

高雄縣燕巢鄉恙蟲病新菌株之分離

程兆明

義守大學附設醫院

摘要

叢林型斑疹傷寒是由恙蟲病立克次體所引起的急性熱病。人類是被恙蟲病立克次體感染的恙蟎之幼蟲咬到所致病。恙蟲病立克次體可細分為多種血清型以及亞型。此些抗原差異性乃由位於細胞表面、分子量為 56kDa 之主要表面抗原成分所決定。現今之疫苗只對同型菌株有效，至今未曾發現可誘發對所有菌株皆有保護作用之單一抗原。此研究之目的為探討南臺灣恙蟲病立克次體之菌種，利用基於此 56 kDa 蛋白質的基因為標的之 PCR 方法，發現一具有獨特序列之新菌株，KS-1。

由於特殊之地理條件以及菌種演化，在高雄縣燕巢鄉可能有具獨特致病等之菌株。多了解臺灣地區 *O. tsutsugamushi* 不同菌株之病原性與其分佈對預防醫學會有所助益。未來應探討此菌株之感染性、免疫性等。

關鍵詞：*Orientia tsutsugamushi*，血清型，高雄縣燕巢鄉高雄縣燕巢鄉

引言

叢林型斑疹傷寒俗稱河流熱或水患熱，是由恙蟲病立克次體所引起的急性熱病。恙蟲病立克次體是一種小而專性細胞內寄生且呈革蘭氏染色陰性微生物。這種疾病主要發生在一個大三角地帶，北由日本開始到西南方的澳洲，再到東南方的南太平洋群島〔1,2〕。

人類是被恙蟲病立克次體感染的恙蟎之幼蟲咬到所致病的。恙蟎生活在

民國 94 年 1 月 9 日受理；民國 95 年 2 月 5 日接受刊載
通訊作者：程兆明；聯絡地址：高雄縣燕巢鄉角宿村義大路 1 號
e-mail: jm.cherng@msa.hinet.net

老鼠和其他齧齒類身上，為病原體之媒傳宿主以及儲存宿主。恙蟎是經由卵垂直的將恙蟲病立克次體傳給下一代〔1,2〕。

恙蟲病立克次體攻擊人類的內皮細胞造成血管炎。臨床徵狀主要有丘疹、頭痛、發燒、寒顫和被恙蟎咬處的焦痂。病症可以經由血清試驗來確定。在發病時及發病兩三週後所抽的血清中，發現恙蟲病立克次體專一性抗體有顯著的增加。傳統之確定診斷方法為把病人之血液接種到小白鼠之腹腔內，再從此分離出恙蟲病立克次體〔1,3〕。

恙蟲病立克次體可細分為 Gilliam, Karp, Kato, Shimokoski, Kuroki, 以及 Kawasaki 等血清型〔1,4〕。不同型之恙蟲病立克次體對小白鼠之毒性有很大之差異〔5〕。現今高雄縣燕巢鄉恙蟲病立克次體之分類不詳，而且此地區是否有在醫學上具有重要性之變異血清型仍為未知之數。另現今之疫苗只對同型菌株有效，未曾發現可誘發對所有菌株皆有保護作用之單一抗原。多了解本島之恙蟲病立克次體，對這些可能之變異型之分類及研究，對疾病之預防及治療醫會有所助益〔2〕。

材料與方法

恙蟲病立克次體之培養以及分離

從民國年九十四年六月初至同年九月底由高雄縣燕巢鄉野外鬼鼠(n=216)耳朵上取得之地理恙蟎，以研鉢在含 20 μ g/ml 的 amphotericin B, 100 units/ml 的 penicillin, 150 μ g/ml 的 streptomycin，以及 2% fetal bovine serum 之 MEM 下均質化。此均質接種在一含單層 L929 細胞之小瓶，以 600 xg 將此小瓶離心 30 分鐘以加速恙蟲病立克次體吸附到單層細胞上。經 37°C 培養二天後，將此細胞轉移到另一新的培養瓶。每 3-4 天換一次培養液，繼續培養直到恙蟲病立克次體在細胞內之生長出，並以 Giemsa 染色的塗片染色觀察⁽⁵⁾。

聚合酶連鎖反應

以 DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, California, USA)依製造廠商之指示將基

因體 DNA 抽取，以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 以放大細胞表面之主要表面抗原成分之部份基因，以定其基因型。Nested PCR 第一對引子為 RTS-8 (5'-AGGATTAGAGTGTGGTCCTT-3') 及 RTS-9 (5'-ACAGATGCACTATTAGGCAA-3')；第二對引子為 RTS-6 (5'-GTTGGAGGAATGATTACTGG-3') 以及 RTS-7 (5'-AGCGCTAGGTTTATTAGCAT-3') [4]。PCR 反應混合物含各種 dNTPs 0.25mM, PfuTurbo DNA polymerase 1U，在 1x reaction buffer (Stratagene, California, California, USA)，每種引子 20 pmoles。取前述所抽得的 DNA 之 1 microgram 作為第一次 PCR 之模板，取第一次 PCR 產物之十分之一作為第二次放大之用。Nested PCR 之條件為：第一步驟：94°C 下作用 1 分鐘，55°C 下作用 1.5 分鐘，以及 72°C 下作用 2 分鐘；第二步驟為：94°C 下作用 1 分鐘，55°C 下作用 1 分鐘，以及 72°C 下作用 1 分鐘。第一及第二步驟皆以 Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, New Jersey, USA) 放大 30 週期。然後將所得 DNA 片段轉殖到 pCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen, California, USA)，並以 dideoxy-mediated chain termination 核酸定序法加以分析。

結果與討論

我們分離出一具有獨特序列新的恙蟲病立克次體菌株 (名為 KS-1) [圖 1 以及表 1]。目前已知恙蟲病立克次體可細分為多種血清型以及亞型 [1,4,5]。這些差異性乃由位於細胞表面分子量為 56 kDa 之主要表面抗原成分所決定 [5,6]。此主要表面抗原具有四個具變異性之 domains (由 521-534 胺基酸組成)。這些具變異性之 domains 與血清特異性有關 [1]。目前已知基於此 56 kDa 蛋白質之 PCR 法可作為診斷以及決定基因型之用 [1,2,4,6-9]。

我們對整個 PCR 產物做定序，並與各原型菌株進行對比，我們發現此新

分離出之 KS-1 具獨特序列，其間序列之相同性介於 73-76.4% 表一)。

可能由於氣候等之特殊地理條件以及菌種演化，在高雄縣燕巢鄉可能有具特殊致病性以及免疫性之特異菌株。將來應進一步研究此一新菌株之免疫性、感染性以及新疫苗等之開發。

參考文獻

1. Chang WH. Current status of tsutsugamushi disease in Korea. J Korean Med Sci 1995; 10:227-238.
2. Hornick RB. Rickettsial diseases. In: Bennett JC, Plum F, eds, Cecil Textbook of Medicine, 20th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996:1726-1736.
3. Tamura A, Ohashi N, Urakami H, et al. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. Nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1995; 45:589-591.
4. Horinouchi H, Mural K, Okayama A, et al. Prevalence of genotypes of *Orientia tsutsugamushi* in patients with scrub typhus in Miyazaki Prefecture. Microbiol Immunol 1997; 41:503-507.
5. Ohashi N, Koyama Y, Urakami H, et al. Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype. Microbiol Immunol 1996; 40:627-638.
6. Song HI, Seong SY, Huh MS, et al. Molecular and serologic survey of *Orientia tsutsugamushi* infection among field rodents in southern Cholla Province, Korea. Am J Trop Med Hyg 1998; 58:513-518.
7. Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, et al. Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31:1637-1640.

8. Kawamura A, Murata M, Osono M, et al. Studies on inapparent infection of tsutsugamuschi disease in Izu Shichito Islands: Seroepidemiology and demonstration of an avirulent Rickettsia strain for mice. Jpn J Exp Med 1980; 50:91-105.
9. Seong SY, Park SG, Kim HR, et al. Isolation of a new *Orientia tsutsugamushi* serotype. Microbiol Immunol 1997; 41:437-443.

```
Gilliam - GTTGGAG-----GAATGATTACTGGTGCAGAATCTACTCGCTTGGGA -50
Karp - *****-----*****C*T*****_G***** -40
Kato - ******TCGTTGGAG*****C*T***** -50
Kawasaki - *****-----*****G*****C*T*****G***** -41
Kuroki - *****-----***** -41
Shimokoshi - *****G*-----*G*C**G*****T*****G***** -41
KS-1 - *****-----*****_*****T*_*****_* -38
    ♦♦♦♦♦ ♦          ♦♦ ♦♦♦♦♦ ♦♦♦ ♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦
```

```
Gilliam - TTCAACTGATTCTGAGGGAAAAAAACATTGTCATTAAACAAC-TGGACTG -100
Karp - *C**G*****G***A**C*****C*****_*A***G*** -89
Kato - *C**G*****G**GT**C*****A**C*****C*C**_* -99
Kawasaki - *C**G*****GT***TT*C*****C*****TAT*_** -90
Kuroki - *****_* -90
Shimokoshi - *C**G*****A**T**G*****C*G***T**AAG***_* -90
KS-1 - ****G_***G*****C*****CG*_-*CA*C_*C*G_* -83
    ♦♦♦ ♦♦♦♦♦ ♦♦♦           ♦♦♦♦♦ ♦♦♦♦♦♦ ♦♦♦♦♦ ♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦
```

```
Gilliam - CCATTGGTGGTACATTAGCTGCGGGTATGACAATTGCACCA-GGATTA -150
Karp - *****A**G*G*****A*****C**T***_* -138
Kato - *****A*****C**G***_* -148
Kawasaki - *****C*****G*****A*****T***G**_* -139
Kuroki - *****_* -139
Shimokoshi - *****T*****A*****A*C***G**G**_* -139
KS-1 - *****A*****A*****G*_**T*** -131
    ♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦ ♦♦♦♦♦ ♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦ ♦♦♦♦♦ ♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦
```

```
Gilliam - GAGCAGAGCTAGGTGTTATGTACCTTAGAAATATAAGCGCTGAGGTTGAA -200
Karp - *****A*****C*****CT***C***** -188
Kato - *****G*****GCG**G***AA**A*****G*** -198
Kawasaki - *****G*****A***** -189
Kuroki - ***** -189
Shimokoshi - *****A**A**CC*****TG**CG**AA**A*****A**G -189
KS-1 - *****G**G*****C*****CT***C***** -181
    ♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦ ♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦ ♦♦♦♦♦♦ ♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦♦
```


Karp - ***_**A**AA**ACA-----AGCC***G**T***_**G***_**A** -388
 Kato - ****GA*G-A***AATCACCT**_**TG*TA**CTT*G-*GC**A** -387
 Kawasaki - ***G*****_T*-----**A----***A***_--G***_***** -374
 Kuroki - G*****_**AA**GCA-----**G**T*---*GCT**A** -391
 Shimokoshi - *A*C**A**AG*-----**AG*A----*A** -354
 KS-1 - *****CAA-*TA-----CC---A**G*T***_**A--A*A** -398



Gilliam - TTGAGCA---GCGGGCTGCAGATAGGATTGCTTGGTTGAAGAATTATGCT -500
 Karp - A*****_--A**T*****C*****C*****A*****G**** -437
 Kato - A*ATT*G---**T***AC*****CA***** -435
 Kawasaki - *****_*****A***** -423
 Kuroki - A*C**A*---**T*****C*****C*****A*****G**** -438
 Shimokoshi - ***TGT---**T***T*C***** -405
 KS-1 - A*CCT*TTGTT**T*GATT*CG*****A*AC*G***** -448



Gilliam - GGTATTGACTATATGGTCCCAGATCCTCAGAATCCTAATG---CTAGAGT -550
 Karp - *****G***AAA*A*C**A*TG*****GGC***TG** -487
 Kato - ***G*****T*****A*T*****C*G*---***A* -481
 Kawasaki - *****T*****_--***** -469
 Kuroki - *****GAAG*****A*T*****_--GGCA**TGA* -485
 Shimokoshi - *****TAT**G**G**T**A*T*****C*G*G---***** -450
 KS-1 - *****GAAG*****A*T*****GGGC---AG*TGA* -463



Gilliam - TATAAATCCTGTATTGTTAAATATTACTCAAGGGCCACC-TAAT---GT- -600
 Karp - *****GA*****C*A*_**TA**C***CCT**T -534
 Kato - *G*****A**GC*A*****C*****T**G*_**GC---- -520
 Kawasaki - *G*****G*****G*****_**G***_**_* -508
 Kuroki - GG*****G**G*****C*A*_**A**C***CCT**T -534
 Shimokoshi - *G*****G*****C*****AA-***C***CCT*_ -494
 KS-1 - GG*****C*****T**G*_**GC*---AA- -540



Gilliam - --ACAGCCT-----AGA---C---C---TCG-GCAA---AATC----- -650
 Karp - GG*A*T**_-----*---*GCAG**A*****_**CGCCTGC -568

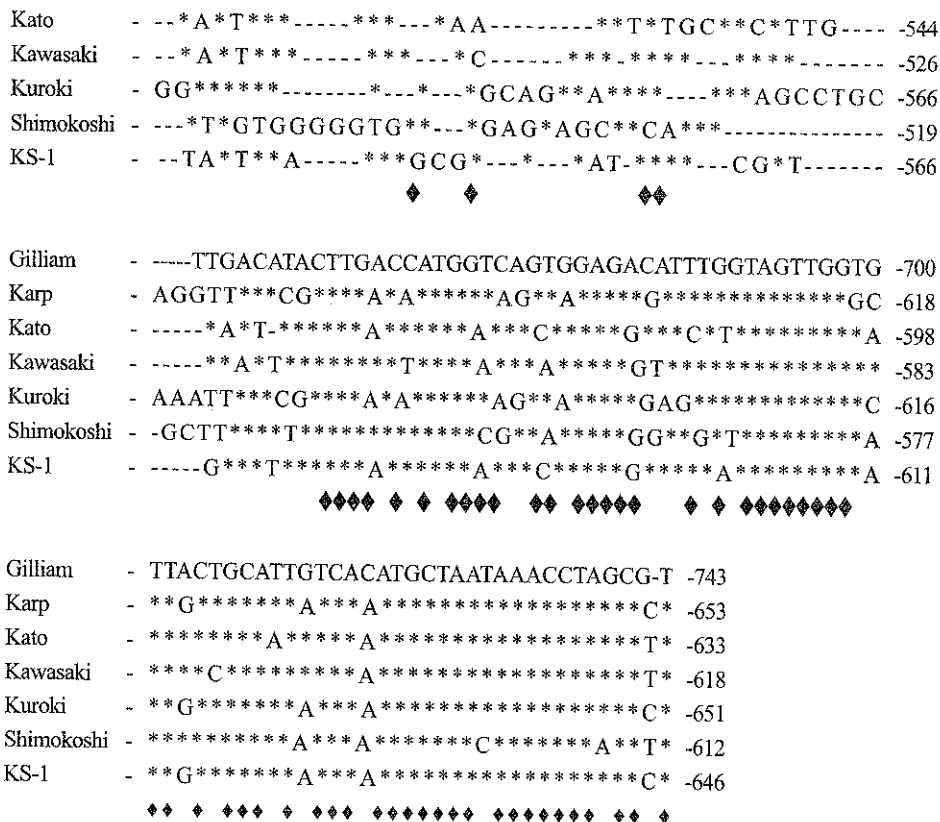


Fig-1 : KS-1 與各種原型恙蟲病立克次體菌株之部分核酸序列之比較。序列是由 KS-1 之 PCR 產物以及相對應之各原型菌株之第一個核酸算起。為了更好的對比，序列的某些部分被中斷。*：顯示相對菌株的核酸與 Gilliam 菌株之核酸相同。◆：顯示相對的所有菌株的核酸皆相同。

表一 KS-1 菌株與各原型恙蟲病立克次體菌株之關係

Strain	Identity (%)	Number of gaps inserted
KS-1		33
Gilliam	74.4	34
Karp	76.3	24
Kato	76.3	25
Kawasaki	78.2	29
Kuroki	77.4	24
Shimokoshi	74.8	26

KS-1 與所示各原型恙蟲病立克次體菌株之相同核酸之數目之百分比以表示其間相同性。核酸間之中斷數目由圖 Fig 1 算出。