

計劃編號：DOH88-TD-1004

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計劃

台灣地區萊姆病感染之實驗室標準診斷的建立

Establishment of standard laboratory diagnosis
for Lyme disease in Taiwan

研 究 報 告

執行機構：國防醫學院、寄生蟲及熱帶醫學科

計劃主持人：師 健 民 教 授

研究人員：趙 麗 蓮，趙 芳 儀

執行期限：87年 7月 1日 至 88年 6月 30日

★本研究報告僅供參考，不代表本署意見★

【誌 謝】

本研究計劃之得以完成，首要感謝行政院衛生署在研究經費上之襄助，使有關台灣地區萊姆病感染之實驗室標準診斷的建立工作得以順利完成。另外有關病媒蜚種之實驗室繼代培養及蜚媒介萊姆病疏螺旋體菌種之純種分離和特性分析亦得以初步鑑定。

研究期間承蒙金門縣衛生局相關同仁在鼠類誘捕工作上之行政支援和指導，特致謝忱。而本實驗室同仁趙麗蓮、蔡靜儀、王明潔和趙芳儀小姐等在實驗動物及蜚種之維護，以及病原螺旋體之分離和鑑定工作上努力不懈，個人表示由衷敬謝。

【目 錄】

	頁 碼
一. 中文摘要-----	1
二. 英文摘要-----	2
三. 前 言-----	3
四. 材料與方法-----	5
(一) 萊姆病疏螺旋體菌之純種及繼代培養	
(二) 抗螺旋體單源抗體及抗血清之來源	
(三) 螺旋體抗原之製備及血清學診斷試驗	
(四) 台灣株疏螺旋體菌之蛋白質電泳試驗	
(五) 台灣株疏螺旋體菌之西方墨點試驗	
(六) 台灣株疏螺旋體菌之聚合脢鏈反應試驗	
五. 結 果-----	8
(一) 台灣株疏螺旋體菌之體外培養生長特性分析	
(二) 台灣株疏螺旋體抗原之血清學診斷試驗分析	
(三) 台灣株疏螺旋體菌之體表蛋白質(0sp)特性分析	
(四) 台灣株疏螺旋體菌之免疫蛋白特異性分析	
(五) 抗螺旋體單源抗體對台灣株疏螺旋體菌之敏感度	
(六) 台灣株疏螺旋體菌之分子診斷特性分析	
六. 討 論-----	11
七. 結論與建議-----	13
八. 參考文獻-----	15
九. 附表及附圖-----	18

【中 文 摘 要】

本研究利用病原體分離培養、免疫螢光抗體試驗、蛋白質電泳分析、西方墨點試驗及聚合酶鏈反應等相關研究技術，針對台灣地區分離之萊姆病致病疏螺旋體菌株 (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) 做血清學及分子診斷試驗分析，並試圖藉由台灣疏螺旋體菌株抗原之應用，以建立本土性萊姆病感染診斷之標準實驗室。研究結果顯示台灣疏螺旋體菌株 (TWKM1-7) 體外培養之世代增殖時間 (generation time) 平均為 10-12 小時，其生長速率較 B31 標準株 (8 小時) 為緩慢。而人群萊姆病感染之血清盛行率，分別以北美標準株 (B31) 及台灣分離株 (TWKM-1) 之螺旋體做為抗原，則受檢樣本之平均陽性率 (13.9% vs. 8%) 在診斷上具有顯著差異性，若以兩種抗原之交叉反應做為陽性判斷標準，則僅有 4.8% 的平均陽性率。另外依據蛋白質電泳分析 (SDS-PAGE) 結果則顯示台灣疏螺旋體菌株之體表蛋白成份 (Outer surface proteins) 與標準株 (B31) 及北美株 (JD1) 相類似，並且以抗螺旋體特異性單源抗體 (MAbs) 做免疫蛋白抗原之診斷試驗 (western blot analysis)，其結果顯示台灣疏螺旋體菌株皆可以抗螺旋體鞭毛抗體 (MAb H9724)、抗螺旋體體表蛋白 A 抗體 (MAbs H5332 & H3TS) 及抗螺旋體體表蛋白 B 抗體 (MAbs H6831 & H614) 做為血清學免疫診斷。尤其台灣疏螺旋體菌株可與 anti-P39 之抗螺旋體免疫抗體產生反應，亦顯示螺旋體感染早期診斷之可行性。而聚合酶鏈反應 (PCR) 試驗結果除證實台灣疏螺旋體菌株之基因種 (genospecies) 歸屬於 *Borrelia burgdorferi sensu stricto*，亦驗證了分子診斷之敏感性及準確性。綜言之，本研究結果不但驗證各種診斷方法之可信性，更首度建立台灣地區萊姆病感染診斷之標準實驗室。

關鍵詞：萊姆病，螺旋體，標準診斷。

【英文摘要】

In order to establish a standard diagnostic laboratory for Lyme disease infection in Taiwan, we analyzed the spirochete isolates of Taiwan by various serological and molecular techniques. Results from In vitro cultivation indicate that the rate of multiplication of Taiwan isolates (TWKM1-7) with an average generation time of 10-12 hr and that is slower than the B31 type strain of Lyme disease spirochete (Borrelia burgdorferi). The seroprevalence of Lyme disease infection in the human populations of Taiwan differs markedly by using antigens of B31 and TWKM1, respectively. The seroprevalence of tested sera was dampened by the cross-reactivity with two spirochete antigens. Protein electrophoresis and immunoblot analysis reveal that the protein profiles and reactivities with B. burgdorferi-specific monoclonal antibodies (MAb) of these Taiwan isolates were consistent with those of Lyme disease spirochete (B. burgdorferi sensu lato). The MAb reactivity against the outer surface proteins (Osp) of these Taiwan isolates demonstrates the feasibility of immunodiagnosis for seroprevalence of Lyme disease infection in Taiwan. PCR analysis indicated that all of these Taiwan isolates were genetically related to the genospecies B. burgdorferi sensu stricto, and these results also highlight the sensitivity and accuracy of molecular diagnosis for Lyme disease infection. In summary, our results demonstrate the reliability of serodiagnosis for Lyme disease infection and establish the primary laboratory for isolation and identification of Lyme disease spirochetes in Taiwan.

Key word: Lyme disease, spirochete, standard diagnosis

【前 言】

蜱媒介人畜共通傳染病(tick-borne zoonotic infections)近年來被世界各國列為重要之病媒滋生傳染病(vector-borne infections)。且由於交通便利及生活型態的改變，人們經常往返於世界各地從事經商、探親及旅遊等活動，加上家飼寵物及流浪動物的盛行，因而使得蜱滋生疾病之預防、診斷及治療事項成為各國防疫工作之重點(1-3)。以美國為例，蜱媒介傳染病成為過去十年來主要之病媒滋生傳染病，其中又以萊姆病(Lyme disease)為臨床上首要之經蜱傳播人畜共通傳染病(4)。而在臨近本省之日本(5-7)、韓國(8)及大陸地區(9-11)等皆有蜱媒介萊姆病的病例報告、病原體分離和病媒蜱種類之確認。本研究室近年來在衛生署支援下已有台灣地區病原螺旋體之分離(12)和首例萊姆病臨床病例之報告(13)，而有關其媒介傳播之病媒蜱種，則正進行確認研究中。

台灣地區屬於亞熱帶氣候，加上人口稠密及人畜接觸機會之頻繁，非常有利於蜱媒介人畜共通傳染病之散播。國人由於旅遊探親或商務往來之需要，常常無法避免野外踏青及疫區停留之經歷，另外由於特殊職業(農牧及軍事服務人員)或居住地等因素，而長期暴露於病媒蜱滋生環境，尤其是目前社會上大量野生動物之非法輸入及豢養動物之氾濫，一旦這些動物帶有病媒或病原體感染，將使得國人遭蜱叮咬而致感染之危險性升高。因此，新興蜱媒介人畜共通傳染病(emerging tick-borne zoonoses)之防治工作，愈來愈顯其重要性而成為大眾關注的焦點。大陸地區近年來曾從事大規模的人群血清學調查研究，結果顯示萊姆病的流行區域遍佈自南到北的19個省、自治區及直轄市，其平均盛行率為5.33%(11)。而台灣地區早期雖有蜱媒人體巴貝原蟲病(human babesiosis)之原住民血清學初步調查

(14)，然有關本省萊姆病的人畜盛行狀況及蜱媒介病原體能力之實驗室相關研究，則付闕如。

萊姆病感染之診斷主要依據臨床病癥及血清抗體反應，而臨床病癥又依感染時程分別以早期之慢性遊走性皮膚紅疹(erythema chronicum migrans)、中期之關節炎(尤其是膝關節)及心肌炎和晚期之多發性神經炎、面神經麻痺及腦膜腦炎等為主。至於血清抗體反應則以抗萊姆病螺旋體之特異性抗體為主要診斷依據，並且以專一性之間接免疫螢光抗體試驗(IFA)及酵素結合免疫吸附試驗(ELISA)為主要診斷方法(15,16)。另外針對宿主感染後產生抗螺旋體體表蛋白抗原(outer surface proteins; Osp)及鞭毛抗原(flagellin protein)之特異性抗體，亦發展出一套利用免疫電泳分析之西方墨點試驗(western blot analysis)以便進一步確認IFA或ELISA診斷上之邊緣陽性個案(17,18)。而使用聚合酶鏈反應技術(Polymerase Chain Reaction; PCR)以偵測存在於感染宿主組織及蜱組織內之螺旋體核酸物質(DNA)，亦可有效提高螺旋體感染診斷之敏感度及準確性(19)。

然由於部份感染病人缺乏感染早期之皮膚表癥及抗螺旋體體表蛋白之特異性抗體，再加上各實驗室間陽性診斷標準之不一致(20-22)，使得免疫電泳分析之診斷標準趨於複雜。而PCR診斷技術之過度敏感亦常造成假陽性判斷，並且無法明確顯示萊姆病之即時感染狀況(active Lyme infection)，因而突顯萊姆病感染診斷標準實驗室建立之重要性。因此，本研究使用台灣地區分離獲得之純種培養螺旋體菌株(TWKM1-7)做為抗原，並利用相關之血清學及分子診斷技術予以檢試，以發展一套較具本土性感染診斷之客觀標準及建立萊姆病感染診斷之標準實驗室，期能做為民眾健康維護之篩檢服務。

【材 料 與 方 法】

一． 萊姆病螺旋體菌之純種及繼代培養：

本研究分別使用台灣分離獲得之純種萊姆病螺旋體菌株(TWKM1-7)、美國ATCC之標準菌株(B31)、北美致病菌株(JD1)及特殊基因種之螺旋體菌株(K48 & VS461)等做為測試診斷用抗原。實驗室螺旋體之體外培養則使用特製之螺旋體培養基(BSK-H, Sigma Co.)，並以每100 μ L液量接種後置入二氧化碳培養箱內(34°C, 5% CO₂)行繼代純種培養(23)，其培養菌株之生長狀況則使用暗視野顯微鏡(dark-field microscope)於接種後每三天吸取5-10 μ L培養液予以檢視，以確認培養螺旋體之正常生長。

二． 抗螺旋體單源抗體及抗血清之來源：

本研究使用診斷萊姆病感染之抗螺旋體體表蛋白(0sp)抗原的特異性單源抗體(MAb)，做為免疫電泳分析試驗之各種不同分離來源螺旋體蛋白抗原特性的鑑定。而診斷所使用之抗螺旋體抗血清及單源抗體則分別針對0spA(H5332 & H3TS)、0spB(H6831 & H614)、鞭毛抗原(H9724)及P39蛋白抗原(anti-P39)等產生免疫反應(24-26)，並分別受贈自美國哈佛大學之Andrew Spielman教授、德州大學之Alan Barbour教授及美國疾病管制中心落磯山研究室之Tom Schwan博士等相關學者。

三． 螺旋體抗原之製備及血清學診斷試驗：

本研究所使用之螺旋體菌株於測定其個別生長曲線(growth curve)後，採取其指數期(exponential phase)生長狀況之菌體做為螺旋體抗原製備之材料，以確保菌體最佳抗原表

現。而菌體生長密度則依照既往文獻顯示之 5×10^6 - 10^7 為最適當濃度，培養之菌體經離心及無菌緩衝液潤洗三次後，置入 -20°C 冰櫃中保存備用。一般而言，間接免疫螢光抗原片(IFA slides)之製作乃將用無菌緩衝液調勻的螺旋體抗原液以每孔(well) $10\ \mu\text{L}$ 量製作而成(大約使每一顯微鏡視野觀察具有100-200個螺旋體)，抗原片經丙酮固定十分鐘後氣乾，隨後於每孔內加入待測血清並置入 37°C 溫箱中進行反應40分鐘後，抗原片經無菌緩衝液潤洗三次及氣乾，再於每孔滴加 15 - $20\ \mu\text{L}$ 之二次螢光抗體(FITC-conjugated goat anti-human/anti-mouse IgG & IgM antibody)並置入 37°C 溫箱中進行反應40分鐘，隨後再經無菌緩衝液潤洗三次及氣乾，以螢光顯微鏡進行鏡檢。

四．台灣株疏螺旋體菌之蛋白質電泳試驗：

本研究利用蛋白質電泳分析(Protein electrophoresis)技術以檢測台灣株螺旋體菌(TWKM1-7)之主要蛋白質組成，並據以和ATCC標準株及其他基因種株(JD1、K48 & VS461)做比較分析。原則上，菌體培養液經離心收取菌塊(pellet)後，以無菌緩衝液潤洗並使其懸浮於含有 5mM MgCl_2 之Sodium dodecyl sulfate (SDS)的樣本緩衝液中，經沸水煮沸5分鐘及適度離心後，取其上清液置 -20°C 保存備用。製備液隨後以每 10 - $15\ \mu\text{g}$ 蛋白抗原含量注入 12.5% 之電泳凝膠片(SDS-PAGE)中進行電泳分析試驗，試驗結果之凝膠片於蛋白質染色後(Coomassie brilliant blue staining)，以比較分析其蛋白質譜(protein profiles)。

五．台灣株疏螺旋體菌之西方墨點試驗：

製備妥當之螺旋體蛋白抗原液經由凝膠電泳處理後，以凝膠轉漬槽(semidry electroblotter)將凝膠片上之蛋白抗原轉漬到醋酸纖維膜(nitrocellulose membrane)上，隨後並以各種螺旋體專一性單源抗體及抗血清進行轉漬後醋酸纖維膜之免疫反應分析。反應完成後之轉漬膜再經由過氧化氫酶呈色反應處理，以呈色後之醋酸纖維膜上色帶(bands)進行螺旋體免疫蛋白抗原成份之比對分析。

六．台灣株疏螺旋體菌之聚合酶鏈反應試驗：

所有螺旋體菌株之去氧核糖核酸(DNA)經由既往文獻顯示之方法萃取後(27)，其去氧核糖核酸之含量則以核酸定量光譜儀(GeneQuant II, Pharmacia Biotech)予以檢定，置於-20℃冰櫃內備用。螺旋體菌株之去氧核糖核酸萃取液隨後以五組聚合酶鏈反應引子(PCR primers)(表一)進行螺旋體核酸循環增殖反應，其循環增殖之主要反應條件分別為：【94℃, 1 min; 47℃ 30 sec; 72℃, 1 min】及【93℃, 1 min; 60℃, 1 min; 72℃, 1 min】。增殖反應後之核酸產物則以洋菜凝膠片(1.5% agarose gels)進行核酸電泳分析處理，隨後洋菜凝膠片經由核酸染色劑(ethidium bromide)處理後以紫外光觀察箱進行核酸色帶(DNA bands)之比對分析。

【結 果】

一. 台灣株疏螺旋體菌之體外培養生長特性分析:

培養之疏螺旋體菌株於接種三天後至二星期，每六小時以微量吸管吸取 $10\mu\text{L}$ 量的培養液在暗視野顯微鏡下進行螺旋體菌落數之計算並予以詳細記錄。研究結果顯示台灣株疏螺旋體菌株平均以 10^4 - 10^5 /mL的接種量後，其持續生長期限可達四星期之久，而螺旋體菌之最大生長密度皆可達到 10^7 菌落數，其平均增殖6-7個世代。結果亦顯示台灣株疏螺旋體菌株之體外培養世代增殖時間平均為10-12小時(表二)，其生長速率較B31標準株(8小時)及JD1北美株(9小時)為緩慢。

二. 台灣株疏螺旋體抗原之血清學診斷試驗分析:

本研究選用台灣疏螺旋體菌株(TWKM1)及ATCC標準株(B31)做為人群血清盛行率之檢測，其結果顯示若分別以ATCC標準株(B31)及台灣分離株(TWKM1)之螺旋體菌做為抗原，則其受檢樣本之平均陽性率在診斷判定上具有顯著差異性(表三)，若以兩種抗原之交叉反應做為陽性判斷標準，則其平均陽性率顯著下降。

三. 台灣株疏螺旋體菌之體表蛋白質(Osp)特性分析:

依據蛋白質電泳分析(SDS-PAGE)結果顯示台灣疏螺旋體菌株(TWKM1-7)之體表蛋白(Outer surface proteins; Osp)成份與標準株(B31)及北美致病株(JD1)相類似，其蛋白質成份之分子量分佈於24-67kDa，並且以31kDa及41kDa兩者為主要蛋白質成份(圖一)。而比較台灣疏螺旋體菌株之體表蛋白成份可以發

現TWKM1-4菌株缺乏34kDa(OspB)體表蛋白成份，此成份與TWKM5-7菌株具有明顯差異性。

四. 台灣株疏螺旋體菌之免疫蛋白特異性分析：

螺旋體菌株之免疫蛋白抗原試驗結果顯示台灣疏螺旋體菌株皆可以抗螺旋體鞭毛抗體(MAb H9724)及抗螺旋體體表蛋白A抗體(MAbs H5332 & H3TS)產生免疫反應(圖二)，而抗螺旋體體表蛋白B抗體(MAbs H6831 & H614)亦可產生免疫反應，然其中之MAb H6831無法與部份台灣疏螺旋體菌株(TWKM1-4)產生免疫反應，此外所有台灣疏螺旋體菌株皆可與anti-P39抗體產生免疫反應。

五. 抗螺旋體單源抗體對台灣株疏螺旋體菌之敏感度：

為瞭解萊姆病感染診斷用之專一性單源抗體對台灣疏螺旋體菌株感染診斷的敏感度，本研究選用兩株台灣疏螺旋體菌(TWKM1 & TWKM5)做為測試用抗原，結果顯示抗螺旋體體表蛋白A抗體(MAbs H5332)之偵測敏感度在TWKM1及TWKM5分別為64x及32x之稀釋度，而抗螺旋體鞭毛抗體(MAb H9724)之偵測敏感度在TWKM1及TWKM5則皆為32x之稀釋度(表四)，另外anti-P39抗體之偵測敏感度在TWKM1及TWKM5分別為16x及64x之稀釋度。

六. 台灣株疏螺旋體菌之分子診斷特性分析：

本研究利用既往文獻已確認之五組聚合酶鏈反應引子(PCR primers)，以測試台灣疏螺旋體菌株的分子診斷特性及初步鑑定其基因種別。結果顯示所有分離之台灣疏螺旋體菌株在基因種(genospecies)上皆歸屬於 Borrelia burgdorferi sensu

stricto，而其聚合酶鏈反應結果亦顯示所有分離之台灣疏螺旋體菌株皆可以Universal-type(primer c)及B31-type(primer a)的PCR引子分別產生127bp及374bp之核酸增殖產物(圖三)。另外若以三種不同基因種之聚合酶鏈反應引子以進行核酸增殖反應，則BB(B. burgdorferi sensu stricto)、BG(B. garinii)及VS461(B. afzelii)三組引子分別產生575bp、575bp及590bp之核酸增殖產物(圖四)。

【討 論】

本研究工作首次成功的建立台灣地區萊姆病螺旋體之分離、純種培養及實驗診斷實驗室，除了已完成分離之台灣疏螺旋體菌株的體表蛋白成份分析，並藉由抗螺旋體之專一性單源抗體進一步確認台灣疏螺旋體菌株的免疫蛋白抗原特性，同時更運用聚合酶鏈反應技術以萊姆病螺旋體之專一性引子，初步完成台灣疏螺旋體菌株的基因種株鑑識工作。現正積極進行實驗動物感染試驗及感染後宿主之免疫反應等研究，期能深入明瞭宿主之感受性及免疫反應的變化，以做為日後改進及發展精確血清學診斷及感染後治療之參考。

本研究完成了台灣地區首次針對人群萊姆病感染之血清盛行率篩檢，由血清篩檢結果得知若以萊姆病螺旋體的標準菌株(B31)做抗原，則人群血清平均盛行率高達13.9%，遠較以台灣株螺旋體(TWKM-1)做為抗原的平均盛行率(8%)為高。此研究結果闡示了萊姆病感染之血清學篩檢必需考量使用本土分離菌株做為偵測用抗原之重要性，否則過高之假陽性率將會影響篩檢調查結果的正確性。因此，我們採取了較保守之估測方式，那就是以同時對兩種抗原(B31 & TWKM-1)產生免疫反應之結果做為陽性反應的判斷標準，使得台灣地區萊姆病的平均血清盛行率成為4.8%，此項結果與大陸地區大規模篩檢之平均盛行率(5.33%)相近。若以臨近台灣的大陸省份相比，則較福建省及浙江省為稍高，但與江蘇省相近(4.85%)。無論如何，本研究已充份闡示了台灣地區有蜱媒介人畜共通萊姆病存在之事實，若考量本省人口稠密及人畜接觸機會之頻繁，愈突顯萊姆病防治研究在公共衛生預防上之重要性。

另外本研究針對台灣分離之疏螺旋體菌株做免疫蛋白抗原測試，其結果所闡示之抗螺旋體專一性抗體對台灣疏螺旋體菌株的免疫反應差異性，除可提供選用不同螺旋體抗原之偵測敏感度(sensitivity)參考外，更說明了台灣疏螺旋體菌株做為血清學免疫診斷之可行性，尤其台灣疏螺旋體菌株皆可與anti-P39抗體反應，更顯示螺旋體菌抗原在未來做為萊姆病感染早期診斷之可行性。而台灣疏螺旋體菌株在體表蛋白B成份的差異性，亦闡示了台灣分離株具有兩組不同之免疫蛋白抗原特性，此差異特性將可應用在未來台灣地區萊姆病感染之鑑別診斷。

台灣疏螺旋體菌株以五組聚合酶鏈反應引子之試驗結果，除確認台灣分離株之基因種株外，亦闡示了PCR分子診斷方法在台灣地區螺旋體感染偵測運用之可行性，尤其此診斷技術之敏感度可以達到pg之螺旋體DNA含量，對於未來萊姆病之慢性感染(chronic infection)及感染性病媒蜱之偵測，深具研究發展之潛力。

【結論與建議】

國人由於生活水準之提升以致嗜養寵物，因而使得暴露在病媒蜚叮咬環境之機率增加，相對的亦提高了蜚媒病原體感染之危險性。而流浪犬在台灣地區之帶病原比率，亦值得深入探討其在公共衛生上之重要性。因此，有關家飼寵物之蜚侵襲率 (infestation rate) 及蜚媒病原體之感染率等進一步研究，皆對阻斷蜚媒介傳染病之散播和維護個人健康有重大影響。茲就一般民眾防蜚保健之預防措施建議如下：

一. 個人安全防護措施：

平日於草叢或矮灌木叢中踏青或工作時，盡量穿著淺色之長袖衣褲，並將褲角紮入襪內以方便檢視及避免蜚之吸附。野外活動結束後亦應檢視個人之耳頸部、腋下、腿部及其他易藏身處有無蜚之吸附，並需早期摘除已吸附蜚和保留蜚標本送國內相關研究室做有無病原體感染之測試。

二. 蜚滋生源之預防及清除：

居住環境應避免人畜共處及有效防止鼠類之侵入，並加強對於飼養動物的持續清潔維護，以及定期對草叢的清理和噴洒殺蟲藥劑以減低或消滅蜚之族群。

三. 防蜚叮咬藥劑之使用：

驅蟲劑 (Repellent) 之使用源自美軍越南戰爭中之驅蚊劑的大量使用，主要塗抹在衣物及皮膚暴露部分以避免蚊蟲叮咬及其傳播之瘧疾等寄生蟲病。此種藥劑中之主要成份為 N,N-Diethyl-m-Toluamide (DEET)，經局部塗抹皮膚後對蚊蟲有 3-4 小時的驅避效果。但此藥劑之過度/不當塗抹 (尤其是孕婦和嬰幼兒) 將會造成不等程度之副作用產生 (28-30)，目前此藥劑經

適度調配以降低DEET成份(<10%)後，已有類似之防蟬藥劑商品 (Skedaddle, LittlePoint laboratories, Boston, Mass., U. S. A.)發售，並且能安全的使用於兒童。

四. 免疫預防注射:

目前先進國家(如:美國)已發展出動物(犬類)使用之疫苗(31)，於每年蟬媒傳染病的盛行季節前予以預防注射，以保護動物免於蟬媒病原體之感染，進而間接的達到防護人類感染之目地。此種疫苗製劑目前亦已部份核可做人體預防使用之測試，以減低人員感染之危險。

五. 血清學診斷之篩檢:

個人可依工作之環境狀況及旅遊經商之經常性，考慮是否做不定期的血清學篩檢試驗，而家飼寵物則建議做定期的血清流行病學篩檢，另外有關國外輸入之野生或豢養動物則應予以強制性的防疫檢驗。依據文獻之記載，蟬媒介傳染病之早期診斷將有助於治療的成效，同時血清學之篩檢工作亦可用來評量蟬防護及相關檢疫措施之成效。

【參考文獻】

1. Schmid GP. The global distribution of Lyme disease. Rev. Infect. Dis. 1985, 7:41-50.
2. Spach DH, Liles WC, Campbell GL, et al. Tick-borne diseases in the United States. N. Eng. J. Med. 1993, 329:936-47.
3. Piesman J. Emerging tick-borne diseases in temperate climates. Parasitol. Today 1987, 3:197-9.
4. Anonymous. Lyme disease-United States, 1996. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 1997, 46:531-5.
5. Kawabata M, Baba S, Iguchi K, et al. Lyme disease in Japan and its possible incriminated tick vector, Ixodes persulcatus. J. Infect. Dis. 1987, 156:854.
6. Nakao M, and Miyamoto K. Susceptibility of Ixodes persulcatus and I. ovatus (Acari: Ixodidae) to Lyme disease spirochetes isolated from humans in Japan. J. Med. Entomol. 1994, 31:467-73.
7. Takada N, Ishiguro F, Iida H, et al. Prevalence of Lyme Borrelia in ticks, especially Ixodes persulcatus (Acari: Ixodidae), in central and western Japan. J. Med. Entomol. 1994, 31:474-8.
8. Park KH, Chang WH, Schwan TG. Identification and characterization of Lyme disease spirochetes, Borrelia burgdorferi sensu lato, isolated in Korea. J. Clin. Microbiol. 1993, 31:1831-7.
9. Ai CX, Wen YX, Zhang YG, et al. Clinical manifestations and epidemiological characteristics of Lyme disease in Hailin county, China. Ann. NY Acad. Sci. 1988, 539:302-13.
10. 潘亮, 于恩庶, 張哲夫等。福建省萊姆病的調查研究。中國媒介生物學及控制雜誌: 1992; 3卷特刊2期, pp. 33-35.
11. 張哲夫, 張金聲, 萬康林等。我國19個省、自治區、直轄市萊姆病的調查。中國媒介生物學及控制雜誌: 1992; 3卷特刊2期, pp. 1-5.

12. Shih CM, and Chao LL. Lyme disease in Taiwan: primary isolation of Borrelia burgdorferi-like spirochetes from rodents in the Taiwan area. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1998, 59:687-92.
13. Shih CM, Wang JC, Chao LL, and Wu TN. Lyme disease in Taiwan: first human patient with characteristic erythema chronicum migrans skin lesion. J. Clin. Microbiol. 1998, 36:807-8.
14. Hsu HM and Cross JH. Serologic survey for human babesiosis on Taiwan. J. Formosan Med. Assoc. 1977, 76:950-4.
15. Russell H, Sampson JS, Schmid GP, Wilkinson HW, Plikaytis B. Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. J. Infect. Dis. 1984, 149:465-70.
16. Magnarelli LA. Serologic diagnosis of Lyme disease. Ann. NY Acad. Sci. 1988, 539:154-161.
17. Magnarelli LA, Anderson JF, Hyland KE, Fish D, and McAninch JB. Serologic analysis of Peromyscus leucopus, a rodent reservoir for Borrelia burgdorferi, in northeastern United States. J. Clin. Microbiol. 1988; 26:1138-1141.
18. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. J. Infect. Dis. 1993, 167:392-400.
19. Rosa PA, and Schwan TG. A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi using the polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. 1989, 160:1018-29.
20. Hedberg CW, Osterholm MT, MacDonald KL, White KE. An inter-laboratory study of antibody to Borrelia burgdorferi. J. Infect. Dis. 1987, 155:1325-7.
21. Magnarelli LA. Quality of Lyme disease tests. JAMA 1989, 262:3464-5.
22. Schwartz BS, Goldstein MD, Ribeiro JMC, Schulze TL, Shahied SI.

- Antibody testing in Lyme disease: a comparison of results in four laboratories. JAMA 1989, 262:3431-4.
23. Pollack RJ, Telford III SR, and Spielman A. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. J. Clin. Microbiol. 1993, 31:1251-1255.
 24. Barbour AG, Tessier SL, Todd WJ. Lyme disease spirochetes and ixodid tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. Infect. Immun. 1983, 41:795-804.
 25. Barbour AG, Hayes SF, Heiland RA, Schrumpf ME, Tessier SL. A Borrelia-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. Infect. Immun. 1986, 52:549-54.
 26. Barbour AG, Tessier SL, Hayes SF. Variations in a major surface proteins of Lyme disease spirochetes. Infect. Immun. 1984, 45:94-100.
 27. Pan MJ, Tsai CP, Yeh JC. Sequence diversity of a gene encoding a putative primary sigma factor among Borrelia burgdorferi sensu lato strains. FEMS Microbiol. Lett. 1997, 148:153-8.
 28. Heick HM, Shipman RT, Norman MG, James W. Reye-like syndrome associated with use of insect repellent in a presumed heterozygote for ornithine carbamoyl transferase deficiency. J. Pediatr. 1982, 97:471-3.
 29. Miller JP. Anaphylaxis associated with insect repellent. N. Engl. J. Med. 1982, 307:1341-2.
 30. Anonymous. Are insect repellents safe? Lancet 1988, ii:610-11.
 31. Chu HJ, Chavez LG, Blumer BM, Sebring RW, Wasmoen TL, Acree WM. Immunogenicity and efficacy study of a commercial Borrelia burgdorferi bacterin. J. Ame. Vet. Med. Aso. 1992, 201(3):403-11.

【附表及附圖】

附表一．萊姆病螺旋體核酸循環增殖之鏈反應引子。

附表二．台灣分離疏螺旋體菌株之體外培養生長世代。

附表三．台灣地區人群萊姆病感染之血清盛行率篩檢。

附表四．抗螺旋體單源抗體偵測台灣疏螺旋體菌之敏感度。

附圖一．台灣株疏螺旋體菌之體表蛋白質成份電泳分析。

附圖二．台灣株疏螺旋體菌之免疫蛋白抗原成份分析。

附圖三．台灣株疏螺旋體菌之聚合酶鏈反應試驗分析。

附圖四．台灣株疏螺旋體菌之基因種試驗分析。

表一. 萊姆病疏螺旋體核酸循環增殖使用之鏈反應引子

引子組別	核酸基因序列	長度	偵測疏螺旋體 之基因種別
Primer a	5'-CGAAGATACTAAATCTGT-3'	18	<u>B. burgdorferi</u> sensu stricto
	5'-GATCAAATATTTCAGCTT-3'	18	
Primer c	5'-CCAACTTTATCAAATTCTGC-3'	20	<u>B. burgdorferi</u> sensu stricto <u>B. garinii</u> , and <u>B. afzelii</u>
	5'-AGGATCTATTCCAAAATC-3'	18	
BB	5'-GGGATGTAGCAATACATTC-3'	19	<u>B. burgdorferi</u> sensu stricto
	5'-ATATAGTTTCCAACATAGG-3'	19	
BG	5'-GGGATGTAGCAATACATCT-3'	19	<u>B. garinii</u>
	5'-ATATAGTTTCCAACATAGT-3'	19	
VS461	5'-GCATGCAAGTCAAACGGA-3'	18	<u>B. afzelii</u>
	5'-ATATAGTTTCCAACATAGC-3'	19	

表二. 台灣分離疏螺旋體菌株之體外培養增殖生長世代

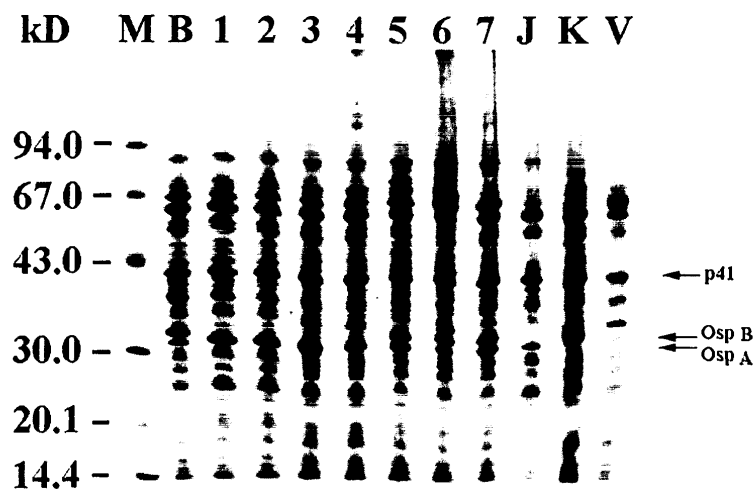
螺旋體菌株 (Strain)	原接種量* (Cells/ml)	最高生長密度 (Cells/ml)	增殖世代數 (Numbers)	世代增殖時間 (Hours)
B31	3.20×10^4	4.64×10^7	10.43	8.47 ± 1.07
TWKM 1	2.80×10^5	9.65×10^7	6.43	10.19 ± 1.27
TWKM 2	7.40×10^4	1.47×10^7	7.59	10.18 ± 1.91
TWKM 3	2.30×10^5	1.10×10^7	6.53	11.22 ± 1.21
TWKM 4	9.30×10^4	1.91×10^7	7.62	10.57 ± 1.83
TWKM 5	2.60×10^5	1.94×10^7	6.20	12.14 ± 2.65
TWKM 6	1.49×10^5	1.93×10^7	6.57	11.63 ± 1.99
TWKM 7	1.66×10^5	1.12×10^7	6.07	12.29 ± 2.87
JD 1	2.77×10^4	1.31×10^7	8.63	9.59 ± 0.98

表三. 台灣地區人群萊姆病感染之血清學(IFA)盛行率
篩檢調查結果

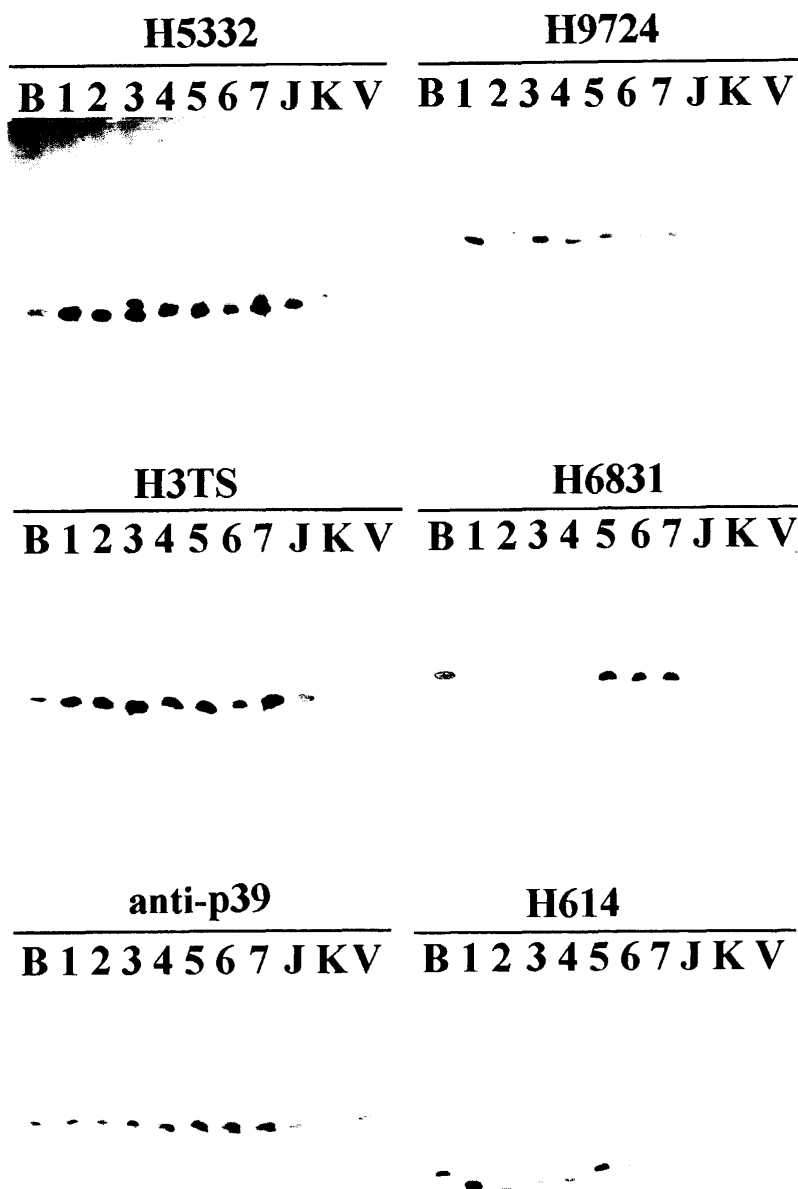
		對不同螺旋體抗原反應之血清陽性數(率)		
區 域 別	受檢人數	B31(%)	TWKM-1(%)	B31&TWKM-1(%)
北部地區	738	135(18.3)	72(9.8)	51(6.9)
西部地區	599	53(8.8)	39(6.5)	13(2.2)
南部地區	266	34(12.8)	18(6.8)	9(3.4)
東部地區	101	15(14.9)	13(12.9)	8(7.9)
合 計	1704	237(13.9)	142(8.3)	81(4.8)

表四．抗螺旋體單源抗體偵測台灣螺旋體菌之敏感度

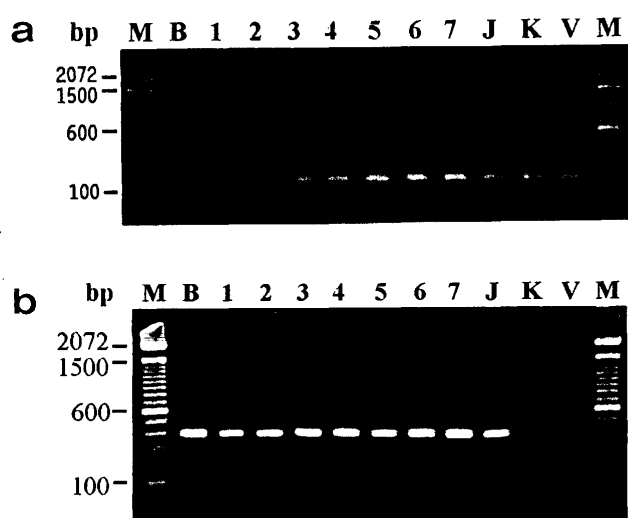
抗螺旋體 單源抗體種類	台灣疏螺旋體 之菌株別	偵測用抗體 之稀釋倍數
H5332(anti-OspA)	TWKM 1	64x
	TWKM 5	32x
H9724(anti-flagella)	TWKM 1	32x
	TWKM 5	32x
P39(anti-P39)	TWKM 1	16x
	TWKM 5	64x



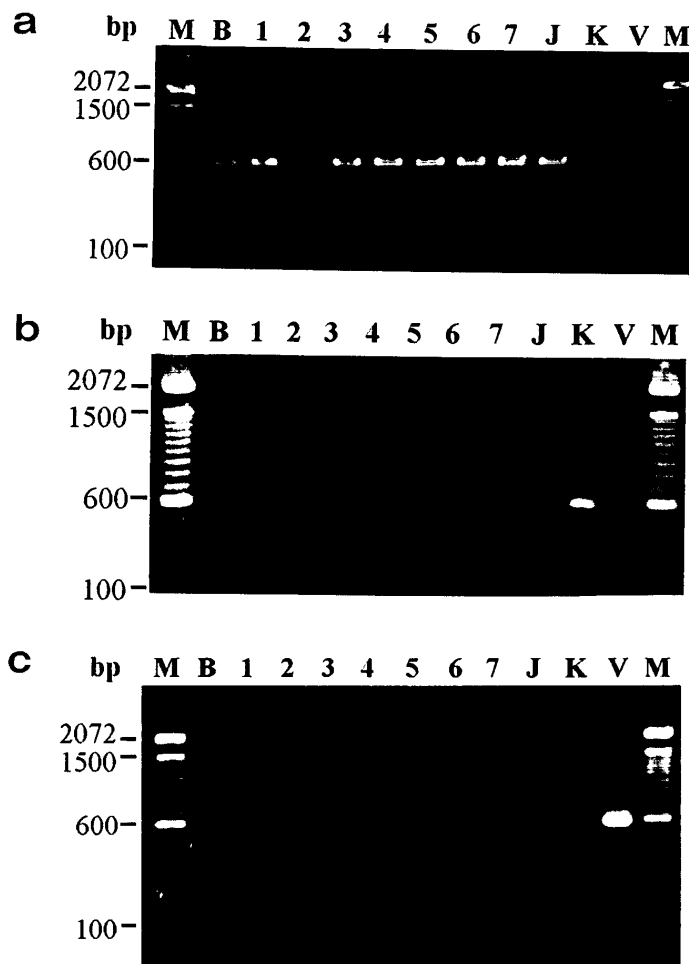
圖一. 台灣株疏螺旋體菌體表蛋白質成份之電泳分析。所有台灣株疏螺旋體皆具有兩個主要體表蛋白成份，其分子量分別為31kDa(OspA)及41kDa(Flagella)，且TWKM5-7菌株另具一個分子量34kDa(OspB)之主要體表蛋白質成份，而TWKM1-4菌株則缺此體表蛋白。



圖二. 台灣株疏螺旋體菌之免疫蛋白抗原成份分析。所有台灣株疏螺旋體皆可與anti-OspA(H5332 & H3TS)、anti-flagella(H9724)及anti-P39(P39 Ab)之抗螺旋體體表蛋白的專一性抗體產生反應，而anti-OspB(H6831)則僅與部份台灣分離株(TWKM5-7)產生免疫反應。



圖三. 台灣株疏螺旋體菌之聚合酶鏈反應試驗分析。
所有台灣株疏螺旋體菌皆可以鏈反應引子c(圖三之a)及
引子a(圖三之b)進行核酸增殖，並分別獲得127bp及374bp
之增殖核酸產物。



圖四. 台灣株疏螺旋體菌之基因種試驗分析。
所有台灣株疏螺旋體菌皆可以鏈反應引子BB(基因種B. burgdorferi sensu stricto)進行循環增殖反應，並獲得575bp之增殖核酸產物(圖四之a)，然若以其他基因種之引子BG(B. garinii)(圖四之b)及VS461(B. afzelii)(圖四之c)進行循環增殖反應，則無法獲得任何增殖核酸產物。