

出國報告（出國類別：研究）

澳洲鈎端螺旋體參考實驗室  
**(WHO/FAO/OIE Collaborating  
Centre for Reference & Research on  
Leptospirosis)研習**

服務機關：衛生署疾病管制局

姓名職稱：王秀貞助理研究員

派赴國家：澳洲

出國期間：97年5月11日至97年5月24日

報告日期：97年8月18日

## 摘要

鉤端螺旋體病是受到國際重視的再浮現人畜共通傳染病，遍布於世界各國，並常在熱帶與亞熱帶地區國家（如泰國、巴西、孟加拉、印度）造成重要的疫情。台灣地處熱帶及亞熱帶地區，氣候高溫多雨，並且動物宿主種類繁多如鼠類、嚙齒類、家畜等哺乳動物，利於鉤端螺旋體之存活與傳播。人類感染鉤端螺旋體多因接觸自動物宿主所排出含有病原菌的體液、組織或遭污染的土壤、水源而感染。由於人類鉤端螺旋體病臨床症狀多變且複雜，需藉助實驗室診斷。顯微凝集試驗（**microscopic agglutination test, MAT**）雖是血清學黃金標準方法（**gold standard**），但抗體最高力價的血清型與分離菌株的血清型常發現無法吻合，並且血清學方法通常需要配對血清（相隔 14 天）才可研判，實無法達到快速診斷的目的。所以藉著到位於澳洲布里斯本的 WHO/FAO/OIE 鉤端螺旋體參考實驗室，研習鉤端螺旋體快速核酸檢測（PCR）及分離菌株的血清型鑑定，並與相關研究人員討論汲取研究經驗，以提昇本局鉤端螺旋體病實驗診斷能力，同時也期望與該參考實驗室建立長期良好互惠的合作及技術交流管道。

# 目 次

壹、目的 .....	4
貳、過程 .....	5
參、心得 .....	16
肆、建議事項 .....	17

## 壹、目的

鉤端螺旋體病是受到國際重視的再浮現人畜共通傳染病，遍布於世界各國。台灣地處熱帶及亞熱帶地區，氣候高溫多雨，並且動物宿主種類繁多如鼠類、嚙齒類、家畜等哺乳動物，利於鉤端螺旋體之存活與傳播。

人類感染鉤端螺旋體多因接觸自動物宿主所排出含有病原菌的體液、組織或遭污染的土壤、水源而感染。所以畜牧業及屠宰場的工作人員、獸醫、肉販、農夫、下水道工人等都是感染本病的高危險群。另外，2000年馬來西亞發生三鐵越野競賽選手集體爆發鉤端螺旋體病，以及日本發生自美國進口的鼯鼠（Southern flying squirrel）感染飼養人員的事件。使得水上休閒、競賽活動與寵物接觸等人類活動模式亦成爲新興感染風險因的重要之一。

鉤端螺旋體病疫情常在水災後爆發流行，國際間多有案例可循（如泰國、印度）；2001年納莉颱風造成嚴重水災，之後，鉤端螺旋體病的通報人數即大幅攀升，由於台灣近年來水災頻繁發生，且從事農牧業人口眾多，人類感染鉤端螺旋體病可能有低估的情形。

人類感染鉤端螺旋體病臨床表現多樣化且差異極大，從輕微的發燒至嚴重的急性黃疸、腎衰竭，或是肺出血，易與其他疾病混淆，而造成診斷及治療上的延誤，若病情嚴重至併發多重器官症狀，致死率可達 20%，不可輕忽。不過，鉤端螺旋體病只要以青黴素加以治療，是很容易痊癒的疾病，因此快速且正確的實驗室診斷能力是極其迫切需要的。MAT 雖是目前血清學黃金標準方法（gold standard），但抗體最高力價的血清型與分離菌株的血清型常發現無法吻合，並且血清學方法通常需要配對血清（相隔 14 天）才可研判，需時長而無法達到快速診斷的目的。

此次至澳洲布里斯本的 WHO/FAO/OIE 鉤端螺旋體參考實驗室研習，學習鉤端螺旋體病之快速核酸檢測（PCR）、病原菌分離培養及血清型別鑑定方法，同時瞭解相關之研究與進展，以期提昇本局在鉤端螺旋體病之實驗診斷能力，使其具有國際水準，以強化此病之防治工作，也期望與該參考實驗室建立長期良好互惠的合作及技術交流管道。

## 貳、過程

### 1 行程

五月十一日至五月十二日

路程

五月十二日至五月二十三日

研習

五月二十四日至五月二十四日

返程

## 2 內容

### 2.1 鉤端螺旋體病簡介

近年來世界各地陸續爆發人畜共通傳染病疫情，不僅嚴重危害農畜生產，更可能傳染給人類而成爲公共衛生的重要威脅，甚且導致社會不安、經濟衰退的現象，如2003年造成全球極度恐慌的嚴重急性呼吸道症候群（SARS）疫情，顯示了人畜共通傳染病防治的重要性。

鉤端螺旋體病是一種廣泛分布於世界各地的、最普遍且嚴重的人畜共通傳染病之一。本病是一個歷史悠久的疾病，早在1886年由德國醫師Adolf Weil從急性腎衰竭的病人身上觀察到脾腫大、黃疸及腎臟炎等臨床症狀；致病性的鉤端螺旋體病原菌則在1915年由日本的Inada及Ido與德國的Huebener及Reiter分別培養得到。更早的記載，也可在中國及日本的古籍中發現，引起被稱爲秋日熱（Autumn fever）或七日熱的疫情。近年，也在尼加拉瓜、巴西、印度、馬來西亞、泰國等地爆發嚴重疫情，也發生三鐵越野競賽選手集體感染鉤端螺旋體病，及進口鼯鼠（Southern flying squirrel）感染飼養人員的事件。不但出現了肺出血熱的新症狀，也以新的傳播方式—水上休閒、競賽活動、寵物接觸，傳播至人，而被歸類於再浮現的人畜共通傳染病（reemerging zoonoses）。

鉤端螺旋體的宿主幾乎包含所有的哺乳類，甚至青蛙、蟾蜍等動物也可自其腎臟分離出致病性的鉤端螺旋體。鼠類、狗、牛、豬等都可爲其保菌宿主（reservoirs），感染後可在腎臟造成慢性感染，並經由尿液大量排菌，污染水源、土壤及食物，其中鼠類及齧齒類是最重要的保菌宿主。

人類經由黏膜、皮膚傷口等直接或間接接觸鉤端螺旋體病原菌而被感染，所以畜牧業及屠宰場的工作人員、獸醫、肉販、農夫、下水道工人等都是感染本病的高危險群。另外，水上休閒、競賽活動與寵物接觸等人類活動模式也是新興的感染風險因子。

鉤端螺旋體分類上隸屬於螺旋體目（Spirochaetales）、鉤端螺旋體科（Leptospiraceae）、鉤端螺旋體屬（Leptospira）。目前共分成17個基因種（genomospecies）：具致病性者有8種，含*L. alexanderi*、*L. borgpetersenii*、*L. genomospecies 1*、*L. interrogans*、*L. kirschneri*、*L. noguchii*、*L. santarosai*、*L. weilii*；中間型（intermediate groups，因這些species 同時包含致病性及腐生性）有3種，含*L. broomii*、*L. inadai*、*L. fainii*；營腐生無致病性者有6種，含*L. bifexa*、*L. genomospecies 3*、*L. genomospecies 4*、*L. genomospecies 5*、*L. meyeri*、*L. wolbachii*。所有基因種皆可用血清學方法來細分，以血清型（serovar）爲分類的基本單位，目前已知病原性鉤端螺旋體共約270種血清型，分別隸屬於上述的基因種內。

1989年前的舊制分類法，則將分爲致病性的*L. interrogans sensu lato*及腐生性的*L. bifexa sensu lato*兩大類，再以血清型確認試驗（cross agglutination absorption test, CAAT）細分成不同血清型，相似而具部份交叉反應的血清型再集成血清群（serogroup）。目前已知致病性共約277餘種血清型，分別隸屬於約25個血清群。

人類感染鉤端螺旋體的鑑別診斷困難且不容易，緣於人類感染臨床症狀變化極大且複雜，從急性發燒、頭痛、肌肉痛、腹痛、腹瀉、倦怠等，到併發以下的臨床症狀：結膜充血、腦膜炎症狀、無尿、少尿或蛋白尿、黃疸、急性腎功能不全。並且，近二、三十年也出現以肺出血熱為主的新症狀，如1975年在南韓，1995年在尼加拉瓜的大流行就是以肺出血熱為主的癥候群。故常被誤診為恙蟲病、流行性感冒、上呼吸道感染(URI)、不明熱(FUO)、漢他病毒感染、無菌性腦膜炎、病毒性肝炎等。

現今常用的實驗診斷方法：

1. 核酸檢測—以PCR偵測患者尿液、血液等檢體有無含有病原菌之核酸，為最直接且具高度敏感及專一性的檢測法。
2. 細菌培養—取患者菌血期的血液或菌尿期的尿液做培養。培養出的分離株可做血清型確認試驗，並可與傳染源的動物分離株做比較，具公共衛生及防疫實務上的重要性。
3. 血清學檢查—患者發病5-7天後出現抗體，就可與活菌進行顯微凝集試驗（microscopic agglutination test, MAT），測得抗體力價。配對血清中之MAT抗體力價超過四倍或以上為確診病例；或MAT單次血清抗體力價 $\geq 400X$ ，視為可能病例。MAT試驗雖為現行血清學檢查之黃金標準（gold standard），但執行MAT試驗時，需利用一組包含各種血清群的活菌，並在暗視野顯微鏡以20X接物鏡觀察凝集之菌數比例，50%細菌被凝集判為陽性，主觀性強較不易標準化，且需長時常規培養及保存致病性的活菌，對一般臨床實驗室有其困難度，故多轉介至參考實驗室執行。

## 2.2 行前聯繫

本局自2000年委託台灣大學獸醫系潘銘正教授辦理「鉤端螺旋體病檢驗監測合約實驗室」，進行疑似鉤端螺旋體病病例之監測及檢驗。2005年自潘教授手中接手由新感染症細菌實驗室負責，本室也成為全國鉤端螺旋體病之後送參考實驗室。雖然本室在例行的MAT試驗上執行無礙，鉤端螺旋體分離株的基因分型（以16s ribosomal RNA gene）也可執行，但在分離菌株的血清型鑑定上，因缺乏適當的抗血清，所以來自人類及鼠類的檢體的分離株並無法確知其血清型。

2007年10月底與澳洲布里斯本的WHO/FAO/OIE鉤端螺旋體參考實驗室的負責人Dr. Lee開始聯繫，經其同意後決定2008年5月成行。並決定研習主軸為：快速的核酸檢測方法；血清型鑑定，即血清型確認試驗（cross agglutination absorption test, CAAT），行前也將15株分離株（包含3株來自人類檢體及12株來自鼠類的分離株）寄送至該實驗室。

## 2.3 研習過程

5月12日抵達澳洲布里斯本的WHO/FAO/OIE鉤端螺旋體參考實驗室後，先由負責人Dr. Lee（他也兼具國際鉤端螺旋體分類命名委員會主席及昆士蘭州衛生部傳染病實驗室之副主任），簡介布里斯本實驗室。

布里斯本實驗室在1958年通過WHO及FAO的認證，也在2001年通過OIE的認證，成爲WHO/FAO/OIE三個國際組織認可的參考實驗室。該實驗室積極參與多項與人類及獸醫領域相關的鉤端螺旋體研究、監測和診斷計劃，包括：與澳洲國內的大學和政府部門廣泛合作，對農畜類及野生動物感染鉤端螺旋體病的流行病學及這些動物傳播此病的潛力的研究；積極發展分子生物學的技术進行分離菌株的基因分型；主動參與公共衛生相關的監測及防疫的議題；協助西太平洋及東南亞地區各國監控端螺旋體病的爆發疫情並提供人員訓練、分離菌株的血清型確認等服務。

布里斯本實驗室成員，共有4位專家，包括負責人Dr. Lee、分子生物學專家Dr. Graig、獸醫師 Mr. Dohnt（已在實驗室工作30多年，對於鉤端螺旋體的特性深度了解並具實務經驗）、技師 Ms.Burns（擅長MAT、CAAT、分離培養等工作）。

### 2.3.1 病原性鉤端螺旋體核酸檢測方法

Dr. Graig是位分子生物學專家，掌管實驗室內的分子生物學方法的開發或引進，他介紹了分子生物學相關的4間不同且隔離的實驗室之配置，並示範病原性鉤端螺旋體核酸檢測方法。

- (1) Clean room：用於準備PCR反應試劑，檢體、DNA及PCR產物禁止出現在此實驗室。Laminar Flow使用前開UV燈照 15 分鐘，實驗室內有-20°C的冷凍櫃，主要用的試劑是Roche的HyProbe Mix，使用時再另外加入water、primers和probe。
- (2) DNA preparation/DNA addition room：此實驗室禁止 PCR 產物出現，其功能有二：一、用於萃取檢體 DNA，主要用的試劑是 Qiagen DNA mini Kit 或 Roche High Pure Template Preparation Kit，並利用 extraction control 來控管萃取效率；二、將萃取出來的 DNA 加入 PCR 反應試劑中。
- (3) Equipment room：實驗室配置多種 real time PCR 機器，專爲 closed tube analysis 之用，含 Roche Light Cycler、Corbett 等機型，以 Roche Light Cycler 進行鉤端螺旋體的定性偵測，內含兩種 positive control（high copy 及 low copy）；另以 Corbett Rotor-Gene 進行 extraction control 的偵測。
- (4) Room for PCR products and purification detection：專供 open tube analysis 之用，內可進行 PCR 產物純化、二次 PCR、定序、跑膠等實驗。

四間分子生物學實驗室門上標示清楚並加上警語『Leave lab coat outside; & Wash hand on Entry』。

### 2.3.2 鉤端螺旋體的分離培養

獸醫師Mr. Dohnt已在實驗室工作30多年，對於鉤端螺旋體的特性深度了解並具實務經驗。跟他提到自本局開始執行鉤端螺旋體檢驗業務至今只分離了3株人類分離株，他強調病原性的鉤端螺旋體在低溫時生長會被抑制，所以布里斯本實驗室寄送了semi-solid EMJH bottles至澳洲各地醫院，要求

醫院直接將疑似病例的全血各滴2滴或5滴至2瓶semi-solid EMJH bottles中，再以常溫運送，建議本室若要進行病原分離時考慮採用他們的方法（泰國衛生當局亦採用此法進行病原分離，培養成功率約佔疑似病例的10%）。亦提及不再進行尿液的培養，因其汙染率極高且成功率相當低（因人尿中pH值偏酸，進行培養時須先調整pH值至弱鹼，醫療院所配合度不高）。對於鉤端螺旋體的分離培養，在收到已接種全血semi-solid EMJH當日，先在暗視野顯微鏡下觀察，並次培養（subculture）至2瓶EMJH broth，總共培養6週，每週觀察1次。

### 2.3.3 MAT試驗

技師 Ms.Burns示範MAT試驗，其摘要如下。

- (1) 目的：檢測疑似感染人類或動物血清中所含特定血清型（serovar-specific）的抗體。
- (2) 原理：不同的血清型活菌與相對抗體反應後會凝集成各式的團塊，當100%凝集時看不到任何自由游離的活菌；血清稀釋以後，凝集團塊變少變小，看到愈多的游離的活菌。≥50%活菌被凝集視為陽性；血清稀釋最大倍數仍可凝集≥50%活菌視為其最高抗體力價。
- (3) 布里斯本實驗室例行使用的不同血清型活菌（the routine MAT panel）如下表一。

Species	Serovar	Strain
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajinto
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Pere
<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. weillii</i>	Cellodoni	Cellodoni
<i>L. interrogans</i>	Copenhageni	M20
<i>L. interrogans</i>	Australis	Ballico
<i>L. interrogans</i>	Zanoi	Zanoi
<i>L. interrogans</i>	Robinsoni	Robinsoni
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. interrogans</i>	Kremastos	Kremastos
<i>L. interrogans</i>	Szwajizak	Szwajizak
<i>L. interrogans</i>	Medanensis	Hond HC
<i>L. kirschneri</i>	Bulgarica	Nicolaevo
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	3522C
<i>L. borgpetersenii</i>	Arborea	Arborea
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Swart
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Veldrat Batavia 46

<i>L. noguchii</i>	Panama	CZ 214
<i>L. santarosai</i>	Shermani	11342K
<i>L. weilli</i>	Topaz	94-79940/3

(4) 與本局檢測方法不同處為

(a) Panel 含 22 種致病性鉤端螺旋體血清型，亦包含 Topaz 血清型乃是近年自昆士蘭州新分離的澳洲本土血清型，不只感染人類，亦會感染牛、澳洲袋狸 (bandicoot)、袋鼠等動物；並未包含腐生型的 biflexa 血清型。

(b) 使用 flat bottom, optically correct 的 96 孔盤，反應完後直接在暗視野顯微鏡下觀察。

(c) 加入 MAT positive control：

MAT control 1—是對抗 Pomona、Hardjo、Tarassovi、Grippytyphosa、Cellodoni 血清型的 rabbit polyclonal antibody；

MAT control 2—是對抗 Copenhageni、Australis、Zanoi、Robinsoni、Canicola 血清型的 rabbit polyclonal antibody；

MAT control 3—是對抗 Kremastos、Szwajizak、Medanensis、Bulgarica、Cynopteri 血清型的 rabbit polyclonal antibody；

MAT control 4—是對抗 Arborea、Bataviae、Djasiman、Javanica、Panama、Shermani、Topaz 血清型的 rabbit polyclonal antibody。

## 2.4 鉤端螺旋體菌株確認 (Leptospira isolate identification)

### 2.4.1 基本流程：

分離菌株以 EMJH broth 培養至適當濃度⇒進行血清群別篩選，使用的抗血清 Panel 如表二⇒最高力價的血清群，再進行個別血清型的篩選⇒針對最高力價的血清型及分離菌株，生產 rabbit polyclonal antibody⇒進行抗血清吸附⇒進行 CAAT 試驗。

## 2.4.2 布里斯本實驗室使用的serogroup screen 的抗血清panel

表二、布里斯本實驗室使用的 serogroup screen 的抗血清 panel

Serogroup	Serovar	Strain
Pomona	Pomona	Pomona
Sejroe	Hardjo	Hardjo
Tarassovi	Tarassovi	Perepelistin
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moska V
Celledoni	Celledoni	Celledoni
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
Australis	Australis	Ballico
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Mini	Szwajizak	Szwajizak
Autumnalis	Bulgarica	Nicolaevo
Cynopteri	Cynopteri	3522C
Ballum	Arborea	Arborea
Bataviae	Bataviae	Swart
Djasiman	Djasiman	Djasiman
Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
Panama	Panama	CZ 214
Shermani	Shermani	1342K

### 2.4.3 台灣分離菌株血清群別篩選初步結果，如表三

表三、台灣分離菌株血清群別篩選初步結果

Culture	POM	HAR	TAR	GRI	CEL	COP	AUS	PYR	CAN	HEB	MIN	AUT	CYN	BAL	BAT	DJA	JAV	PAN	SHE
Control sera	3200	800	3200	6400	6400	6400	6400	3200	6400	6400	800	12800	3200	400	3200	6400	12800	6400	1600
2939	<50	<50	<50	<50	400	<50	400	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<b>3200</b>	<50	<50
34CCF	<50	<50	100	<50	<50	<50	<50	<50	<50	400	100	<50	<50	200	100	<50	<50	<50	<50
26CSY	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
R3	<50	<50	200	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<b>3200</b>	<50	<50	<50	<50
C026	<50	<50	100	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<b>1600</b>	<50	<50	<50	<50
20u	<50	<50	<50	<50	<50	200	<50	400	<b>6400</b>	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
44K	<50	<50	200	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<b>3200</b>	<50	<50	<50	<50
42K	<50	<50	200	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<b>3200</b>	<50	<50	<50	<50
C034	<50	<50	100	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<b>3200</b>	<50	<50	<50	<50
54K	<50	<50	200	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<b>3200</b>	<50	<50	<50	<50
C025	<50	<50	200	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<b>3200</b>	<50	<50	<50	<50
83K	<50	<50	200	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<b>6400</b>	<50	<50	<50	<50
28	<50	<50	200	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<b>6400</b>	<50	<50	<50	<50
58K	<50	<50	100	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<b>3200</b>	<50	<50	<50	<50
57K	<50	<50	100	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<b>3200</b>	<50	<50	<50	<50

POM = Pomona

HAR = Hardjo

TAR = Tarassovi

GRI = Grippotyphosa

CEL = Celledoni

COP = Copenhageni

AUS = Australis

PYR = Pyrogenes

CAN = Canicola

HEB = Hebdomadis

MIN = Mini

AUT = Autumnalis

CYN = Cynopteri

BAL = Ballum

BAT = Bataviae

DJA = Djasiman

JAV = Javanica

PAN = Panama

SHE = Shermani

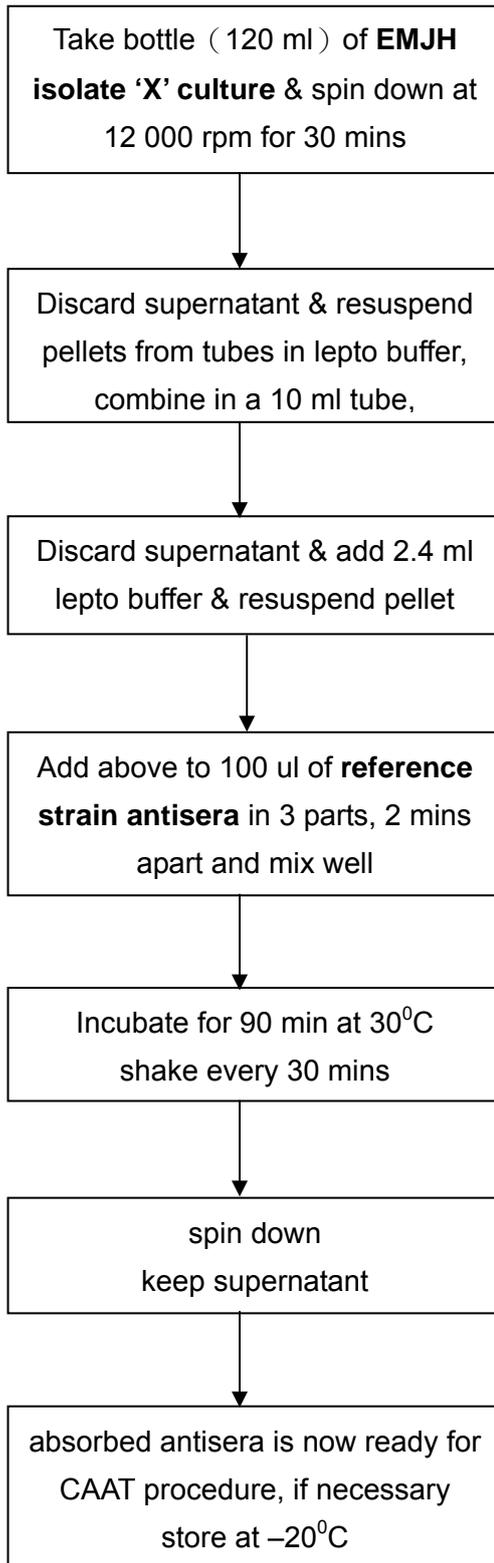
**2.4.4 原理：**若未知血清型之分離菌株X與最高力價之已知血清型菌株的血清型相同，則部分分離株X的活菌將會已知血清型的抗血清吸收，未被吸附的抗體應小於10%，反之亦然。

#### 2.4.5

##### (1) 抗血清吸附實驗

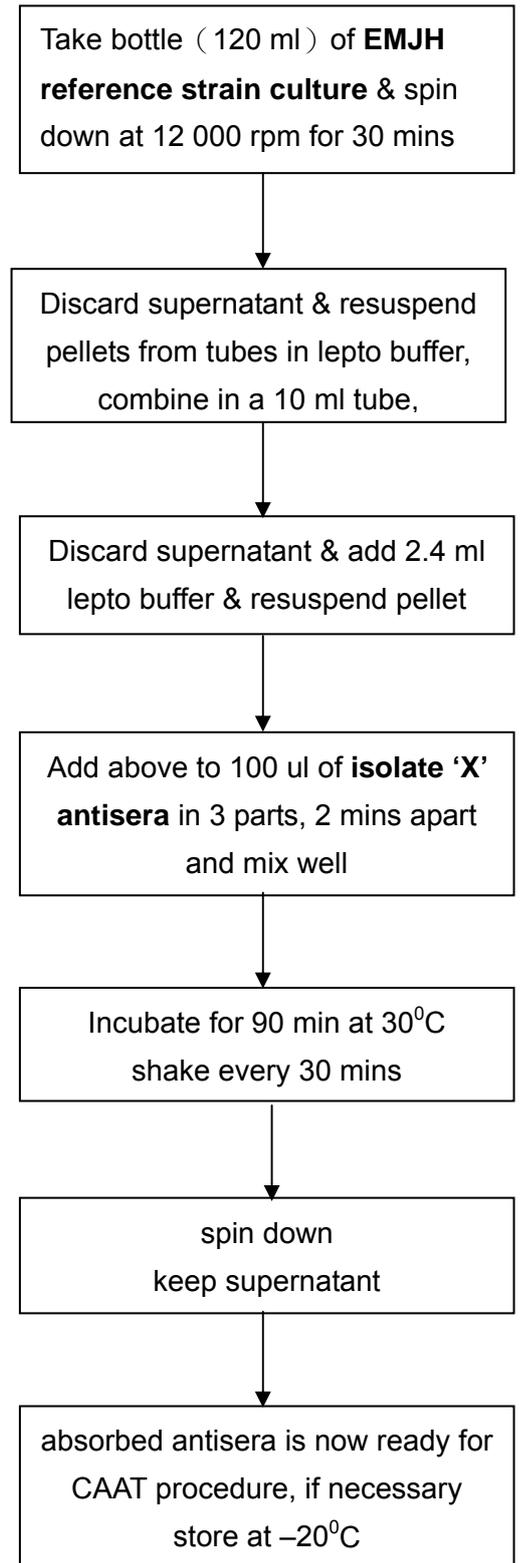
##### ISOLATE 'X' CULTURE

(未知血清型之分離菌株 X)



##### REFERENCE CULTURE

(最高力價之已知血清型菌株)



## (2) CAAT 試驗摘要

抗血清、吸附抗血清、菌株不同組合的凝集反應依序標示如下：

- 1 Isolate 'X' antisera VS Isolate culture 'X' \*
  - 2 Isolate 'X' antisera VS Reference culture 'X' \*\*
  - 3 (Isolate 'X' antisera) /  
(Reference culture) VS Isolate 'X' culture
  - 4 (Isolate 'X' antisera) /  
(Reference culture) VS Reference culture
- 

- 5 Reference antisera VS Reference culture \*
- 6 Reference antisera VS Isolate 'X' culture \*\*
- 7 (Reference antisera) /  
(Isolate culture) VS Reference culture
- 8 (Reference antisera) /  
(Isolate culture) VS Isolate 'X' culture

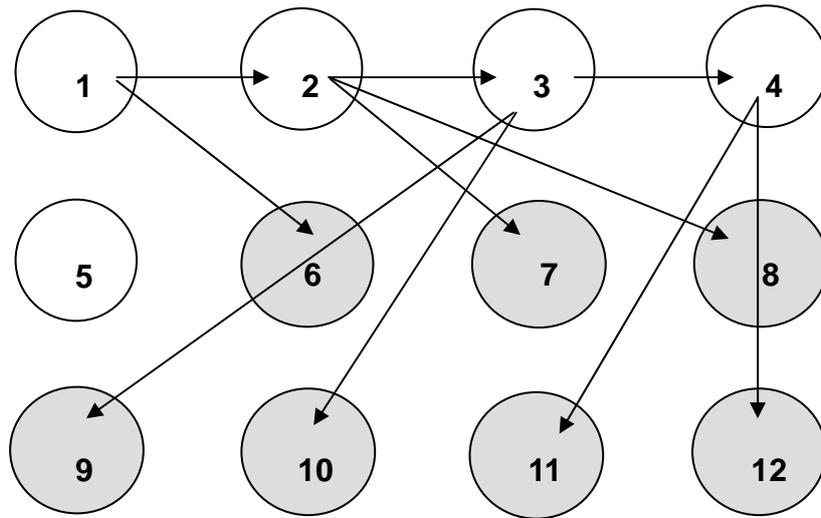
legend

- \* homologous titre
- \*\* heterologous titre
- / absorbed by

## (3) Wolffee 稀釋及反應步驟

Well	Buffer	Antisera	Dilution	Antigen
1	8 drops	2 drops		-
2	9 drops	-	1 drop from Well 1	-
3	9 drops	-	1 drop from Well 2	-
4	9 drops	-	1 drop from Well 3	-
5	-	-		-
6	2 drops	-	1 drop from Well 1	3 drops
7	-	-	3 drops from Well 2	3 drops
8	2 drops	-	1 drop from Well 2	3 drops
9	-	-	3 drops from Well 3	3 drops
10	2 drops	-	1 drop from Well 3	3 drops
11	-	-	3 drops from Well 4	3 drops
12	2 drops	-	1 drop from Well 4	3 drops

**(4) Wolffee 稀釋步驟圖示：**



**(5) Wolffee 稀釋後，每孔最終稀釋倍數：**

WELL 1	---	WELL 7	1/100
WELL 2	---	WELL 8	1/300
WELL 3	---	WELL 9	1/1000
WELL 4	---	WELL 10	1/3000
WELL 5	---	WELL 11	1/10000
WELL 6	1/30	WELL 12	1/30000

**(6) 判讀標準**

若未知血清型之分離菌株 X 與最高力價之已知血清型菌株相同，凝集反應組合 3 之力價除以凝集反應組合 1 之力價應小於 10%；凝集反應組合 4 之力價除以凝集反應組合 2 之力價應小於 10%；凝集反應組合 7 之力價除以凝集反應組合 5 之力價應小於 10%；凝集反應組合 8 之力價除以凝集反應組合 6 之力價應小於 10%。

## 參、心得

澳洲－澳大利亞是全球地理面積第六大的國家，也是大洋洲最大的國家，擁有豐富的生態環境，是 17 個超級生物多樣性國家之一：擁有許多獨有的生物，約 85% 的被子植物、84% 的哺乳類動物、超過 45% 的鳥類以及 89% 的近岸溫帶魚類是特有種。澳洲農牧業及農畜產品加工業均相當發達，從事相關產業的人口眾多。

昆士蘭州早在 1934 年在甘蔗收割病人確認首例鉤端螺旋體病例，並且該州鉤端螺旋體病發生率為全澳之冠，這次有幸在此認證已久的實驗室（通過 WHO/FAO 認證已有 50 年歷史），與從事鉤端螺旋體病相關工作多年的專業人士討論本室檢驗工作可提升之處，深覺不虛此行。

短短兩週的相處被他們的積極、認真、不畏麻煩的敬業心態所激勵。在這期間發現他們不只接受澳洲當地、泰國、印度，甚至美國實驗室（Dr. Vinetz Lab）的請求，進行分離菌株血清型別的鑑定，冗長且繁複的 rabbit polyclonal antibody 之生產過程及 CATT 試驗步驟，並未令他們拒絕外人的請求。我相信基於他們的態度，對外來分離菌株的研究興趣，不僅培育了他們的實力，也奠定他們成為一流的鉤端螺旋體病臨床診斷實驗室的基礎。並且使得各地實驗室樂意與其合作，共同分享研究成果。布里斯本實驗室也是全球的鉤端螺旋體菌株的庫存中心之一，也接管了日本 Inada 博士的實驗室的菌株庫存。

最令我感動的是，Dr. Lee 及實驗室同仁，在臨別之際，仍繼續強調十分樂意協助並支援本局的需要，包括參考菌株、相對應之抗血清的提供，接受分離菌株血清型鑑定的請求。回台之後，也跟 PI 慕博士商量去函商請他們提供參考菌株及相對應的抗血清，以提昇本局對於鉤端螺旋體病研究、檢驗的實力。

短短兩週的研習讓我深刻體驗何謂「態度決定高度」，期許自己效法布里斯本實驗室人員的熱情、認真、不畏麻煩的心態及嚴謹並樂意分享的工作態度，不僅自己獲益、整個新感染症細菌實驗室的工作團隊也因此而獲益。

## 肆、建議事項

- 1 鉤端螺旋體病血清學檢驗黃金標準為顯微凝集試驗 (MAT)，執行試驗時，需利用一組包含各種 (20 多種) 血清群的活菌，由於目前本室例行所僅用 12 種台灣常見血清群，不免忽略了較不常見的血清群。故每年應將過去一年中 IgM 呈陽性、但卻無 MAT 抗體力價的血清檢體，重新利用包含 20 多種血清群的活菌 panel，重作 MAT 試驗，以評估來年是否應當加入新的血清群。
- 2 鉤端螺旋體病原之分離培養，是否可能採用布里斯本實驗室的方法，以提高血液分離病原之成功率。寄送 semi-solid EMJH bottles 至各地醫院，要求醫院直接將疑似病例的全血各滴 2 滴或 5 滴至 2 瓶 semi-solid EMJH bottles 中，再以常溫運送。泰國衛生當局採用此法進行病原分離，培養成功率約佔疑似病例的 10%。另外，是否繼續進行尿液的培養也值得再評估，因其污染率極高且成功率相當低 (因人尿之 pH 值偏酸，進行培養時須先調整 pH 值至弱鹼，醫療院所配合度不高)。若能減少一些無效的培養工作，是否就能減輕檢驗者的負擔，而將心力更多的放在提升專業水準的研發新的檢驗技術上呢？
- 3 上述之血清學檢驗及病原之分離培養費時甚久，無法達到快速診斷的目的，應否建立常規性病原性鉤端螺旋體核酸檢測方法，以輔助上述方法之不足。布里斯本實驗室的病原性鉤端螺旋體核酸檢測方法，已被多項臨床研究採用當做參考方法。可以考慮直接利用他們的 protocol，再來研發其他的方法。
- 4 關於鉤端螺旋體病確認病例之研判，本局採用較嚴苛的標準，唯有配對血清中之 MAT 抗體力價超過四倍或以上才為確認病例；但在澳洲 (鉤端螺旋體病為其法定傳染病) — 鉤端螺旋體病較盛行的國家，研判標準尚且有二項：配對血清中之 MAT 抗體力價超過四倍或以上或 MAT 單次血清抗體力價  $\geq 400X$ ，皆視確認病例。本局採用嚴苛的標準，是否造成此病的低估呢？
- 5 鉤端螺旋體病檢驗相當繁複，實驗室現有 3 名工作人員，但需兼做類鼻疽、貓抓病、萊姆病及鼠疫監測等其他人畜共通傳染病的檢驗工作，很難有餘力與餘暇進行鉤端螺旋體病相關的研究、並與國內相關研究單位共同合作進行調查、檢驗技術之開發等研究工作，以提升素質及更深鑽研相關的研究。
- 6 鉤端螺旋體病是人畜共通的傳染病，保菌的動物宿主是人類感染來源，所以本局不應僅與臨床醫師密切合作，也應與獸醫師、農委會的家畜衛生試驗所及動植物防疫檢疫局、相關的農畜單位建立全面性的合作管道，才可對台灣的鉤端螺旋體病流行現況有全盤性的了解，對防疫工作助益更大。
- 7 布里斯本實驗室在鉤端螺旋體病的研究及檢驗技術方面，其經驗及作法有很多值得我們借鏡之處，因此加強與對方建立長期良好互惠的合作及技術交流管道，將有助於我們實驗室檢驗與研究能量的提昇。
- 8 提昇鉤端螺旋體病研究及檢驗，必須積極參與國際性會議 (現有兩年舉辦一次的鉤端螺旋體病年會，明年將在印度舉辦)，以建立區域性暨全球性的聯絡網路，增進長期之技術合作與知識諮詢關係，達到防疫的目標。