

封面樣式

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000115

衛生福利部疾病管制署 104 年署內科技研究計畫

計畫名稱：立克次體傳染病快速檢驗試劑之研發

年度/全程研究報告

執行單位：研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：楊素鈴

研究人員：楊素鈴、呂琇瑩、陳湘妃、舒佩芸

執行期間：104 年 1 月 1 日至 104 年 12 月 31 日

目 錄

	頁碼
封面	
目錄	
壹、摘要	
一、中文摘要	3
二、英文摘要	4
貳、本文	
一、前言	5
二、材料與方法	9
三、結果	15
四、討論	17
五、結論與建議	18
六、重要研究成果及具體建議	19
七、參考文獻	20
八、圖、表	25

共 28 頁

一、中文摘要

恙蟲病是由 *Orientia tsutsugamushi* 所引起。立克次體感染引起急性高燒、淋巴結腫大等臨床症狀，有時會併發肺炎或肝功能異常。恙蟲病在台灣一年約有400-500例恙蟲病發生。恙蟲病的臨床症狀和許多病原體 (*leptospirosis, murine typhus, malaria, dengue fever* 及 *viral hemorrhagic fevers*) 的感染都會引發類似的徵兆及症狀，難於區別。因此常見恙蟲病的誤診或延誤了正確治療時機。目前立克次體的實驗室診斷主要以免疫螢光染色法去偵測病人血清抗體來判讀，但需要有經驗的技術人員及較長的檢驗時間，且需在 Biosafety Level III 等級實驗室培養恙蟲病極不易培養，約需2-3個星期。建立ELISA系統可用 *E. coli* 大量製備 immunodominant protein TSA56，且不需在三級實驗室即可獲得 diagnostic antigen。係屬較為安全穩定，易於純化等優勢。因此本計劃選殖立克次體之主要抗原 TSA56, ompB 的基因片段，在細菌系統下表現 TSA56, ompB 重組蛋白質，篩選出最佳的高親和性抗原，建構酵素免疫分析法及免疫色層分析法。並研發提高試驗的靈敏度及專一性。使能在病人急性期全血或血清中快速檢驗出病原抗體，應用於疾病的早期診斷及流行病學的研究，這對立克次體傳染病之防治工作是極為重要。

關鍵詞：恙蟲病、免疫螢光染色法、酵素免疫分析法、免疫色層分析法

二、英文摘要：

Scrub typhus is caused by infection with *Orientia tsutsugamushi*. The symptoms of Rickettsial infection include acute fever and lymphadenopathy, pneumonia and liver function abnormalities. Every year, approximately 5000 suspected cases were analyzed in CDC, in which approximately 400 to 500 were the confirmed cases. The clinical symptom of scrub typhus is non-specific, similar to *leptospirosis*, *murine typhus*, *malaria*, *dengue fever* and *viral hemorrhagic fevers* infection. Accordingly, the misdiagnosis and delayed treatment of Scrub typhus is not unusual. At present, the laboratory diagnosis of rickettsial mainly relies on immunofluorescence staining to detect patient's serum antibodies. The IFA assay is conducted by an experienced technical staff, is time consuming and need at Biosafety III level facility to propagate the pathogen. Therefore, development of a high sensitive and specificity enzyme immunoassay test system is urgently needed. To develop the diagnostic system, we clone the rickettsia major antigens including TSA56, ompB for productions of recombinant proteins in an *E.coli* protein expression system. Subsequently, the high-affinity antigen will be determined by patient's serum and used to construct the diagnostic system. The main objective of this project is to establish a rapid diagnostic system, including enzyme immunoassay, immune layer chromatography test and ELISA; enable rapid confirms the Rickettsial infection and is used in the early diagnosis and epidemiological studies to control rickettsial diseases.

Key words: *Orientia tsutsugamush*, , immunofluorecence, enzyme immunoassay, immuno-chromatography

貳、計劃內容

一、前言

恙蟲病為患者遭帶有病原 *Orientia tsutsugamushi* 之恙蟲幼蟲叮咬，所引起的急性傳染性疾病。恙蟲病的潛伏期約1-2週，通常為9-12天，特徵為在螫口處形成特有的無痛性洞穿式潰瘍性焦痂 (eschar)，主要臨床症狀包括發熱、頭痛、肌肉酸痛、紅疹與淋巴結病變等症狀。恙蟲病之地理分佈，北由日本北部與俄羅斯東部，南至澳洲北部與西太平洋群島，西至阿富汗均有病例發生。雖然恙蟲病可藉由抗生素治療而痊癒，但由於錯誤的診斷與抗生素的選用不當，世界上每年仍有零星致死的案例發生。台灣在1955年將此病列為通報傳染病，現歸類為第四類傳染病。台灣地區的恙蟲病近年來每年約有400-500個確定病例，在各縣市均有病例報告，主要是在金門縣、台東縣、花蓮縣、高雄縣市及南投縣，發生月份以每年5月至10月較多，感染的年齡層多為20~29歲。台灣地區的傳播媒介主要為地里恙蟎 (*Leptotrombidium deliense*)。恙蟲的動物宿主主要為啮齒類 (rodent)，哺乳類 (羊、豬、狗、貓)，鳥類 (鳥、雞) 等，其中又以啮齒類為最主要的宿主，依據文獻報導 *Orientia tsutsugamushi* 之主要抗原蛋白質為TSA56，本計劃將從台灣近年來流行菌株cloning主要抗原蛋白質TSA56表現純化，利用此抗原應用於ELISA及ICT系統，提高診斷的正確性及即時性。

地方性(鼠蚤型)斑疹傷寒為*Rickettsia typhi*引起的疾病，其病程和人蝨型（流行性）斑疹傷寒類似，有頭痛、惡寒、疲勞、發燒、全身性疼痛和出疹等現象，但病情較流行性斑疹傷寒溫和。現歸類為第四類傳染病。在各年齡層的致死率依年齡增加而遞增，但均小於1%。實驗室診斷通常用IFA鑑定。台灣地區有散發性病例，日據時期又稱為兩週熱。傳染窩為鼠類和一些小哺乳類動物，在自然界以鼠—蚤—鼠的循環方式維持傳播，此時鼠為傳染窩。地方性斑疹傷寒立克次體在老鼠為不顯性感染，傳染方式為具有傳染性的鼠蚤在吸血時排出立克次體而污染了叮咬部位或其他新鮮的皮膚傷口，進而造成感染，偶爾也有因吸入了乾的蚤糞而感染的病例。小袋鼠、貓和其他野生或家中動物均可受感染，通常具有自限性，但這些動物可傳播具有傳染性的蚤類給人類。貓蚤(*Ctenocephalides felis*)也是一種可能的媒介，一旦感染，在蚤體中終生維持(可長至一年)。人感染後潛伏期約1—2週，通常為12天，並不會直接由人傳染給人。如因災難而導致人口聚集、衛生條件不良，且人、鼠和蚤密集共存時，有可能發生流行，且在這種狀況下，一般會併有其他疾病同時流行。依據文獻報導其主要抗原蛋白質為omp B，本計劃將cloning主要抗原蛋白質omp B，並表現純化，將利用此抗原應用於ELISA及ICT系統，並研發提高診斷的正確

性及即時性。

立克次體實驗室的診斷方法主要分為三類：

(i) **細菌分離及培養**；傳統的方法將菌種或檢體接種到實驗動物如天竺鼠、大白鼠、倉鼠或雞胚胎等，但目前以細胞培養方法最為常用。培養出之細菌可再以細菌型別特異性(serotype-specific)之單株抗體做免疫螢光染色，以確知被感染細菌之血清型，但因檢體需接種至細胞株培養至少20天後才能進行免疫螢光染色判讀，檢驗流程耗費時日是其缺點。

(ii) **PCR方法**；可以偵測血液、組織等檢體之細菌核酸分子，可縮短檢驗時間，提升確診時效。傳統的Nested PCR檢驗方法有易污染及需要較長檢驗時間的缺點，並不可靠。近年來，螢光定量PCR方法已被廣泛的使用於許多傳染病的常規檢驗，是目前分子診斷發展中最有效的檢驗方法，但仍有偽陽性的疑慮。

(iii) **血清學方法**；傳統的方法如Weil-Felix test，其原理為立克次體病人產生之抗體可與腸細菌*Proteus*屬的菌種有交叉結合反應

(cross-reaction)，如Typhus group (*Rickettsia prowazekii*, *R. typhi*)及*R. rickettsii*可與*P. vulgaris* OX19反應，Spotted fever group 之菌種可與*P. vulgaris* OX2反應，*O. tsutsugamushi*則可與*P. mirabilis* OXK反應。但此

方法缺乏靈敏度及專一性，且有高的偽陽性及偽陰性機率，並不建議使用。目前最常用的立克次體血清學診斷方法為微量免疫螢光染色法(MIF)，這種方法的可信度較高，但在區分不同Spotted fever group菌種時，仍有困難。

因此本計劃選殖立克次體之主要抗原TSA56, ompB的重組蛋白質，在細菌系統下表現TSA56, ompB蛋白質，篩選出最佳的高親和性抗原，建置**(1) 酵素免疫分析法**，因具有高的靈敏度、特異性、再現性與可自動化的優點，是目前許多實驗室正在努力開發的方法。**(2) 免疫色層分析法檢驗方法**，因具有即時性，不需特殊的儀器，操作簡便，能迅速得到檢測結果。並研發提高試驗的靈敏度及專一性。使能在病人急性期全血或血清中快速檢驗出病原抗體，有助於快速檢測出傳染病病源，可對及早給予病人正確的醫療照顧，並進行防疫措施，這對立克次體傳染病之防治工作是極為重要。

二、材料與方法

- 1. 檢體及細菌株：**血液檢體來源為通報自疾病管制署之各種立克次體傳染病之疑似病例血液。全部檢體（含Heparin或EDTA之全血5~10c.c.及血清3c.c.）皆由各地區衛生所或醫院之醫護人員使用無菌空針採取血樣，並分別注入符合標準之特製無菌真空採血管內，以保持低溫之國內快捷郵件寄送或由專人親送方式送達實驗室。而實驗室於收到檢體後立即置於4°C冰箱內靜置保存，隨後進行後續之檢驗分析事項。細菌株為疾病管制局歷年來立克次體分離方法所得者。原型菌株 (prototype)，Gilliam、Karp、Kato等為購自ATCC。病人血清及血液檢體包括急性期(症狀出現後0-7天)、早恢復期(症狀出現後8-13天)、晚恢復期(症狀出現後14-30天)之檢體。病人檢體收集後，將進行病原分離、血清學及分子生物學之實驗室診斷，以確認感染源。不同期血清，將用以分析病人對各種抗原之抗體反應，如抗體之效價、種類、特異性及動力學變化，建立免疫保護力及免疫病理機轉之相關性。經實驗室確診為陽性反應之檢體將加以分裝，儲存於 -80。C冷凍櫃長久保存。
- 2. 立克次體分離法：**檢體為病患急性期（1~7病日）含heparin(10U/mL)之全血，分離出周邊血液單核細胞（PBMC），

再將其接種至L929或HEL 細胞株 (shell-vial細胞培養瓶)。每隔3~4天更換培養基，並觀察是否有細胞病變發生，並以間接免疫螢光法偵測是否有立克次體生長。2週後若無立克次體生長，則將細胞凍解3次後再行細胞株接種1-2次。所有實驗過程應於P3實驗室生物安全操作台內操作，慎防感染自己及他人。培養基中不可添加四環黴素及氯黴素等抗生素。

3. 血液標本及細胞培養製備立克次體DNA：以ROCHE High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat. No. 11 796 828 001) 萃取病人檢體全血或細胞培養之細菌DNA核酸。首先取加抗凝血劑之全血200 μ l，與200 μ l之Binding Buffer均勻混合後，再加入40 μ l Proteinase K，以震盪器混合均勻，置於70°C水浴槽加熱10分鐘。再加入isopropanol 100 μ l均勻混合後，加到High Pure Filter Tube以8,000 x g離心1分鐘。置換High Pure Filter Tube至新的Collection Tube後，加入500 μ l之Inhibitor Removal Buffer，以8,000 x g離心1分鐘。再置換High Pure Filter Tube至新的Collection Tube後，加入500 μ l之Wash Buffer，以8,000 x g離心1分鐘，重複此步驟再wash一次。置換High Pure Filter Tube至新的Collection Tube後，以13,000 x g離心1分鐘，將High Pure Filter Tube上殘留的廢

液甩乾淨。最後將High Pure Filter Tube放至新的ependorf，加入50 µl預熱70°C的Elution Buffer，靜置10分鐘，以8,000 x g離心1分鐘，ependrof中的液體即為欲萃取之DNA。

4. 引子(Primer)的設計與合成：引子的設計可依不同的需要而定，其功能是在有效地擴增模版DNA序列，引子(Primer)的設計與合成將依不同抗原選定，進行PCR。

5. 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)以立克次體基因為template，設計不同的primers加入反應試劑內，進行PCR反應。取1ul cDNA加入含有2X buffer Mix(50mM KCl、10mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、dNTP mixture 1mM)、5 units *Taq* polymerase 共50uL，於94°C變性(denature)10分鐘後，以94°C：30秒、60°C：30秒、72°C：1分鐘，進行30次反應（上述反應依不同primer特性而有不同的溫度及反應設定），最後在72°C作用10分鐘。經PCR增幅放大之TSA56產物片段，須以DNA電泳確認產物大小。及DNA sequencing確認基因正確方能進一步表現及純化重組蛋白質。

6. TSA56重組蛋白質之製備與純化：主要是以大量表現於恙蟲病立克次體細胞膜上的蛋白質，如*O. tsutsugamushi*的tsa56kD及斑疹

傷寒、斑點熱之omp A、omp B gene為標的，構築質體（PET-47B plasmid）表現其基因重組蛋白質。由於大腸桿菌可提供便宜、快速且能大量生產蛋白質的多種優點，本計畫將採用大腸桿菌表現重組蛋白質。首先利用PCR得到tsa56kD gene或omp A、omp B genes 的DNA片段。將此DNA片段選殖至pET表現系統(Novagen)，產生N端為His-tag的全長或片段重組蛋白質。將質體構築完成後，轉殖至蛋白質表現系統BL-21（DE3），以1 mM IPTG誘導標的蛋白質產生。抽取該菌液蛋白質後，利用AKTA液相色層分析儀（LPLC）將不同分子量分子加以分離，再將純化後收集之蛋白質溶液混合後，以梯度透析及PEG濃縮等方法，得到純化之重組蛋白質。再利用mAb against His-tag(正對照組)、老鼠抗立克次體單株抗體等，決定重組蛋白質是否帶立克次體抗原決定位置(Western blot, Immuno-precipitation)。再大量表現、純化之，並利用ELISA的方法評估其發展ELISA檢驗試劑之可能性。並將有潛力的各種重組蛋白質片段，做適當的混合(cocktail)，製成更高靈敏度、高專一性的酵素免疫診斷試劑。

- 7. 蛋白質電泳(SDS-PAGE)及西方墨點法(Western blot)：**純化之樣品以8%梯度的正十二烷硫酸鈉一聚丙烯醯胺膠體，在電壓165

伏特之下做電泳分離45分鐘，之後以Coomassie blue染色方式分析蛋白質電泳的情況。純化之樣品經過蛋白質電泳後，利用Semi-phor半乾式轉移槽，將蛋白質樣品由膠體轉移至硝酸纖維膜上，加入5%脫脂奶粉溶液於纖維膜上，震盪30分鐘後以0.1% Tween20/PBS清洗之後加入經過適當稀釋的蛇毒抗體於纖維膜上，在37°C保溫箱中作用2小時，以0.1% Tween20/PBS清洗三次來清除未結合之抗體。加入適當稀釋之HRP-conjugated goat anti-mouse IgY抗體，在37°C保溫箱中作用1小時，以0.1% Tween20/PBS清洗三次來清除未結合之抗體。將TMB置於纖維膜上，震盪5-10分鐘，待其呈色後以去離子水洗淨纖維膜上，並觀察染色情形。

- 8. Indirect IgM and IgG ELISA :**先以5 μ g/ml, 100 μ l/well of 單株抗体在4°C下隔夜吸附(coating)在96孔微量效價盤上。再用200 μ l之1% 牛血清白蛋白緩衝液(1% Bovine serum albumin in PBS)於37°C下進行1小時blocking作用。以PBS清洗後，將立克次體抗原稀釋後加入， 37°C下反應1小時。以PBS清洗後，加入1:100稀釋好的待測血清及對照血清反應1小時。加入1:1000稀釋之山羊抗人IgM或IgG抗体-鹼性磷酸酶結合體，於37°C反應1小時。加入酵素

受質體，於室溫作用30分鐘，再以波長405 nm測吸光度。

三、 結果

1. 目前已選出並分離近年台灣立克次體傳染病流行主要菌株，主要為 TW1, TW10, TW19 及 TW22 菌株，以及 worldwide phototype strains Karp, Gilliam 與 Kato 菌株 (**Fig.1**)。

2. 恙蟲病最重要的抗原是 TSA56 蛋白質，全長為 56Kda，前面 N 端序列為 signal peptide，C 端為 transmembrane domain，因此設計 specific primer 使能涵蓋 TSA56 的抗原區域(20-458 aa)進行聚合酶鏈鎖反應(**Fig.2**)。再與載體 PET47b 以限制酵素(BamHI 及 XhoI)作用，進行 ligation 轉至 E.coli 細菌內。挑出 single colony 抽取 DNA 確認 insert 有 ligation 至載體。同時確認所選殖的 clone 其 DNA 序列正確。
3. 將成功轉殖的 TSA56 基因，以 1mM IPTG induction 在 37°C 予以表現，以 1 小時，3 小時及 5 小時做 time course 分析，結果發現在 37°C, 3 小時即可大量表現出重組 TSA56 蛋白質，再以 His resin 純化蛋白質 (**Fig.3**)。所純化 TSA56 皆能被 anti-his tag Ab 及專一性 TSA56 Ab 所辨識(**Fig.4A, 4B**)；另以恙蟲病病人血清亦能辨識到 TSA56 蛋白質，而正常血清則無法辨識，顯示所表現出的重組蛋白質 TSA56 具有特異的抗原性能被專一性抗體及病人血清所確認及辨識 (**Fig.4C**)。
4. 進行地方性斑疹傷寒最重要的抗原 ompB cloning，因 ompB 蛋白質全長為 1645 個 aa，因此將 OmpB 分成 3 段做 cloning。第一段 ompB1 序列為 31-280aa；第二段 ompB2 序列為 261-760aa；第三段 ompB3 序列為 740-1354aa (**Fig 5A**)；以 specific primer 對 ompB1, ompB2, ompB3 進行聚合酶鏈鎖反應。再與載體 PET47b 以限制酵素(BamHI 及 XhoI)作用，

進行 ligation 轉至 E.coli 細菌內。挑出 single colony 抽取 DNA 確認 insert 有 ligation 至載體。同時確認 ompB1, ompB2 所選殖的 clone 其 DNA 序列正確。以 1mM IPTG 在 37°C induction 3 小時再以 N-NTA resin 純化蛋白質(**Fig.6A**)，所純化 ompB1, ompB2, ompB3 可以用特異性抗體 anti-his antibody 偵測辨識 (**Fig.6B**)。

5. 純化出來的 TSA56 coating 在 ELISA strip 進行 ELISA 測試結果，以 IFA 作為 golden standard 作平行比對，用 106 個陽性血清及 90 個陰性血清實驗測試結果：IgG ELISA 的 sensitive 為 94%，specificity 為 96%，PPV 為 97.3%，NPC 為 92.9% (**Table1**)。IgM 的 ELISA sensitive 為 96.7%，specificity 為 97.6%，PPV 為 97.8%，NPC 為 96.4% (**Table2**)。

四、討論

目前立克次體的實驗室診斷以免疫螢光染色法為診斷依據，除了需要有經驗的技術人員，尚須有精密的螢光顯微鏡儀器設備。目前台灣每年約有 4500 案疑似檢體須檢驗，若依免疫螢光染色法診斷，檢驗中的檢體除了需經有經驗、受過專業訓練的技術人員判定之外，

也因檢驗數量龐大，亦會耗費大量人力及較長的檢驗時間來完成，且免疫螢光染色法需在 Biosafety Level III 等級實驗室培養恙蟲病極不易培養，約需 2-3 個星期，實著不易。本計畫目的在建立 ELISA 系統以 E.coli 大量製備 immunodominant protein TSA56，不需在三級實驗室即可量產獲得 diagnostic antigen. 係屬較為安全、穩定，易於純化等優勢且能自動快速檢測。並具有極高的靈敏度、特異性、再現性、可快速自動化的優勢。

除了建置酵素免疫分析法可自動快速檢測外，未來將進一步評估 ELISA 系統成本效益分析及獨立驗證的結果作為對照。持續性進一步積極開發免疫色層分析法，使具有即時性(point of care)，不需特殊的儀器，操作簡便，即能迅速得到檢測結果，可及早給予病人正確的醫療照顧，進行防疫措施，這對立克次體傳染病之防治工作是極為重要。

五、 結論與建議

目前我們已成功表現恙蟲病 *Orientia tsutsugamushi* 不同菌株涵蓋 worldwide phototypes Karp、Kato 及 Gilliam 及台灣 local strains TW1, TW10, TW19, TW22 共七種血清型別之 Tsa 56 kDa 的重組蛋白質，斑疹傷寒 omp B gene 的重組蛋白質表現純化，該蛋白質抗原的

專一性及特異性可用 anti-his Ab, 專一性 TSA56 及病人血清能確認其抗原性。最後建置 ELISA 系統，將純化出來的 TSA56 coating 在 ELISA strip 進行 ELISA 測試結果，以 IFA 作為 golden standard 作平行比對結果：IgG ELISA 的 sensitive 為 94%，specificity 為 96%，PPV 為 97.3%，NPC 為 92.9% (**Table1**)。IgM 的 ELISA sensitive 為 96.7%，specificity 為 97.6%，PPV 為 97.8%，NPC 為 96.4%。實驗結果顯示這些純化蛋白質 TSA56 具有作為 diagnostic antigens 潛能，除了建置酵素免疫分析法可自動快速檢測外，未來將進一步積極開發免疫色層分析法，使具有即時性(point of care)，不需特殊的儀器，操作簡便，即能迅速得到檢測結果，及早進行防疫措施。

六、重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

我們建置 indirect IgG 及 IgM ELISA 系統，結果發現具有優異的敏感性與特異性，較傳統的 IFA 方法安全穩定，亦可大量自動篩選出疑似檢體，有效縮短檢驗時間。除了開發 ELISA 系統外，未來將進一步開發 point of care 免疫色層分析法，使具有即時性(point of care)，不需特殊的儀器，操

作簡便，能在最短 10 分鐘內迅速得到檢測結果，及早進行防疫措施

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

加強衛教宣導、鼓勵醫師通報等防疫措施可及早發現立克次體傳染病，對於非特異性、無症狀之患者，能及早進行篩檢診斷，避免病患延誤就醫減少惡性病情發展。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

由於國際間交通往來頻繁、氣候變遷等因素，各種人畜共通傳染病如恙蟲病、地方性斑疹傷寒、發熱伴血小板減少綜合症、斑點熱、人粒細胞無形體、艾利希氏體症、病蜱媒腦炎病毒等已成為目前全球公共衛生防疫上的重大問題，建議應積極加強境外及本土人畜共通傳染病之監測。

七、參考文獻：

1. 陳慧玲、謝國珍、陳豪勇等。由病人血液中分離台灣地區 *Rickettsia tsutsugamushi* 之探討台灣醫誌。94 (suppl2) :S112-119，1995
2. Chang WH, Kang JS, Lee WK, Choi MS, Lee JH. Serological classification by monoclonal antibodies of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated in Korea. J Clin Microbiol 28:685-688, 1990.
3. Chang WH. Current status of tsutsugamushi disease in Korea. J Korean Med

Sci 10:227-238, 1995.

4. Ching WM, Wang H, Eamsila C, Kelly DJ, Dasch GA. Expression and refolding of truncated recombinant major outer membrane protein antigen (r56) of *Orientia tsutsugamushi* and its use in enzyme-linked immunosorbent assays. Clin Diagn Lab Immunol 5:519-526, 1998.
5. Ching WM, Rowland D, Zhang Z, Bourgeois AL, Kelly D, Dasch GA, Devine PL. Early diagnosis of scrub typhus with a rapid flow assay using recombinant major outer membrane protein antigen (r56) of *Orientia tsutsugamushi*. Clin Diagn Lab Immunol 8:409-414, 2001.
6. Coleman RE, Sangkasuwan V, Suwanabun N, Eamsila C, Mungviriyaya S, Devine P, Richards AL, Rowland D, Ching WM, Sattabongkot J, Lerdthusnee K. Comparative evaluation of selected diagnostic assays for the detection of IgG and IgM antibody to *Orientia tsutsugamushi* in Thailand. Am J Trop Med Hyg 67:497-503, 2002.
7. Enatsu T, Urakami H, Tamura A. Phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* strains based on the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. FEMS Microbiol Lett 180:160-169, 1999.
8. Jang WJ, Huh MS, Park KH, Choi MS, Kim IS. Evaluation of an immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Orientia tsutsugamushi* infection. Clin Diagn Lab Immunol 10:394-398, 2003.
9. Jang WJ, Kim JH, Choi YJ, Jung KD, Kim YG, Lee SH, Choi MS, Kim IS, Walker DH, Park KH. First serologic evidence of human spotted fever group Rickettsiosis in Korea. J Clin Microbiol 42:2310-2313, 2004.
10. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: current

- approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 35:2715-2727, 1997.
11. Mahara F. Japanese spotted fever: report of 31 cases and review of the literature. *Emerg Infect Dis* 3:105-111, 1997.
 12. Mediannikov OY, Sidelnikov Y, Ivanov L, Mokretsova E, Fournier PE, Tarasevich I, Raoult D. Acute tick-borne Rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian far east. *Emerg Infect Dis* 10:810-817, 2004.
 13. Oaks EV, Rice RNM, Kelly DJ, Stover CK. Antigenic and genetic relatedness of eight *Rickettsia tsutsugamushi* antigens. *Infect Immun* 57:3116-3122, 1989.
 14. Odorico DM, Graves SR, Currie B, Catmull J, Nack Z, Ellis S, Wang L, Miller DJ. New *Orientia tsutsugamushi* strain from scrub typhus in Australia. *Emerg Infect Dis* 4: 641-4, 1998.
 15. Ohashi N, Fukuhara M, Shimada M, Tamura A. Phylogenetic position of *Rickettsia tsutsugamushi* and the relationship among its antigenic variants by analyses of 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* 125: 299-304, 1995.
 16. Qiang Y, Tamura A, Urakami H, Makisaka Y, Koyama S, Fukuhara M, Kadosaka T. Phylogenetic characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan according to the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. *Microbiol Immunol* 47:577-583, 2003.
 17. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 10:694-719, 1997
 18. Saisongkroh W, Chenchittikul M, Silpapojakul K. Evaluation of nested PCR for the diagnosis of scrub typhus among patients with acute pyrexia of

- unknown origin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98:360-366, 2004.
19. Sekeyova, Z., V. Roux, and D. Raoult. 2001. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1353-1360.
 20. Shirai A, Coolbaugh JC, Gan E, Chan TC, Huxsoll DL, Groves MG. Serologic analysis of scrub typhus isolates from the Pescadore and Philippine Islands. *Jpn J Med Sci Biol* 35: 255-9, 1982
 21. Stover CK, Marana DP, Dasch GA, Oaks EV. Molecular cloning and sequence analysis of the *sta58* major antigen gene of *Rickettsia tsutsugamushi*: Sequence homology and antigen comparison of *sta 58* to the 60-kilodalton family of stress proteins. *Infect Immun* 58:1360-1368, 1990.
 22. Tamura A, Ohashi N, Koyama Y, Fukuhara M, Kawamori F, Otsuru M, Wu PF, Lin SY. Characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan by immunofluorescence and restriction fragment length polymorphism analyses. *FEMS Microbiol Lett* 150: 225-31, 1997.
 23. Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Miyamura S. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45: 589-91, 1995.
 24. Tay ST, Rohani MY, Ho TM, Devi S. Expression of recombinant proteins of *Orientia tsutsugamushi* and their applications in the serodiagnosis of scrub typhus. *Diag Micro Infect Dis* 44:137-142,2002.
 25. Tselentis Y, Psaroulaki A, Maniatis J, Spyridaki I, Babalis T. Genotypic identification of murine typhus *Rickettsia* in rats and their fleas in an endemic area of Greece by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 54: 413-7, 1996.

26. Wang YC, Jian TY, Tarn LJ, Hung YW, Chao HY, Ji DD, Liu HW.
Development of a recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay and its applications in field surveillance of rodent mice for presence of immunoglobulin G against *Orientia tsutsugamushi*. Clin Diagn Lab Immunol 10:451-458, 2003.
27. Zhang JZ, Fan MY, Wu YM, Fournier PE, Roux V, Raoult D. Genetic classification of “*Rickettsia heilongjiangii*” and *Rickettsia hulinii*,” two Chinese spotted fever group Rickettsiae. J Clin Microbiol 38:3498-3501, 2000.
28. Oh J. S., Ha G. W., Cho Y. S., Kim M. J., An D. J., Hwang K. K., Lim Y. K., Park B. K., Kang B., Song D. S. One-step immunochromatography assay kit for detecting antibodies to canine parvovirus. Clin Vaccine Immunol. 2006; 13(4):520-524.
29. Rajerison M., Dartevelle S., Ralafiarisoa L. A., Bitam I., Tuyet D. T., Andrianaivoarimanana V., Nato F., Rahalison L. Development and Evaluation of Two Simple, Rapid Immunochromatographic Tests for the Detection of *Yersinia pestis* Antibodies in Humans and Reservoirs. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(4):421.
30. Mikawa A. Y., Santos S. A., Kenfe F. R., da Silva F. H., da Costa P. I. Development of a rapid one-step immunochromatographic assay for HCV core antigen detection. J Virol Methods. 2009; 158(1-2):160-164.
31. Zhou Y., Pan F. G., Li Y. S., Zhang Y. Y., Zhang J. H., Lu S. Y., Ren H. L., Liu Z. S. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples. Biosens Bioelectron. 2009; 24(8):2744-2747.

八、圖、表

Phylogenetic tree of TSA56

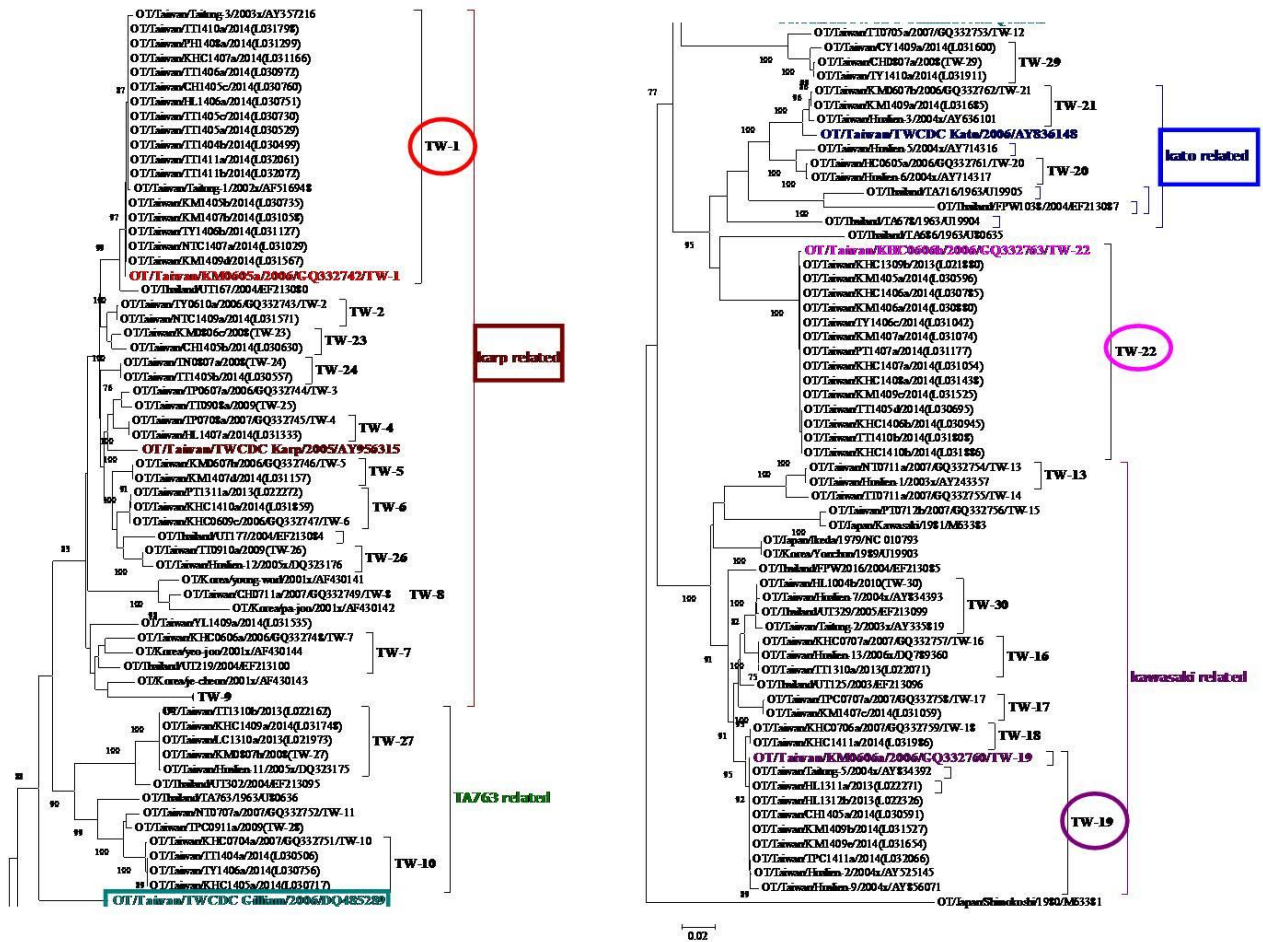


Fig. 1. Phylogenetic tree of the TSA56

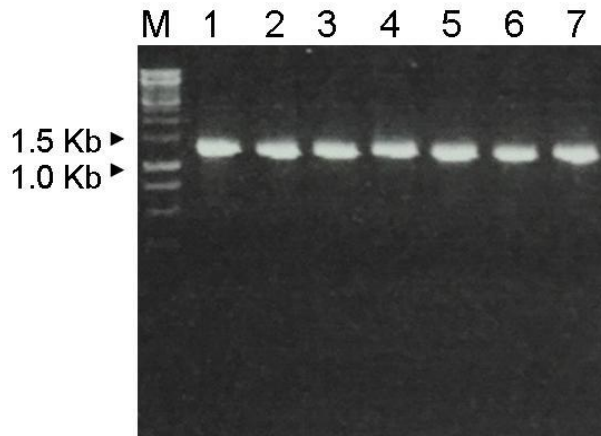


Fig. 2. PCR amplified products of the 56-kDa type-specific antigen (TSA56) from genomic DNA of *O. tsutsugamushi* strains including TW1, TW10, TW19, TW22, Kato, Gilliam, Karp (lane 1-7). Lane M: 1 Kb DNA ladder marker.

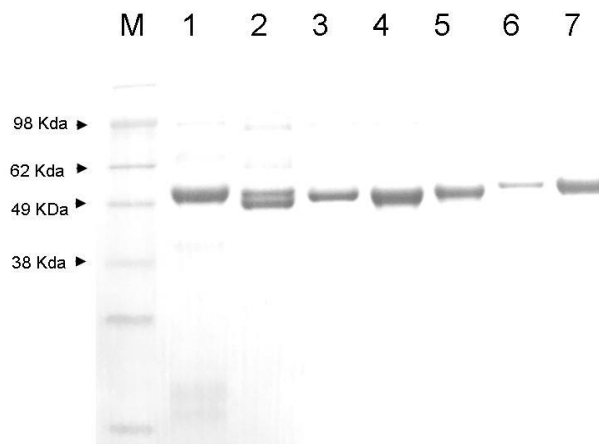


Fig. 3. Protein analysis of *E. coli* expressing TSA56 proteins. TSA56 protein was resolved using 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The purification of TSA56 protein is described in the Materials and Methods. Lane 1-7, TSA56 of TW1, TW10, TW19, TW22, Kato, Gilliam, Karp. Lane M, protein molecular weight marker.

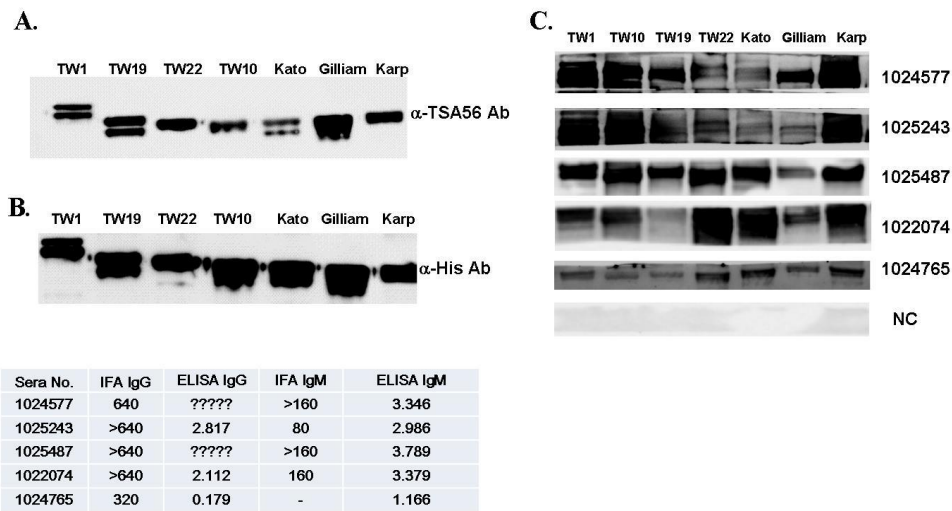


Fig. 4. Western blot analysis of recombinant TSA56 proteins from different strains using (A) a commercially available anti-TSA56 antibody; (B) Anti-His tag antibody to detect loading amount of each antigen onto membrane; (C) the scrub typhus patients' serum samples (TW1 ~ TW25). NC, serum from a healthy donor.

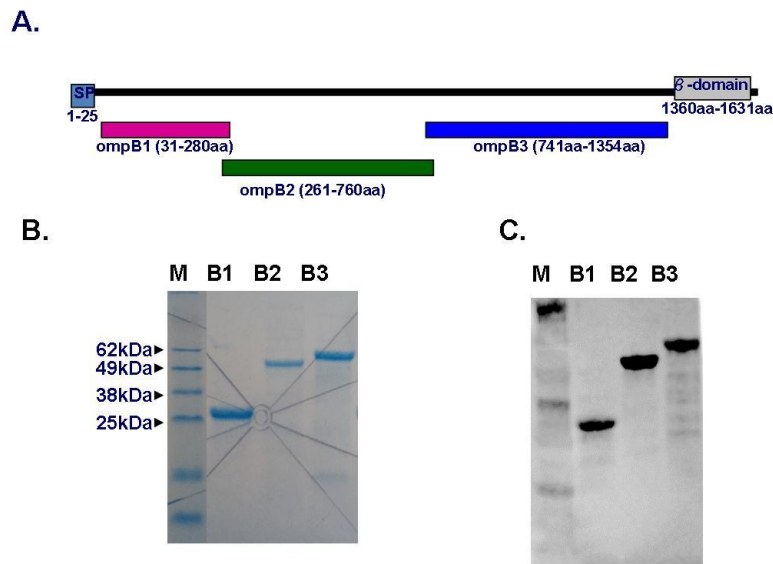


Fig. 5. Cloning and expression of the ompB. Purification of the ompB1, ompB2 and ompB3 fragments (B) ; Western blotting by the anti-his antibody (C).

Table 1. Comparison of recombinant TSA56 ELISA with IFA-positive scrub typhus patients' IgG samples (n=116) and healthy volunteer serum samples (n=82)

IFA result	No. with ELISA result		
	Positive	Negative	Total
Positive	110	6	116
Negative	3	79	82
Total	113	85	198

*Sensitive : $110/(110+6) \times 100\% = 94.8\%$

*Specificity : $79/(79+3) \times 100\% = 96.3\%$

*Positive Predict Value = $110/(110+3) \times 100\% = 97.3\%$

*Negative Predict Value = $79/(79+6) \times 100\% = 92.9\%$

Table 2. Comparison of recombinant TSA56 ELISA with IFA-positive scrub typhus patients' IgM samples (n=90) and healthy volunteer serum samples (n=82).

IFA result	No. with ELISA result		
	Positive	Negative	Total
Positive	87	3	90
Negative	2	80	82
Total	89	83	172

*Sensitive : $87/(87+3) \times 100\% = 96.7\%$

*Specificity : $80/(80+2) \times 100\% = 97.6\%$

*Positive Predict Value = $87/(87+2) \times 100\% = 97.8\%$

*Negative Predict Value = $80/(80+3) \times 100\% = 96.4\%$