

計畫編號：DOH91-DC-1068

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

台灣地區鉤端螺旋體病之檢驗監測計畫及貓抓病標準實驗室之建立

研究報告

執行機構：國立台灣大學獸醫學系

計畫主持人：潘銘正

研究人員：徐婉毓，李秋靜

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，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目錄

目次

中文摘要	4
英文摘要	5
前言	6
材料與方法	10
結果	16
討論	19
結論與建議	20
參考文獻	22
附圖	29

圖次

圖 1 鈎端螺旋體病血清抗體檢驗結果	29
圖 2 鈎端螺旋體病病例抗體檢驗結果	29
圖 3 鈎端螺旋體病陽性病患性別分布	30
圖 4 鈎端螺旋體病病患年齡分布	30
圖 5 鈎端螺旋體病病患居住地分布	31
圖 6 鈎端螺旋體病病患症狀統計	31
圖 7 鈎端螺旋體病陽性血清型分布	32
圖 8 鈎端螺旋體病陽性抗體力價分布	33
圖 9 貓抓病抗體檢驗結果	33
圖 10 貓抓病陽性病患性別分布	33
圖 11 貓抓病陽性病患年齡分布	34
圖 12 貓抓病陽性病患居住地分布	34
圖 13 貓抓病陽性抗體力價分布	34

一、中文摘要：

本實驗室自 2002 年 1 月起至 2002 年 10 月止,收到各醫院送檢共 747 個疑似鉤端螺旋體病病例,共檢驗 937 個血清、323 個尿液和 6 個腦脊髓液檢體。其中 25 個 (3.3%) 血清抗體為陽性 (顯微凝集試驗抗體力價大於等於 400 倍), 男性 22 人、女性 3 人, 62 個血清為疑陽性 (抗體力價 100 倍及 200 倍), 男性 48 人、女性 14 人, 及 660 個血清為陰性。腦脊髓液抗體檢查及尿液 PCR 檢測均為陰性。感染的血清型以 *shermani* 最多 (67 個檢體), 依次為 *bratislava* 血清型 (30 個檢體), *australis* 血清型 (14 個檢體), *tarassovi* 血清型 (12 個檢體), *autumnalis* 血清型 (7 個檢體), *bataviae* 血清型 (6 個檢體), *canicola* 血清型 (6 個檢體), *poi* 血清型 (5 個檢體), *copenhageni* 血清型 (3 個檢體), *icterohaemorrhagiae* 血清型 (2 個檢體), *javanica* 血清型 (1 個檢體), *manilae* 血清型 (1 個檢體), *hebdomedis* 血清型 (1 個檢體)。陽性血清之幾何平均抗體力價為 264 倍。患者症狀以發燒居多, 次為黃疸、急性腎功能不全、血小板減少、意識不清、頭痛、呼吸障礙、肝脾腫大、出血傾向、腹痛、肌肉痛, 不過有 24 名疑陽性患者和 11 名陽性患者症狀不明。貓抓病部分共收到各醫院送檢 62 件疑似病例檢體, 包含 10 件全血檢體及 52 件血清檢體, 全血檢體進行間接螢光抗體測定 (IFA) 及病原核酸聚合酶鏈反應 (PCR) 增幅偵測, 而血清檢體僅做抗體測定。其中有 30 件 (48.4%) 抗體測定為陽性 (抗體力價大於等於 64 倍), 幾何平均抗體力價為 283 倍。病原核酸 PCR 偵測 1 件 (10%) 為陽性。抗體陽性病患中男性 15 名。女性 14 名。病患症狀以局部淋巴結腫痛為最多 (48.3%), 其次為發燒 (31.0%)、白血球增多 (3.44%) 及倦怠 (3.44%), 14 名陽性病患症狀不明。

中文關鍵詞：鉤端螺旋體病、顯微凝集試驗、貓抓病、間接螢光抗體測定

二、英文摘要：

A total of 937 sera, 323 urine, and 6 cerebrospinal fluid (CSF) specimens collected from 747 leptospirosis-suspected patients were examined during January to October, 2002. Among the 747 patients, 25 (3.3%) were antibody positive (titer \geq 1:400), 62 (8.3%) were probable positive (titer = 1:100 or 1:200) by Microscopic agglutination test (MAT). Six hundred and sixty sera and 6 CSF specimens were negative (titer $<$ 1:100). All urine samples were negative for leptospiral DNA by polymerase chain reaction (PCR). Antibody reacted to the dominant serovars were as follow: *shermani* (67 sera), *bratislava* (30 sera), *australis* (14 sera), *tarassovi* (12 sera), *autumnalis* (7 sera), *bataviae* (6 sera), *canicola* (6 sera), *poi* (5 sera), *copenhageni* (3 sera), *icterohaemorrhagiae* (2 sera), *javanica* (1), *manilae* (1), *hebdomedis* (1). The geometric mean MAT titer was 1: 264. The most common clinical feature is fever, followed by jaundice, acute renal insufficiency, thrombocytopenia, coma, headache, respiratory distress, hepatomegaly, splenomegaly, hemorrhage tendency, abdominal pain, and muscle pain. As for Cat scratch disease, a total of 10 anti-coagulated blood and 52 sera specimens were examined for *Bartonella henselae* antigen (by PCR) and antibody detection (by indirect fluorescence antibody assay, IFA). One of 10 (10%) blood was positive in nucleic acid amplification. Thirty of 62 (48.4%) showed antibody positive (titer \geq 1:64). The geometric mean IFA titer was 1: 283. The most common symptom is lymphadenopathy (48.3%), followed by fever (31.0%), leukocytosis (3.44%), and malaise (3.44%).

Keywords: Leptospirosis, Microscopic agglutination test, Cat scratch disease, *Bartonella henselae*, Indirect fluorescence antibody assay

三、前言：

鉤端螺旋體症是一種世界性分佈的重要人畜共同傳染病。根據報告，本病之死亡率約為 5%。但若老年人感染此症且合併有肝、腎病變者，其死亡率可高達 20%⁽¹⁷⁾。台灣自 1976 年報告第一位病例以來⁽²⁴⁾，直至 1996 年才有第二位的病例報告，顯見本病長期以來未被重視^(45,48)。依據前人的調查結果^(14,16,39,40)顯示，接觸動物組織，尿液，住家有鼠類出沒，使用雨水，從事水上活動，皮膚有傷口，接觸泥沼地，在農田、礦區、衛生下水道工作等都為感染鉤端螺旋體症的危險因子。因此，與農業相關之行業(如在水田工作農夫、甘蔗工人)、衛生相關行業(如汙水處理工人及經常與動物接觸的牧場工人、獸醫師、屠宰作業人員、肉品販售員)、獵人、軍人，礦工等均為鉤端螺旋體症的高職業危險群^(4,15,35,40)。對屠宰場衛生檢查獸醫師、養豬場相關從業人員及非開業獸醫師所做之鉤端螺旋體抗體檢查結果，發現其陽性率分別為 52.4%、64.4% 及 70.3%⁽¹⁾。

感染鉤端螺旋體的臨床症狀從不顯性到致死性肝腎衰竭均有可能發生^(16,36,45,48)，從臨床症狀變化大概可分以下三種類型：一、發燒或無黃疸型，潛伏期約 7 至 14 天，突然發生發冷、發高燒、結膜充血、嚴重頭痛、肌肉痛。二、肝腎衰竭型，此為前述菌血症未消退而進一步轉化成較嚴重者，常出現黃疸出血、尿毒等症狀。三、腦膜炎型，主

要症狀有發燒、頭痛、懼光、嘔吐等。並無血清型特異性臨床症狀。

由於人鉤端螺旋體病廣泛存在世界各地，尤其是潮濕的地方或家畜大量飼養的農場，而台灣的環境則是一個適合鉤端螺旋體生長的地方。有鑑於近年來國內多起鉤端螺旋體病病例之報導，如果無法及時確診可能造成國人生命威脅。本計畫第二年在已建立鉤端螺旋體病標準診斷實驗室，繼續負責檢驗台灣各大醫院及醫學中心轉送之病患檢體。實驗室診斷主要利用顯微凝集試驗（microscopic agglutination test，簡稱 MAT）來檢驗病患血清抗體，以細菌分離培養、免疫染色及核酸增幅法來偵測病原體或抗原。另外以 3 種市售抗體檢查套組，針對所有陽性反應血清及部份陰性血清進行平行檢驗，以評估確認這類檢驗套組之實用性，並且提供日後自製檢驗試劑之參考。本計畫亦將建立台灣感染血清型分佈、盛行率、患者年齡等流行病學基本資料，做為日後臨床醫師診斷及公共衛生之參考。

貓抓病自 1930 年代即有病例的報告，然而到 1950 年代才由 Debre 等發表第一篇的臨床報告。貓抓病多半是良性的局部淋巴腺炎，因為大多會自行緩解而容易被病人及醫生所忽略，但在免疫功能不全的患者如：愛滋病、器官移植、癌症等患者，卻會引起較嚴重的併發症，甚至死亡。從病名可知，貓抓傷人後，將病傳染給人。貓抓病的臨床

特點是皮膚上有一塊塊的紫斑，淋巴結腫大，但這種細菌卻會在免疫功能不全的患者血流中傳布，至骨骼、肝、脾、腦部等，無論它們寄宿何處，都會產生腫塊，醫師稱之為桿菌性血管瘤（bacillary angiomatosis；BA）⁽¹²⁾。貓抓病的病原長久以來一直有爭議，原來認為是由病毒所引起，之後才又認為是一種革蘭氏陰性桿菌所引起。1992年之後才證實貓抓病的致病因是一種多形性的革蘭氏陰性桿菌 *Bartonella henselae*。在血清學檢測及分子生物學方式偵測巴東氏菌發展之前，貓抓病的診斷是以臨床症狀為主，包括：一、局部性的淋巴腺病變及接觸貓的歷史；二、找不出其他造成淋巴腺病變的可能細菌；三、淋巴結的組織檢驗；四、貓抓病抗原的皮膚試驗陽性。貓抓病抗原的皮膚試驗於 1950 年代被開發出來，然而自病患的淋巴結化膿液抽出物中製備抗原的方式並未標準化。此外，近來來對這種製備過程產生的產品也有安全性的疑慮。自從致病菌分離培養成功後，有越來越多的檢驗技術可用於貓抓病的檢驗；包括自人或貓分離病原菌^(22,36)，間接螢光抗體反應（indirect immunofluorescence assay；IFA）^(3,7,42)，及酵素連結免疫吸附法檢驗（enzyme linked immunosorbent assay；ELISA）^(3,7,42)。在人類的貓抓病病例中，以 IFA 偵測抗巴東氏菌的 IgM 或 IgG 抗體為現今最常用的診斷方法。這個診斷方法由美國疾病管制局發展

出來，於美國及歐洲的貓抓病病例中都有很好的敏感性及特異性^(3,7,42)。也有人使用免疫酵素 (enzyme-immunoassay ; EIA) 的方式檢測各種巴東氏菌屬的抗體，在某些人的研究中指出 IFA 及 EIA 的結果相符^(5,25)，但也有人認為 EIA 的敏感性不如 IFA^(7,42)。IFA 或 ELISA 的抗體檢測方式也可應用於動物。值得注意的是，AIDS 病患在患有桿菌性血管瘤或增生性肝炎時的血清抗體反應是陰性的。

國內已有臨床病例報告⁽²³⁾。本計畫擬建立貓抓病實驗室診斷，針對國內疑似病例提供診斷服務。初步將利用間接螢光法檢查疑似病患之血清抗體。以細菌分離培養、免疫染色及核酸增幅法來偵測病原體或抗原。

四、材料與方法：

- 1、材料：由疾病管制局送驗本實驗室進行疑似鉤端螺旋體症患者之檢驗。祇要發現不明熱、黃膽、腎衰竭等疑似鉤端螺旋體症以及淋巴結腫大發燒等疑似貓抓病病人，則填寫通報表格（含簡易問卷），採取適當檢體，郵寄至實驗室進行血清抗體或偵測抗原等各項檢查。
- 2、顯微凝集試驗（MAT）：選用的抗原為 *bratislava*、*canicola*、*grippotyphosa*、*icterohaemorrhagiae*、*kennewicki*、*balcanica*、*autumnalis* 及 *shermani* 等至少 8 個血清型。

試驗步驟

- (1)陰性對照 取 0.025 mL 陰性血清（以 PBS 稀釋 50 倍）及 0.025 mL 鉤端螺旋體抗原。
- (2)陽性對照 取 0.025 mL 陽性血清（以 PBS 稀釋 50 倍）及 0.025 mL 鉤端螺旋體抗原。
- (3)PBS（phosphate buffered saline）對照 取得 0.025 mL 的 PBS 加上鉤端螺旋體抗原。
- (4)欲測試血清 將 0.025 mL 欲測試血清（以 PBS 稀釋 50 倍）及 0.025 mL 鉤端螺旋體抗原加入培養盤每格中。[將欲測力價之血清以 PBS 稀釋 50 倍。將稀釋好的血清 0.05 mL 加入平板培養盤第一格。加 0.025 mL PBS 至一系列的其餘 7 格中。從第一格開始連續稀釋至第八格（1:

6,400)]

(5)用保鮮膜蓋住培養盤，放入 37 保溫箱中半小時。

(6)置於暗視野顯微鏡下判讀。

力價判讀

結果以暗視野顯微鏡，以 100 倍判讀，在視野下 50%菌體凝集者判定為陽性。

3、螢光抗體試驗 (IFA) : *B. henselae* 以 16S rRNA 基因序列分析結果分為第一型及第二型，其抗體反應相異。故製作間接螢光抗體反應所需之抗原盤時，需分別以 *B. henselae* ATCC 49882 菌株 (第一型) 及美國分離株 U4 (第二型) 做為抗原。

(1)抗原盤製作：

B. henselae ATCC 49882 菌株及 U4 分離株接種於 5% rabbit blood agar plates，於 35、5% CO₂ 下培養 7-14 天，收集培養基上的菌落，懸浮於 PBS 中以 12,000 rpm，10 分鐘離心清洗 2 次，感染 Vero 細胞 24 小時後，懸浮感染的細胞於玻片上，製作 12 格之抗原盤。

(2)試驗步驟：

陽性對照：陽性對照血清 (抗體力價 \geq 128 \times) 以 10% 脫脂乳稀釋 18 倍，取 30 mL 加於抗原盤陽性對照格中。

陰性對照：取陰性對照血清以 10% 脫脂乳稀釋 18 倍，取 30 mL 加於抗原盤中陰性對照格內。

將疑似貓抓病病患血清由 1: 32 濃度開始，以 10% 脫脂乳進行 2 倍連續稀釋至 1: 512。將稀釋後的血清依序加於抗原盤上，37 °C 下作用 40 分鐘。以 PBS 潤洗 5 分鐘後，加入螢光標定之二次抗體 (FITC-Goat IgG anti-human IgG)，於 37 °C 下作用 40 分鐘後，以 PBS 潤洗 5 分鐘，再以二次蒸餾水潤洗 5 分鐘後，以螢光顯微鏡觀察判定力價。

(3) 力價判讀：

結果以螢光顯微鏡，以 100 倍判讀。螢光積分判定由 0 至 3，陽性對照強度判定積分為 2 分，陰性對照強度積分判定為 0 分。以此標準分別判定各稀釋濃度螢光強度之積分，當稀釋倍數 $\geq 64\times$ 螢光強度 $\geq 1-2$ 分時，判定為抗體陽性。

4、鉤端螺旋體病核酸增幅偵測法 (PCR)：

G1/G2 引子組⁽¹⁶⁾：能對所有的病原性鉤端螺旋體增幅出 285-bp 的產物。 G1 : 5'CTGAATCGCTGTATAAACT3' G2 : 5'GGAAAACAAATGGTCGGAAG3'

5、貓抓病核酸增幅偵測法 (PCR) ^(8,13,29) :

(1) 偵測及鑑定巴東氏菌的分子方法主要將針對 citrate synthase (*gltA*) 基因 ^(10,13,19,29,30,34) 來進行。取上述菌落以 TNE 懸浮後抽取 DNA。以下列引子進行 *gltA* 基因增幅 續以 *Taq* I 及 *Hha* I 限制酵素切割進行菌種區分。

BhCS.781p *B. henselae* GGGGaCCaGCTCAtGGtGG

BhCS.1137n *B. henselae* AaTGCAAAAAGaACAGTaAACA

(2) 針對 *htrA* 基因 ⁽¹⁵⁾ 進行。取疑似感染貓抓病病患之全血、與血清分離之紅血球或純培養之菌落，抽取 DNA。以下列引子進行 *htrA* 基因增幅。可增幅出 414 bp 的核酸產物。

CAT: *B. henselae* GATTCAATTGGTTTGAA(G/A)GAGGCT

CAT2: *B. henselae* TCACATCACCAGG(A/G)CGTATTC

(3) 另一常用偵測巴東氏菌的方法為針對 16S rRNA 基因 ^(8,29) 進行。取疑似感染貓抓病病患之全血、與血清分離之紅血球或純培養之菌落，抽取 DNA。以下列引子進行 16S rRNA 基因增幅。可增幅出 512 bp 的核酸產物。

16SF *B. henselae* AGAGTTTGATCCTGG(CT)TCAG

16SR *B. henselae* CTTTACGCCCA(AG)TAA(AT)TCCG

再以下列 2 組引子進行增幅，區別 *B. henselae* 第一型及第二型，可增幅出 185 bp 之核酸產物。

第一型：

16SF *B. henselae* AGAGTTTGATCCTGG(CT)TCAG

BH1 *B. henselae* CCGATAAATCTTTCTCCCTAA

第二型：

16SF *B. henselae* AGAGTTTGATCCTGG(CT)TCAG

BH2 *B. henselae* CCGATAAATCTTTCTCAAAT

6、鉤端螺旋體病病原體培養：

- (1) 分離材料及方法：在培養基內（EMJH 液體培養基(Bacto Leptospira Medium Base EMJH，及 Bacto Leptospira Medium Enrichment EMJH，Difco) 添加 5-fluorouracil（100-300 μ g/mL）或 neomycin sulfate（neomycin，兔血清培養基添加 5-25 μ g/mL；牛血清白蛋白 Tween 培養基則可添加高達 300 μ g/mL）以抑制雜菌生長，將接種後之培養基置於 28-30 之培養箱中。
- (2) 血液（僅限高熱期，感染初期約一星期內及未投藥前）- 加抗凝血劑（使用 heparin，勿用 sodium citrate 做為抗凝血劑）之血液取 0.1-0.2mL 直接接種至 5-10 mL 培養基。
- (3) 尿液（中段尿）- 取尿液 5-10 mL 可採離心濃縮（先低速取上液，再高速取沉澱物）過濾（0.45 μ m）以一莫耳濃度 phosphate buffer (pH7.4) 調整 pH 值，連續稀釋 10^{-1} 至 10^{-5} 後再接種。

- (4) 腦脊髓液 (CSF) - 在發病的 5-10 天內取 0.5mL CSF 直接接種於 5mL 的半固體培養基中。
- (5) 肝臟、腎臟 Biopsy - 取 1g 的組織加入少量的液體培養基製成懸浮液，再以培養基行 10 倍連續稀釋 10^{-1} 至 10^{-3} 後再接種。
- (6) 鑑定：每週 1 次，以暗視野顯微鏡檢查，至少觀察 1 個月，發現雜菌污染時，可用稀釋法或過濾法 (0.45 μm 過濾膜) 處理。

7、貓抓病病原體培養：

取疑似病例樣本進行細菌培養。通常是將 1.5 mL 的血液置於塑膠的 EDTA 抗凝採血管中，於 -30°C 或 -70°C 冰凍數天至數週^(8,13)，再將這些管子的離心得到的沈澱塗佈在含有 5% 新鮮兔血的 heart infusion 平版培養基上，於潮濕且有 5% CO_2 的 35°C 環境中培養數週，通常菌落的生長需 2-4 週才能生成。

五、結果：

鉤端螺旋體病：

本實驗室自 2002 年 1 月起至 2002 年 10 月止，共收到各醫院送檢共 747 個疑似病例，共檢驗 937 個血清檢體，323 個尿液檢體和 6 個腦脊髓液檢體。其中 25 個疑似病例血清抗體檢查為確定陽性(抗體力價大於等於 400 倍)，陽性比例為 3.3%，62 個疑似病例血清抗體檢查為疑陽性(抗體力價 100 倍及 200 倍)，及 660 個疑似病例血清抗體檢查為陰性【如圖 2】；腦脊髓液抗體檢查均為陰性；尿液 PCR 檢測均為陰性。患者年齡分佈在 1 至 89 歲之間【如圖 4】，陽性男性 22 人、女性 3 人，疑陽性男性 48 人、女性 14 人【如圖 3】，所感染的血清型以 *shermani* 居多(67 個檢體)，其次才是 *bratislava* 血清型(30 個檢體)，*australis* 血清型(14 個檢體)，*tarassovi* 血清型(12 個檢體)，*autumnalis* 血清型(7 個檢體)，*bataviae* 血清型(6 個檢體)，*canicola* 血清型(6 個檢體)，*poi* 血清型(5 個檢體)，*copenhageni* 血清型(3 個檢體)，*icterohaemorrhagiae* 血清型(2 個檢體)，*javanica* 血清型(1 個檢體)，*manilae* 血清型(1 個檢體)，*hebdomedis* 血清型(1 個檢體)【如圖 7】。抗體陽性血清之抗體力價 100 倍共 65 件，200 倍共 32 件，400 倍共 9 件，800 倍共 9 件，1600 倍共 6 件，3200 倍共 10 件，6400 倍共 4 件【如圖 8】；抗體力價幾何平均為 263.9 倍。

本年度月別檢驗結果如下【如圖 1】：91 年 1 月收到疑似病例血清檢體 84 件，尿液檢體 24 件，腦脊髓液 1 件(抗體陽性 3 件，抗體疑陽性 9 件)；2 月收到疑似病例血清檢體 54 件，尿液檢體 10 件，腦脊髓液 1 件(抗體陽性 2 件，抗體疑陽性 5 件)；3 月收到疑似病例血清檢體 65 件，尿液檢體 18 件(抗體陽性 2 件，疑陽性 6 件)；4

月收到疑似病例血清檢體 94 件，尿液檢體 33 件，腦脊髓液 1 件（抗體陽性 3 件，疑陽性 9 件）；5 月收到疑似病例血清檢體 96 件，尿液檢體 31 件，腦脊髓液 3 件（抗體陽性 5 件，疑陽性 14 件）；6 月收到疑似病例血清檢體 103 件，尿液檢體 26 件（抗體陽性 2 件，疑陽性 16 件）；7 月收到疑似病例血清檢體 125 件，尿液檢體 52 件（抗體陽性 6 件，疑陽性 7 件）；8 月收到疑似病例血清檢體 104 件，尿液檢體 48 件（抗體陽性 5 件，疑陽性 5 件）；9 月收到疑似病例血清檢體 111 件，尿液檢體 43 件（抗體陽性 5 件，疑陽性 16 件）；10 月收到疑似病例血清檢體 101 件，尿液檢體 38 件（抗體陽性 5 件，疑陽性 10 件）。

接觸者送驗之血清檢體共計 6 件，2 個來自於 1 名抗體疑陽性病患，3 件來自於 1 名抗體陽性病患，1 件為 1 名抗體陽性病患所飼養的狗，6 件血清檢體均為抗體陰性。

抗體陽性及疑陽性病患居住地以台北居多(21 名)，次為桃園(13 名)，花蓮(11 名)，高雄(11 名)，屏東(7 名)，南投(4 名)，新竹(4 名)，台中(4 名)，基隆(3 名)，嘉義(3 名)，彰化、雲林、苗栗、台南、(各 1 名)【如圖 5】，另有一名病患居住地不名。患者症狀以發燒居多，次為黃疸、急性腎功能不全、血小板減少、意識不清、頭痛、呼吸障礙、肝脾腫大、出血傾向、腹痛、肌肉痛，不過有 24 名疑陽性患者和 11 名陽性患者症狀不明(送驗單位未填寫)【如圖 6】。

貓抓病：

本實驗室自 2002 年 1 月起至 2002 年 10 月止，共收到各醫院送檢共 62 件疑似病例檢體，包含 10 件全血檢體及 52 件血清檢體，全血檢體做抗體測定(IFA)及抗原檢查(PCR)，而血清檢體僅做抗體測定。其中有 30

件檢體抗體測定為陽性(抗體力價大於等於 64 倍), 陽性比例為 48.4% ; 抗原檢查 1 件為陽性。病患年齡為 1-80 歲【如圖 11】; 男性 15 名、女性 14 名【如圖 10】; 居住地方以台北最多(10 名), 次為台中(6 名), 桃園(4 名), 苗栗、高雄、彰化(各 2 名), 南投、花蓮、金門(各 1 名)【如圖 12】。

本年度月別檢驗結果如下【如圖 9】: 91 年 1 月起始收到疑似病例檢體 7 件(抗體陽性 2 件); 2 月收到疑似病例檢體 1 件(抗體陽性 1 件); 3 月收到疑似病例檢體 4 件(抗體陽性 1 件); 4 月收到疑似病例檢體 4 件(抗體陽性 2 件); 5 月收到疑似病例檢體 3 件(抗體陽性 3 件); 6 月收到疑似病例檢體 4 件(抗體陽性 2 件); 7 月收到疑似病例檢體 14 件(抗體陽性 8 件); 8 月收到疑似病例檢體 15 件(抗體陽性 8 件, 抗原陽性 1 件); 9 月收到疑似病例檢體 5 件(抗體陽性 2 件); 10 月收到疑似病例檢體 5 件(抗體陽性 1 件), 抗體陽性力價為 64 倍 8 件, 128 倍 8 件, 256 倍 6 件, 512 倍 4 件, 1024 倍 3 件; 幾何平均力價為 282.5 倍【如圖 13】。

病患症狀以局部淋巴結腫痛為最多(14 名), 其次為發燒(9 名), 及白血球增多(1 名), 倦怠(1 名), 不過 14 名陽性患者症狀不明(送驗單位未填寫)。

六、討論：

- 1、在陽性病例判定方面，因為本實驗室未進行免疫組織染色或免疫螢光染色的檢驗，故若欲符合美國 CDC 之確立診斷條件，僅能以「相同實驗室，取得病患急性期及恢復期之血清，相隔時間至少兩星期，進行血清凝集試驗，得到四倍或以上增加者」。但可能因為病患發病後未能立即就醫、或醫院無法立即懷疑為鉤端螺旋體病並採檢送驗而無法取得急性期血清、或病患與醫院未能配合於兩週後採檢送驗之種種因素，故無法確診。至於血清抗體陽性判定，在實驗室計畫執行初期定為抗體力價 200 倍以上，後來主管單位要求以 400 倍較適當，故判定標準改為 400 倍以上。
- 2、由於實驗室收到的檢體資料中對病患的臨床症狀陳述資料並不完整，故無法進行相關統計分析，且同一名病患可能同時檢驗出不同血清型抗體陽性，所以報告中沒有針對血清型與臨床症狀關聯性做比較。
- 3、91 年的所有送檢檢體病原分離均為陰性，血清分離陰性可能沒有採到病人菌血期之血清，而由於人的尿液偏酸，鉤端螺旋體較難存活，故本實驗室建議送檢醫院能在採檢後於 10 毫升尿液中立即加入 0.5 毫升 1 莫耳濃度 pH 值為 7.4 的 PB Buffer，但大部分醫院反應製備此緩衝溶液有困難，無法配合執行，以致影響 PCR 的診斷率；且須考量病患為

急性或慢性病患及採檢前是否投藥，都可能影響病患是否會由尿液排菌。

七、結論與建議：

- 1、 MAT 檢驗方法並不適合做大量第一線篩選用，而應該為做最後確診用，否則非常的費時耗材，所以建議先由適當 IgM 快速檢驗試劑做篩選，再進一步進行 MAT 確診。
- 2、 由於各地方流行之血清型並不相同，故進口國外之快速檢驗試劑使用並不能一體適用，而且價格昂貴，因此有必要儘速自行發展適合本土且價格合理的快速檢驗試劑。

八、參考文獻：

1. 潘銘正、楊智偉、李智隆。鉤端螺旋體病。疫情報導 1996; 12(12): 389-394.
2. Arimitsu Y, Kobayashi S, Akama K, Matsuhashi T: Development of a simple serological method for diagnosing leptospirosis: a microcapsule agglutination test. *J Clin. Microbiol* 1982;15: 835-841.
3. Barker NE, Hadfield T, Patnaik M, Schwartzman WA, Peter JB: EIA for detection of *Rochalimaea henselae*-reactive IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with suspected cat-scratch disease. *J Infect Dis* 1993;167: 1503-4.
4. Bergmans AM, Peeters MF, Schellekens JF, Vos MC, Sabbe LJ, Ossewaarde JM, Nerbakel H, Hooft HJ, Schouls LM: Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: evaluation of *Bartonella henselae*-based indirect fluorescence assay and enzyme-linked immunoassay. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1931-7.
5. Bergmans AM, Schellekens JF, van Embden JD, Schouls LM: Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 1996; 34:254-62.
6. Birtles RJ: Differentiation of *Bartonella* species using restriction endonuclease analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Fems Microbiol Lett* 1995;129: 261-5.
7. Birtles RJ, Raoult D: Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequence for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46:891-7.
8. Bereswill S, Hinkelmann S, Kist M, Sander A: Molecular analysis of

- riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the *ribC* gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37:3159-66.
9. Brenner SA, Rooney JA, Manzewitsch P, Regnery L. Isolation of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*: Effects of methods of blood collection and handling. *J Clin Microbiol* 1997;35: 544-7.
 10. Chang CC: Epidemiology of *Bartonella* infection in canids and ruminants in the Western and central United States: identification of potential reservoirs and vectors. *PhD dissertation. University of California, Davis* 2000;
 11. Chomel BB: Cat-scratch disease. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2000; 19: 136-150.
 12. Effler PV, Bogard AK, Domen HY, Katz AR, Higa HY, Sasaki DM: Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol* 2002;40: 1464-9.
 13. Everard COR, Edwards CN, Everard J D, et al: A twelve- year study of leptospirosis on Barbados. *Europ J. Epidemiol* 1995; 11:311-320.
 14. Faine S: *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed., *MediSci, Melbourne, Australia*. 1999.
 15. Fournier PE, Robson J, Zeaiter Z, McDougall R, Byrne S, Raoult D: Improved culture from lymph nodes of patients with cat scratch disease and genotypic characterization of *Bartonella henselae* isolates in Australia. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3620-3624.
 16. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ: Detection of

- seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 1993; 139:1691-700.
17. Joblet C, Roux V, Drancourt M, Gouvernet J, Raoult D: Identification of *Bartonella (Rochalimaea)* species among fastidious gram-negative bacteria on the basis of the partial sequence of the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1879-83.
 18. Kawabata H, Watanabe H: Molecular typing of *Leptospira* spp. By "flaB-typing". *Proceeding of Regional Seminar-workshop on Leptospirosis, Manila* 2000; p.155-157.
 19. Kelly TM, Padmalayam I, Baumstark BR: Use of the cell division protein ftsZ as a means of differentiating among *Bartonella* species. *Clin Diag Lab Immunol* 1998; 5:766-72.
 20. Koehler JE, Glaser CA, Tappero JW: *Rochalimaea henselae* infection- a new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA* 1994;271:531-5.
 21. Kordick DL, Wilson KH, Sexton DJ, Hadfield TL, Berkhoff HA: Breitschwerdt EB. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33:3345-51.
 22. Lee SC, Fung CP, Lee N, & Shieh WB: Cat-scratch disease caused by *Bartonella henselae*: the first case report in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1998; 97:569-572.
 23. Levett PN: Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:296-326.
 24. Lin KC, Fong MS, and Lee LD: Leptospirosis in Taiwan. *Chin. Med* 1976; J. 23:204~216.
 25. Litwin CM, Martins TB, Hill HR: Immunologic response to *Bartonella*

- henselae* as determined by enzyme immunoassay and western blot analysis. *Am J Clin Pathol* 1997;108:202-9.
26. Marston EL, Summer JW, Regnery RL: Evaluation of intraspecies genetic variation with the 60kDa heat-shock protein gene (*groEL*) of *Bartonella* species. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49:1015-23.
 27. Maruyama S, Hiraga S, Yokoyama E, Naoi M, Tsuruoka Y, Ogura Y, Tamura K, Namba S, Kameyama Y, Nakamura S, Katsube Y: Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* infections among pet cats in Kanagawa and Saitama Prefectures. *J Vet Med Sci* 1998;60(9): 997-1000.
 28. Maruyama S, Nakamura S, Kabeya H, Tanaka S, Sakai T, Katsube Y: Prevalence of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* and the 16s rRNA gene types of *Bartonella henselae* among pet cats in Japan. *J Vet Med Sci* 2000; 62(3): 273-279.
 29. Maruyama S, Nogami S, Inoue I, Namba S, Asanome K, Katsube Y: Isolation of *Bartonella henselae* from domestic cats in Japan. *J Vet Med Sci* 1996; 58(1): 81-83.
 30. Martar GM: Inter- and intraspecies identification of *Bartonella* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a fragment of the ribosomal operon. *J Clin Microbiol* 1995; 33:3370.
 31. Matar GM, Koehler JE, Malcolm G, Lambert-Fair MA, Tappero J, Hunter SB, Swaminathan B: Identification of *Bartonella* species directly in clinical specimens by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment. *J Clin Microbiol* 1999;37:4045-4047.

32. Matar GM, Swaminathan B, Hunter SB, Slater LN, Welch DF: Polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis of a fragment of the ribosomal operon from *Rochalimaea* specie for subtyping. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1730-1734.
33. Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1797-803.
34. Onyemelukwe N F: A serological survey for leptospirosis in the Enugu area of eastern Nigeria among people at occupational risk. *J. Trop. Med. Hyg*1993; 96:301-304.
35. Park SK, Lee SH, Rhee YK, et al: Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients. *Am. J. of Trop. Med. & Hyg*1989; 41: 345~351.
36. Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE, Rodriguez-Barradas, Jones DC, Carr JH: Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* 1992; 30:265-74.
37. Sander A, Buhler C, Pelz K, von Cramm E, Bredt W: Detection and identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. *J Clin Microbiol*1997; 35:584-7.
38. Sander A, and Penno S: Semiquantitative Species-Specific Detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* by PCR-Enzyme

- Immunoassay. *J. Clin. Microbiol* 1999 ;37: 3097-3101.
39. Smits HL, Ananyina YV, Chereshsky A, Dancel L et al: International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. *J. Clin. Microbiol* 1999; 37:2904-9.
 40. Smits HL et al: Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format. *Tropical Medicine and International Health* 2001; 6:114-118.
 41. Smits HL et al: Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clin Diag Lab Immunol* 2001; 8: 166-9.
 42. Szlec-Kelly CM, Goral S, Perez-Perez GI, Peerkins BA, Pegnery RL, Edward KM: Serologic responses to *Bartonella* and *Afipia* antigens in patients with cat scratch disease. *Pediatrics*1995; 96:1137-42.
 43. Thomas DR, Salmon RL, Kench SM, et al: Zoonotic illness-determining risk factors and measuring effects: association between current animal exposure and a history of illness in a well characterized rural population in the UK. *J. Epidemiol Community Health*1994; 48:151-155.
 44. Torten, M: Leptospirosis, in CRC Handbook Series in Zoonoses. Section A. I. Bacterial, rickettsial and mycotic diseases, Steele, JH., ED., CRC Press, Boca Raton, Florida 1979; p. 363-421.
 45. Wang SC, Wang YM: Leptospirosis: report of one case. *J Microbiol Immunol Infect*1999; 32: 129-132.
 46. WHO, ILS: Human Leptospirosis:guidance for diagnosis, surveillance and control. 2002.
 47. Winearls CG, Chan L, Coghlan JD, et al: Acute renal failure due to

- leptospirosis: clinical features and outcome in six cases. *Quarterly Journal of Medicine* 1984; 53:487~495.
48. Winslow WE, Merry DJ, Pirc ML, Devine PL: Evaluation of a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. *J. Clin. Microbiol* 1997;35:1938-1942.
49. Yamamoto, K, Chomel, BB, Kasten, RW, Hew, CM, Weber, DK, Lee, WI, Droz, S, and Koehler, JE: Experimental Infection of Domestic Cats with *Bartonella koehlerae* and Comparison of Protein and DNA Profiles with Those of Other *Bartonella* Species Infecting Felines. *J. Clin. Microbiol* 2002 ;40: 466-474.
50. Yang, CW, Pan MJ, Wu, MS, et al: Leptospirosis: An ignored cause of acute renal failure in Taiwan. *Am J of Kid Dis* 1997; 30:840-845.

九、附圖：











