

外來犬科動物人畜共通細菌性及原蟲性疾血清抗體之監測

黃淑敏^{*1}、黃春中¹、楊昀真¹、陳貞志²、裴家騏²、張惟茗¹

¹行政院農委會家畜衛生試驗所

²屏東科技大學野生動物收容中心

摘要 針對台灣地區自國外輸入犬科動物血清，以酵素連結免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)進行洛磯山斑疹熱(*Rickettsia rickettsii*; Rr)、犬艾利希體(*Ehrlichia canis*; Ec)、地中海斑點熱(*Rickettsia conorii*; Rc)、萊姆病(*Borrelia burgdorferi*; Bb)、萊姆病(*Borrelia afzelii*; Ba)及利什曼原蟲症(*Leishmania donovani*; Ld)等血清中 IgG 抗體之監測。結果顯示：居住都市之犬血清中 Rr 抗體陽性率為 29.1%(32/110)、Ld 為 5.5%(6/110)、Ec 為 4.5%(5/110)、Rc 為 6.4%(8/110)、Bb 為 0.9%(1/110)、Ba 為 3.6%(4/110)。居住於山區鄉村之犬血清中 Rr 抗體陽性率為 0%、Ld 為 0.6%(1/179)、Ec 為 5.8%(10/179)、Rc 為 0.6%(1/179)、Bb 為 1.8%(3/179)、Ba 為 1.2%(2/179)。自國外輸入之犬血清中 Rr 抗體陽性率為 15.5%(22/141)、Ld 為 14.8%(21/141)、Ec 為 21.1%(30/141)、Rc 為 10.6%(15/141)、Bb 為 5.6%(8/141)、Ba 為 14.1%(20/141)。抗體力價分析結果顯示：抗體檢測為陽性檢體其抗體力價大都高於 1024 倍。此外，以流產布氏桿菌(*Brucella abortus*)及犬布氏桿菌(*Brucella canis*)之全菌抗原及補體試驗確認所有犬科動物之血清抗體，其結果皆為陰性。由上述結果顯示，自國外境外輸入之犬隻其人畜共通細菌性疾之抗體盛行率普遍高於國內目前居住於都市及鄉村之犬隻，此結果可提供臨床獸醫師疾診斷及第一線防疫人員作為疾防疫政策之參考。

關鍵字：人畜共通性傳染病、犬、酵素連結免疫吸附法

緒言

萊姆病之病原為伯氏疏螺旋體(*B. burgdorferi sensu lato*)，目前已知 11 基因體，至少有 3 種基因種(genospecies)會造成人與動物感染的病原菌，如 *B. burgdorferi sensu stricto*、*B. garinii* 及 *B. afzelii* (8)。臺灣地區犬萊姆病血清盛行率，據前人於 1993 年 9 月至 1994 年 9 月間調查本省 7 縣市地區家犬，結果顯示血清平均陽性盛行率為 9.5%。血清陽性犬隻多集中於臺灣東北部地區，依不同地區分析就

診犬族群其抗體盛行率，以花蓮地區 34.5%最高，臺東地區 12.5%及臺北地區 12.3%次之，高雄地區 3.8%最低(1)。此外，臺灣地區之犬科動物之立克次體之感染症及利什曼原蟲症之血清抗體監測，則無正式報告可供參考。本試驗之研究目的為增加國內外疾資料收集及分析，瞭解目前國內各感受性宿主動物其細菌性及原蟲性之人畜共通性之疾發生情形，擬針對台灣地區自國外新輸入犬科動物血清、居住都市及山區鄉村之犬科動物血清進行洛磯山斑疹

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

熱、地中海斑點熱、萊姆病、萊姆病(*Borrelia afzelii*)及利什曼原蟲症等血清中 IgG 抗體之監測，進一步瞭解動物來源及活動區域之血清中抗體陽性率之差異。其結果可提供臨床獸醫師進行疾病診斷及第一線防疫人員作為疾病防疫政策之參考，以減少疾病外來傳播機會及流行。

材料與方法

血清樣本之採集

犬隻血清樣本來自屏東科技大學野生動物收容中心之野外調查病例，其採樣範圍分布於屏東縣、台南縣及高雄縣山林間及鄉村之犬隻及台大動物醫院及屏東科技大學動物醫院定期送檢之自國外進口新輸入動物血清樣本及本所研究人員定期主動式至臺北市動物防治所管轄之動物之家進行樣品收集之血清檢體。本研究共收集犬科動物共計 430 例，其中居住都市之犬為 110 例、居住於山區鄉村之犬為 179 例、自國外輸入犬隻為 141 例。其中自國外輸入犬隻國家主要有美國(78 例)、加拿大(30 例)、香港(17 例)、泰國(1 例)、菲律賓(8 例)、韓國(3 例)、法國(1 例)、荷蘭(1 例)、南非(1 例)、巴拉圭(1 例)。

血清 IgG 抗體檢測(ELISA)及力價分析：

本試驗犬科動物血清中 IgG 抗體檢測試劑乃採用洛磯山斑疹熱、犬艾利希體症、地中海斑點熱、萊姆病、萊姆病 (*Borrelia afzelii*) 及利什曼原蟲症等市售的酵素連結免疫吸附分析試劑主要來自 Euroclone、Heilca 之 ELISA 產品，其來源詳見表一。其操作方法為將待測血清及試劑上附的陽性及陰性血清，依試劑上要求比例方式予以稀釋，取 100 μ L 加入已覆蓋特異抗原之孔洞內，於 37 $^{\circ}$ C 下感作 30 分鐘後，取 300 μ L 之 wash buffer 沖洗作用盤 5 次，加入 100 μ L 之具標示過氧化酶之兔子抗犬 IgG 結合效素進行結合，最後加入 50 μ L 之呈色劑進行呈色，以波長 450 nm 之免疫效素分析儀進行讀值分析，最後依各說明書上之判定公式進行判別陽陰性。

布氏桿菌檢測試驗用抗原

玫瑰苯凝集試驗(Rose bengal test, RBT)所用抗原為市售之玫瑰苯布氏桿菌檢測試劑，肉用牛、山羊、豬及人的血清檢測為使用英國 VLA 生產之流產布氏桿菌全菌抗原，而犬血清檢測是使用美國 SYNBIOTICS 所生產之犬布氏桿菌全菌抗原。補體結合試驗(Complement fixation test, CFT)在肉用牛、山羊、豬及人的血清檢測所用抗原為日本動物衛生研究所出品之脂多醣抗原，稀釋 100 倍後使用。犬血清檢測用抗原為使用犬布氏桿菌標準菌株 ATCC23365 株依照 WHO 手冊方法配製(2)。補體為採集自天竺鼠之混合血清，分裝存於-70 $^{\circ}$ C，使用之力價為可使測定系統產生 50%溶血之 4 倍強度(即 4 單位)。溶血素為抗綿羊紅血球之免疫球蛋白，所購得之 DIFCO 此類產品，其完全溶血力價約為 2,000 倍，因此採其略高力價，稀釋 1:1,500 使用。敏感紅血球為 3%綿羊紅血球與等量之稀釋溶血素混合，存放於 4 $^{\circ}$ C 感作隔夜之紅血球。以 RBT 作為初步篩檢，檢測時以抗原 0.03 ml 加上血清 0.03 ml 於玻璃板上混合震盪 4 分鐘後觀察凝集情形，任何的可視反應都被認為是陽性反應。判定為陽性者再以 CFT 複檢。CFT 操作為血清先以 60 $^{\circ}$ C 30 分鐘進行非動化，再以緩衝液 Barbitol Buffer Saline 製成 5 倍稀釋液。在 96 孔盤上連續稀釋 5 倍，10 倍，20 倍，40 倍，80 倍，160 倍，320 倍，再順序加入市售稀釋之 1 倍抗原和 4 單位補體後置於 4 $^{\circ}$ C 隔夜作用。加入敏感紅血球搖晃均勻，之後移至 4 $^{\circ}$ C 冰箱 1 小時後進行判讀。判讀分為 5 個等級：4+=完全不溶血，3+=溶血 25%，2+=溶血 50%，1+=溶血 75%及 0=完全溶血。若完全溶血則判定為陰性。

結果

各疾病檢測結果分析顯示

居住都市之犬血清中抗體陽性率分別為洛磯山斑疹熱為 29.1%；利什曼原蟲症為 5.5%；犬艾利希體症為 4.5%；地中海斑點熱為 6.4%；萊姆病為

0.9%；萊姆病(*Borrelia afzelii*)為 3.6%。居住於山區鄉村之犬血清中抗體陽性率分別為洛磯山斑疹熱為 0%；利什曼原蟲症為 0.6%；犬艾利希體為 5.8%；地中海斑點熱為 0.6%；萊姆病為 1.8%；萊姆病(*Borrelia afzelii*)為 1.2%。自國外輸入之犬血清中抗體陽性率分別為洛磯山斑疹熱為 15.5%；利什曼原蟲症為 14.8%；犬艾利希體為 21.1%；地中海斑點熱為 10.6%；萊姆病為 5.6%；萊姆病(*Borrelia afzelii*)為 14.1%，其結果詳見表二。此外，以布氏桿菌(*Brucella abortus*)及犬布氏桿菌(*Brucella canis*)之全菌抗原檢測所有犬科動物之血清抗體，其結果皆為陰性。

血清抗體力價分析：

居住於山區鄉村之犬血清中洛磯山斑疹熱抗體陽性率為 0%、利什曼原蟲症為 0.6%(1/179)、犬艾利希體為 5.8%(10/179)、地中海斑點熱抗體為 0.6%(1/179)、萊姆病為 1.8%(3/179)、萊姆病(*Borrelia afzelii*)為 1.2%(2/179)，上述疾病其抗體力價分析皆大於 1024 倍，除了其中 1 例之犬艾利希體抗體力價小於 4 倍及 1 例之地中海斑點熱抗體陽性血清含量不足而無法進行抗體力價之分析，其結果詳見表三。

自國外輸入之犬血清中洛磯山斑疹熱抗體陽性率為 15.6%(22/141)，其抗體力價分析 17 例大於 1024 倍、2 例大於 256 倍及 3 例因血清含量不足無法檢測；利什曼原蟲症為 14.9%(21/141)，其抗體力價分析 7 例大於 1024 倍、8 例大於 256 倍、1 例大於 64 倍、3 例小於 4 倍及 2 例因血清含量不足無法檢測；犬艾利希體為 21.3%(30/141)其抗體力價分析 20 例大於 1024 倍、3 例大於 256 倍、1 例小於 4 倍及 6 例因血清含量不足無法檢測；地中海斑點熱為 10.6%(15/141)，其抗體力價分析 11 例大於 1024 倍、及 4 例因血清含量不足無法檢測；萊姆病為 5.6%(8/141)，其抗體力價分析 5 例大於 1024 倍及 3 例因血清含量不足無法檢測；萊姆病(*Borrelia afzelii*)為 14.2%(20/141)，其抗體力價分析 19 例大於 1024 倍及 1 例因血清含量不足無

法檢測，其結果詳見表四。

居住都市之犬血清中洛磯山斑疹熱抗體陽性率為 29.1%(32/110)、利什曼原蟲症為 5.5%(6/110)、犬艾利希體為 4.5%(5/110)、地中海斑點熱為 6.4%(8/110)；萊姆病為 0.9%(1/110)；萊姆病(*Borrelia afzelii*)為 3.6%(4/110)，其抗體力價分析皆大於 1024 倍，其結果詳見表五。

討論

萊姆病之病原為伯氏疏螺旋體(*B. burgdorferi sensu lato*)，目前已知 11 基因體，至少有 3 種基因種(genospecies)會造成人與動物感染的病原菌，如 *B. burgdorferi sensu stricto*、*B. garinii* 及 *B. afzelii*。目前犬隻之萊姆病疫苗已成功於美國、德國及捷克共和國等國家上市使用，最近研究報告指出，比較目前上市 5 種疫苗免疫後 1 年，以 ELISA 方法監測其抗體力價發現，只有 Prolyme® 的疫苗在 1 年內可達到最高 500 倍之抗體力價，其餘皆在半年內或 1 年內，由最高 500 倍之抗體力價降至 200 倍(6)，而就本研究結果顯示：且自國外輸入之犬萊姆病抗體陽性率為 5.6%較國內寵物犬(無論是居住都市或山區鄉村)之陽性率為高；此外另一由全鉤硬蜱(*Ixodes persulcatus*)所媒介之萊姆病(*Borrelia afzelii*)基因型之血清抗體亦進行血清抗體監測，亦相同發現自國外輸入犬隻其血清抗體陽性率為 14.2%(20/141)，皆較居住於山區鄉村之犬、居住都市之犬為高。分析其可能原因有三：一為施打疫苗所激起之抗體，二為體內曾受到病原之入侵感染，三為體內重覆感染造成免疫刺激。而相對於台灣地區目前並無推廣使用此疫苗，因此臺灣地區之犬科動物血清中抗體反應結果，應可推測為台灣之犬科動物之宿主體內確實曾遭到病原之入侵感染；而在自國外輸入犬隻其血清抗體盛行率及力價分析部份發現：在萊姆病抗體力價分析之結果，無論是居住於山區鄉村之犬、居住都市之犬及自國外輸入之犬其抗體力價大多大於 1024 倍，此結果之可能原因為自國外輸入之犬隻可能接受疫苗注射之機會較高而體內存有抗體，或再經入關後之

繫留觀察期間可能再次接受到病原之刺激而激發更強之免疫反應，致使抗體力價高於 1024 倍，因此若要進一步確定國外輸入之犬隻體內是否存在病原，應再以分子生物之檢測方法加以補強證據。

自中國犬隻之萊姆病(*B. burgdorferi sensu lato*)血清抗體陽性率為 5.06%(1724/34104)，陽性率高的地區大多分布於山區(7)。在地中海地區國家如西班牙其犬隻血清抗體盛行率亦非常高：Rc 為 56.4%、Bb 為 0.6%、Li 為 30%、Ec 為 16.7%，其推測亦與傳播宿主有關(5)。前人研究進行臺灣地區犬萊姆病血清盛行率，據前人於 1993 年 9 月至 1994 年 9 月間調查本省 7 縣市地區家犬，結果顯示血清平均陽性盛行率為 9.5%(66/696)。血清陽性犬隻多集中於臺灣東北部地區，依不同地區分析就診犬族群其抗體盛行率，以花蓮地區 34.5%(20/58)最高，臺東地區 12.5%(6/48)及臺北地區 12.3%(12/98)次之，高雄地區 3.8%(7/184)最低(1)。此結果與本試驗結果有所類同，因本試驗之山區鄉村犬大都集中於高屏地區山區，其疾病抗體之陽性率較低；而都市犬及國外輸入犬大都分布於北部地區，其疾病抗體之陽性率為高，因此若能增加採樣地點，必能增加數據之代表意義。

本試驗結果發現台北地區之犬科動物體內 Rc 抗

體陽性率高達 29.1%，本病為人畜共通傳染病，對於此監測結果應提醒相關衛生單位之重視及注意。以色列國家進行例行之人畜共通傳染病之監測發現該國之家畜動物體內之 Rc 抗體陽性率很高，因此進一步想瞭解同一村莊之犬隻與人類其血清中 Rc 抗體之相關性，結果發現 Rc 對犬隻比人類具有較高之感受性，因此，可利用犬隻之血清抗體盛行率來當人類暴露於該疾病之危險程度之指標(3)。

由蜱蝨所媒介之疾病如艾利希體及立克次體等，在感染宿主體內嚴重的會有臨床症狀出現，但不管是否有治療，最後宿主體內之免疫大都會形成不完全之免疫保護狀態而形成持續性不顯性感染，因此在許多感染的病例中其病理之變化常於關節、眼睛葡萄膜眼色素層、腎臟、皮膚及中樞神經會有免疫沉積複合物所造成之血管炎及高球蛋白血症(4)。美國自 2000 年開始針對境外輸入犬隻及貓提供相關疾病診斷分析如狂犬病疫苗給予之確定及進入國內前 24-48 小時給予藥物治療，將疾病境外移入之機會降低。結論，建議自國外輸入之寵物犬，可增加上述疾病血清抗體篩選，針對抗體力價高的犬隻於入境前添加抗生素予以治療，將體內病原數降低，以減少上述病原自境外移入入侵之機會。

表 1. 本試驗犬科動物血清中 IgG 抗體檢測試劑之來源：

檢測疾病名稱	檢測試劑品牌	出廠國家
洛磯山斑疹熱 (<i>Rickettsia rickettsii</i>)	Euroclone	義大利
犬艾利希體 (<i>Ehrlichia canis</i>)	Euroclone	義大利
地中海斑點熱 (<i>Rickettsia conorii</i>)	Helica	美國
萊姆病 (<i>Borrelia burgdorferi</i>)	Helica	美國
萊姆病 (<i>Borrelia afzelii</i>)	Helica	美國
利什曼原蟲症 (<i>Leishmania donovani</i>)	Helica	美國

表 2：不同來源之犬血清於各疾病 IgG 抗體檢測結果：

來源/數量	犬科動物血清各疾病 IgG 抗體檢測陽性比例(%)					
	利什曼原蟲症	萊姆病(Ba)	萊姆病(Bb)	洛磯山斑疹熱	地中海斑點熱	艾利希體症
都市犬 (110)	5.5	3.6	0.9	29.1	6.4	4.5
山區鄉村犬 (179)	0.6	1.2	1.8	0	0.6	5.8
國外輸入犬 (141)	14.8	5.6	14.1	15.5	10.6	21.1

表 3：山區鄉村犬血清檢測各疾病血清 IgG 抗體力價之分佈：

疾病名稱	樣本數	陽性數	抗體力價 檢驗數	抗體力價數				
				≥4×	≥16×	≥64×	≥256×	≥1024×
利什曼病原蟲症 (<i>Leishmania donovani</i>)	179	1	1	0	0	0	0	1
萊姆病 (<i>Borrelia afzelii</i>)	179	2	2	0	0	0	0	2
萊姆病 (<i>Borrelia burgdorferi</i>)	179	3	3	0	0	0	0	3
洛磯山斑疹熱 (<i>Rickettsia rickettsii</i>)	179	0	0	0	0	0	0	0
地中海斑點熱 (<i>Rickettsia conori</i>)	179	1	0	0	0	0	0	0
犬艾利希體 (<i>Ehrlichia canis</i>)	179	10	10	1	0	0	0	9

表 4：國外輸入犬血清檢測各疾病血清 IgG 抗體力價之分佈：

疾病名稱	樣本數	陽性數	抗體力價 檢驗數	抗體力價數				
				≥4×	≥16×	≥64×	≥256×	≥1024×
利什曼病原蟲症 (<i>Leishmania donovani</i>)	141	21	19	3	0	1	8	7
萊姆病 (<i>Borrelia afzelii</i>)	141	20	19	0	0	0	0	19
萊姆病 (<i>Borrelia burgdorferi</i>)	141	8	5	0	0	0	0	5
洛磯山斑疹熱 (<i>Rickettsia rickettsii</i>)	141	22	19	0	0	0	2	17
地中海斑點熱 (<i>Rickettsia conori</i>)	141	15	11	0	0	0	0	11
犬艾利希體 (<i>Ehrlichia canis</i>)	141	30	24	1	0	0	3	20

表 5. 都市犬血清檢測各疾病血清 IgG 抗體力價之分佈：

疾病名稱	樣本數	陽性數	抗體力價 檢驗數	抗體力價數				
				≥4×	≥16×	≥64×	≥256×	≥1024×
利什曼原蟲症 (<i>Leishmania donovani</i>)	110	6	6	0	0	0	0	6
萊姆病 (<i>Borrelia afzelii</i>)	110	4	4	0	0	0	0	4
萊姆病 (<i>Borrelia burgdorferi</i>)	110	1	1	0	0	0	0	1
洛磯山斑疹熱 (<i>Rickettsia rickettsii</i>)	110	32	32	0	0	0	0	32
地中海斑點熱 (<i>Rickettsia conori</i>)	110	8	4	0	0	0	0	4
艾利希體 (<i>Ehrlichia canis</i>)	110	5	5	0	0	0	0	5

表 6. 國外輸入犬隻血清來源地區及各疾病血清 IgG 抗體陽性率百分比之分佈

地區	輸入 數量	國外輸入犬隻血清各疾病 IgG 抗體檢測陽性率(%)					
		利什曼原蟲症	萊姆病(Ba)	萊姆病(Bb)	洛磯山斑疹熱	地中海斑點熱	艾利希體症
美國	78	19.2	14.1	7.7	21.8	14.1	21.8
加拿大	30	16.7	10	6.7	6.7	6.7	30
香港	17	0	17.6	0	11.8	5.8	11.8
泰國	1	0	100	0	0	0	0
菲律賓	8	12.5	25	0	12.5	12.5	0
韓國	3	0	0	0	0	0	66.7
法國	1	0	0	0	0	0	0
荷蘭	1	0	0	0	0	0	0
南非	1	0	0	0	0	0	0
巴拉圭	1	0	0	0	0	0	0

參考文獻

1. 嚴一峰。臺灣地區犬萊姆病血清盛行率。家禽世界現代畜殖合訂本11:17-22, 2000。
2. Alton GG, Jones LM, Pietz DE. Laboratory techniques in Brucellosis. 2nd ed, Geneva, WHO, 1975.
3. Harrus SY, Lior, et al. Rickettsia conorii in humans and dogs: a seroepidemiologic survey of two rural villages in Israel. Am J Trop Med Hyg 77(1): 133-135, 2007.
4. Shaw SE, Day et al. Tick-borne infectious diseases of dogs. Trends Parasitol 17(2): 74-80, 2001.
5. Solano GL, Lull et al. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. Vet Res 37(2): 231-44, 2006.
6. Topfer KH, Straubinger RK. Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. Vaccine 25(2): 314-26, 2007.
7. Zhonghua L, Xing B, Xue ZZ. Studies on epidemiology and etiology of Lyme disease in China. 1997 Feb.
8. Saint GI, Gern L, Gray JS, Guy EC, Korenberg, EN, Nuttall PA, Rijpkema SG, Schonberg A, Stanek G, Postic D. Identification of Borrelia burgdorferi sensu lato species in Europe. Zentralbl. Bakteriologie 287: 190-195, 1998.

Serological survey the bacterial and parasitic zoonotic diseases of canines animals which immigrated to Taiwan.

Sue-Min Huang*¹, Chen-Sheng Huang¹, Yun-Chen Yang¹, Chen-chih Chen², Jai-Chyi Pei²,
Wei-Ming Chang¹

*Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan
Institute of Wildlife Conservation, National Pingtung University of Science and Technology*

Abstract This research focus the serological study on the prevalence of *Rickettsia rickettsii* (Rr), *Ehrlichia canis*(Ec), *Rickettsia conorii* (Rc), *Borrelia burgdorferi* (Bb), *Borrelia afzelii* (Ba) and *Leishmania donovani* (Ld) in canine animals which immigrated to Taiwan. Serum samples collected from three different areas. The dogs from the urban areas whose total prevalences were as the followings: Rr (29.1%), Ld (5.5%), Ec (4.5%), Rc (6.4%), Bb (0.9%) and Ba (3.6%). The dogs from rural areas whose total prevalences were as the followings: Rr (0%), Ld (0.6%), Ec (5.8%), Rc (0.6%), Bb (1.8%) and Ba (1.2%). The dogs from different foreign countries whose total prevalences were as the followings: Rr (15.5%), Ld (14.8%), Ec (21.1%), Rc (10.6%), Bb (5.6%) and Ba (14.1%). All the serum was detected by using the antigen of *Brucella abortus*, *Brucella canis* and complement fixation (CF) test to check *Brucella spp* infection and the results show negative. Using the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to analyze the virus titers of the above-mentioned diseases, the results showed the titers were almost higher than 1024 dilution fold. This study indicates the dogs from the foreign countries whose diseases prevalences were higher than those from in domestic urban and rural areas, which can provide serological data that helps the clinical veterinarians and epidemic prevention workers to establish strategies to control the diseases.

Keywords: *zoonotic diseases, dog, Enzyme-linked immunosorbent assay*

* Corresponding Author
Animal Health Research Institute