~15% 動物血清提供其膽固醇、脂肪酸及大部分胺基酸來使其生長。其共同培養基配方通常含有牛心浸粉，蛋白胨，酵母抽出物，及牛或馬血清等。針對不同 *Mycoplasma species*，需要添加不同成分以利其培養，如 *M. pneumoniae* 和其它幾種黴漿菌需添加葡萄糖、*M. hominis* 需添加精氨酸 (arginine)、*U. urealyticum* 則需要 urea。另外，黴漿菌因缺乏細胞壁對於 penicillin 有抗性，且對於醋酸鉍也具有相當抗性，大多培養基也含有這些成分，可避免細菌及黴菌污染。目前先嘗試以 Medium B (modified Hayflick medium)^{15, 16}、SP-4 medium¹⁷ 及 PPLO medium¹⁸ 等培養人類黴漿菌標準菌株及臨床菌株，以期於實驗室中建立其培養技術。

鸚鵡熱 (Psittacosis ; Parrot fever) 又稱鳥病 (Ornithosis)，係由鸚鵡熱披衣菌 (*Chlamydia psittaci*，舊稱 *Chlamydia psittaci*) 所引起的一種細

菌性人畜共通傳染病。人類感染會出現類似感冒之症狀，並有頭痛、發燒、出疹、寒顫、肌痛、肝脾腫大、心律徐緩等症狀，偶而併發腦炎、心肌炎及血栓性靜脈炎¹⁹，有時伴隨乾咳、胸痛與呼吸困難，嚴重時會引起肺炎^{19, 20}。鸚鵡熱傳染窩存在於多數的鳥類，尤其是鸚鵡類（如：鸚鵡、金剛鸚鵡、鸚哥、小冠鸚鵡等²¹）等觀賞用鳥、鴿子及部分家禽（如：火雞及鴨）^{22, 23}，外觀健康的禽鳥也可能帶菌並排放病菌，特別是處在擁擠或運輸的環境中。鳥類感染鸚鵡熱披衣菌後的潛伏期一般在3~10天，人則為7~28天，若不治療，致死率約20%²²。人類傳染途徑主要是因為吸入受污染的飛沫或塵土而感染，如吸入已感染致病菌之鳥類乾燥排泄物及羽毛等粉塵^{19, 20, 22}；而人與人之間的傳播則很少發生。

寵物飼養從業人員、家禽及寵物鳥飼主、獸醫師、屠宰場及肉品處理加工廠從業人員等為高危險群。鳥類鸚鵡熱盛行於熱帶及亞熱帶地區，歐洲、美國²⁴及澳洲²⁵常見人類爆發感染病例報導。國內的禽鳥走私案例自民國92年初起迄民國100年8月底已經超過20件，走私的鳥種涵蓋二十餘種，數量從數十到千隻不等，造成人禽共通傳染病散佈的一大隱憂。

鸚鵡熱檢驗方法以培養分離病原體及血清學檢驗為主。在實驗室診斷部分常利用之血清學檢驗法為：補體結合試驗（complement fixation test, CFT）、酵素連結免疫吸附試驗（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）和微量免疫螢光試驗（Microimmunofluorescence, MIF），以這三種檢驗方式作為診斷鸚鵡熱之參考^{26, 27}。病人若被診斷得宜即時接受抗生素治療，一些抗體反應可能不會出現。

值得注意的是，這三種藉由檢測血清中對抗披衣菌之抗體存在的方法非常容易產生偽陰性和偽陽性結果，以MIF診斷鸚鵡熱病例之偽陰性結果已被前人報導^{19, 27}；MIF和CFT試驗若利用整個披衣菌菌體抗原來捕捉疑似病

例血清中之抗體，但某些表面抗原，例如：披衣菌之脂多醣（lipopolysaccharide, LPS）或熱休克蛋白（heat shock protein, HSP）可與針對其他細菌之抗體形成交叉反應，造成偽陽性結果²⁶，使得判讀上述試驗之結果時必須更加謹慎。因此進而在MIF和ELISA試驗上，發展利用不含LPS的披衣菌抗原當作基質，來避免其他細菌病原所造成之偽陽性結果。但另一方面，現行血清學檢驗仍然無法針對鸚鵡熱披衣菌進行鑑定，起因於披衣菌屬中不同種之披衣菌仍會造成交叉反應，因此使得*C. pneumoniae*、*C. trachomatis*及*C. psittaci*這三種病原披衣菌難以特定的區別出來。此外，若在血清學檢驗前 2~3 週使用抗生素治療可能會抑制抗體的發展，亦會造成偽陰性結果，因此必須在抗生素治療前進行血清檢體之採樣¹⁹。

本文報告 2011 年台灣首例血清學診斷陽性家裡養有鸚鵡熱的男性個案其血清學檢驗及疫情調查結果。

本研究計畫旨在建立鑑定、及培養技術。期能達到及早確定菌種，釐清國內流行概況及原因，以提供防治策略研擬之參考依據。精確的鑑定菌種有助於臨床更精準地投藥，避免藥物濫用減緩抗藥性菌株之崛起。

二、材料與方法

1. 菌株與檢體的收集

(1) 黴漿菌

菌株：從美國 ATCC 菌種中心引進 *Mycoplasma pneumoniae* 標準菌株-ATCC15531、ATCC15377、ATCC29085、ATCC39505、ATCC15293 與 ATCC15492 共六株。

檢體：北部主要由教學醫院及聯合醫院性病防治中心合作，全國監測方面收集全國具地理分佈代表性醫療院所，收集臨床檢體，以生殖泌尿道拭子為主。

(2) 鸚鵡熱及肺炎披衣菌

檢體：疑似感染鸚鵡熱及肺炎披衣菌之傳染病檢體，以血液或血清檢體為主。

2. 黴漿菌培養基配製

參考文獻資料，使用三種培養基來培養肺炎黴漿菌，其各成分如下：

(1) *Mycoplasma growth broth* (Modified Hayflick Medium)：

(Media formulas designated by an asterisk are those of the FAO/WHO

Collaborating Center for Animal Mycoplasmas)

Heart infusion broth (Difco) 2.85 g

[or PPLO broth (Difco)] 2.52 g

Distilled water 90.0 ml

pH 7.8 Autoclaving 121°C, 20 min.

無菌狀態添加：

Horse serum(56°C, 30min. inactivated) 20.0 ml

25%(W/V) Fresh yeast extract solution 10.0 ml

0.2%(W/V) Calf thymus DNA solution 1.2 ml

(Sigma, St. Louis, MO; Type 1, No.1501)

1.0%(W/V) Thallium acetate solution 1.0 ml

Benzylpenicillin, 20,000 IU/ml 0.25 ml

1% Phenol Red (Agar plate 不加) 0.25 ml

調整培養基 pH 至 7.5-7.8(酒紅色)後分裝入無菌管 3 ml / tube，置於
37°C, 5-7% CO₂ 隔夜檢菌(Medium 變為黃色者丟棄)，置4°C保存備用。

(2) SP-4 medium :

Mycoplasma Broth Base (BD) 3.5 g

Bacto Peptone (Difco) 5.3 g

Bacto Tryptone (Difco) 10 g

Glucose 5 g

Distilled water 560 ml

pH 7.5-7.6, Autoclaving 121°C, 15 min.

無菌狀態添加：

CMRL 1066 tissue culture supplement (10 x) 50 ml

25%(W/V) Fresh yeast extract solution 35 ml

2%(W/V) Yeastolate (Difco) 100 ml

Fetal bovine serum (heated 56°C- 1 hour) 170 ml

Penicillin G (100,000 units/ml) 10 ml

Thallium acetate (1:50 solution) 50 ml

Polymyxin B (100,000 units/ml) 5 ml

1% Phenol Red (Agar plate 不加) 0.25 ml

調整培養基 pH 至 7.4-7.5 (酒紅色)後分裝入無菌管 3 ml / tube，置於

37°C, 5% CO₂ 隔夜檢菌(Medium 變為黃色者丟棄)，置4°C保存備用。

(3) PPLO broth:

PPOL broth Base (BD) 21 g

Dextrose 1 g

Distilled water 650 ml

pH 7.5-7.6, Autoclaving 121°C, 15 min.

無菌狀態添加：

heat-inactivated horse serum 200 ml

Fresh yeast extract solution 100 ml

Penicillin G 0.626 ml

Thallium Acetate 0.5 ml

1% Phenol Red (Agar plate 不加) 0.25 ml

調整培養基 pH 至 7.4-7.5 (酒紅色)後分裝入無菌管 3 ml / tube，置於

37°C, 5% CO₂ 隔夜檢菌(Medium 變為黃色者丟棄)，置4°C保存備用。

3. 黴漿菌培養及觀察

於無菌操作台，取標準菌株液樣品100 μL，無菌操作加入黴漿菌液態培養基之試管內，將試管蓋緊。置入37°C，5% CO₂ 培養箱內，每日觀察顏色變化並進行記錄，需觀察5-7 天。俟黴漿菌液態培養基轉變為黃色，取液態培養菌株液樣品100 μL，接種於黴漿菌固態培養基上，置入37°C，5% CO₂ 培養箱內。培養約7-14天，利用 Nikon SMZ800解剖顯微鏡觀察培養之黴漿菌菌落型態。將培養皿放置於載物檯並調整顯微鏡各機構，以放大倍率20-40倍觀察並拍照紀錄。

4. 鸚鵡熱及肺炎披衣菌血清學檢驗

血清檢體以可同時檢驗 *Chlamydia psittaci*、*Chlamydia pneumoniae* 及

Chlamydia trachomatis 三種 (species) 的微量免疫螢光 (Microimmunofluorescence , MIF) 法檢驗。

(1). Savyon® Chlamydia IgM/IgG SeroFIA™

將疑似病例之血清檢體於56°C之水浴槽中反應30分鐘，以不活化補體。接著利用 Chlamydia IgM/IgG SeroFIA™ (Savyon® Diagnostics Ltd., Israel) 兩組套組分別進行 IgM 和 IgG 的檢驗，其所需血清稀釋倍數分述如下：進行 IgM 檢驗者，先利用 IgG 去活性試劑 (IgG inactivation reagent) 阻斷 IgG 活性，再加入血清稀釋試劑 (serum diluent) 製備為1：20稀釋濃度之血清。進行 IgG 檢驗者，利用血清稀釋試劑 (serum diluent) 將血清序列稀釋為1：32稀釋濃度之血清，並將將各個稀釋濃度之血清分別點置於反應玻片 (reaction slides) 上標示 *C. pneumoniae*、*C. trachomatis* 及 *C. psittaci* 之孔洞。

進行 IgM 檢驗者，將反應玻片置於保濕盒中於37°C反應90分鐘；進行 IgG 檢驗者，則於相同條件下反應30分鐘。反應後，利用預先配製之1倍的洗滌緩衝液 (wash buffer) 洗滌反應玻片，再以純水洗淨反應玻片後晾乾。

於各個孔洞點置 10 µl 之 FITC 標記 IgM 或 IgG 試劑 (FITC-conjugate IgM / IgG)，置於保濕盒中於37°C下反應30分鐘後，依上述方式洗滌反應玻片並晾乾。

(2). ANI Labssystem Chlamydia pneumoniae IgM/IgG Micro-IF Test

Chlamydia pneumoniae IgM/IgG Micro-IF Test kit (ANI Labssystem Ltd. Oy, Finland) 套組分別就 IgM 和 IgG 進行檢驗，所需血清稀釋

倍數分述如下：進行 IgM 檢驗者，先以 IgG 阻斷試劑 (IgG blocking reagent) (ANI Labssystem Ltd. Oy, Finland) 阻斷 IgG 活性，再以的樣本稀釋試劑與血清製備為1:16稀釋濃度之血清。進行 IgG 檢驗者，以的樣本稀釋試劑 (sample diluent) 製備與血清製備為1:32稀釋之血清，再序列稀釋為1:128和1:512稀釋濃度之血清，並將將各個稀釋濃度之血清分別點置於反應玻片之孔洞。

進行 IgM 檢驗者，將反應玻片置於保濕盒中於37°C反應3小時；進行 IgG 檢驗者，則於相同條件下反應30分鐘。反應後，利用預先配製之1倍的磷酸緩衝液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗滌反應玻片，再以純水洗淨反應玻片後晾乾。

於各個孔洞點置 10 μ l 之 FITC 標記 IgM 或 IgG 試劑 (FITC-conjugate IgM / IgG)，置於保濕盒中於37°C下反應30分鐘後，依上述方式洗滌反應玻片並晾乾。

(3). FOCUS Chamydia MIF IgG/IgM

Chamydia MIF IgG/IgM (FOCUS Diagnostics, U.S.A.)套組分別就 IgM 和 IgG 進行檢驗，所需血清稀釋倍數分述如下：進行 IgM 檢驗者，以 IgM 前處理稀釋試劑 (IgM Pretreatment Diluent) 阻斷 IgG 活性，與血清製備為1:10稀釋濃度之血清。進行 IgG 檢驗者，以樣本稀釋液 (sample diluent) 與血清製備為1:16稀釋之血清，並將各個稀釋之血清、陽性及陰性對照分別點置25 μ l 於反應玻片之孔洞。

進行 IgM 檢驗者，將反應玻片置於保濕盒中於37°C反應90分鐘；進行 IgG 檢驗者，則於相同條件下反應30分鐘。反應後，利用預先

配製之1倍的磷酸緩衝液（phosphate buffer saline， PBS）洗滌反應玻片，再以純水洗淨反應玻片後晾乾。

於各個孔洞點置 25 μ l 之 FITC 標記 IgM 或 IgG 試劑（FITC-conjugate IgM / IgG），置於保濕盒中於 37°C 下反應 30 分鐘後，依上述方式洗滌反應玻片並晾乾。

(4). 微量免疫螢光（Microimmunofluorescence， MIF）反應玻片之觀察

反應完成之玻片於反應孔洞旁滴上固定液（mounting fluid），蓋上蓋玻片使固定液擴散至孔洞中，並吸除溢出的固定液。

利用 Nikon ECLIPSE E800 顯微鏡附裝 Nikon VFM Epi-Fluorescence Attachment（Nikon Instruments Inc.， Melville， NY， U.S.A.）觀察結果。調整顯微鏡各機構：濾鏡使用 B-2A 濾鏡，光圈使用暗視野（darkfield），並於玻片放置於置物台後再開啟遮光器（shutter slider），以放大倍率 200 倍觀察反應玻片各孔洞之披衣菌基體顆粒（Chlamydia elementary body particles）的形成情況及螢光亮度，陽性對照之結果呈現披衣菌基體顆粒清晰可辨並顯現中等至強烈的蘋果綠螢光；陰性對照之結果則不見披衣菌基體顆粒且螢光黯淡。將檢體結果對照陽性對照之結果，若其披衣菌基體顆粒之形成與螢光亮度相符或超過陽性對照結果，則判定為陽性；反之，若其披衣菌基體顆粒之形成與螢光亮度不及陽性對照結果，則判定為陰性。

除了微量免疫螢光（Microimmunofluorescence， MIF）法檢驗，評估利用免疫墨點法（Immunoblot）同時檢驗血清檢體中 Chlamydia

psittaci 及 *Chlamydia pneumoniae*、*Chlamydia trachomatis* 三種 (species) 的專一性抗體。

(5). recomLine Chamydia IgG/IgA[IgM]

recomLine Chamydia IgG/IgM (MIKROGEN Diagnostik, Germany) 套組分別就 IgM 和 IgG 進行檢驗。進行 IgG 及 IgM 檢驗者，分別以 20 μ l 血清加入 2 ml 預先配製之 1 倍的洗滌緩衝液 A (1 x ready-to-use wash buffer A) 製備為 1:100 稀釋濃度之血清於反應槽中，並將檢測條放入，於室溫下輕搖振盪反應 1 小時。反應後，倒掉血清稀釋液，每個反應槽以 2 ml 預先配製之 1 倍的洗滌緩衝液 A (1 x ready-to-use wash buffer A) 於室溫下輕搖振盪清洗 5 分鐘，再倒掉清洗液，共重複三次。於各個反應槽中加入 1:100 稀釋濃度之 HRP 標記 IgM 或 IgG 試劑 (HRP-conjugate IgM / IgG)，於室溫下輕搖振盪反應 45 分鐘。反應後，倒掉二級抗體稀釋液，每個反應槽以 2 ml 預先配製之 1 倍的洗滌緩衝液 A (1 x ready-to-use wash buffer A) 於室溫下輕搖振盪清洗 5 分鐘，再倒掉清洗液，共重複三次。之後於各反應槽加入 1.5 ml TMB 基質液反應 8 分鐘，之後以乾淨的去離子水清洗三次。由反應槽中取出檢測條，以吸水紙輕輕壓乾，黏貼於套組所附的估算表中，以檢測條上呈色之條帶的有無和濃度，依照試劑說明書指示，計算 *C. psittaci*、*C. pneumoniae* 及 *C. trachomatis* 之各抗體反應。

三、結果

1. 比較黴漿菌培養基培養菌株之結果

由於肺炎黴漿菌 (*M. pneumoniae*)之選擇性培養基中含有葡萄糖，肺炎黴漿菌於生長過程中會代謝葡萄糖變成乳酸，因此導致培養基的pH值下降，而使得含有酚紅指示劑的培養基由紅色轉變為黃色。所以一般藉由培養基的顏色來初步判別是否有黴漿菌之生長。本研究使用三種黴漿菌培養基嘗試培養肺炎黴漿菌之標準菌株，結果如表一。本研究共培養六株標準菌株，ATCC15531、ATCC15377、ATCC29085及ATCC39505四株於SP-4 medium和PPLO medium兩種皆有生長；ATCC15293和ATCC15492則無培養出。而各標準菌株於Mycoplasma growth medium皆無生長。

2. 肺炎黴漿菌菌落型態觀察

將肺炎黴漿菌培養於固態培養基後，約每24-72小時，以20X-40X顯微鏡倍率觀察*M. pneumoniae*菌落如圖一。在固態培養基上可觀察到所培養的*M. pneumoniae*菌株呈現重要的菌落特徵：形成煎蛋 (fried egg)形態的菌落且深入培養基內，並可發現其各生長菌落大小不一。

3. 鸚鵡熱及肺炎披衣菌血清學檢驗比較

本研究利用4支不同病人之血清檢體 (No.UN0226、UN0316、192149、647203)來比較四組血清檢測套組的一致性及使用上的優缺點。如表二所列，肺炎披衣菌陽性的檢體，No.UN0226及UN0316，於Savyon® Chlamydia IgM/IgG SeroFIA™套組檢測為*C. pneumoniae* IgG陽性，FOCUS Chlamydia MIF IgG/IgM套組及recomLine Chlamydia MIF IgG/IgA[IgM]套組的檢驗結果皆與之一致；而ANI LabSystem Chlamydia

pneumoniae IgM/IgG Micro-IF Test套組的結果卻是No.UN0226為C. psittaci IgG陽性，No. UN0316則為C. pneumoniae IgG陽性及C. psittaci IgM和IgG陽性。鸚鵡熱陽性的檢體，No.192149及No.647203於Savyon套組皆可檢測到三種Chlamydia的IgM或IgG抗體，於ANI LabSystem及FOCUS套組也皆可偵測到三種Chlamydia的IgG抗體，而使用Immunoblot原理的recomLine套組則只呈現C. psittaci IgG陽性結果。因此，以上結果可發現，recomLine套組對於偵測不論是C. pneumoniae或是C. psittaci的IgG抗體皆有較具專一性的結果（圖二），而其他MIF相關之套組則在部分血清樣本可能容易產生C. pneumoniae、C. trachomatis及C. psittaci這三種披衣菌交叉反應。由表三比較本研究測試之各市售披衣菌血清學檢驗套組，各套組進行操作檢驗之時間差異不大，且單一測試皆可於一個工作天內完成（多重複測試除外）。由於MIF檢驗法為將樣本點置於玻片上於顯微鏡下觀察，所需樣本體積只要約2-5 μ l，而Immunoblot方法則相對需要較多樣本體積（20 μ l）來使檢測條可完全與之反應。於呈現反應結果中，MIF需要以顯微鏡來觀察是否有螢光產生，而有時背景值、樣本中其他雜質或交叉反應等干擾，加上螢光結果須於短時間內判讀完畢，否則容易衰弱等，常常對於判讀結果有影響，且也與人員操作經驗有關。比較之下，FOCUS套組由於其背景清晰，且附有背景對照，對於結果判讀則較其他兩組容易。Immunoblot呈現肉眼可見色帶於檢測條，可直接辨識其有無，在結果判讀上相對容易許多。目前所測試的三組MIF套組試劑，皆發現可能會出現三種披衣菌交叉反應的情形（交叉反應有無及程度因樣本不同而異）。以Immunoblot方法的recomLine套組雖然在IgM呈現效果不佳（可能無反應或無法判讀），但在IgG結果則有較專一的表現，對於結果也不易誤判（圖二）。

4. 台灣首例鸚鵡熱血清學檢驗

通報疑似鸚鵡熱個案為一位居住於台灣中部的44歲男性，於2011年1月1日起出現頭痛、發燒、發冷、全身痠痛及咳嗽等症狀，1月11日由某醫學中心通報，於1月11日、1月24日和2月14日分別採集第一、二及三次血清樣本，血清檢體送至經疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心檢驗。個案於接受醫院住院治療後，1月底已康復出院。

衛生單位至個案家中進行疫調，發現飼養之二隻玄鳳鸚鵡（學名：*Nymphicus hollandicus*常稱雞尾鸚鵡）為可能的感染來源，一隻在個案發病前一個月死亡，另一隻則在個案住院期間死亡。

四、討論

肺炎黴漿菌的感染一般無法由臨床症狀直接診斷，仍須經由實驗室方法進行確認。早期是利用冷凝集素反應 (Cold agglutinins) 來偵測 *M. pneumoniae* 之感染，然而因缺乏好的靈敏度及特異性，因此常被誤導此症狀為由其他細菌或病毒病源所造成²⁸⁻³⁰。目前常搭配血清學抗體檢驗以提高肺炎黴漿菌的確診率。另外，發展新興的分子生物檢測如 PCR 等技術也可同時做測定來提高檢驗準確度³¹。利用培養法來檢驗黴漿菌雖然費工費時，且需要一定的專業技術及經驗，但由於其具有 100% 的專一性，所以仍是目前的檢驗參考標準，是各個參考實驗室及大型醫學研究中心所需建立的技術¹⁷。此外，全球黴漿菌抗藥性菌株的浮現，特別是亞洲地區更是日趨嚴重，更須建立黴漿菌培養技術來監測其藥物敏感性並進一步探討其抗藥性機制來即時調整臨床治療情形。本研究利用兩種 Medium 分別是 SP-4 及 PPLO medium 成功培養 ATCC 標準菌株，並已發展菌株繼代及保存等技術，待更進一步收集臨床菌株，以期能培養保存，一方面作為檢驗標準，另一方面可發展其他相關檢驗技術及進一步研究可能的抗藥性機制等。

披衣菌是一種絕對細胞內寄生的病原菌，其發育週期和寄主細胞有密切關係，被感染的細胞也會受到披衣菌的影響，而調控其免疫系統，兩者間的平衡，會造成披衣菌的感染、潛伏或再次感染，或是寄主的防禦、耐受或免疫。目前在披衣菌感染的檢測上，可以使用培養 (culture)、直接免疫螢光 (direct fluorescent antibody, DFA)、核酸增幅檢測 (nucleic acid amplification tests)、血清學檢測 (serology tests) 等。然而，培養和直接免疫螢光法因為檢體的收集及運送的困難及操作過程複雜，因此較

少做為一般檢測方法³²。而核酸增幅檢測可以快速地瞭解目前體內是否有披衣菌的存在，但是對於再次感染或潛伏感染則無法判斷。因此，血清學檢測包含補體結合試驗(complement fixation)、間接螢光法(indirect immunofluorescent assay, IFA)及酵素免疫法(enzyme immunoassays, EIA)則較常做為常規檢驗方法，可以瞭解是否為初次感染、再次感染或是潛伏感染的情形，但是靈敏性(sensitivity)較低，檢測速度也較慢^{33, 34}。

由本研究披衣菌血清學檢驗比較結果可得知，MIF 檢驗試劑可容易偵測到有反應的 IgM 或 IgG 披衣菌抗體，但因 *C. pneumoniae*、*C. trachomatis* 及 *C. psittaci* 間，部分抗原相似度高，所以易產生三物種有交叉反應之現象；而 Immunoblot 的檢測試劑 recomLine 則是鸚鵡熱 IgM 反應效果不佳，但鸚鵡熱和肺炎披衣菌的 IgG 反應均有良好的呈現，且較無交叉反應之現象。關於交叉反應的產生，藉由本研究的這些 MIF 檢驗套組可得到幾個經驗：(1) 鸚鵡熱陽性比肺炎披衣菌陽性檢體易產生交叉反應，(2) IgG 比 IgM 可能較容易有交叉反應，(3) 對於肺炎披衣菌陽性檢體，ANI Labsystems 相較於其他兩套組易產生 IgG 交叉反應，(4) 對於鸚鵡熱陽性檢體，Savyon 相較於其他兩套組易產生 IgM 交叉反應，而三個套組皆會產生物種間 IgG 交叉反應。綜合本研究的比較測試，以成本考量下，MIF 方法仍舊比 Immunoblot 方法具有優勢，但因其所容易產生物種間交叉反應及判讀不易的之缺點也常構成檢驗上的困擾。因此，我們可初步擬定未來對於鸚鵡熱及肺炎披衣菌的檢驗策略：(1)檢驗肺炎披衣菌，可選擇使用 MIF 法的 Savyon 套組或 FOCUS 套組之一來做判斷，若仍發生交叉反應，可搭配 Immunoblot 的 recomLine 套組做確認；(2)檢驗鸚鵡熱，可選擇使用 MIF 法的 FOCUS 套組(其較

無產生交叉反應且相對容易判讀)來判斷並且搭配 Immunoblot 的 recomLine 套組來確認鸚鵡熱 IgG 陽性反應。

本研究報告報告台灣的首例鸚鵡熱個案，由鸚鵡熱病例臨床表現，流行病學調查，血清學證據和臨床抗生素的反應證實。患病玄鳳鸚鵡被懷疑是鸚鵡熱感染的可能來源。血清學反應結合臨床，影像學，以及旅遊，職業暴露，聚集感染等資訊，特別是鳥類的接觸和近期國外旅遊血清學數據的綜合研判和解釋，對於正確和有效的鑑別人類鸚鵡熱十分重要。

五、結論與建議

本計畫為期五年（103-107年），計畫之總目標為建立披衣菌及黴漿菌之標準檢驗流程，並針對國內高危險族群及爆發流行案例進行檢驗，以瞭解國內流行概況及防治策略擬定之參考。實施方法為建立披衣菌及黴漿菌之培養分離、血清學及分子檢驗之標準檢驗流程，並針對本局疫情調查收集之相關檢體進行檢驗，以釐清疫情並瞭解國內流行概況。建立披衣菌及黴漿菌肺炎菌之血清學及PCR檢驗方法。收集市售血清學檢驗試劑（MIF，EIA，ELISA）及文獻發表相關資料，參酌美國CDC採行及推薦之方法，以所收級的檢體進行測試，篩選出具專一性及敏感性之檢測方法。由Genebank和發表的文獻，收集披衣菌及黴漿菌之序列資料基因資料，設計專一性引子並篩選出特異性片段核酸探針，以建立快速PCR檢驗方法。完成標準檢驗流程。建立快速檢測披衣菌及黴漿菌菌之real-time -PCR和LAMP檢驗方法。我們的主要進展有三：**第一**、篩選培養基，發展黴漿菌培養方法。**第二**、比較披衣菌多種血清學檢驗方法並測試及評估新穎披衣菌檢驗方法。**第三**、整理國內黴漿菌肺炎血清流行病學資料。

我們將致力於建立披衣菌及黴漿菌參考實驗室。相關型別資料將回饋給臨床醫師，合作持續分型並與臨床及流病資料整合建立資料庫。國際上持續建立合作關係，交換型別資訊或提供訓練。希望藉由持續努力瞭解病原可能傳播流行及特定高抗藥性性株系崛起之情形。

六、計畫重要研究成果及具體建議

具體建議有十二：

1. 預應可能新興及罕見病原爆發流行或境外移入疫情，建立參考實驗室鑑定架構。強化披衣菌及黴漿菌鑑定能力，並提供鑑定服務及教育訓練。
2. 建立培養方法，整合並精進披衣菌及黴漿菌快速、多重檢驗流程，擴大應用各種鑑定及分型方法於各種高危險族群之檢驗及鑑別。將研究成果及型別資料將回饋給送檢單位及臨床醫師，協助釐清病原於病程及療程中之變化，並持續合作與臨床及流病資料整合建立資料庫。與醫院合作轉譯醫學，探討實際臨床應用之可行性。
3. 持續監測抗藥性的趨勢，適時提供抗生素治療建議。
4. 發展可國際接軌之分型方法，追蹤型別、抗藥性基因盛行及變遷情形，提供防治及未來疫苗選擇的參採。
5. 深入探討抗藥性披衣菌及黴漿菌之抗藥性機制，以提供預防因應之道。
6. 藉由建立可國際接軌之分型方法參與國際監測，與其他國家進行菌株及型別資料之交流，持續進行實質國際交流，並共同合作發表論文。
7. 由疾管署主動提供鑑定及分型服務，教育訓練及技術推廣：本實驗室發展之快速多重流式微珠陣列方法實驗細節已提供多個署內外相關單位參考，協助其建立技術。最適化的 PFGE 分子分型流程，也有多名相關研究助理來學習研習，將持續以寬闊的胸襟分享所知，發揮公僕服務奉獻之精神，並建立國際聲譽。
8. 教育民眾如何落實防治，自我保護。
9. 持續努力提升國際SCI論文發表的質與量，分享台灣經驗，展現實力。

七、参考文献

Reference

1. Waites KB, Katz B, Schelonka RL: Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clinical microbiology reviews* 2005;18:757-89.
2. Waites KB, Talkington DF: Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen. *Clinical microbiology reviews* 2004;17:697-728, table of contents.
3. Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, et al: Complete sequence analysis of the genome of the bacterium Mycoplasma pneumoniae. *Nucleic acids research* 1996;24:4420-49.
4. Huang TH, DeSiervo AJ, Yang QX: Effect of cholesterol and lanosterol on the structure and dynamics of the cell membrane of Mycoplasma capricolum. Deuterium nuclear magnetic resonance study. *Biophysical journal* 1991;59:691-702.
5. Esposito S, Droghetti R, Bosis S, et al: Cytokine secretion in children with acute Mycoplasma pneumoniae infection and wheeze. *Pediatric pulmonology* 2002;34:122-7.
6. Leonardi S, Pavone P, Rotolo N, et al: Stroke in two children with Mycoplasma pneumoniae infection. A causal or casual relationship? *The Pediatric infectious disease journal* 2005;24:843-5.
7. Cunha BA: The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2006;12 Suppl 3:12-24.
8. Suzuki Y, Itagaki T, Seto J, et al: Community outbreak of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae in Yamagata, Japan in 2009. *The Pediatric infectious disease journal* 2013;32:237-40.
9. Zhao F, Liu G, Wu J, et al: Surveillance of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae in Beijing, China, from 2008 to 2012. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013;57:1521-3.
10. Wu PS, Chang LY, Lin HC, et al: Epidemiology and clinical manifestations of children with macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae pneumonia in Taiwan. *Pediatric pulmonology* 2013;48:904-11.
11. Uldum SA, Bangsbo JM, Gahrn-Hansen B, et al: Epidemic of Mycoplasma pneumoniae infection in Denmark, 2010 and 2011. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 2012;17.
12. Dumke R, von Baum H, Luck PC, et al: Occurrence of macrolide-resistant

- Mycoplasma pneumoniae strains in Germany. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2010;16:613-6.
13. Bebear CMPereyre S: Mechanisms of drug resistance in Mycoplasma pneumoniae. *Current drug targets Infectious disorders* 2005;5:263-71.
 14. Pereyre S, Guyot C, Renaudin H, et al: In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in Mycoplasma pneumoniae. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004;48:460-5.
 15. Hayflick L: Tissue cultures and mycoplasmas. *Texas reports on biology and medicine* 1965;23:Suppl 1:285+.
 16. Smith CB, Chanock RM, Friedewald WT, et al: Mycoplasma pneumoniae infections in volunteers. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1967;143:471-83.
 17. Tully JG: New laboratory techniques for isolation of Mycoplasma pneumoniae. *The Yale journal of biology and medicine* 1983;56:511-5.
 18. Chanock RM, Hayflick LBarile MF: Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1962;48:41-9.
 19. Beeckman DSVanrompay DC: Zoonotic Chlamydophila psittaci infections from a clinical perspective. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2009;15:11-7.
 20. Senn LGreub G: Local newspaper as a diagnostic aid for psittacosis: a case report. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2008;46:1931-2.
 21. Kaleta EFTaday EM: Avian host range of Chlamydophila spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian pathology : journal of the WVPA* 2003;32:435-61.
 22. Vanrompay D, Harkinezhad T, van de Walle M, et al: Chlamydophila psittaci transmission from pet birds to humans. *Emerging infectious diseases* 2007;13:1108-10.
 23. Verminnen KVanrompay D: Chlamydophila psittaci infections in turkeys: overview of economic and zoonotic importance and vaccine development. *Drugs of today* 2009;45 Suppl B:147-50.
 24. Newman CP, Palmer SR, Kirby FD, et al: A prolonged outbreak of ornithosis in duck processors. *Epidemiology and infection* 1992;108:203-10.
 25. Sting R, Lerke E, Hotzel H, et al: [Comparative studies on detection of Chlamydophila psittaci and Chlamydophila abortus in meat turkey flocks using cell culture, ELISA, and PCR]. *DTW Deutsche tierärztliche*

- Wochenschrift* 2006;113:50-4.
26. Haralambieva I, Iankov I, Petrov D, et al: Cross-reaction between the genus-specific lipopolysaccharide antigen of *Chlamydia* spp. and the lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli* O119 and *Salmonella newington*: implications for diagnosis. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2001;41:99-106.
 27. Verminnen K, Duquenne B, De Keukeleire D, et al: Evaluation of a *Chlamydia psittaci* infection diagnostic platform for zoonotic risk assessment. *Journal of clinical microbiology* 2008;46:281-5.
 28. Johnson S: Possibly autoantibody complications in *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2006;43:1246.
 29. Tsiodras S, Kelesidis I, Kelesidis T, et al: Central nervous system manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *The Journal of infection* 2005;51:343-54.
 30. Uldum SA, Jensen JS, Sondergard-Andersen J, et al: Enzyme immunoassay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies to *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology* 1992;30:1198-204.
 31. Yamazaki T, Narita M, Sasaki N, et al: Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2006;13:708-10.
 32. Gibson JP, Egerer RM, Wiedbrauk DL: Improved isolation of *Chlamydia trachomatis* from a low-prevalence population by using polyethylene glycol. *Journal of clinical microbiology* 1993;31:292-5.
 33. Kohl KS, Markowitz LE, Koumans EH: Developments in the screening for *Chlamydia trachomatis*: a review. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* 2003;30:637-58.
 34. Barnes RC: Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clinical microbiology reviews* 1989;2:119-36.

八、圖與表

表一、肺炎黴漿菌標準菌株於三種培養基之生長情形

<i>M. pneumoniae</i> strain	Mycoplasma growth medium	SP-4 medium	PPLO medium
ATCC15531	-	+	+
ATCC15377	-	+	+
ATCC29085	-	+	+
ATCC39505	-	+	+
ATCC15293	-	-	-
ATCC15492	-	-	-

+：代表培養基顏色由紅變黃，有黴漿菌生長

-：代表培養基顏色維持紅色，無黴漿菌生長

表二、鸚鵡熱及肺炎披衣菌血清學檢測試劑結果比較

Detection method Species	Microimmunofluorescence (MIF)						Immunoblot	
	Savyon		ANI Labssystem		FOCUS		recomLine	
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
	No. UN0226							
<i>C. pneumoniae</i>	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>C. trachomatis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. psittaci</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
	No. UN0316							
<i>C. pneumoniae</i>	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>C. trachomatis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. psittaci</i>	-	-	+	+	-	-	-	-
	No. 192149							
<i>C. pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	+	-	+/-
<i>C. trachomatis</i>	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>C. psittaci</i>	+	+	-	+	+	+	-	+
	No. 647203							
<i>C. pneumoniae</i>	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>C. trachomatis</i>	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>C. psittaci</i>	+	+	+	+	-	+	-	+

結果表示：

+：陽性反應

-：陰性反應

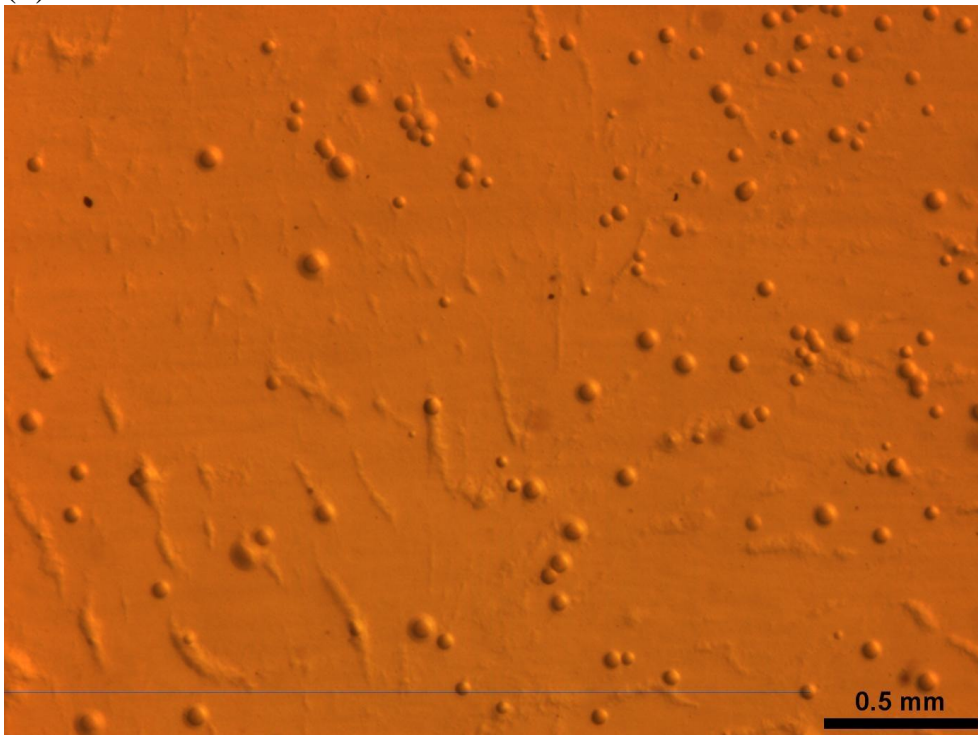
+/-：Borderline，介於陽性及陰性反應之間（試劑說明書提供）

表三、本研究中披衣菌血清學檢測試套組特性比較

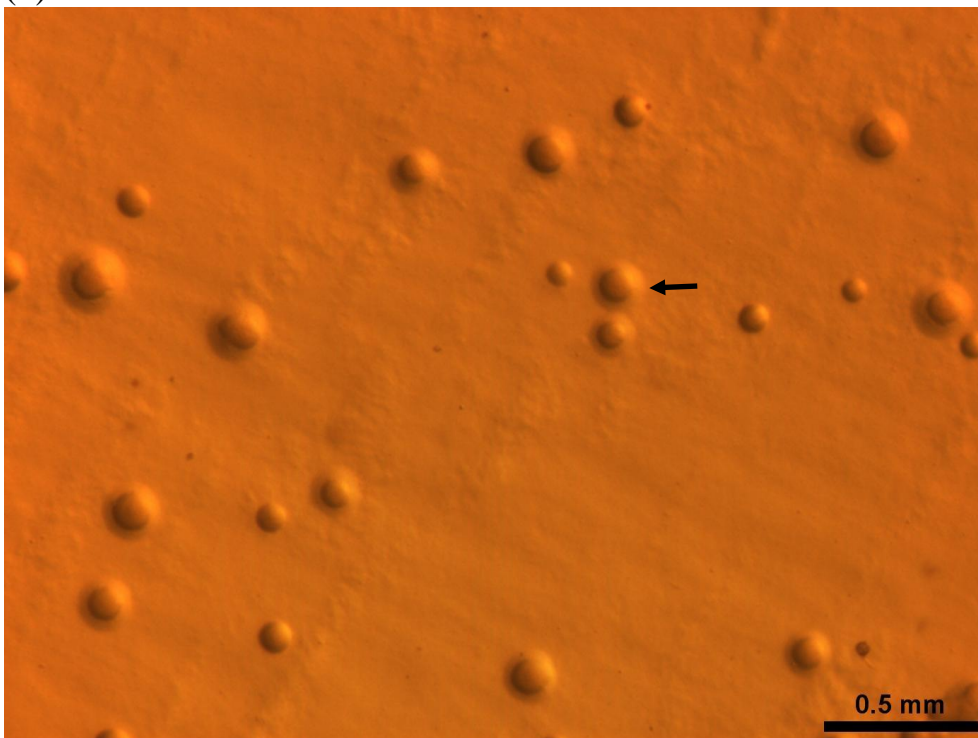
Detection method Species	Microimmunofluorescence (MIF)						Immunoblot	
	Savyon		ANI Labssystem		FOCUS		recomLine	
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
操作進行時間	3 h	2 h	4 h,30 m	2 h	3 h	2 h	2 h, 30 m	2 h, 30 m
所需樣本體積	5 µl	5 µl	2 µl	5 µl	5 µl	2 µl	20 µl	20 µl
呈現結果	綠色螢光 (需在顯微鏡下觀察)						可見光色帶	
結果保存	黑暗中，2-8°C，24 h						常溫，數週	
結果判讀	不一 定	不一 定	不易	不易	容易	容易	容易	容易
產生交叉反應	√	√	√	√	√	√	x	x
價格	\$188/ts	\$188/ts	\$385/ts	\$142/ts	\$142/ts	\$120/ts	\$990/ts	\$990/ts

圖一、肺炎微漿菌標準菌株之菌落型態觀察

(1)20X



(2)40X



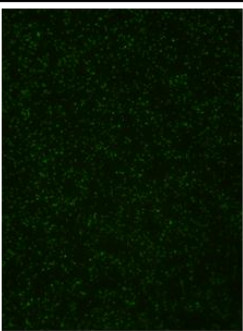
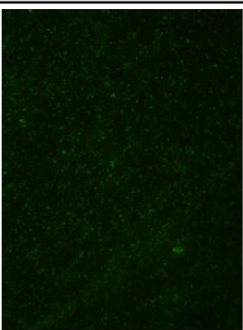

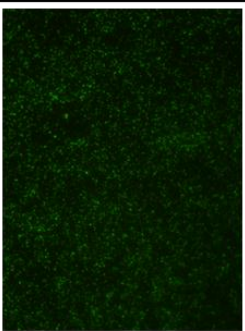
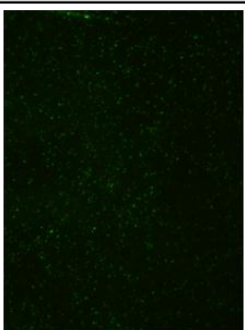

圖二、recomLine Chamydia 套組檢驗鸚鵡熱及肺炎披衣菌之結果

Sample no.	Antibody	Antigen bands pattern	Antigen bands score																	
			C. trachomatis						C. pneumoniae						C. psittaci					
			MOMP	OMP2	TARP	CPAF	HSP60	Result	MOMP	OMP2	TARP	CPAF	YWBM	Result	MOMP	OMP2	TARP	CPAF	Result	
	IgG		6	2	3	3	1	6	2/6*	3	3	3	6	4/6**	1	3	3	3	3	
No. UN0226	V		3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. UN0316	V		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. 192149	V		0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. 647203	V		0	2	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. 192149	V		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. 647203	V		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. UN0226	V		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. UN0316	V		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

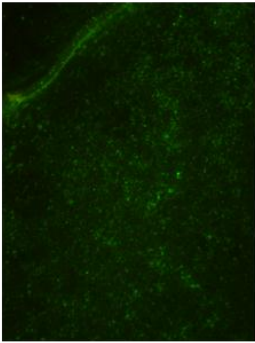
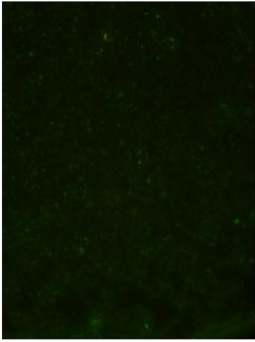

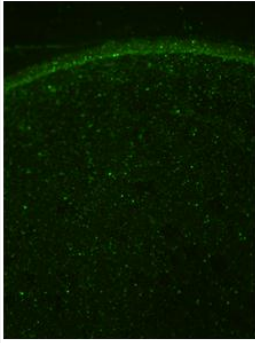
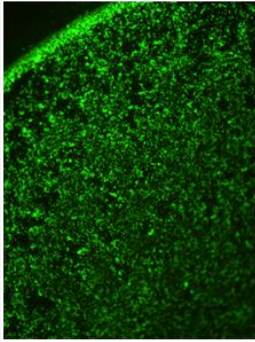
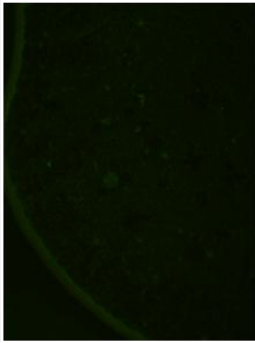
* 此抗原出現時，若C. trachomatis和C. psittaci的OMP2為陰性，給予6分，否則給2分
 ** 此抗原出現時，若C. trachomatis和C. pneumoniae的MOMP為陰性，給予6分，否則給4分

圖三、MIF 套組之陽性陰性樣本結果

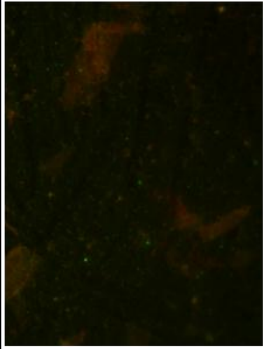
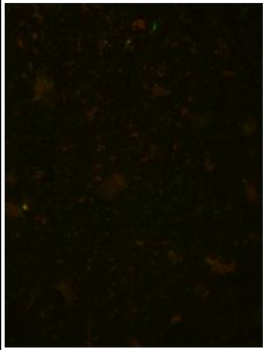
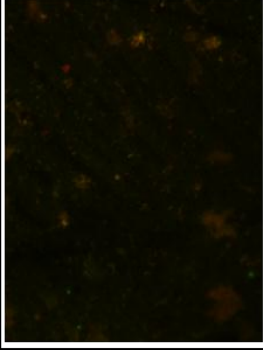
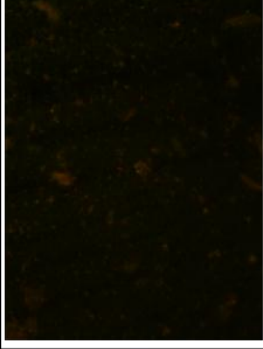
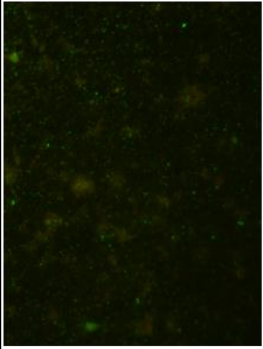
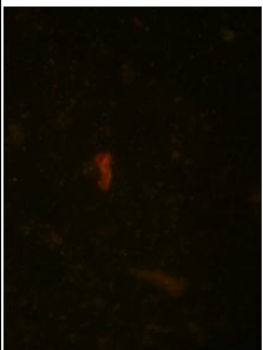
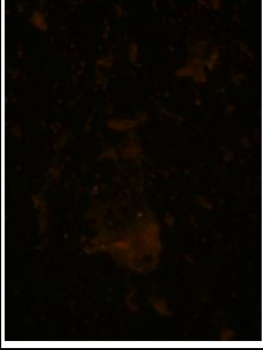
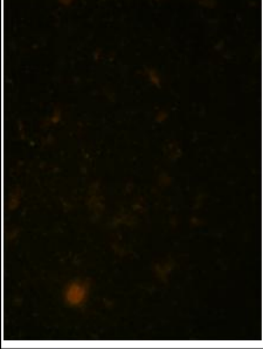
(1) Savyon® Chlamydia IgM/IgG SeroFIA™

[Savyon] Positive sample		[Savyon] Negative sample	
	C. pneumoniae	C. psittaci	C. psittaci
IgM			
Result	+	+	-
IgG			
Result	+	+	-

(2) ANI Labsystem Chamydia pneumoniae IgM/IgG Micro-IF Test

[ANI Labsystems] Positive sample		[ANI Labsystems] Negative sample	
	C. pneumoniae	C. psittaci	
IgM			
Result	+	+	-
IgG			
Result	+	+	-

(3) FOCUS Chamydia MIF IgG/IgM

[FOCUS] Positive sample		[FOCUS] Negative sample		
	C. pneumoniae	C. psittaci	C. pneumoniae	C. psittaci
IgM				
Result	+	+	-	-
IgG				
Result	+	+	-	-

附錄一：圖表目錄

表一、肺炎黴漿菌標準菌株於三種培養基之生長情形.....	28
表二、鸚鵡熱及肺炎披衣菌血清學檢測試劑結果比較.....	29
表三、本研究中披衣菌血清學檢測試套組特性比較.....	30
圖一、肺炎黴漿菌標準菌株之菌落型態觀察.....	31
圖二、recomLine Chamydia 套組檢驗鸚鵡熱及肺炎披衣菌之結果.....	32
圖三、MIF 套組之陽性陰性樣本結果.....	33