計畫編號：DOH96-DC-2029

行政院衛生署疾病管制局 96 年度科技研究發展計畫

建構南台灣 *C. burnetii* 菌(Q fever)檢驗參考實驗室

研 究 報 告

執行機構：疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：林立人

協同主持人： 施文儀 舒佩芸 嵇達德

研究人員：林建州 林栢杉 侯閔議

執行期間：2007 年 1 月 1 日至 2007 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	(7)
材料與方法	(11)
結果	(16)
討論	(18)
圖表	(21)
參考文獻	(25)

共 (26 頁)

中文摘要

本計畫目的對人畜共通潛在新興傳染病及可應用在生物戰劑上--Q fever (*C. burnetii*)，在南台灣建立快速檢驗和培養細胞實驗室，以實驗診斷和分子流行病學調查，預防疾病之爆發保障人民健康安全。

2007 年本實驗室發展出新的 PCR 檢測方法，稱為 single tube nested Real Time PCR（STN-RT PCR）其目標基因為 *IS1111*，我們利用 2006 年 84 個確定為 Q 熱病患的 DNA 檢體及 86 個非 Q 熱病患的陰性 DNA 檢體，比較 STN-RT PCR 和原來 Real time PCR 的靈敏度及專一性，結果發現靈敏度由原來的 20.2%增加為 51.2%並且皆具有 100%的專一性。此外我們利用核酸自動萃取機取代以往手工抽取 DNA 的方式並且結合 STN-PCR，應用於 2007 年 Q 熱的例行性檢驗，其靈敏度高達 60.2%。

在血清流行病學方面，本實驗室於台灣好發 Q 熱的南部地區，針對須經常從事於與動物有接觸活動的相關職業人員，包括動物農場工作者、肉品市場及屠宰場工作者、獸醫師、獸醫院工作人員，共分析 235 名個體血清，以間接免疫螢光抗體法（IFA）檢測血清中之 IgG 之 Q 熱抗體，共檢測出 62 位具有 Q 熱抗體，進一步分析問卷資料中之接觸動物及病史，找出“工作上經常接觸羊”（$p<0.001$）是本群體 Q 熱的危險因子。

關鍵詞：Q 熱、間接免疫螢光抗體法

ABSTRACT

Q fever is a ubiquitous zoonosis caused by *Coxiella burnetii* which can occur in large outbreaks of acute infections and is a possible bioterrorism agent. In order to lessen the delay in diagnosing acute Q fever, we have developed single tube nested Real time PCR (STN-RT PCR), a rapid nested PCR assay that uses blood sampled early during the disease as a specimen. We used the repetitive, transposon-like element as the DNA target. We applied this method to the first blood samples taken from 84 patients diagnosed in our laboratory as having acute Q fever on the basis of the clinical manifestations and serology and to 86 controls. We compared STN-RT PCR to Real Time PCR used before. The sensitivity was 51.2％ when used STN-RT but only 20.2％ with prime Real time PCR. The both of methods had a specificity of 100％. In addition we used automatic DNA extraction machine to replace DNA extraction by hand and then combined STN-RT PCR. In 2007 routine diagnosis, a total of 93 confirmed Q fever patients were tested by this new protocol and the detection sensitivity was 60.2％.

In Taiwan, studies about seroprevalence of *C. burnetii* in certain groups at risk for Q fever infection were lacking. As a result, we undertake this study to investigate the seroprevalence and the risk factors for *C. burnetii* infection among these specific populations in southern Taiwan where Q fever is endemic. Univariate analysis revealed that male

gender (p=0.001) and frequent goat contact (p<0.001) were the risk factors for seropositivity of *C. burnetii* among these specific populations in southern Taiwan; and the later factor remained highly significant under multivariate logistic regression analysis (p<0.001).

Key words：*Coxiella burnetii*、single tube nested Real time PCR、*IS1111*

前言

Q fever(*Coxiella burnetii*)是人畜共通傳染病(zoonosis)是細胞內寄生之病原菌，其癒後不佳。有發生不明熱、肝炎、如血液培養是陰性但為心內膜炎(endocarditis)、 非典型性肺炎(atypical pneumonia)及伴有高燒和類流感等症狀。蟎(ticks)是野生動物至宿主間的傳播媒介，人類感染Q 熱主要是因為吸入被病原體污染的塵土，或因為飲用病畜的乳汁、污染的水及食入被污染的食物，或因為破損的皮膚、粘膜接觸污染物而造成。此病原存於動物的尿液、糞便、乳汁，特別是有蹄類家畜的胎衣及羊水。*C. burnetii* 的型態呈多形性，可為球桿狀、桿狀、球狀等，大小約為寬0.2 至0.4 微米、長0.4 至1.0 微米，細菌染色呈革蘭氏染色陰性，且吉耶姆薩氏染色呈藍色。*C. burnetii* 具內孢子樣之結構，對外界抵抗力強，能耐熱及乾燥，對一般消毒劑也有抗性。*C. burnetii* 的抗原有相的變異，在人、動物及壁蝨體內新分離的貝氏考克斯菌具有I 相抗原，毒力較強。經雞胚卵黃囊連續繼代培養後，抗原會變異為II 相抗原，毒力也會減弱(Fournier, Marrie et al. 1998)。

Q fever 疫情在很多國家是不須通報，所以國際間並不很了解其

其發生率（incidence），因為他們也少作疫情監測，在地中海國家中如法國、義大利、以色列和英國或東歐等國家研究報告，其畜牧業者接觸牛、綿羊、山羊等，如特定農夫、獸醫師、屠宰場或實驗室工作人員和現有飼主寵物猫、狗等密切接觸均會有感染之危險，已造成許多公共衛生上之問題(Maurin and Raoult 1999)。國外對 Q fever 同一地區發生率也有不同報告，均不能很準確的反應發生率，因 Q fever 並未有明確和標準症狀。在歐洲好發生於春季和初夏，當時人們喜好戶外運動，也因畜牧農場羔羊出生（含大量病菌羊水）暴露感染，但一般羔羊在十月是出生期高峰，但反而不是最高發生率(Parisi, Fraccalvieri et al. 2006)。台灣自 1993 年第一個 Q 熱病例報告發表(Wang, Wang et al. 1993)，之後本土 Q 熱相關文獻發表很少，其中又以病例描述居多(Wang, Wang et al. 1993; Ko, Liu et al. 1997; Lee, Ko et al. 2002; Chang, Yan et al. 2004; Chang, Ko et al. 2005)，僅有一篇是以血清學方法檢測南灣 Q 熱盛行率的調查研究，該調查顯示不論是 357 個位於鄉下的一般就醫病患血清，以及 259 個至城市醫院作一般健康檢查之個體血清，其血清陽性率皆約等於 4.2%(Ko, Liang et al. 2000)。而至目前為止，台灣尚無針對特定危險職業族群作血清學調查研究。

Q fever 病菌在生物恐佈攻擊中亦是可能被選擇生物戰劑之

一，有研究指出在空氣動力學中若有 100 病原菌/每立方公尺，若暴露 30-60 分鐘即有可能吸入肺中而感染。另有研究指出，在強風中 C. burnetii 病原菌可由定點源擴散到 11 英哩(18.3 公里)外(Ongradi 2002)。

目前 Q 熱的疫情通報檢體皆送疾病管制局檢驗，依據疾病管制局的統計資料，近三年(2004、2005、2006 年)的通報病例數分別約 1349、1590、1596 例，而其確定病例數分別 98、117、159 例，主要集中在高雄縣市、屏東縣、台南縣等南部縣市，另中部彰化縣也有不算少之確定病例。其中特別在高雄縣，2006 年的確定病例由之前二年分別為 24、25 例，急速增加至 55 例，佔全國確定病例之 71%(30/42)，這其中的因素很有趣值得探討。

這些確定病例分布密集的縣市剛好也都是台灣畜牧業較發達的縣市或鄰近高雄市；為了了解鄰近這些動物畜牧場是否為感染 Q 熱的重要危險因子，我們在 2007 年 Q 熱的研究計劃中，針對高高屏地區的特定職業族群如獸醫、畜牧業、屠宰業等工作人員共 235 人和相關動物如牛、羊等作局部的血清流行病學調查。

因應南台灣 Q 熱通報疫情及可能高盛行率畜牧業縣市，防範人畜傳染及潛在恐佈攻擊事件發生，在南台灣南區實驗室建立 Q 熱病

原體檢驗核心實驗室並為南台灣熱帶醫學扎根。目前，2007 年已建立 Q 熱最適化的檢驗程序，提高檢驗效率和精確度，在 2008 年擬建立細胞培養及分子分型等方法。另一方面，長期培養 Q 熱相關檢驗及研究人員，為南台灣疫病防疫和熱帶醫學大環境的耕耘及努力。

材料與方法

一、通報病例檢體

A、血清來源

國內（除花東外）相關 Q fever 病原菌之檢驗由本實驗室承辦。並由本局發函,請各縣市通報Q fever 檢體送本參考實驗室負責檢驗。

B、檢體採集

1、病原體檢測：用含Heparin（10μ/mL）或EDTA 的採血器採取病人14 病日內之的急性期血液5 mL，於當日以冷藏（2～8℃）方式送至疾病管制局研究檢驗中心，以聚合酶連鎖反應（PCR）作病原體檢測。

2、抗體測定：採取病人的急性期及恢復期血清各2～3 mL，置於4 mL 的螺旋蓋血清瓶中，於當日內以冷藏（2～8℃）方式送至疾病管制局研究檢驗中心， 以間接螢光抗體法（ Indirect Immunofluorescene Assay，IFA）測其IgM 及IgG 抗體，檢驗結果之IgM≧1：80 或IgG 有4 倍以上上升者判定為陽性。

C、採血方法(用於抗體的檢驗)

1、第1 次採血（A 血清）日為發病日後<7 天內，第2 次採

血（B 血清）日訂為發病日14 天後。

2、若第1 次採血（A 血清）日為發病日後>7 天後，第2 次採血（B 血清）日與第一次採血日隔7 天。

D、檢驗方法：IFA血清檢驗 和PCR檢驗

E、檢驗報告：檢驗結果輸入「傳染病通報系統」

F、病原分離：全血應保存於 4℃冰箱內。檢體應分成二份，一份檢驗，另份留存以備必要時覆檢。其血清檢體量至少 1 ml，應保存於-80℃冰箱。菌株應保存於-80℃冰箱內

G、品質管制：定期進行細胞Mycoplasma之檢測及敏感度試驗。菌株分離用細胞株來源、繼代細胞和黴漿菌測試等之紀錄需長期保存。菌株分離及鑑定之觀察紀錄至少保存二年。

二、特定族群檢體採集

A、血清來源：我們透過高雄縣、高雄市、屏東縣這三縣市之動物防疫機關協助，取得該縣市轄內大部分公務獸醫師、執業獸醫師、動物飼養業者、屠宰業者之資料；並藉由這些從業人員參加該縣市動物防疫機關之講習會議或教育訓練之機會，徵得同意後進行血液採樣。或經調查其意願，直接至所在之工作場所採血；於 2007 年 3 月至 2007 年 6 月間，共計採集 235 名經常與動物接觸相關職業之工作人員，每一接受採血之

個體並有問卷之調查，內容包括個人基本資料、職業、過往病史、動物接觸史及接觸動物種類等。

B、IFA檢測Q熱血清抗體：採得之血清以IFA方法檢測Q熱血清IgG抗體，本研究使用之試劑套組為Q Fever IgG Kit(Focus Diagnostics, U.S.A)，檢測方法如Kit使用說明；簡單來說，將受測血清自 16 倍起，等倍序列稀釋後分別加至已Coating C. burnetii PhaseI及PhaseII 抗原之玻片，經 30 分鐘培養後，再加入有螢光標幟之anti-human IgG抗體，再經 30 分鐘培養後，移至螢光顯微鏡觀察是否有螢光反應。

判定標準：PhaseI IgG抗體力價≧16 且PhaseII IgG抗體力價≧16，或者PhaseII IgG抗體力價≧256 以上判定為血清Q熱抗體陽性。

資料分析：搜集到的問卷資料以SPSS 13.0 軟體執行分析，先以single variable logistic regression 分析，P＜0.2 之變數再以multivariable variable logistic regression 分析

三、檢驗流程

1、血清抗體間接免疫螢光法步驟（indirect immunofluorescence antibody；IFA ）

(1)、將抗原玻片取出， 風乾

(2)、將患者血清以 3%NYS (3%(w/v)normal hen’s egg yolk sac

in PBS)做等倍稀釋

(3)、將稀釋血清滴至抗原玻片上

(4)、置 37°C 潮濕水箱中作用 30 分鐘

(5)、PBS(phosphate buffer solution)沖洗玻片後， 將玻片浸於 PBS 中， 5 分鐘後再換一次 PBS， 並浸泡 5 分鐘。

(6)、以蒸餾水沖洗玻片，風乾

(7)、加 FITC(Fluorescein isothiocyanate)-goat anti-human antibody (IgG、IgM、或 IgA+G+M)置 37°C 潮濕水箱中作用 30 分鐘

(8)、以 PBS 沖洗玻片後，將玻片浸於 PBS 中 5 分鐘後再換一次 PBS， 並浸泡 5 分鐘。

(9)、以蒸餾水沖洗玻片風乾

(10)、加 pH 8.0 之 0.01M PBS:甘油=1:1 之緩衝液及蓋玻片

(11)、以螢光顯微鏡 400 倍鏡檢

2、聚合脢鏈鎖反應步驟

<u>IS1111 primer set</u>:

QF9 （5’- TAT gTA TCC ACC gTA gCC AgTC-3’）

QF10 （5’-CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC-3’）

QF11(5’-gAg CgA ACC ATT ggT ATC g-3’)

QF12(5’-CTT TAA CAg CgC TTg AAC gT-3’)

3、細胞分離(Gouriet, Fenollar et al. 2005)

(1)、將急性期（1~7 病日）含 heparin(10U/mL) 或 EDTA 之血液，以 Ficoll-Paque 分離白血球

(2)、接種入 Human embryonic lung(HEL)細胞株(100μL/25T 細胞培養瓶)

(3)、加入小量 10% 小牛蛋白血清（fetal calf serum）和 1% glutamine

(4)、取 1ml 含 50，000 細胞 HEL 放在 Shell vials 中放置 CO2 培養箱 3 天。

(5)、每隔 3~ 4 天更換培養基， 並觀察是否有細胞病變發生，並以間接免疫螢光法偵測是否有 C. burnetii 生長

(6)、所有過程應於無菌無塵操作台內操作， 慎防感染自己及他人 ，培養基中不可添加四環黴素及氯黴素等抗生素

結果

一、Single Tube Nested Real Time PCR 及其目標基因

Single tube nested Real Time PCR（STN-RT PCR）其目標基因為 *IS1111*，而之前 Real time PCR 的目標基因為 *QpRS*/*QpH1* 及 *Com1*(表一)，我們利用 2006 年 84 個確定為 Q 熱病患的 DNA 檢體及 86 個非 Q 熱病患的陰性 DNA 檢體，比較 STN-RT PCR 和原來 Real time PCR 的靈敏度及專一性，結果發現靈敏度由原來的 20.2%增加為 51.2%並且皆具有 100%的專一性(表二)。

二、建立最適化病源體檢驗程序

在 2007 年我們利用核酸自動萃取機，萃取 DNA 並結合 STN-RT PCR 檢測 Q 熱病原體，在 93 個確定為 Q 熱病患的 DNA 檢體中檢測出 56 個 PCR 陽性，其靈敏度為 60.2%(56/93)，進一步分析，當血清中無 Q 熱抗體時，靈敏度高達 69.6%（46/66），但是當血清中存在 Q 熱抗體時靈敏度為 37.0%（10/27）（表三）

三、結合血清抗體及病原體檢測

分析 2007 年 93 個確定為 Q 熱病患的檢驗結果，當 STN-RT PCR 或 IgM 抗體為陽性，其靈敏度為 77.4%(表四)

四、南台灣特定族群Q熱抗體分析

在所採集的235個血清檢體中，162個(68.9%)來自男性，年齡分佈19-78歲(平均42.8歲)；其職業分布為，38人為農場主，40人為屠宰場工人，152人為獸醫師及助理，5人為捕犬人員。其中62個(26.4%)檢體為Q熱抗體陽性（PhaseI及PhaseII IgG抗體力價均≧16或者PhaseII IgG抗體力價≧256)。單變項分析顯示，“性別”(p=0.001)及“工作上經常接觸羊”（p<0.001）是本群體Q熱的危險因子；然而經常接觸“貓”，“狗”的人，相對於這些必須經常接觸動物的族群中較不容易感染Q熱(表五)。進一步以多變項分析“性別”，“接觸羊”，“接觸狗”及“接觸貓”；其中“接觸羊”具有顯著意義（表六)。

五、動物Q熱抗體分析

利用IFA分析2007年高高屏地區動物的Q熱抗體，其抗體陽性率分別為牛（19.9%)、羊（44.0%)、豬（0.0%)、流浪犬（0.5%)、家犬（0%）及老鼠（0%)（圖二)。

討論

在 PCR 檢測抗原方面，本研究採用新的檢驗方法為 single tube nested real time PCR (STN-RT PCR)，以同時使用不同濃度的兩對引子（Primer）加在同一個 PCR 反應管中，利用溫度的調控，使其中一對引子先選擇複製大片段的目標基因 *IS1111*，之後另一對引子針對較小片段的目標基因作大量複製，之前已經有類似的方法，成功的增加檢測感染性疾病的靈敏度(Fournier and Raoult 2003; Parisi, Fraccalvieri et al. 2006)；由於此方法是將兩對不同的引子加在同一個 PCR 反應管中，可以避免傳統 nested PCR 在操作時易造成污染的問題，卻又具有 nested PCR 的高專一性及靈敏度，此外利用 Real time PCR 方式可以直接判定檢驗結果以縮短檢驗時間。本實驗所使用的目標基因在不同種的 *C. burnetii* 中具有 7 至 110 個重複片段(Klee, Tyczka et al. 2006)，並且已經證實在實驗室 Q 熱的診斷上具有高專一性及靈敏度。在本實驗室也發現以 IS1111 為目標基因的 SNT-RT PCR 其靈敏度 51.2％優於目標基因為 QpRS/QpH1 及 Com1 的 Real Time PCR(20.2％)(表二)。

在 Q 熱病原體檢驗流程方面，我們利用核酸自動萃取機萃

取血液中的 DNA 取代傳統手工抽取 DNA，可節省人工操作的時間。以同時操作 20 個血液檢體為例，依照原來的流程需花費約 5 個小時的人工操作時間，但是若改以儀器操作僅需人工操作半小時（圖一）大幅縮短人工操作時間。我們觀察 2007 年中 93 個 Q 熱病患的 PCR 結果，在沒有 Q 熱抗體的存在下，PCR 靈敏度為靈敏度高達 69.6%（46/66），但是當血清中存在 Q 熱抗體時靈敏度為 37.0%（10/27）（表三）。 先前研究指出急性 Q 熱病患在發病日後兩週及三週之間會產生 phase II 抗體(Dupont, Thirion et al. 1994)，這個現象由在本實驗室再次獲得驗證，在感染 Q 熱的 12 天內，血清學缺少偵測的靈敏度（表三）。根據發病天數來比較 STN-RT PCR 及血清學的靈敏度可以發現，STN-RT PCR 在發病後的 12 天內能夠有效的診斷出疾病，而之後血清學則可有效的診斷疾病。本實驗室結合 PCR 及 IFA 的結果其檢測為 Q 熱的靈敏度為 77.4%(表四)。

因為 *C. burnetii* 可能引起嚴重的感染(Fournier, Etienne et al. 2001; Bernit, Pouget et al. 2002)並且被認為是潛在生物恐怖攻擊病菌，因此需要一個快速且靈敏的診斷工具來診斷 Q 熱。本實驗室利用 SNT-RT PCR 結合目標基因 *IS1111*，快速並且靈敏的偵測 *C. burnetii*，可提前診斷出急性 Q 熱

。我們認為 SNT-RT PCR 應該可以應用於檢測疑似 Q 熱的病患，特別是恐怖攻擊所導致的疫情暴發。

針對南台灣(高雄縣市及屏東縣)特定職業族群共採集 235 個血清檢體，其中 62 個(26.4%)為 Q 熱抗體陽性；而先前的研究顯示南台灣一般民眾之陽性率為 4.2%(Ko, Liang et al. 2000)，所以我們推論南台灣 Q 熱高危險職業族群比一般民眾有明顯較高的 Q 熱血清陽性率，代表工作上必須與動物接觸該職業族群比一般民眾更容易感染 Q 熱。而在危險因子的分析中，“經常接觸羊”是本群體感染 Q 熱之危險因子(表五)。在 62 個 Q 熱陽性抗體中，有 8 個 Q 熱抗體力價 phaseI>1：800(表七)為疑似慢性 Q 熱感染的個案，這些個案在將來都有可能演變成致死率高達 27%的心內膜炎(Brouqui, Dupont et al. 1993)，因此十分值得相關單位重視此問題。此外針對南台灣動物的血清學調查，我們發現羊的 Q 熱抗體陽性率最高，其次是牛；故在南台灣，養羊場可能 Q 熱重要的感染源之一。

表一. 新舊 PCR 引子序列

目標基因	引子代號	序列
Com1	pQF3	5'ATTgCTATCACTgAgggTgACg3'
	pQF4	5'CTgACgAAgAAgCAgCATTAgC3'
QpRS/QpH1	pQF1	5'TCCTAAACAAgTgATggTCTCC3'
	pQF2	5'TTCgCAgAAAgTCAgCTATCg3'
IS1111	pQF9	5'TATgTATCCACCgTAgCCAgTC3'
	pQF10	5'CCCAACAACACCTCCTTATTC3'
	pQF11	5'gAgCgAACCATTggTATCg3'
	pQF12	5'CTTTAACAgCgCTTgAACgT3'

表二. 比較新舊 PCR 方法專一性及靈敏度

結果	Single-Tube Nested Real Time PCR _*IS1111*	Real Time PCR *QpRS/QpH1;Com1*
靈敏度	51.2%	20.2%
專一度	100.0%	100.0%
陽性預測值	100.0%	100.0%
陰性預測值	67.1%	56.2%

表三. 抗體存在與否對於 PCR 結果的影響

IgM 抗體 陰性(66)		IgM 抗體 陽性(27)	
PCR陽性	PCR 陰性	PCR陽性	PCR陰性
46	20	10	17

表四. 根據發病天數長短對於偵測.IgM抗體及STN-RT PCR靈敏度的影響

Result	% Sensitivity[a] for time interval (day) of :						
	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21
Titer of IgM, >=1:80	18(2/11)	12(4/34)	23(5/22)	42(5/12)	75(6/8)	80(4/5)	100(1/1)
Psoitive STN-RT PCR	45(5/11)	74(25/34)	77(17/22)	50(6/12)	25(2/8)	20(1/5)	0(0/1)
Either STN-RT PCR or serology were positive	54(6/11)	80(27/34)	82(18/22)	75(9/12)	87(7/8)	100(5/5)	100(0/1)

[a]括號內代表:陽性檢體數目/測試檢體總數

表五. 單變項分析Q熱的危險因子

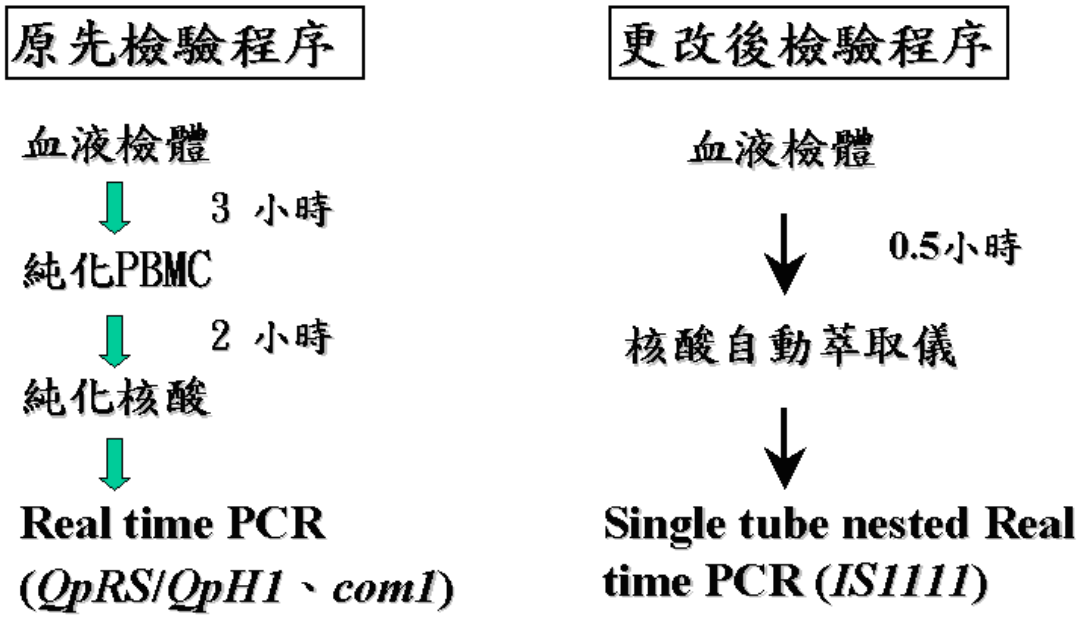
Risk Factor	Seropositivity		Odd Ratio(OR) (2006% CI)	P value
	Expo.	Unexpo		
Gender	32.7% (53/162)	12.3% (9/73)	3.458(1.599-7.476)	0.001
Cow contact	29.4% (15/51)	25.5% (47/184)	1.215(0.611-2.415)	0.579
Goat contact	42.5% (45/106)	13.2% (17/129)	4.860(2.565-9.210)	0.000
Dog contact	14.2% (19/134)	42.6% (43/101)	0.223(0.119-0.417)	0.000
Cat contact	10.5% (10/2006)	37.1% (52/140)	0.199(0.02006-0.417)	0.000
Pig contact	27.9% (34/122)	24.8% (28/113)	1.173(0.655-2.100)	0.591

表六. 多變項邏輯回歸分析Q熱的危險因子

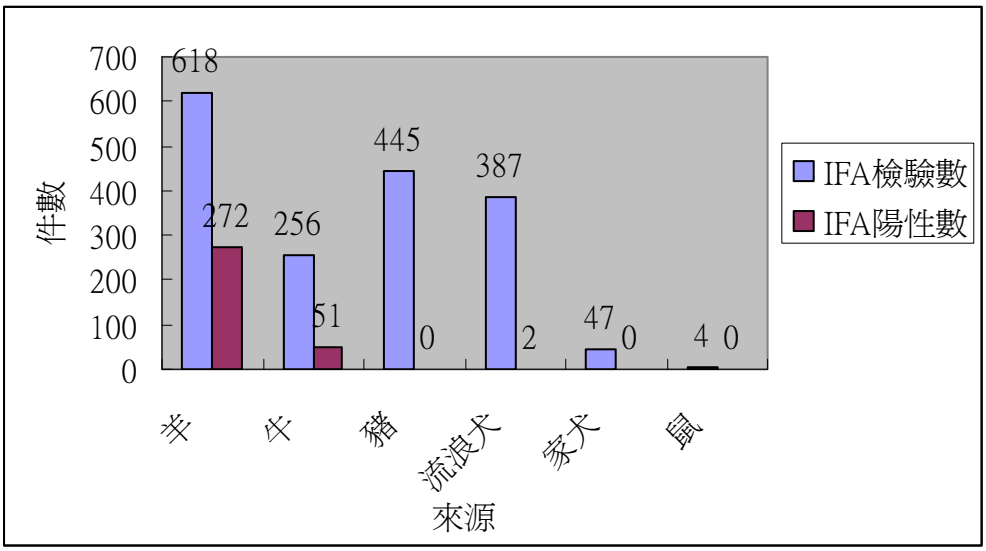
Risk Factor	Odd Ratio(OR) (2006% CI)	P value
Gender	2.354(1.011-5.476)	0.047
Goat contact	3.541(1.805-6.946)	0.000
Dog contact	0.404(0.173-0.946)	0.037
Cat contact	0.610(0.222-1.678)	0.338

表七. 疑似慢性 Q 熱抗體分布情形

個案	phaseI 抗體力價	phaseII 抗體力價
1	4096	4096
2	2048	1024
3	2048	1024
4	4096	4096
5	1024	1024
6	2048	2048
7	1024	2048
8	16384	8192



圖一. 病原體檢測流程圖。原先檢驗程序是先抽取血液檢體的周邊血液單核細胞(PBMC)之後萃取 PBMC 的 DNA，最後進行 Real time PCR；更改後的檢驗程序為直接抽取血液中的 DNA，最後進行 single tube nested Real Time PCR。



圖二. 高高屏地區動物 Q 熱檢驗數及抗體陽性數。其抗體陽性率分別為牛（19.9%）、羊（44.0%）、豬（0.0%）、流浪犬（0.5%）、家犬（0%）及老鼠（0%）

參考文獻

Bernit, E., J. Pouget, et al. (2002). "Neurological involvement in acute Q fever: a report of 29 cases and review of the literature." Arch Intern Med **162**(6): 693-700.

Brouqui, P., H. T. Dupont, et al. (1993). "Chronic Q fever. Ninety-two cases from France, including 27 cases without endocarditis." Arch Intern Med **153**(5): 642-8.

Chang, K., W. C. Ko, et al. (2005). "Diffuse abdominal uptake mimicking peritonitis in gallium inflammatory scan: an unusual feature of acute Q fever." Kaohsiung J Med Sci **21**(11): 522-6.

Chang, K., J. J. Yan, et al. (2004). "Acute hepatitis with or without jaundice: a predominant presentation of acute Q fever in southern Taiwan." J Microbiol Immunol Infect **37**(2): 103-8.

Dupont, H. T., X. Thirion, et al. (1994). "Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence." Clin Diagn Lab Immunol **1**(2): 189-2007.

Fournier, P. E., J. Etienne, et al. (2001). "Myocarditis, a rare but severe manifestation of Q fever: report of 8 cases and review of the literature." Clin Infect Dis **32**(10): 1440-7.

Fournier, P. E., T. J. Marrie, et al. (1998). "Diagnosis of Q fever." J Clin Microbiol **36**(7): 1823-34.

Fournier, P. E. and D. Raoult (2003). "Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever." J Clin Microbiol **41**(11): 5094-8.

Gouriet, F., F. Fenollar, et al. (2005). "Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience." J Clin Microbiol **43**(10): 4993-5002.

Klee, S. R., J. Tyczka, et al. (2006). "Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of Coxiella burnetii." BMC Microbiol **6**: 2.

Ko, W. C., C. C. Liang, et al. (2000). "Seroprevalence of Coxiella burnetii infection in southern Taiwan." J Formos Med Assoc **99**(1): 33-8.

Ko, W. C., J. W. Liu, et al. (1997). "Acute Q fever as a cause of acute febrile illness of unknown origin in Taiwan: report of seven cases." J Formos Med Assoc **2007**(4): 22006-7.

Lee, H. C., W. C. Ko, et al. (2002). "Clinical manifestations and complications of rickettsiosis in southern Taiwan." J Formos Med Assoc **101**(6): 385-92.

Maurin, M. and D. Raoult (1999). "Q fever." Clin Microbiol Rev **12**(4): 518-53.

Ongradi, J. (2002). "[Microbial warfare and bioterrorism]." Orv Hetil **143**(33): 1935-9.

Parisi, A., R. Fraccalvieri, et al. (2006). "Diagnosis of Coxiella burnetii-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR." Vet Microbiol **118**(1-2): 101-6.

Wang, J. H., Y. H. Wang, et al. (1993). "Acute Q fever: first case report in Taiwan." J Formos Med Assoc **92**(10): 917-9.