

計畫編號：DOH94-DC-1020

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

FliD 鞭毛帽蓋蛋白抗原檢測生物恐怖攻擊之類鼻疽病

研究報告

執行機構：輔英科技大學 醫事技術系

計畫主持人：黃小萍

研究人員：陳亞雷 陳堯生 蘇勳壁

執行期間：94 年 1 月 1 至 94 年 12 月 31 日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目錄

中文摘要.....	3
英文摘要.....	4
前言.....	5
材料方法.....	8
結果.....	10
討論.....	12
結論與建議.....	13
參考文獻.....	14
圖一、圖二.....	18
圖三、圖四.....	19
表一、表二.....	20
表三、表四.....	21
表五、表六.....	22
表七、表八.....	23

中文摘要

類鼻疽病是全球性新興疾病，可引發嚴重致死性的感染，然而目前對於類鼻疽在台灣盛行的情形，卻仍不清楚。因此，本計劃一則是發展檢測類鼻疽血清抗體的方法，二則利用此法調查類鼻疽的盛行狀況。我們利用生物資訊學比對 *Brucella pseudomallei* 的基因體，發現其 fliD 帽蓋蛋白(Cap1、Cap2)具有高度的專一性與抗原性，特別是 cap2 蛋白是潛在鑑別 *B. thailandensis* (*B. pseudomallei* 的最大干擾菌)的標靶。因此，將 *B. pseudomallei* 的 Cap1 與 Cap2 蛋白基因選殖並表達、純化之。並使用類鼻疽病人血清，證明 Cap1 與 Cap2 的 immunodomain 性質。因此，將兩者帽蓋蛋白，在適當濃度[cap1(0.5 µg/mL)與 cap2(1 µg/mL)]覆蓋於 96-well 血清盤，進行血清抗體效益分析。當在 1:32 的閾值時，使用 cap1 蛋白為標靶檢測時，其敏感度是 75%、特異性是 71%，而使用 cap2 蛋白時，則為敏感度是 81%、特異性是 92%。雖與我們前期發展之 fliC 蛋白為血清檢測的標靶(其敏感度為 93.8%、特異性為 96.3%)較不理想，但基於 cap2 蛋白是目前最能區別 *B. pseudomallei* 與 *B. thailandensis* 的標靶，而 fliC 蛋白較利於區別 *B. pseudomallei* 與其它 G(-)菌。因此，混合 fliC 與 fliD 蛋白為標靶的血清檢查法，成為日後發展的重點。我們採集北、中、南部醫院健康人血清以及類鼻疽的最主要危險族群-糖尿病患者，進行類鼻疽盛行率的評估。結果顯示類鼻疽的血清陽性抗體盛行率為 2.5-5%，並沒有特定地域或族群有偏高的情形。因此，目前台灣地區仍不宜歸類於類鼻疽高度盛行的地區，但此 2.5-5%的血清陽性率，仍說明了民眾有機會暴露於這種嚴重社區型的感染。因此，需提醒醫護人員重視與注意類鼻疽發生的感染。

關鍵詞：類鼻疽、鞭毛帽蓋蛋白、血清盛行率

英文摘要

Melioidosis is an emerging disease in global, can lead to patients with serious and fatal infection. However, the spreading and prevalence of this disease is not clear in Taiwan. The aim of this project was to develop a serological method for detecting the specific antibodies to melioidosis, and then to survey the prevalence of seropositivity from healthy adults in Taiwan. Firstly, fliD (capping protein of flagella; including Cap1 and Cap2) exhibits, using bioinformatic analysis, highly specificity and antigenicity. In particular, cap2 protein is potential target for distinguishing between *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* (mostly source of interference in serological test for melioidosis). Both cap1 and cap2 protein genes were cloned, expressed and their products were purified. These purified proteins as antigenic target were examined the optimal coating concentration to be 0.5 µg/ml (cap1) and 1 µg/mL (cap2) for developing an indirect ELISA. The cutoff values were also determined to be 1:32 in both cap1 and cap2 as antigenic targets. The sensitivity was shown to be 75% and 81%, and the specificity was shown to be 71% and 92% in which cap1 and cap2 protein was respectively used as antigenic target. The cap2 protein was still suggested to be used as antigenic target for distinguish between *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* although both specificity and sensitivity were not comfortable, compared as when fliC was used as antigen, with 93.8% of sensitivity and 96.5% of specificity, in previously. Furthermore, the seroprevalence of anti-flagellin antibodies was surveyed for serum samples collected from hospitals in northern, central and southern Taiwan. Results indicated that seropositivity was 2.5-5% amongst of these geographical distributions. No certain areas or disease population exhibited to be hyperprevalent. Thus, Taiwan is not included to endemic areas. However, the 3.0 % seropositivity rate highlights the need for physicians managing these patients in Taiwan to be aware of the possibility of community-acquired pneumonia and sepsis arising from *B. pseudomallei* infection.

Key words: melioidosis, capping protein, seroprevalence

前言

類鼻疽病由 *B. pseudomallei* 所引發，於東南亞與澳洲北部引起地方性流行 (Leelarasmee, 2004)。類鼻疽產生多樣性的疾病，引發之急性敗血症會在 24-48 h 內死亡，死亡率高達 40-60% (Chaowagul et al., 1993)，是一種不容忽視之高致死、感染性的疾病。類鼻疽病在台灣屬於種新興疾病(emerging disease)(Hsueh et al., 2001),於 1984 年出現首件病例(Lee et al., 1985)，其後自 1994 年起，散發性的病例就逐年增加(Hsueh et al., 2001)，其中有多起本土性的病例(Lee et al., 1996; Chen et al., 1999; Hsueh et al., 2001)。台灣的是一個類鼻疽感染、散佈的敏感地區(Chen et al., 2004)。建立一套偵測的血清抗體的檢驗系統，對於瞭解現今台灣類鼻疽散佈的情形有其重要性。

B. pseudomallei 有許多分泌性抗原因子，如：protease、phospholipase 與對熱不穩定之 exotoxin (Gauthier et al., 2000; Sexon et al., 1994)等，類似一般 G(-)菌的致病機制。其中 protease 被認為能分解 connective tissue 的 fiber,以利病原菌侵入組織(Sexon et al., 1994)。Phospholipase 中之 Phospholipase C (PLC) 則認為係與細胞內存活和細菌在細胞與細胞間的散播有關 (Korbsristate et al., 1999)。此類的抗原分子，普遍存在於 G(+) 與 G(-) 菌群中，如 *Clostridium perfringens* (Saint-Joanis et al., 1989) *Listeria monocytogenes* (Smith et al., 1995) 與 *Pseudomonas aeruginosa* (Ostroff et al., 1989)等，扮演著類似的致病機制。因此，雖然有大量的分泌，但基於蛋白功能與結構均相似，不能成為血清學診斷用的抗原。此外，*B. pseudomallei* 可分泌一 36 kDa 之 exotoxin (Ismail et al., 1987)與 19.5 kDa、40 kDa 之特異性蛋白(Anuntagool et al., 1993)。其中 36 kDa 之 exotoxin (又稱 melioidin)已發展 IHA 的診斷方法，雖然展現了高度的敏感性 (93%)，但卻只有低度的特異性(34%) (Sirisinha et al., 2000)。至於其他的 19.5 kDa、40 kDa 的蛋白，目前尚未評估其臨床應用價值。

B. pseudomallei 培養之上清液，有一群對熱不穩定之抗原，對實驗動物有很高的致死率(Ismail et al., 1987)，並且對 HL60 與 Hela cell 細胞株有細胞毒性作用(Haubler et

al., 1998), 稱為 CCF (crude culture filtrate) (Brett and Woods, 2000)。雖然, 此類蛋白的毒性易被 albumin 所中和, 且不易在冷凍乾燥過程中保存毒性, 但在上述的處理過程中, 可以維持很好的抗原性(Brett *et al.*, 1997)。在最近使用此群抗原發展血清學檢查, 係較成功的方法(敏感度為 96%、特異性 94%) (Chenthamarakshan *et al.*, 2001)。然而, 此類未分析的抗原群, 係由 12-96 kDa 的蛋白組成, 並且在不同的培養基與培養條件, 呈現不同的抗原表現(Wongratancheewin *et al.*, 1993), 因此其再現性仍有質疑(Chenthamarakshan *et al.*, 2001)。

B. pseudomallei 菌體表面抗原 -Exopolysaccharides (EPS) 又稱 capsular polysaccharides, 係內毒素的主要來源, 構成菌體表面的重要毒力抗原(Moxon *et al.*, 1990; Steinmetz *et al.*, 2000)。*B. pseudomallei* 之 EPS 經重複酒精沉澱後, 經 MonoQ 純化後發現, EPS 有一直鍵的四糖重複結構, 係屬於 typeII O-antigen polysaccharide (Deshazer *et al.*, 1998), 如: 【 3 】 - -D-(2-O-Ac)Galp-(1,4)-D- Galp-(1,3)-D- -Galp-(1,5)- -KDO-(2)。此結構與許多 G(-)菌, 如: *E. coli*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella nonliquefaciens*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* 皆不相同(Reistad *et al.*, 1993)。因此, 被認為是一特異性抗原。現今已有利用 EPS 之 monoclonal 或 polyclonal Ab, 製備成 Latex agglutination, 以直接偵測 *B. pseudomallei*, 達到 80% 的敏感性, 但由於 EPS 的處理過程, 仍會保有一般 G(-)菌之 LPS 結構, 因此導致其特異度僅有 23% (Sirisinha *et al.*, 2000)。此外, 利用純化之 EPS 偵測類鼻疽病體內特異性之 IgM 與 IgG 的 titer, 亦有被報告 (Cuzzubbo *et al.*, 2000), 在最近改良後, 可以達到中度的敏感度(70%)與特異性(77%)。不過, 此 EPS 結構與 *B. thailandensis* 之 EPS 類似, 仍不能解決兩者間 cross-reaction 的問題。

Brett *et al* (1994) 指出 *B. pseudomallei* 的鞭毛抗原(flagellin) 提供足夠的 immunodominant epitopes, 和類似菌(*Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*) 一樣, 含有 H-antigenic target (Brett *et al.*, 1994)。我們前期實驗中, 亦證實類鼻疽病人體內有高效

價的抗鞭毛抗體(Chen et al., 2003)。並在動物實驗模組中，證實鞭毛可誘發高度的免疫抗原性(Chen et al., 2004)。在我們目前對 *B. pseudomallei* 的抗原性評估，認為鞭毛係最有潛力發展血清檢測的抗原標靶(Chen et al., 2003)。

我們利用生物資訊軟體，分析 *B. pseudomallei* 的基因體，定義出鞭毛合成相關之五個 cluster 基因群，與四個散佈的基因-fliC、fliD、fliE 與 fliS。其中 fliD 係 flagellin 的 cap protein。由基因體的分析，*B. pseudomallei* 類似 *Pseudomonas aeruginosa* 之 fliD，有兩個不同型式的 Cap1 與 Cap2 蛋白。Cap2 蛋白的 N-terminal，係屬於 *B. pseudomallei* 的特異性蛋白。並經 proteomics tools 分析，其具有 MHC class I 與 Class II 的 epitope，顯示其可能是很好的抗原。我們將 Cap2 蛋白之 N-terminal，設計 Degenerate Probe。在 Southern hybridization 的實驗中，可以與 *B. pseudomallei* 的臨床分離株(Chen et al., 2003)雜交，但不可以與 *B. thailandensis* 的環境分離株(Chen et al., 2002)雜交。顯示 Cap2 蛋白，可能不存在於 *B. thailandensis* 的菌株。基於 fliD 的 Cap2 蛋白的高抗原性與高特異性(包括特異於 *B. thailandensis*)，以及我們先前使用 fliC 發展 indirect ELISA 的經驗(Chen et al., 2003)，本計劃將使用 fliD 蛋白改善目前使用 fliC 發展的血清檢測方法。

材料與方法

fliD 抗原基因的構築

B. pseudomallei 之 fliD gene, 使用 degenerate primer, 進行 PCR 反應。反應條件為: Denature: 94 °C、1min.; Anneal: 55 °C、30sec; Extention: 72 °C、1min。所得之之 specific amplicon, 以 BamHI、EcoRI 切割後, 與 pGEX4T-2 質體結合, 選殖進 *E.coli* BL21 內, 進行蛋白質表現。有關之 DNA 分子操作技術, 係依據標準操作手冊實施之(Sambrook and Russell, 2001)。

GST-fused truncated flagellin 抗原的表現

選殖成功之 *E.coli* BL21 pGEX4T-2/fliD 的表達, 係利用 250 uM IPTG 誘導四小時後, 將菌體收集。並利用 sonication 或 protein extraction kits 將菌體擊破、並離心之。所得之上清液, 則利用 glutathione column, 快速純化 GST-fliD 蛋白。切割 GST 係使用 1 U/ml 的 thrombin, 於 glutathione column 內完成, 並以 PBS 引流之。所得之 fliD 純化蛋白, 經蛋白質電泳鑑別其分子量, 並使用 Western blot 分析之。

FliD 抗原之 epitopes 之 cross-reactivity 檢測

FliD 的表現蛋白, 以 SDS-PAGE 電泳之, 並將其轉澤至 Hybond-P membrane (Amersham)。轉澤後的 membrane 分別剪下, 並置於 rabbit anti-flagella polyclonal Ab 於 37°C 吸附 30 分鐘。經 PBS(pH 7.2)洗滌後, 使用 glycine saline buffer (150 mM NaCl, 200 mM glycine [pH 2.8])於室溫震盪 30 分鐘, 將抗體引流出, 並使用 Tris buffer (pH 9.8) 中和之, 此中和的抗體, 稱為純化抗體(Chia *et al.*, 1998)。所得之純化抗體, 以 Western blot 分析, 證明其識別 fliD 抗原的片段。

檢體之收集與處理

檢體採自高雄榮總所收集的類鼻疽病人血清(n=30), 正常人血清(n=60)與疾病控制組血清(n=100)。疾病控制組血清, 係感染科發生率頻繁者, 如: *Pseudomonas* group, *Klbsiella* group, *E. coli*, *Salmonella*, *Enterobacter choacae*, other gram-negative bacteria group (*Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Moraxella sp.*, *Chromobacterium sp.*, *Aeromonas sp.*, other gram-positive bacteria group (*Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* 等。所收集的檢體於-80 保存之。糖尿病患者的血清, 則採集至高雄榮民總醫院與高雄市立民生醫院的血清。另調查血清盛行率的健康人血清, 則收集至台北國泰醫院(n=200)、台中杏林醫院(n=180)與高雄榮民總醫院(n=220)的血清。

Indirect ELISA

取純化之 fliD 蛋白, 約 1 μ g/ml 覆蓋於 U-shape 之 96 well 血清盤, 並以 BSA(1 mg/mL) blocking, 經 PBS-T 洗滌後, 加入抗血清, 於 37 $^{\circ}$ C、作用 1 h。再次以 PBS-T 洗滌後, 加入 peroxidase-labeled anti-human IgG, 並於 37 $^{\circ}$ C 反應 1 h 後, 加入 ABTS 與 H₂O₂、作用 30 min 後比色之(405nm)。

統計分析

偵測之陽性值的定義, 係使用以正常人族群之抗體效價之平均值, 高過 3SD 測量範圍為 cut-off 基準(Chen et al., 2003)。各種度量的結果, 係依 P<0.05 定義其有明顯差距。血清檢驗群組之特異性、敏感度、陽性預測值、陰性預測值、效率與感受性等, 係依 Bayes' theorem 計算之(Winkel et al., 1989)。類鼻疽病的血清盛行率, 則依 Winkel et al (1989)定義之(Winkel et al., 1989)。

結果

1. 選殖與表現類鼻疽菌之 fliD 基因

B. pseudomallei 基因體系利用 Sanger 公司提供之基因體資料庫 (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes>)。我們利用生物資訊軟體，搜尋與分析 *B. pseudomallei* 的帽蓋蛋白(fliD)，有兩個不同型式的 Cap1 與 Cap2 蛋白(Fig. 1)。FliD gene 之 primer 設計，則挑取 unique sequence 部份，依據 bioinformatics tools (Primer3) 分析 設計完成(Table 1)。經 PCR 反應後，所得到 specific amplicon，以 BamHI EcoRI 切割後，與 pGEX4T-2 質體結合，選殖進 *E.coli* BL21 內，進行蛋白質表現。經快速純化後，以 SDS-PAGE 確定純化之 fliD 蛋白分子量(fliD1=39.6 kDa; fliD2=52.8 kDa) (Fig. 2)。

2. 類鼻疽病人血清內抗 fliD 蛋白之抗體效價評估

為證明類鼻疽病人血清確實有 fliD 蛋白之抗體，我們取類鼻疽病人血清，進行 Western blotting 分析，證明 fliD1 與 fliD2 均可被類鼻疽病人之抗血清識別(Fig. 3)。但當使用正常人血清為陰性控制組，則不會產生 immuno-reactive band。

為決定 indirect ELISA 的適中 fliD coating concentration，使用 0.1-5 $\mu\text{g/mL}$ 之純化蛋白，以 mouse anti-fliD polyclonal antibody 反應之。結果顯示，Cap1 protein 的覆蓋濃度為 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 4)，Cap2 protein 的覆蓋濃度為 1 $\mu\text{g/mL}$ (數據未列)，有最較的線性關係。因此，我們使用 cap1(0.5 $\mu\text{g/mL}$)與 cap2(1 $\mu\text{g/mL}$)檢測類鼻疽病人血清的抗體效價，得到 1:32-1:1024 (cap 1)與 1:32-1:512 (cap 2)的抗體效價(Table 2)。顯示 fliD 蛋白具有 immunodominant motifs。

3. FliD 蛋白產生之 cross-reactive 與 background 效價評估

為釐清 fliD 蛋白檢測血清抗體時，可能發生的 cross-reactivity。因此，我們使用 16 位病人血清(n=32)，正常人血清(n=60)與疾病控制組血清(n=100)。分別比較 cap1

(Table 3)、cap2 (Table 4)、full-length fliC (Table 5)與 truncated fliC (Table 6) 蛋白為 antigen 所發展的 indirect ELISA。茲因不易判斷控制組的健康族群，是否曾經感染過類鼻疽，因此在暫不考慮控制組曾曝露過類鼻疽的情況下。結果顯示，cap1 蛋白的敏感度是 75%、特異性是 71%；而 cap2 蛋白的敏感度是 81%、特異性是 92%。

4. 類鼻疽血清抗體盛行率分析

為評估類鼻疽的血清盛行率，我們採集類鼻疽的最主要危險族群-糖尿病患者，作為評估的對象。在 365 個血清樣本中，呈現 11(3%)的血清陽性反應(Table 3)。這個結果與隨機採用北、中、南部醫院健康人血清篩選的結果(Table 4)，呈現類似的血清陽性反應(2.8-5%)。

討論

國際研究顯示，目前使用各種不同的菌體抗原評估分析類鼻疽血清抗體校價的各種血清學方法，其敏感度與特異性都無法超過 90%(Sirisinha et al., 2000)。雖然，最近報告使用部分純化的 culture filtrate 當抗原時，可以有 96%的敏感度與 94%的特異性，但使用此種抗原需要大量的培養 *B. pseudomallei* 活體，進行抗原的純化，可能造成實驗室感染(Chenthamarakshan et al., 2001)。迄今，僅有 Bps-1 抗原曾被嚐試置備成 recombinant protein，大量安全的純化，作為血清檢測的抗原，但卻僅得到 69.7%的敏感度(Wongprompitak et al., 2001)。

我們的研究結果顯示，recombinant flagella protein (fliC 與 fliD)都具有 immunodominant epitopes，可以用來檢測類鼻疽特異性的抗體。雖然，fliD 的特異性可提高與其他 G(-)菌的區別，但敏感度確受限制。總括而言，truncated flagellin 的 recombinant protein 為檢測抗原時，可以達到 93.8%的敏感度與 96.3%的特異性，仍是目前最好的檢測抗原。雖然 fliD 蛋白與其他 G(-)菌產生 cross-reactivity 的情形較 truncated flagellin 蛋白嚴重，但基於 fliD (cap2 蛋白)是潛在區別 *B. thaliandensis* 與 *B. pseudomallei* 的抗原(*B. thaliandensis* 是目前干擾 *B. pseudomallei* 抗體檢測的最主要因素)。因此，同時使用 fliD 與 fliC 抗原作為檢測用的標把，可以成為下一步的發展目標。無論如何，現今台灣地區所發生類鼻疽的病例數仍有限，若要將此 indirect ELISA 作為普遍性的評估，可能尚需收集更大量的類鼻疽血清檢體進行分析。

B. pseudomallei 是腐生菌，主要發現在 300-600 mm 深度的耕植土壤中(Kao et al., 2003)。在流行區的流性病學調查研究，顯示土壤中 *B. pseudomallei* 的含量與當地發生類鼻疽的病例成正相關，顯示類鼻疽的感染主要藉由接觸污染的土壤所致(Dance, 2000)。迄今，台灣地區 *B. pseudomallei* 的分佈情形仍在積極的調查中，但從我們目前的研究顯示，台灣地區(包括北、中、南地區)對 *B. pseudomallei* 的血清抗體陽性率是 2.5-5%，並沒有特定地區偏高的情形。甚至使用類鼻疽的好發族群-糖尿病患者進行調查，其血清盛行率仍與健康族群一致。因此，目前台灣地區仍不宜歸類於類鼻疽高度盛行的地區。

據我們的調查顯示，血清抗體的陽性率明顯座落在>60 歲的族群中，顯示高齡具累積暴露類鼻疽的情形。無論如何，3%的血清陽性率，仍說明了民眾有機會暴露於這種嚴重社區型感染，仍需提醒醫護人員重視與注意類鼻疽發生的感染。

結論與建議

FliD 與 fliC 蛋白都具有高的免疫抗原性與專一性，因此可進一步發展並應用於類鼻疽的血清盛行率調查。本計劃起始之初(94 年 1 月)，對於台灣地區逐年增加的類鼻疽個案討論，仍面臨個案來源是境外移入或本土性病例的爭議。但於計劃執行中(94 年 7 月)，台灣地區二仁溪流域發生類鼻疽爆發性感染，並且隨即由二仁溪流域土壤中分離出 *B. pseudomallei*(致病株)與 *B. thalilandensis*(非致病株)[DOH94-DC-1055]。雖然目前環境中分離之 *B. pseudomallei* 與本次爆發性感染的分離株，仍未進行基因型相關性的鑑別，但就感染模式的觀察，大多學者都已認同，台灣地區存在著本土性感染類鼻疽的潛在危機。本計劃藉由調查台北、台中、高雄地區 fliC 抗體，得到 2.5-5% 等一致性抗體陽性率分佈的結論，雖可說明類鼻疽在台灣地區仍未普遍性的散播，但仍需對特定地區(如二仁溪地區)加以篩檢。同時，就由本次(94 年 7 月)類鼻疽感染事件，仍說明快速檢測類鼻疽的重要性。因此，我們建議：

- (1) 利用 fliC 與 fliD 免疫抗原性與專一性的特性(fliC 的 central regions 特異性可區別多種 G(-)菌的菌體抗原；fliD 之 cap2 蛋白可區別 *B. pseudomallei* 與 *B. thailandensis* 的菌體抗原)，進行 epitope typing 的研究，並挑選適當的 epitope 發展單株抗體，以便發展可直接偵測菌體抗原的血清檢測試劑，作為臨床快速檢測之用。
- (2) 使用目前發展之 indirect ELISA，對於發生類鼻疽個案集中地區(如：高雄縣鳳山、永安、茄萣、湖內；台南現永康、仁德、台南市南區等地)，進行血清抗體盛行率的調查，資以釐清目前民眾曝露類鼻疽的情形。
- (3) 現今國際研究報告指出，類鼻疽個案發生數與民眾曝露污染源(土壤)的 *B. pseudomallei* 的含量有關(Dance, 2000)。然而，*B. pseudomallei* 又棲息於 30-60 cm 深層土壤(Dance, 2000; Chen et al., 2003)。因此，甚麼因素導至土壤的翻騰，致使 *B. pseudomallei* 能棲息於表層土，並且存活相當時間，致使民眾接觸並感染。利用 fliC 與 fliD 特異性的 target，發展 immuno-PCR 技術或 DGGE(denature gel gradient electrophoresis)技術，當可追蹤土壤 *B. pseudomallei* 漂移機制，則可對類鼻疽可能發生的區域，提出更適當的防疫措施。

參考文獻

- Anuntagool, N., Rugdech, P., Sirisinha, S.** (1993). Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. *J Clin Microbiol* 31, 1232-1236.
- Brett, P. J., Mah, D. C., & Woods, D. E.** (1994). Isolation and characterization of *Pseudomonas pseudomallei* flagellin proteins. *Infect Immun* 62, 1914-1919.
- Brett P. J., DeShazer D., Woods D. E.** (1997). Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains. *Epidemiol Infect* 118, 137-148
- Brett P. J. Woods D. E.** (2000). Pathogenesis of and immunity to melioidosis. *Acta Trop* 74, 201-210.
- Chaowagul W, Suputtamongkol Y, Dance DA, Rajchanuvong A, Pattara-arechachai J, White NJ.** (1993). Relapse in melioidosis: incidence and risk factors. *J Infect Dis* 168, 1181-1185.
- Chia JS, Yang CS, Chen JY.** (1998) Functional analyses of a conserved region in glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 66, 4797-803.
- Chen, Y. H., Peng, C. F., Hwang, K. P., Tsai, J. J., Lu, P. L., Chen, T. P.** (1999) An indigenous melioidosis: a case report. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 15, 292-296.
- Chen, YS. Chen, SC. Kao CM. Chen YL*.** (2003). Effects of soil pH, temperature and water contents on the growth of *Burkholderia pseudomallei*. *Folia Microbiol.* 48: 253-256.
- Chen, YS. Chen, SC. Wu, TR. Ji, DD. Chen, YL*.** (2004) Seroprevalence of anti-flagellin antibody against *B. pseudomallei* in Taiwan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57:224-5.
- Chen, YS. Lin, HM. Pan, NC. Chien, SM. Chen, YL.*** (2002) Comparison of 16S RNA, flagella and type III secretion gene PCR primer sets for diagnosis of *Burkholderia pseudomallei* in paddy soil. *J Biomed Lab Sci* 14:95-100.

- Chen YS, Hsiao YS, Lin HH, Yen CM, Chen SC, Chen YL** (2004) Immunogenicity and anti-*Burkholderia pseudomallei* activity in Balb/c mice immunized with plasmid DNA encoding flagellin. *Vaccine*. 2005 Sep 15; [Epub ahead of print]
- Chen, YS. Shiuan, D. Chen, SC. Chye, SM. Chen, YL.** * (2003) Recombinant truncated flagellin of *Burkholderia pseudomallei* as a molecular probe for the diagnosis of melioidosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:423-425.
- Chenthamarakshan, V., Vadivelu, J., Puthuchery, S. D.** (2001). Detection of immunoglobulin M and G using culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 39, 1-7.
- Cuzzubbo AJ, Chenthamarakshan V, Vadivelu J, Puthuchery SD, Rowland D, Devine PL.** (2000). Evaluation of a new commercially available immunoglobulin M and immunoglobulin G immunochromatographic test for diagnosis of melioidosis infection. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1670-1671.
- Dance D.A.** (2000) Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia spp.* and human-animal hosts. *Acta Trop* 74, 159-168.
- DeShazer D, Brett P. J., Wood D. E.** (1998). The type II O-antigenic polysaccharide moiety of *Burkholderia pseudomallei* lipopolysaccharide is required for serum resistance and virulence. *Mol. Microbiol.* 30, 1081-1100.
- Gauthier YP, Thibault FM, Paucod JC, Vidal DR.** (2000). Protease production by *Burkholderia pseudomallei* and virulence in mice. *ACTA Trop.* 74, 215-220.
- Haubler S, Nimtz M, Domke T, Wrat V, Steinmetz I.** (1998). Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 66, 1588-1593.
- Hsueh P R., Teng LJ, Lee LN, Yu CJ, Yang PC, Ho SW, Luh KT** (2001) Melioidosis: an emerging infection in Taiwan? *Emerg. Infect. Dis.* 7, 428-433.
- Ismail G, Embi MN, Omar O, Allen JC, Smith CL.** (1987). A competitive

immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas pseudomallei* extoxin. *J. Clin. Microbiol.* 23, 353-357.

Korbsristate S, Suwanasai N, Leelaporn A, Ezaki T, Kawamura Y, Saraombaath S. (1999). Cloning and characterization of a nonhemolytic phospholipase C gene from *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3742-3745.

Lee N, Wu JL, Lee CH, Tsai WC. (1985) *Pseudomonas pseudomallei* infection from drowning: the first reported case in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 22, 352-4.

Lee SS., Liu YC, Chen YS, Wann SR, Wang JH, Yen MY, Wang JH, Lin HH, Huang WK, Cheng DL. (1996). Melioidosis: two indigenous cases in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 95, 562-566.

Leelarasamee A. (2004) Recent development in melioidosis. *Curr Opin Infect Dis.* 17, 131-136.

Kao, CM. Chen, SC. Chen, YS. Lin, HM. Chen, YL.* (2003) Detection of *Burkholderia pseudomallei* in the paddy soil with PCR-based technique. *Folia Microbiol.* 48: 521-524.

Moxon, E. R., Kroll, J. S. (1990). The role of bacterial polysaccharide capsules as virulent factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 150, 65-85.

Ostroff RM, Wrelind B, Vasil ML. (1989). Mutations in the hemolytic-phospholipase C operon result in decreased virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI grown under phosphate-limiting conditions. *Infect. Immun.* 57, 1369-1373.

Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U. (1996). Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Cur Top Microbiol Immunol* 216, 39-81.

Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

- Sexon MM, Jones AL, Chaowagul W, Woods DE.** (1994). Purification of characterization of a protease from *Pseudomonas pseudomallei*. *Can. J. Microbiol.* 40, 903-910.
- Saint-Joanis B, Garnier T, Cole S.** (1989). Gene cloning shows the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* to contain both sphingomylinase and lecithinase activities. *Mol. Gen Genet.* 219, 453-460.
- Sirisinha, S., Anuntagool, N., Dharakul, T., Ekpo, P, Wongratanacheewin S., Naigowit, P., Petchclai, B., Thamlikitkul, V., Suputtamongkol Y.** (2000). Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. *Acta Tropica* 74, 235-245.
- Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, portony DA, Goldfine H.** (1995). The two distinct phospholipase C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacule and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 63, 4231-4237.
- Steinmetz I, Nimtz M, Wray V, Haubler S, Reganzerowski A, Brenneck B.** (2000). Exopolysaccharide of *Burkholderia pseudomallei*. *ACTA Trop.* 74, 211-214.
- Winkel P, Statland B. E.** (1991). Interpreting laboratory results: reference values and decision making. *Clinical Diagnosis and management*. Edit. Henry JB. NY. Pp49-54.
- Wongratanacheewin, S., Tattawasart, U., Lulitanond, V., Wongwajana, S., Sermswan, R. W., Sookpranee, M., Nuntirooj, K.** (1993). Characterization of *Pseudomonas pseudomallei* antigens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and western blot. *South Asian J Trop Med Public Health* 24, 107-113.
- Wongprompitak P, Thepthai C, Songsivilai S, Dharakul T.** (2001) *Burkholderia pseudomallei*-specific recombinant protein and its potential in the diagnosis of melioidosis. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 19:37-41.

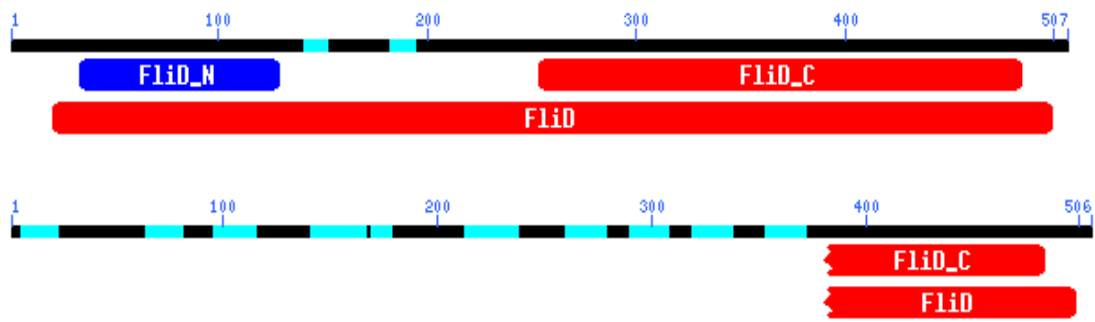


Fig. 1. **The carton of fliD gene maps.** The black line represents the numbers of amino acid sequence of cap1 protein (Upper) and cap2 protein (bottom). The light block in black line represents the unique sequence compared to other G(-) bacterial cap proteins. The fill circles represents the highly conserved regions compared to other G(-) bacterial cap protein.

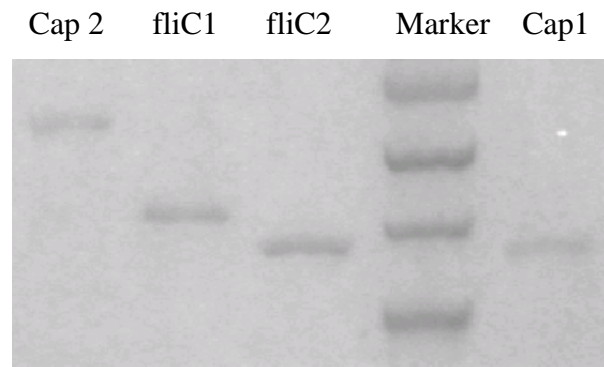


Fig. 2. SDS PAGE for purified flagella antigens. Cap2 represents cap2 proteins of fliD gene products. fliC1 represents full-length of flagellin of fliC gene products. fliC2 represents truncated flagellin of fliC gene products. Marker represents the

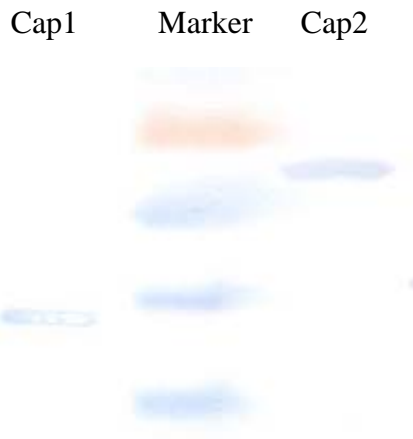


Fig. 3. Western blotting analysis for fliD protein.

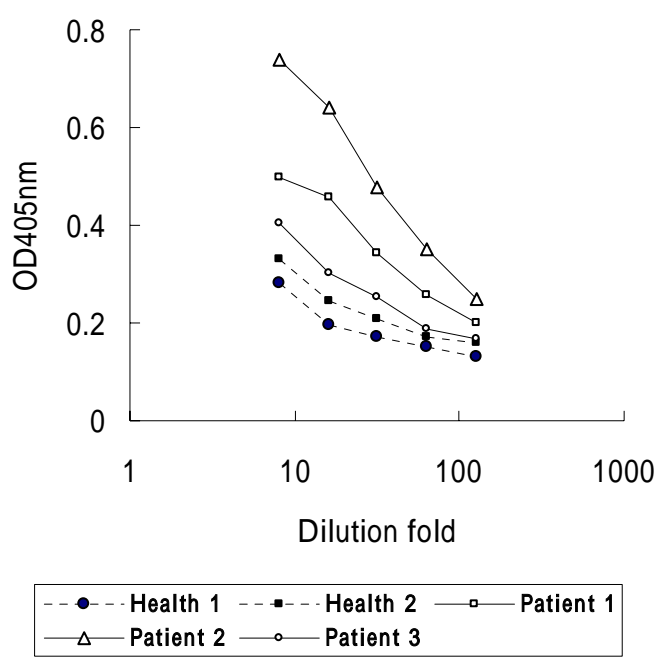


Fig. 4. The titration curve of ELISA. The cap 1 protein (0.5 µg/ml) was used for coating on microplates. The sera admitted to melioidosis patients were serially diluted ranging from 8 to 128 fold of dilution. The linearity of optical density was shown herein. With regarding the coating concentration of cap 2 protein, the optimal concentration of 1 µg/ml was choiced (data not shown).

Table 1. The sequence and amplicon size of *fliD* genes

The primer design of <i>fliD</i> genes		
	Primer sequence	Expected size (bp)
fliD1 (Cap1 protein)	Forward: 5'-ggtttcgatccgaagcaca-3'	345
	Reversed: 5'-gaaatcgctctgcttccagg-3'	
fliD2 (Cap2 protein)	Forward: 5'-atgtccacgcccgccaccca-3'	774
	Reversed: 5'-ggcgaacttgatgccgatcg-3'	

Table 2 IgG titres of ELISA in the sera from melioidosis patients

	flagella antigens			
	fliC		fliD	
	full-length	truncated	cap1	cap2
<1:32			8	6
1:64			10	8
1:128	4		6	8
1:256	2	2	2	6
1:512	2	26	2	4
1:1024	20	4	4	
>1:2048	4			

Table 3 IgG results with Cap1 antigen in an indirect ELISA

	antibody titers (diluted fold)						positive
	<1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	>1:1024	
<i>B. pseudomallei</i>	8 ^a	10	6	2	2	4	75% (24/32) ^b
<i>Pseudomonas sp.</i>	4	12	3	3	0	0	33% (8/22)
<i>Klebsiella sp.</i>	10	5	0	0	0	0	20% (3/15)
<i>E. coli</i>	7	2	1	1	0	0	36% (4/11)
<i>Salmonella sp.</i>	8	1	1	1	0	0	27% (3/11)
<i>Enterobacter sp.</i>	9	0	1	1	0	0	18% (2/11)
Other G(-) sp.	10	2	1	3	1	1	44% (8/18)
Other G(+) sp.	9	1	0	2	0	0	25% (3/12)
Healthy group	44	10	4	2	0	0	20% (12/60)

a: the numbers of sera with positive result

b: the numbers of sera with antibody titers above or equal to cutoff value/ the numbers of sera with antibody titers below cutoff value, with the cutoff value of 1:64.

Table 4 IgG results with Cap2 antigen in an indirect ELISA

	antibody titers (diluted fold)					positive
	<1:32	1:64	1:128	1:256	>1:512	
<i>B. pseudomallei</i>	6 ^a	8	8	6	4	68.4% (26/32) ^b
<i>Pseudomonas sp.</i>	20	1	1	0	0	9.0% (2/22)
<i>Klebsiella sp.</i>	15	0	0	0	0	0 % (0/15)
<i>E. coli</i>	10	0	0	1	0	9.1 % (1/11)
<i>Salmonella sp.</i>	11	0	0	0	0	0% (0/11)
<i>Enterobacter sp.</i>	10	0	1	0	0	9.1 % (1/11)
Other G(-) sp.	17	0	1	0	0	5.6% (1/18)
Other G(+) sp.	12	0	0	0	0	0 % (0/12)
Healthy group	57	3	0	0	0	5 % (3/60)

a: the numbers of sera with positive result

b: the numbers of sera with antibody titers above or equal to cutoff value/ the numbers of sera with antibody titers below cutoff value, with the cutoff value of 1:64.

Table 5 IgG results with full-length flagellin antigen in an indirect ELISA

	antibody titers (diluted fold)							positive
	<1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	
<i>B. pseudomallei</i>	0 ^a	4	2	2	20	2	2	75% (24/32) ^b
<i>Pseudomonas sp.</i>	3	10	3	1	5	0	0	23% (5/22)
<i>Klebsiella sp.</i>	4	5	1	1	4	0	0	27% (4/15)
<i>E. coli</i>	3	3	2	0	3	0	0	27% (3/11)
<i>Salmonella sp.</i>	4	3	0	1	3	0	0	27% (3/11)
<i>Enterobacter sp.</i>	4	3	2	1	1	0	0	9% (1/11)
Other G(-) sp.	9	2	1	2	4	0	0	22% (4/18)
Other G(+) sp.	9	3	0	0	0	0	0	0% (0/12)
Healthy group	27	16	6	3	8	0	0	13% (8/60)

a: the numbers of sera with positive result

b: the numbers of sera with antibody titers above or equal to cutoff value/ the numbers of sera with antibody titers below cutoff value, with the cutoff value of 1:1024.

Table 6 IgG results with truncated flagellin antigen in an indirect ELISA

	antibody titers (diluted fold)					positive
	<1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	
<i>B. pseudomallei</i>	0 ^a	2	12	14	4	93.8 % (30/32) ^b
<i>Pseudomonas sp.</i>	19	2	0	1	0	4.5 % (1/22)
<i>Klebsiella sp.</i>	14	1	0	0	0	0 % (0/15)
<i>E. coli</i>	8	2	0	1	0	9.1 % (1/11)
<i>Salmonella sp.</i>	7	3	0	1	0	9.1 % (1/11)
<i>Enterobacter sp.</i>	9	0	1	1	0	18.2 % (2/11)
Other G(-) sp.	16	1	0	1	0	5.6 % (1/18)
Other G(+) sp.	11	1	0	0	0	0 % (0/12)
Healthy group	47	13	0	0	0	0 % (0/60)

a: the numbers of sera with positive result

b: the numbers of sera with antibody titers above or equal to cutoff value/ the numbers of sera with antibody titers below cutoff value, with the cutoff value of 1:256.

Table 7. The antibody titers in geographical distribution in Taiwan

Group	Total cases	Anti-flagellin antibody titers ^a					Seropositive rate ^b
		<16	32	64	128	>256	
Southern Taiwan	220	53	57	49	50	11	5.0 (32*) %
Middle Taiwan	180	36	68	49	22	5	2.8 (15) %
Northern Taiwan	200	72	72	34	14	8	4.0 (11) %

a: The antibody titers were determined with indirect ELISA using truncated flagellin antigens.

b: The seropositive rates were determined at serum dilution fold of 1:256 (1:128), * represents the highest groups significantly (P<0.05).

Table 8. Seroprevalence of melioidosis with diabetes mellitus
Individual patients with diabetes mellitus
(Ages)

Antibody titer	Male			Female			Total
	< 40	41-59	> 60	< 40	41-59	> 60	
≤16	15	23	30	17	26	42	153
32	7	22	29	9	15	25	107
64	1	15	19	4	8	12	59
128	2	1	15	1	5	12	36
256		1	1		1	3	6
512						2	2
≥1024					1	2	3
Seropositivity* (%)	0 %	1.6 %	1.1 %	0 %	3.6 %	7.1 %	3.0 %

* The antibody titers were determined with indirect ELISA using truncated flagellin antigens.