

計畫編號：DOH93-DC-2024

行政院衛生署疾病管制局九十三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

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局

計畫主持人：黃瑞禎

研究人員：潘銘正、邱詩惠、江奇璇

執行期間：93年1月1日至93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	10
討論	13
結論與建議	15
參考文獻	16
圖表	18
附錄	20

摘要

關鍵詞：鼠咬熱、人畜共通傳染病、念珠狀鏈桿菌

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。本研究的目的是在於建立念珠狀鏈桿菌分離鑑定方法及血清檢測方法。我們以聚合酶連鎖反應法增幅 16S Ribosomal DNA 300 bp，經 Bfa I 限制酵素切割確認，亦可作為快速方便的菌種鑑定工具。利用高率薄層色層分析法，將菌體脂質展開，可偵測到 9 個脂質分子。其中 5 個醣酯質與全菌免疫之兔抗體具有抗原抗體反應。最後採用間接螢光抗體法，針對大鼠及發燒、淋巴結病變人體血清抗體調查，於蒐集到的金門、馬祖的 20 隻大鼠，全數有抗體反應，幾何平均抗體力價為 107.6；96 件人體血清中，抗體力價 32 倍以上 86.5%。結果顯示台灣可能有念珠狀鏈桿菌感染的可能性。

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. We adapt PCR to amplify 16S rDNA, which include 300 bp. The product was digest into 3 fragments by restriction enzyme, Baf I. The lipid fraction that extracted from *S. moniliformis* could be separated by high-performance thin-layer chromatography into 9 components. Three glycolipids of lipid components were reacted with polyclonal rabbit antisera by immunostaining assay. We also launch serology surveillance by IFA, focusing on rat and human. All of 20 rats caught from Kinmen and Matzu had reacted with *S. moniliformis*. Among 96 human sera, 86 samples(86.5%) had antibody titers more then 32X. This study indicates the possible infection of rat bite fever in Taiwan.

前言

鼠咬熱為罕見的人畜共通傳染病，其致病菌為念珠狀鏈桿菌 (*Streptobacillus moniliformis*) 或小螺旋菌 (*Spirillum minus*)。主要途徑為受到帶菌鼠咬傷或抓傷而引發感染，以接觸實驗動物的工作人員與寵物飼主為高危險群。病原存在於大鼠口腔中，據文獻指出有 10% 至 100% 健康實驗用鼠，50% 至 100% 野生鼠口腔中存有念珠狀鏈桿菌。另外曾在大鼠中耳分離到本菌。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)。患者之臨床症狀會出現發燒、畏寒、頭痛、肌肉痛、關節腫痛及四肢斑丘狀紅疹等一般性的症狀，臨床上需區別敗血症、全身性淋病、腦膜炎球菌血症、鏈球菌感染、萊姆病、布氏桿菌症、落磯山斑點熱、鉤端螺旋體、梅毒等疾病。由於念珠狀鏈桿菌培養條件嚴苛，從臨床檢體分離不易，小螺旋菌無法使用人工培養基增殖，因此容易被忽略或是誤診為其他疾病；但是在近年來國外已有多起鼠咬熱病例報告，像是西班牙、美國等地的患者血液、女性生殖道分離出念珠狀鏈桿菌，更引起各界的注意。目前，但仍屬少見散發，偶見爆發集體感染的感染症。台灣曾在病患分離出念珠狀鏈桿菌的案例，發現

患者出現淋巴結病變比例較高，儘管如此，念珠狀鏈桿菌在台灣的流行狀況仍然不明，因此鉤端螺旋體、恙蟲病、斑疹傷寒也是經由鼠媒介的傳染病，因此有必要進行鼠類的調查，研判鼠咬熱在台灣公共衛生上的地位。本研究計畫的主要目標是希望能找到適合的念珠狀鏈桿菌菌體分子作為血清學診斷用抗原，利用高敏感性與特異性的血清學診斷工具來調查台灣鼠類血清抗體反應情形，以及調查台灣患者感染念珠狀鏈桿菌。

材料與方法

● 念珠狀鏈桿菌培養與核酸增幅偵測

1. 菌株培養：將念珠狀鏈桿菌參考菌株 (ATCC 14647) 培養於含 20% 馬血清培養基上，於潮濕且有 5% CO₂ 的 37°C 環境中培養 2 天。
2. 鑑定：挑取針點狀灰色之疑似菌落，顯微鏡檢查為革蘭氏染色陰性排列成鏈狀短桿菌，進行生化特性試驗 (Koneman EW et al, 1997)。
3. 參考已發表的參考菌株 16S rRNA 核酸序列，採用 Boot 設計之核酸引子 (Hoover RB, 2003; Goldenberger D et al, 1997; Ojukwu IC, Christy C, 2002; Berger C et al, 2001; Boot R et al, 2002) 進行核酸增幅、產物 Bfa I 限制酵素切割確認，與產物序列比對分析。

BR4 : 5'-GCTTAACACATGCAAATCTA-3' (forward)

BR5 : 5'-ACTCTATGCCGGGAATGA-3' (reverse)

● 菌體醣脂質 (glycolipids) 抗原性分析

1. 兔抗體製備：將考菌株 (ATCC 14647) 接種於 1 隻實驗兔，兩個月後採得念珠狀鏈桿菌兔抗體，保存於冷凍櫃中，以便日後

進行免疫反應試驗。

2. 脂類萃取與純化：以馬血清培養基大量增殖參考菌株（ATCC 14647），以有機溶劑（chloroform/methanol）萃取，保留下層含有菌體脂質有機溶液層。脂質乾燥後溶解於 chloroform/methanol/0.1 M KCL（3/98/74）樣品溶液，樣品液通過 Reverse-phase cartridge（Sep-Pak C18 cartridge, Waters, USA）管柱以去除鹽類與雜質。最後以 chloroform/methanol 將樣品回收，至於-20°C 冷凍櫃保存（Hossain H, 2001）。
3. High-performance thin-layer chromatography（HPTLC）分析脂類：樣品點於 HPTLC-silica gel₆₀（Merck, Germany）上，以展開液展開。利用展開液將各成分分開，展開後之膠片分別以 iodine，orcinol/sulfuric acid 試劑偵測各脂類之醣類等成分。
4. 免疫染色法：將樣品展開後的膠片乾燥，以 1% BSA-PBST 覆被（blocking），清洗後加入以 1:100 稀釋血清反應 40 分鐘，再以 1:1000 稀釋二級抗體（標識 HRP）反應 40 分鐘。最後加入酵素受質反應 4-12 分鐘。洗淨膠片後判讀免疫反應條帶。

● IFA 血清抗體檢測

1. IFA 抗原片：調整參考菌株（ATCC 14647）菌液，使濁度與

MacFarland No.1 標準管相同，滴至 12 孔螢光玻片，製作成全菌抗原片。

2. 大鼠抗體檢測：收集大鼠血清檢體，從 1:8 開始連續 2 倍稀釋至 1:1024，再以 1:100 抗大鼠 IgG 標幟 FITC 抗體反應，以螢光顯微鏡檢測螢光反應。
3. 人血清抗體檢測：由血清庫中收集發燒症狀患者，從 1:8 開始連續 2 倍稀釋至 1:1024，再以 1:100 抗人類 IgG 標幟 FITC 抗體反應，以螢光顯微鏡檢測螢光反應。

結果

● 檢驗鑑定

1. 參考菌株生化反應中 catalase、oxidase 與 urease 均為陰性反應，且無法使用 bioMerieux Vitek 商品化生化鑑定系統鑑別，一般實驗室需仰賴核酸比對以協助菌種鑑定。
2. 以 300 pg \pm 10% 的 DNA 作為聚合酶鏈鎖反應之模板，於 1X 聚合酶緩衝液（含 1.5mM 鎂離子）、正反股核酸引子對各 10 pmole、200 μ M dNTP、0.5 U 聚合酶等反應條件（附錄），可得到最佳產量與品質（data not shown）。所得產物大小為 300 bp，將產物純化後以限制酵素 Bfa I 進行進一步的酵素切割，於 4% agarose gel 電泳分析確認，結果有 3 個片段，分別是 131 bp、93 bp、與 76 bp（圖一），結果與文獻結果相同。
3. 實驗中引用文獻發表之引子對增幅 16S rDNA，所得 PCR 增幅產物經純化與序列比對，其結果與 GenBank 以及文獻結果比對均相似，準確度達 99.6%。因此確認為 *Streptobacillus moniliformis*(ATCC 14647, Type strain) 16S rDNA。將可應用為念珠狀鏈桿菌菌種鑑定之確認工具。

● 菌體醣脂質 (glycolipids) 抗原性分析

1. 抽取念珠狀鏈桿菌菌體 lipid，粗估 1g 菌體可抽取 50 mg 粗脂質，純化的脂質先以 chloroform/methanol/water (65/15/2, v/v/v) 溶液展開 25 分鐘，膠片乾燥隨後將膠片旋轉 90 度，續以 chloroform/methanol/acetone/acetic acid/water (65/10/20/10/3, v/v/v/v/v) 溶液展開 25 分鐘。經 I₂ vapour、orcinol/sulfuric acid spray reagent、ninhydrin spray 染色偵測各脂質的各種成分。共有 9 個脂質條帶發現 (圖二、三)，其中的 3、4、5、6、7、8 有糖脂質反應，總計共有 6 個 (圖二、三)，但是並無氨基脂成分 (data not shown)。發現第二項展開液具有最佳的展開效果，故採用作為 HPTLC 之展開液。
2. HPTLC-silica gel₆₀ 膠片與免疫前兔血清反應，並未發現免疫反應條帶。與免疫後兔血清反應後，有 5 個條帶發現有免疫反應 (圖三)。

● IFA 血清抗體檢測

1. 由徐爾烈教授於 90 年捕獲的金門與馬祖地區老鼠血清庫中，總共蒐集到 20 個溝鼠血清檢體，其中 7 個來自金門，13 個來自馬祖。其念珠狀鏈桿菌抗體反應情形：均有抗原抗體反應，抗

體力價介於 32 倍至 512 倍之間，幾何平均抗體力價為 107.6 倍。

抗體力價呈 32 倍有 3 個，64 倍有 8 個，128 倍有 3 個，256 倍有 3 個，512 倍有 3 個。

2. 由人類發燒病患與淋巴結症狀中選取的 98 個血清中，有以 32 倍以上列為陽性，共有 86 個血清，占 86.5%，其平均抗體力價為 112.3 倍。抗體力價未達 32 倍有 13 個，呈 32 倍有 18 個，64 倍有 21 個，128 倍有 19 個，256 倍有 11 個，512 倍有 11 個，1024 倍有 3 個。發燒患者與淋巴結患者念珠狀鏈桿菌血清抗體反應並無統計學上的差異。

討論

目前最值得信賴的檢驗方法仍以病原分離為宗。但是本菌培養需求較為特殊，需要較高的溼度、馬血清培養基優於羊血液、生長速度緩慢，加上生化反應多為陰性等特性，因此容易被臨床與檢驗室所忽略。

由實驗室血清庫調出由金門與馬祖捕捉之大鼠血清全數與念珠狀鏈桿菌有抗原抗體反應，推測金馬外島地區可能有本菌的存在，與過去文獻中認為念珠狀鏈桿菌分布限於歐美非等地，過去也沒有針對本菌進行調查，鼠咬熱是否趁交通運輸之便，由歐美非等地轉進台灣等資料。台灣本島鼠類念珠狀鏈桿菌帶菌率與血清抗體盛行率等流行病學特性，惟有進一步的鼠類採集調查方能有更清楚的瞭解。

再者，有文獻指出鼠咬熱患者中有 25% 的比例，於梅毒 VDRL 檢測顯現偽陽性反應。本實驗另以超音波擊碎器擊碎念珠狀鏈桿菌參考菌株之菌體抗原，經 SDS-PAGE 電泳分析發現，菌體中脂質成分比例較其他細菌（如 *Borrelia burgdorferi* B31 strain）高，必須經萃取除脂質，方可進行電泳分析。利用西方莫點法觀察菌體抗原與已確為其他診疾病血清抗體之交叉反應（cross reaction）；在觀察到

與萊姆病陽性反應時，無論提高抗原抗體反應嚴苛度，或是提高反應抗體稀釋倍數，結果發現萊姆病陽性血清中仍存有與念珠狀鍊桿菌呈正反應之抗體 (data not shown)；此現象暗示發展念珠狀鍊桿菌血清診斷法時，必須特別注意抗原抗體間交叉反應之困擾，值得進一步研究尋求解決方法。

結論與建議

由鼠類媒介的人畜共通傳染病計有：鼠疫、流行性出血熱、鉤端螺旋體病、恙蟲病、回歸熱、地方性斑疹傷寒、野兔病、鼠咬熱、沙門氏菌病、萊姆病等。。台灣氣候高溫多雨，十分適合鼠媒的繁殖，加上位居西太平洋海、空運與貿易之樞紐，有些適應力強的鼠類，拜全球化的趨勢與交通運輸之便，極有可能由世界各地攜帶病原遷徙至本地。念珠狀鏈桿菌是否已經逐漸打破過去侷限的區域，傳佈至亞洲各地，進入台灣將為人畜共通傳染病鼠媒監測的重要課題。未來，我們將繼續改進病原檢驗與血清抗體檢測技術，開發快速、敏感度與特異性更高之檢測系統。

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. 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.
3. Boot R, Oosterhuis A, Thuis HC. 2002. PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*. *Lab Anim.* 36:200-8.
4. 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
5. Glaser C, Lewis P, Wong S. 2000. Pet-, animal-, and vector-borne infections. *Pediatr Rev.* 21: 219-232.
6. 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.
7. 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.
8. Hossain H, Wellensiek HJ, Geyer R, Lochnit G. 2001. Structural analysis of glycolipids from *Borrelia burgdorferi*. *Biochimie.* 83:

683-692.

9. 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.
10. Ojukwu IC, Christy C. 2002. Rat-bite fever in children: case report and review. Scand J Infect Dis 34: 477.
11. Rand MS. 2002. ZOONOTIC DISEASES OF LABORATORY RODENTS AND RABBITS (Risk Category 1).
<http://128.196.155.29/uac/Zoonotic%20Diseases%20of%20rodents.doc>
12. 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.
13. Wullenweber M. 1995. *Streptobacillus moniliformis*--a zoonotic pathogen. Taxonomic considerations, host species, diagnosis, therapy, geographical distribution. Lab Anim. 29:1-15.
14. 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.
15. 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.

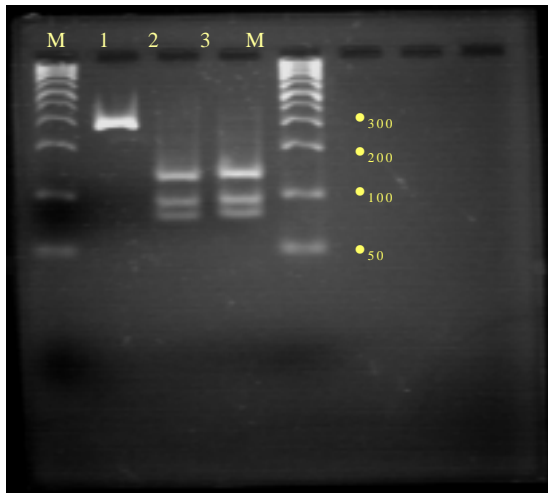


Figure 1 *Streptobacillus moniliformis* PCR product(BR4f/BR5r)
M:50-2500 bp marker;1: PCR product(ea. 300 bp) ;2: PCR product treat with Bfa I (3 fragments);3: PCR product treat with Bfa I, heat inactive (3 fragments), 4% agarose gel, 5V/cm

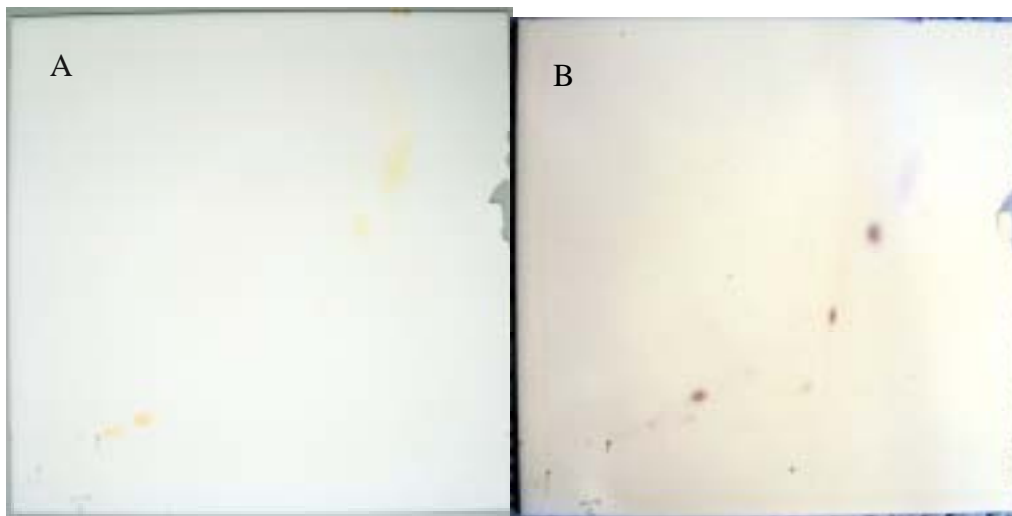


Figure 2 Differential chemical staining of HTPLC-resolved glycolipid of *Streptobacillus moniliformis*. Total lipids using chloroform/methanol/water(65:15:2) as first running solvent, and chloroform/methanol/acetone/acetic acid/water(65:10:20:10:3) as second running solvent. The following reagents were used for detection: (A) iodine vapour(lipids); (B) orcinol/H₂SO₄(carbohydrates)

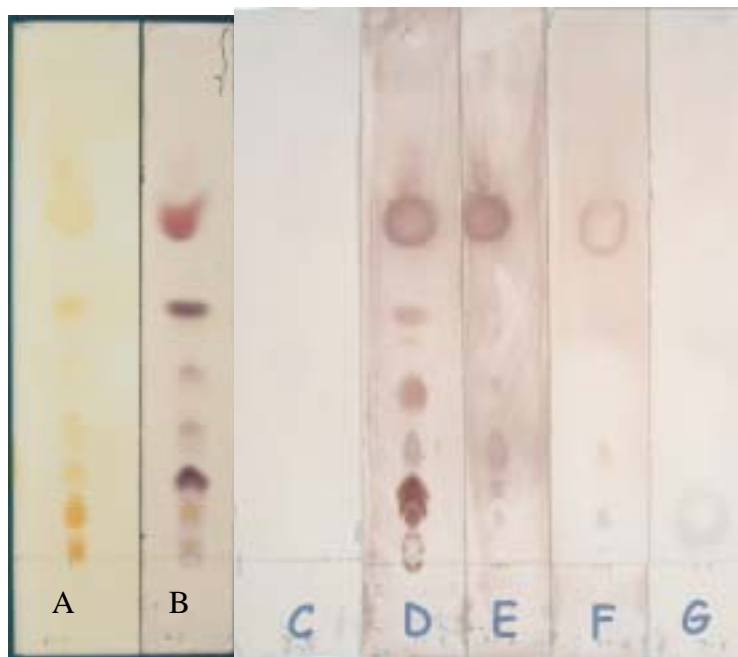


Figure 3 Differential chemical staining of HTPLC-resolved glycolipid of *Streptococcus moniliformis*. Total lipids using chloroform/methanol/acetone/acetic acid/water(65:10:20:10:3) as running solvent. The following reagents were used for detection: A, iodine vapour(lipids), 9 bands; B, orcinol/H₂SO₄(carbohydrates), 6 bands revealed glycolipids; C to G, immunostain(C, rabbit sera before immune, no reactive band; D, rabbit polyclonal anti-sera, 8 reactive bands; E, rabbit sera with partial hemolysis, 6 reactive bands; F, human sera with Lyme disease, 3 reactive bands; G, normal human sera, no reactive band).

附錄

念珠狀鏈桿菌菌種鑑定核酸引子對(BR4/BR5)PCR 反應條件:94
°C 反應 5 分鐘，再以 94°C 30 秒、62.5°C 1.5 分鐘、68°C 2 分鐘，
進行 30 個循環，於 72°C 反應 10 分鐘，最後降溫至 4°C。