

花蓮恙蟲病新菌株之分離

摘要

目的：叢林型斑疹傷寒是由恙蟲病立克次體所引起的急性熱病。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。人類是被恙蟲病立克次體感染的恙 之幼蟲咬到所致病。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 咬處的焦痂。此病症可以作血清學檢驗。恙蟲病立克次體可細分為多種血清型以及亞型。不同型之恙蟲病立克次體對小白鼠之毒性有很大之差異。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。現今之疫苗只對同基體菌株有效，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。材料與方法：利用基於此 56 Kda 蛋白質的基因之 PCR 方法，以探討花蓮之特異恙蟲病立克次體。結果：發現一具有獨特序列之新菌株。結論：由於地理上之隔離，在花蓮可能有具獨特致病性之菌株。多了解本島東部 *O. tsutsugamushi* 原體類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，花蓮

前 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呈革蘭氏染色陰性的微生物。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 之幼蟲咬到所致病的。恙 生活在老鼠和其他齧齒類身上，為病原體之媒介宿主以及儲存宿主。恙 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 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，發現間接螢光抗體有意義的增加。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⁾。現今花蓮恙蟲病立克次體之分類不詳，而且此處是否有對醫學上有重要性之變型仍為未知之數。另現今之疫苗只對同基體菌株有效，未曾發現可誘發對所有菌株皆有保護作用之單一抗原。多了解本島東部特異之恙蟲病立克次體，對這些可能變型之分類以及預防醫學將有所助益⁽²⁾。

材料及方法

恙蟲病立克次體之培養及分離

由花蓮野外老鼠 (n=108) 耳朵上取得之恙 ，以研鉢在含 20μg/ml 的amphotericin B, 100 units/ml的penicillin, 150μg/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 X g 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，將此細胞轉到一新的培養瓶。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獲得以 Giemsa 染色的塗片之證實⁽⁵⁾。

聚合 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 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 Corporation, 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 1/10 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 片段克隆到 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

吾人分離出一具獨特序列新的恙蟲病立克次體菌株 (名為 Hualien-A) [圖 1 以及表 1]。目前已知恙蟲病立克次體可細分為多種對小白鼠具毒性之

血清型以及亞型^(1,4,5)。此些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^(5,6)。此主要表面抗原有四種具變異性之 domains，由 521-534 胺基酸組成。此些具變異性之 domains 與血清特異性有關⁽¹⁾。目前已知基於此 56Kda 蛋白質之 PCR 法可作為診斷以及決定基因型之用^(1,4,6-9)。

吾人對整個 PCR 產物做定序，並與各原型菌株對比。吾人發現此新分離出之 Hualien-A 具獨特序列。此新菌株與其他原型菌株相比，其間序列之相同性介於 74.8~78.2%（表一）。

由於地理上之隔離，台灣東部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。

撰稿者：程兆明¹、王志鴻¹、高德亨²、林孝義³、王崇任⁴、王立信¹

1 花蓮佛教慈濟綜合醫院內科

2 財團法人國泰綜合醫院風濕科

3 國立陽明大學過敏免疫風濕科

4 國立成功大學內科

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.

表一 Hualien-A 與各原型恙蟲病立克次體菌株之關係。Hualien-A 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 1 算出

Strain	Identity (%)	Number of gaps inserted
Hualien-A		25
Gilliam	76.4	31
Karp	76.3	21
Kato	76.3	24
Kawasaki	78.2	26
Kuroki	77.4	17
Shumokoshu	74.8	21