

計畫編號：DOH95-DC-2024

行政院衛生署九十五年度自行研究計畫

立克次體傳染病螢光定量分子診斷系統之建立

研究報告

執行機構：疾病管制局

研究主持人：舒佩芸

研究人員：黃智雄、呂琇瑩、蔡坤憲、林穎君、陳宗佑

執行期間：95年1月1日至95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

	頁 碼
封面	1
目錄	2
中文摘要	3-4
英文摘要	5-6
前言	7-10
材料與方法	11-14
結果	15-17
討論	19
結論與建議	20
參考文獻	21-29
表	30-34
圖	35-38

## 中文摘要

研究檢驗中心病媒病毒及立克次體實驗室是疾病管制局內負責病媒性傳染病（Vector-borne infectious disease）監測與檢驗之權責單位。由於國際間交通往來日益頻繁，全球氣候也因溫室效應影響，使得病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加，發生頻率也愈趨頻繁與嚴重。同樣地，台灣地區的立克次體傳染病亦有逐年增加的趨勢。目前，立克次體的實驗室診斷主要是靠血清學的抗體陽轉或成對血清抗體 4 倍上升為依據（8,9,13,26,38,42），因為傳統的 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。本計畫的主要目標在建立一套完整的立克次體傳染病螢光定量分子診斷系統，能在病人急性期全血或血清中準確的檢驗出病原核酸分子，使治療工作更具成效。本實驗室利用近年來新開發的螢光定量 PCR 方法，已成功建立出一套以 SYBR Green I 螢光染劑為基礎的即時螢光定量 PCR 檢驗系統，能快速偵測恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒及斑點熱等立克次體傳染病之核酸分子。在恙蟲病方面，我們利用 *Orientia tsutsugamushi* 56kDa type-specific antigen gene 及 *groEL* gene 之核酸序列設計出可偵測病人血液中恙蟲病立克次體菌之引子，再配合螢光定量 PCR 產物核酸定序，則可以區分不同血清型別(serotype)的菌體，目前已用於疾病管制局之例行性檢驗。在斑疹傷寒及斑點熱方面，以 *groEL* gene 及 17kDa 之核酸序列設計出之共通引子，不但可同時偵測流行性及

地方性斑疹傷寒菌種，更可以偵測斑點熱菌種。篩檢出之陽性檢體再配合螢光定量 PCR 產物的核酸定序，則可以區分流行性或地方性斑疹傷寒菌種或斑點熱菌種。應用螢光定量 PCR 方法及核酸定序，已成功自一位到南非旅遊的病人血液中偵測出南非斑點熱之病原體。在 Q 热方面，本實驗室根據 Zhang 等人發表之 Nested PCR 方法改良成螢光定量 PCR，偵測出 Q 热菌種 (63)。本實驗室自 95 年起，利用本計畫所發展之螢光定量 PCR 方法檢測全國送驗之法定傳染病(恙蟲病、斑疹傷寒及 Q 热)之疑似病例全血檢體進行例行性之分子檢驗，並可得知此系統在未來，可望取代傳統 Nested PCR 方法，成為分子診斷的新標準，這對於病患的早期治療將有極大的改善。

#### 中文關鍵詞

螢光定量 PCR 方法，立克次體，恙蟲病，斑疹傷寒，斑點熱

## ABSTRACT

The laboratory of Vector-borne viral and Rickettsial diseases in the Center of Research and Diagnostics is responsible for the laboratory diagnostics of various reportable Rickettsial diseases in CDC Taiwan. Due to increased international traffic exchanges and global warmer climate, the spread of vector-borne diseases have expanded rapidly in whole world with increased intensity and severity. Similarly, the tendency of these infectious diseases has increased in Taiwan in recent years. Although molecular diagnosis based on polymerase chain reaction (PCR) method had been developed for years, laboratory diagnosis of Rickettsial infections was largely relied on serological assay detecting antibody serum conversion between acute and convalescent phase serum samples. The main obstacle in adopting PCR for routine laboratory diagnosis is that traditional PCR method is less reliable due to sample contamination in the running process. In addition, although assay sensitivity could be improved by using nested PCR method, much longer time (usually more than 12 hours) was needed. In this study, we reported the development of a real time SYBR Green I-based quantitative PCR system that can be used to rapidly detect Rickettsial infections in acute-phase blood samples. For scrub fever, two sets of *O. tsutsugamushi*-specific primer pairs against conserved sequences in the 56kDa, type-specific antigen gene and *groEL* gene were successfully designed and used for routine diagnosis of scrub typhus in CDC. The amplification product from real time SYBR Green I-based quantitative PCR were further sequenced to differentiate various serotypes of *O. tsutsugamushi*. For typhus fever and spotted fever, primer pairs against conserved sequences in the *groEL* gene and 17 kDa gene, were designed and were used to detect epidemic typhus, endemic typhus and spotted fever infections. We have successfully detected a patient infected with *Rickettsia africae* by using real-time PCR and nucleotide sequencing. In the future, real time quantitative PCR will replace traditional nested PCR method gradually and

become the new standard of molecular diagnostic method. This improvement will have great impact on the clinical treatment of patients with Rickettsial infections.

*Key words:* Rickettsia, , Real-Time SYBR Green I-based PCR, scrub typhus, endemic typhus, Q fever

## 前言

立克次體為革蘭氏陰性，絕對細胞內寄生的細菌，台灣地區的立克次體傳染病主要有恙蟲病及地方性斑疹傷寒（1-6）。恙蟲病（又稱叢林性斑疹傷寒），為患者遭帶有病原 *Orientia tsutsugamushi* 之恙蟲幼蟲叮咬，所引起之急性傳染性疾病（1,9,50,53）。臨床症狀包括發熱、焦痂(eschar)、紅疹與淋巴腺病等症狀。在缺乏治療的情形下，可能造成患者的無尿、肺水腫與心衰竭，致死率可由 1 到 30%。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（9,26,28,33-38,43,46-48,50,59）。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。而台灣在 1955 年即將此病列為通報傳染病，現歸類為第三類傳染病。台灣地區的恙蟲病近年來每年約有 250-400 個確定病例，在民國 90 年至 94 年的確定病例數為 371、284、258、401 及 323 例，且在各縣市均有病例報告，但主要是在金門縣、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 deliensis*)（36）。恙蟲的動物宿主主要為齧齒類(rodent)，哺乳類(羊、豬、狗、貓)，鳥類(鳥、雞)等，其中又以齧齒類為最主要的宿主（26,38,43,50）。

恙蟲病之潛伏期約 9 至 12 天，特徵為在螯口處形成特有的無痛性

洞穿式潰瘍性焦痂 (eschar)。併發高燒( $39^{\circ}\text{C}$ 以上甚至 $40.5^{\circ}\text{C}$ )，若未治療高燒可持續約 14 天。局部淋巴腺發炎腫大。自發病日起 4-5 天開始，軀幹先出現紅疹繼而擴至四肢及臉，約第 9-10 病日後會消退。常伴有頭痛、出汗、結膜充血、昏迷、末期心跳衰竭、休克等症狀。本病的死亡率依地區、立克次體株、感染史與治療與否有關，有 1-30% 之差異，但若經正確診斷適當用藥則死亡率可低於 1%。

為得到快速準確的診斷及正確的治療以降低死亡率，有必要建立檢驗新技術。目前恙蟲病的實驗室診斷主要是靠血清學的抗體陽轉為依據，因為傳統的 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。本計畫的主要目標即在建立一套完整的立克次體傳染病即時螢光定量分子診斷系統，能在病人急性期全血或血清中準確的檢驗出病原核酸分子，使治療工作更具成效。

地方性(鼠蚤型)斑疹傷寒為 *Rickettsia typhi* 引起的疾病，其病程和人蟲型(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 (26,38)。在各年齡層的致死率依年齡增加而遞增，但均小於 1%。在缺乏蟲子的侵襲、季節性的分布和疾病的散發性等因素，均有助於和人蟲型斑疹傷寒區別。實驗室診斷通常用 IFA 法，病人血清先和不同的立克次體抗原吸附，以作為鑑別性診斷。或用細胞培養方法分離病原體，再以 IFA 鑑定。

流行通常發生在有大量老鼠存在，且人與鼠居住在同一棟建築物的地區，季節性的尖峰在夏末和秋天。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(通常為屋頂鼠 *Rattus rattus* 和溝鼠 *R. norvegicus* )。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(通常為 *Xenopsylla cheopis* )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。

Q 热 (Q fever) 為 *Coxiella burnetii* 引起的疾病，是一種發生在大部分國家的人畜共通傳染病 (30)，在台灣地區雖然並未列入法定傳染病，但每年約有六百餘報告病例，其中約有 30-40 例為確定病例。人感染 Q 热時，會呈現急性型（肺炎、肝炎、感冒、頭痛）或是嚴重慢性型（心內膜炎）症狀。急性型可以在服用抗生素 (Tetracycline or chloramphenicol) 後

立刻得到改善，但嚴重型則需要更長時間的抗生素治療（1-2 年）。傳播途徑可能和扁蟲（Tick）有關，但直接吸入污染 Q 热病原體的灰塵是主要的原因。實驗室診斷主要利用間接免疫螢光法（indirect immunofluorescence assay；IFA）來檢驗病患血清抗體，以核酸增幅法（PCR）方法來偵測病原體或抗原。

在立克次體分子診斷方面，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，因為具有更靈敏（可測得 10 copy DNA）、更快速（5 小時內完成）、及低污染率的優點，將逐漸取代傳統 Nested PCR 方法，成為分子診斷的新標準。開發出一套完整的螢光定量 PCR 方法，能在病人急性期全血或血清中準確的早期診斷出病原核酸分子，對立克次體傳染病之治療及防治工作非常重要。

## 材料與方法

本計畫的主要方法在利用螢光定量 PCR 偵測儀及螢光定量 PCR 方法，開發立克次體傳染病實驗室診斷的檢驗試劑。由於傳統的 PCR 方法只能做定性檢測，而且 PCR 產物需經過瓊脂糖凝膠電泳及紫外線檢試，不僅需要多種儀器設備，而且實驗步驟冗長費時，並不適合大量檢體篩檢之用。競爭性 PCR 雖然可做定量分析，但是有再現性低及偵測範圍小的缺點，而且也有傳統 PCR 產物繁複的後處理過程的缺點。

所謂螢光定量 PCR 即是能夠在 PCR 的每個循環(Cycle)中，都能同步(即時)偵測(Real-Time Detection)到 PCR 產物的增生，因此可以獲得反應到達飽和前的資料，並利用此功能來定量樣品中 DNA 與 RNA 的原始模版量。如果是用 Mx 3000P, Stratagene 儀器進行檢測，反應結束後，可透過電腦分析，直接計算出定量結果。自 PCR 反應開始後，全部的過程不需再打開管蓋，既簡化了操作步驟，又可避免後處理過程的污染導致的偽陽性。本計畫實施策略係配合 Mx 3000P 定量 PCR 序列偵測儀，有系統地找出最具潛力的核酸序列及螢光探針組合，而利用 SYBR-Green I 螢光劑及 TaqMan 的特性，則能快速篩選出最適合的引子及探針組合。

### 檢體之輸送：

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。

本計畫之實驗方法概述如下：

(一) 血液檢體及細菌株：

血液檢體來源為通報自疾病管制局之各種立克次體傳染病之疑似病例血液，細菌株為疾病管制局歷年來所分離出之立克次體菌株。原型株(prototype)為購自 ATCC。

(二) 立克次體分離法：

1. 取自病患急性期（1~7 病日）含 heparin(10U/mL)之全血，分離出 buffy coat 或 peripheral blood mononuclear cell (PBMC)。
2. 接種入 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。
3. 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。

注意事項：

1. 所有過程應於 P3 實驗室無菌無塵操作台內操作，慎防感染自己及他人。
2. 培養基中不可添加四環黴素及氯黴素等抗生素。

(三) 由血液標本及細胞培養製備立克次體 DNA：以 QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) 抽取及純化細菌核酸。主要原理為利用裝有矽土-膠膜的離心圓柱，可以選擇性的與 DNA 結合，再經過數次清洗步驟，進而達到純化的目的。詳細的步驟如下：首先將病人血液檢體或經由細胞培養之立克次體加入溶解液，分解蛋白質等雜質，同時將核糖核酸酶去活性，再將處理後的液體加到離心圓柱中，使 DNA 與矽土膜結合，再經過離心及加入清洗液之重覆步驟清洗離心圓柱，最後以純水將 DNA 洗脫下來。血液(200 μl)中的 DNA 依據本法萃取，最後將 DNA 溶於 75 μl 純水 (Water , containing 0.02% sodium azide)。

(四) 引子(Primer)與螢光探針(Fluorogenic Hybridization Probe)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。螢光探針則可與引子擴增出的 DNA 序列進行雜交作用，釋出螢光。引子與螢光探針的選擇可依據 Primer Express software (PE Applied Biosystems Inc., Foster City, CA)。理論上螢光定量 PCR 的靈敏度可以到達 1~10 copies/reaction，可藉由核酸引子之設計及純化、檢體核酸

的萃取及純化、反應試劑之選擇、反應條件之修正等，改善系統之靈敏度及專一性。目前立克次體已有多種基因序列可供參考及比對，其中以 *Citrate synthase*、*OmpA*、*OmpB* 及 *groEL* 等基因序列，是最常被作為區分斑疹傷寒、斑點熱等菌種之用 (7,15,20,23,54,62)。*O. tsutsugamushi* 則可利用 56-kDa type-specific antigen (tsa)、47-kDa 蛋白質及 *groEL* 等基因序列作為偵測病原體及區分菌種血清型別之用 (6,14,17,18,24,25,34,-39,44)。

(五) SYBR Green 即時螢光定量聚合酶連鎖反應 (SYBR Green Real-time PCR Reaction)：使用 QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN)為反應試劑。依序加入以下試劑：25 μl 的 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，最後加入 5 μl 檢體 DNA，反應最終體積為 50 μl。再進行 SYBR Green PCR 反應：95°C 15 分鐘，45 次循環之 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 38 秒 (讀取螢光值)。熔點曲線分析(Melting curve analysis)：PCR 反應完成後，再進行熔點曲線分析：95°C, 1 分鐘、65°C, 30 秒，再進行 45 次循環，每次循環比前次溫度+0.5°C/30 秒/循環。

## 結果

(1) 利用 SYBR Green 螢光定量 PCR 方法偵測恙蟲病立克次體核酸分子：恙蟲病病原體 *O. tsutsugamushi* 專一性引子之核酸序列如表一所示。引子組 RST-14F-6R 是依據 tsa-56kDa 基因序列所設計，RST-25F-26R 則是依據 groEL heat shock protein 基因序列所設計出。表二顯示 RST-14F-6R 及 RST-25F-26R 兩對引子組，利用 SYBR Green 融光定量 PCR 方法可偵測到所有 *O. tsutsugamushi* 六種不同的血清型 (prototype)，且對 *O. tsutsugamushi* 具有專一性，亦可偵測到所有恙蟲病病原體本土菌株 (Data not shown)。目前已利用本研究所研發之引子組，作為疾管局例行性分子檢驗，圖一所示為疾管局立克次體傳染病例行性分子檢驗流程，恙蟲病、斑疹傷寒、斑點熱及 Q 熱所使用之引子組名稱，此外，所有的 PCR 檢測均採用相同的實驗步驟，所以同一儀器可同時偵測圖上所列的病原體核酸分子。

(2) 以 SYBR Green 融光定量 PCR 方法偵測恙蟲病疑似病例 PBMC 檢體中之病原體核酸分子：由 94 年研究得知，周邊血液單核細胞 (PBMC) 檢體所得的 PCR 陽性率最高，最適合用於菌株分離。表三所示為 95 年實驗室例行性 PCR 檢驗，593 支發病日 1-13 日之 PBMC 檢體，有 70 支檢體為 PCR 陽性，陽性率為 11.8% (70/593)，發病日 1-7 日之急性期檢體所得之陽性率為 12.8%，略高於發病日 8-13 日之

早恢復期檢體（陽性率為 9.3%）。若綜合血清學結果，則恙蟲病確定病例發病日 1-13 日，80 支 PBMC 檢體中，有 57 支檢體為 PCR 陽性，陽性率可達 71%，恙蟲病確定病例 1-7 日之急性期檢體所得之陽性率更可高達 75%，可見螢光定量 PCR 方法具有高靈敏度。圖二所示為恙蟲病立克次體 *groEL* 引子組之靈敏度測試， $C_t = 38$  時，Detection limit 為 2.11copies/reaction.

(3) 螢光定量 PCR 陽性產物核酸序列分析：以引子組 RST-14F-6R 所得的陽性 PCR 產物之大小約為 212-260 bp，以核酸定序方法可比較各陽性檢體長度約為 160-208 bp (共計有 7 種長度: 160bp, 166bp, 169bp, 175bp, 184bp, 205bp, 208bp ) 的核酸序列。此核酸序列位於 *tsa* 56-kDa gene variable domain I (VDI)的位置，在不同 *O. tsutsugamushi* serotype 間的差異很大，可以用來區分不同 serotype 之用。圖三所示為 95 年 1 至 11 月所收集 111 支 PBMC ，PCR 陽性產物定序結果之分析；可將序列歸納為 16 個 clusters，其中 cluster 1 與 Tt-1 及 Tt-3 的序列相同，與原型株 Karp 相似，共有 46 支檢體，佔了總數的 41.4% (46/111)，是 95 年偵測到數量最多的菌種，分佈於金門、高雄、台北、桃園等地區，也是分佈最廣的菌株。其次是 cluster 6，與 HL-2 、Tt-5 、HL-9 的序列相同，與原型株 Gilliam 及 Kuroki 相似，共有 25 支檢體，佔了總數的 22.5% (25/111)，主要分佈於金門、高雄、南

投、台北、嘉義等地。cluster 16，與 HL-4 的序列相同，與原型株 Kato 相似，共有 17 支檢體，佔了總數的 15.3% (17/111)，主要分佈於高雄、金門、台北、台中等地。此外，一些較特殊的菌種如 cluster 3、cluster 12 及 cluster 13 只出現在屏東，cluster 15 只出現在金門。

(4) 利用 SYBR Green 融光定量 PCR 方法偵測斑疹傷寒立克次體：斑疹傷寒立克次體專一性引子之核酸序列如表一所示。引子組 RR-F1-R2 及 RR-F8-R12 分別是依據 *groEL* heat shock protein 及 17kDa 之核酸序列設計出之共通引子。表二顯示 RR-F1-R2 及 RR-F8-R12 兩對引子組，利用 SYBR Green 融光定量 PCR 方法可偵測到斑疹傷寒及斑點熱立克次體，且具有專一性。表四顯示 94 及 95 年共偵測到 5 支地方性斑疹傷寒 PCR 陽性檢體，分佈於台北、高雄及屏東。

(5) 利用 SYBR Green 融光定量 PCR 方法偵測斑點熱立克次體：RR-F1-R2 及 RR-F8-R12 兩對引子組，如前所述，亦可用於偵測斑點熱立克次體。表五所示為偵測出由南非旅遊回國非洲斑點熱病人檢體的融光定量 PCR 結果；因融光定量 PCR 產物無法與 *R. conorii* 區分，故將另外兩段 PCR 產物 (*ompA* 及 *ompB*) 定序，確認其為 *R. africae* 菌株。圖四所示為 *GroEL*、17 kD、*ompA*、*ompB* 基因片段之定序結果。

## 討論

目前立克次體之實驗室診斷，主要是以血清學 IFA 方法為主(8,9,13,26,38,42)。在急性期血清中，因抗體尚未大量產生，主要必需靠菌種分離及 PCR 檢驗，因此我們建立了快速、靈敏度及專一性高的螢光定量 PCR 方法，取代目前大部分實驗室所使用的 Nested PCR 方法檢測立克次體特異性核酸序列。本計畫利用螢光定量 PCR 方法，結合特殊的引子偵測恙蟲病、斑疹傷寒及斑點熱立克次體。在恙蟲病方面，引子組 RST-14F-6R 是依據 *tsa*-56kDa 基因序列所設計，RST-25F-26R 則是依據 *groEL* heat shock protein 基因序列所設計，均可同時偵測所有不同血清型的 *O. tsutsugamushi* 菌體，因此可作為篩檢恙蟲病人陽性檢體之用。此外，亦設計出對血清型別具有專一性之特殊引子，可區分不同血清型別的 *O. tsutsugamushi* 菌體。但由於 *O. tsutsugamushi* 血清型種類繁多，本研究採用核酸定序方法，藉著直接定序 PCR 陽性產物來確定血清型別。由核酸序列分析發現，引子組 RST-14F-6R 所得之 PCR 陽性產物定序結果可區分不同血清型別的 *O. tsutsugamushi* 菌體。

在斑疹傷寒方面，引子組 RR-F1-R2 及 RR-F8-R12 分別依據 *groEL* heat shock protein 及 17kDa 之核酸序列設計出之共通引子。這兩對引子組，利用 SYBR Green 融光定量 PCR 方法可偵測到所有斑疹傷寒(Typhus fever

group)及斑點熱(Spotted fever group)之病原體，可作為篩檢斑疹傷寒及斑點熱病人陽性檢體之用。若再直接定序 PCR 陽性產物，則可以區分立克次體菌種。利用本方法，今年成功的偵測出由南非旅遊回國非洲斑點熱感染之病人。

本研究設計出恙蟲病、斑疹傷寒及斑點熱立克次體之引子，配合 SYBR Green I 螢光定量 PCR 方法，不但靈敏度高，而且步驟簡單、易操作，是非常適合立克次體的分子診斷方法。

## 結論與建議

由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，建立一套完整的病媒性傳染病診斷系統（血清學及分子診斷），監測台灣地區已知存在的立克次體傳染病是十分重要的。建立 Real-time PCR 立克次體傳染病快速鑑別診斷系統，除了對病患的早期治療有很大的幫助外，對防治的工作也極為重要。

## 參考文獻

1. 李淑芳、蔡淑芬、施清河等。一九九三年台閩地區恙蟲病流行病學調查報告。中華公共衛生雜誌。14(4):334-341，1995。
2. 陳垚生、劉永慶、顏慕庸等。鼠蚤型斑疹傷寒:南台灣三病例報告。中華民國感染症醫學會雜誌。6(2):145-150，1995。
3. 陳慧玲、陳豪勇、洪其璧。台灣地區恙蟲病的發生近況。中華民國微生物及免疫學雜誌。26(4):166-170，1993。
4. 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。
5. 陳慧玲、陳豪勇、鍾兆麟等。金門地區鼠體內斑點熱抗體之初步篩檢。中華民國微生物及免疫學雜誌。30(2):55-61，1997。
6. 謝國珍、陳慧玲、陳豪勇等。以聚合酶連鎖反應來判定恙蟲病立克次氏菌之血清型。中華民國微生物及免疫學雜誌。29(2):116-121，1996。
7. Carl M, Tibbs CW, Dobson ME, Paparello S, Dasch GA. Diagnosis of acute typhus infection using the polymerase chain reaction. J Infect Dis 161:791-793, 1990.
8. 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.
9. Chang WH. Current status of tsutsugamushi disease in Korea. J Korean Med Sci 10:227-238, 1995.

10. 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 enzymed-linked immunosorbent assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 5:519-526, 1998.
11. 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.
12. Cho NH, Seong SY, Huh MS, Kim NH, Choi MS, Kim IS. Induction of the gene encoding macrophage chemoattractant proteon 1 by *Orientia tsutsugamushi* in human endothelial cells involved activation of transcription factor activator protein 1. *Infect Immun* 70:4841-4850, 2002.
13. Coleman RE, Sangkasawan V, Suwanabun N, Eamsila C, Mungviriya 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.
14. 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.
15. Fournier PE, Fujita H, Takada N, Raoult D. Genetic identification of Rickettsiae isolated from ticks in Japan. *J Clin Microbiol* 41:2176-2181, 2002.
16. Furuya Y, Yamamoto S, Otu M, Yoshida Y, Ohashi N, Murata M, Kawabata N, Tamura A, Kawamura Jr A. Use of monoclonal antibodies

- against *Rickettsia tsutsugamushi* Kawasaki for serodiagnosis enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 29:340-345, 1991.
17. Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Kawamori F, Yamamoto S, Ohashi N, Tamura A, Kawamura Jr A. Specific amplification of *Orientia tsutsugamushi* DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 29:2628-2630, 1991.
  18. Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Yamamoto S, Kawamura Jr A. Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 31:1637-1640, 1993.
  19. Hickman CJ, Stover CK, Joseph SW, Oaks EV. Murine T-cell response to native and recombinant protein antigens of *Rickettsia tsutsugamushi*. Infect Immun 61:1674-1681, 1993.
  20. Higgins JA, Radulovic S, Noden BH, Troyer JM, Azad AF. Reverse Transcriptase PCR Amplification of *Rickettsia typhi* from Infected Mammalian Cells and Insect Vectors. J Clin Microbiol 36: 1793-1794, 1998.
  21. 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.
  22. 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.
  23. Jiang J, Temenak JJ, Richards AL. Real-time PCR duplex assay for *Rickettsia prowazekii* and *Borrelia recurrentis*. Ann N Y Acad Sci 990:302-310, 2003.

24. Kawamori F, Akiyama M, Sugieda M, Kanda T, Akahane S, Yamamoto S, Ohashi N, Tamura A. Two-step polymerase chain reaction for diagnosis of scrub typhus and identification of antigenic variants of *Rickettsia tsutsugamushi*. J Vet Med Sci. 55(5): 749-55, 1993.
25. Kee SH, Choi IH, Choi MS, Kim IS, Chang WH. Detection of *Rickettsia tsutsugamushi* in Experimentally infected mice by PCR. J Clin Microbiol 32: 1435-1439, 1994.
26. 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.
27. Land MV, Ching WM, Dasch GA, Zhang Z, Kelly DJ, Graves SR, Devine PL. Evaluation of a commercially available recombinant-protein enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies produced in scrub typhus Rickettsial infections. J Clin Microbiol 38:2701-2705, 2000.
28. Lewis MD, Yousuf AA, Lerdthusnee K, Razee A, Chandranoi K, Jones JW. Scrub typhus reemergence in the Maldives. Emerg Infect Dis 9:1638-41, 2003.
29. Mahara F. Japanese spotted fever: report of 31 cases and review of the literature. Emerg Infect Dis 3:105-111, 1997.
30. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev* 12:518-553, 1999.
31. 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.
32. Oaks EV, Rice RNM, Kelly DJ, Stover CK. Antigenic and genetic

- relatedness of eight *Rickettsia tsutsugamushi* antigens. Infect Immun 57:3116-3122, 1989.
33. 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.
  34. Ohashi N, Nashimoto H, Ikeda H, Tamura A. Diversity of immunodominant 56-kDa type-specific antigen (tsa) of *Rickettsia tsutsugamushi*. J Biol Chem 267:12728-12735, 1992.
  35. 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.
  36. Ohashi N, Koyama Y, Urakami H, Fukuhara M, Tamura A, Kawamori F, Yamamoto S, Kasuya S, Yoshimura K. Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype. Microbiol Immunol 40: 627-38, 1996.
  37. 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.
  38. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev 10:694-719, 1997.
  39. Saisongkorh 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. Saito

- Y. Parasitism of chiggers on the meadow mouse on the islet "Kawamura Nakasu" in the lower regions of the river Agano, Niigata prefecture, Japan, in 1966. Isolation of rickettsia from the host and parasites. *Acta Med Biol (Niigata)* 15: 15-30, 1967.
40. Seong SY, Park SG, Kim HR, Han TH, Kang JS, Choi MS, Kim IS, Chang WH. Isolation of a new *Orientia tsutsugamushi* serotype. *Microbiol Immunol* 41: 437-43, 1997.
  41. Shieh GJ, Chen HL, Chen HY, Horng CB. Detection of *Rickettsia tsutsugamushi* specific DNA from the lymphocyte of patients by polymerase chain reaction. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 19: 43-6, 1995.
  42. Shirai A, Coolbaugh JC, Gan E, Chan TC, Huxsoll DL, Groves MG. Serologic analysis of scrub typhus isolates from the Pescadores and Philippine Islands. *Jpn J Med Sci Biol* 35: 255-9, 1982.
  43. Song HJ, Seong SY, Huh MS, Park SG, Jang WJ, Kee SH, Kim KH, Kim SC, Choi MS, Kim IS, Chang WH. Molecular and serologic survey of *Orientia tsutsugamushi* infection among field rodents in southern Cholla province, Korea. *Am J Trop Med Hyg* 58:513-518, 1998.
  44. 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.
  45. Tamura A, Makisaka Y, Enatsu T, Urakami H, Okubo K, Fukuhara M, Mahara F. Isolation of *Orientia tsutsugamushi* from patients in Shikoku and finding of a strain which grows preferentially at low temperatures.

Microbiol Immunol 43: 979-81, 1999.

46. Tamura A, Makisaka Y, Kadosaka T, Enatsu T, Okubo K, Koyama S, Yu Q, Urakami H. Isolation of *Orientia tsutsugamushi* from Leptotrombidium fuji and its characterization. Microbiol Immunol 44: 201-4, 2000.
47. 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.
48. 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.
49. Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Takahashi K, Oyanagi M. Analysis of polypeptide composition and antigenic components of *Rickettsia tsutsugamushi* by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. Infect Immun 48: 671-5, 1985.
50. Tamura A, Urakami H, Ohashi N. A comparative view of *Rickettsia tsutsugamushi* and the other groups of rickettsiae. Eur J Epidemiol 7: 259-69, 1991.
51. Tamura A, Urakami H, Tsuruhara T. Purification of *Rickettsia tsutsugamushi* by Percoll density gradient centrifugation. Microbiol Immunol 26: 321-8, 1982.
52. 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.
53. Tsay RW, Chang FY. Serious complications in scrub typhus. J Microbiol

Immunol Infect 31: 240-4, 1998.

54. 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.
55. Urakami H, Ohashi N, Tsuruhara T, Tamura A. Characterization of polypeptides in *Rickettsia tsutsugamushi*: effect of preparative conditions on migration of polypeptides in polyacrylamide gel electrophoresis. Infect Immun 51: 948-52, 1986.
56. Urakami H, Takahashi M, Hori E, Tamura A. An ultrastructural study of vertical transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* during oogenesis and spermatogenesis in *Leptotrombidium pallidum*. Am J Trop Med Hyg 50: 219-28, 1994.
57. Urakami H, Takahashi M, Murata M, Tamura A. Electron microscopic study of the distribution and the vertical transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* in *Leptotrombidium pallidum*. Jpn J Med Sci Biol 47: 127-39, 1994.
58. Urakami H, Takahashi M, Tamura A, Hori E. Electron microscopic observations of the embryo *Leptotrombidium* (*Leptotrombidium*) *pallidum* naturally infected with *Rickettsia tsutsugamushi*. Microbiol Immunol 32: 967-72, 1988.
59. Urakami H, Tamura A, Tarasevich IV, Kadosaka T, Shubin FN. Decreased prevalence of *Orientia tsutsugamushi* in trombiculid mites and wild rodents in the Primorye region, Far East Russia. Microbiol Immunol 43: 975-8, 1999.
60. Urakami H, Tsuruhara T, Tamura A. Penetration of *Rickettsia*

- tsutsugamushi* into cultured mouse fibroblasts (L cells): an electron microscopic observation. *Microbiol Immunol* 27: 251-63, 1983.
61. 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.
  62. 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.
  63. Zhang GQ., A. Hotta, M. Mizutani, T. Yamaguchi, H. Fukushi, K.Hirai. Direct identification of “*Coxiella burnetii*” plasmids in human sera by nested PCR. *J Clin Microbiol* 36:2210-2213,1998.

表一、立克次體 SYBR Green 融光定量 PCR 所使用之引子

Primer	Nucleotide sequence	Gene	Specificity
RST-14F	CCA TTT GGT GGT ACA TTA GCT GCA GGT	<i>Tsa</i> 56	<i>O. tsutsugamushi</i>
RST-6R	TCA CGA TCA GCT ATA CTT ATA GGC A	<i>Tsa</i> 56	<i>O. tsutsugamushi</i>
RST-25F	CTT TGC AAC GAA TCG TGA AAA GAT GAT TAC	<i>GroEL</i>	<i>O. tsutsugamushi</i>
RST-26R	GTA AGA GCT TCT CCG TCT ACA TCA TCA GCA	<i>GroEL</i>	<i>O. tsutsugamushi</i>
RR-F1	AAA ATG GTT GCT GAG CTT GAA AAT CCT TT	<i>GroEL</i>	Rickettsia group (TG, SFG)
RR-R2	ACT TTC AAA CCA CCA CGT AAT CTA TTG AC	<i>GroEL</i>	Rickettsia group (TG, SFG)
RR-F8	GGC GGY GCA TTA CTT GGT TCT CAA TTC GG	17-kD	Rickettsia group (TG, SFG)
RR-R12	GTT TTC CSC CTA TTA CAA CTG TTT GAG T	17-kD	Rickettsia group (TG, SFG)
OMP3 (QF-3)	GAA GCG CAA CAA GAA GAA CAC	<i>com-1</i>	<i>C. burnetii</i> (Zhang, et. al)
OMP4 (QF-4)	TTG GAA GTT ATC ACG CAG TTG	<i>com-1</i>	<i>C. burnetii</i> (Zhang, et. al)
HF1 (QF-7)	TCC TAA ACA AGT GAT GGT CTC C	conserved region of <i>C.</i> <i>burnetii</i> plasmids	<i>C. burnetii</i> (Zhang, et. al)
HF2 (QF-8)	TTC GCA GAA AGT CAG CTA TCG	conserved region of <i>C.</i> <i>burnetii</i> plasmids	<i>C. burnetii</i> (Zhang, et. al)

表二、利用立克次體專一性引子偵測恙蟲病、斑疹傷寒、斑點熱及

## Q 热病原體核酸

	Prototype	RST-spe.		TG/SFG-spe.		QF-spe.	
		56kD, tsa	<i>groEL</i>	<i>groEL</i>	17kD	<i>com-1</i>	plasmid
		RST-14F-6R	RST-25F-26R	RR-F1-R2	RR-F8-R12	OMP3-OMP-4	HF1-HF2
RST	Gilliam	22 (78.95)	24 (78.45)	-	-	-	-
	Karp	20 (78.85)	22 (80.05)	-	-	-	-
	Kato	19 (80.45)	20 (79.95)	-	-	-	-
	Kawasaki	30 (79.45)	27 (78.45)	-	-	-	-
	Shimokoshi	32 (79.45)	31 (77.45)	-	-	-	-
	Kuroki	35 (79.95)	38 (78.35)	-	-	-	-
TG	Prowazekii	-	-	29 (78.95)	27 (81.45)	-	-
	Typhi	-	-	22 (78.45)	21 (80.95)	-	-
SFG	Conorii	-	-	21 (78.45)	20 (80.95)	-	-
	Japonica	-	-	22 (78.95)	20 (81.45)	-	-
	Sibirica	-	-	20 (78.45)	18 (81.45)	-	-
QF	Phase I	-	-	-	-	17 (82.05)	17 (80.95)
	Phase II	-	-	-	-	20 (81.95)	17 (80.95)
L929		-	-	-	-	-	-
NTC		-	-	-	-	-	-

表三、95 年恙蟲病報告病例病人急性期血液檢體之病原體核酸分子檢測

Total : 593 PBMC		恙蟲病	
2006年 qPCR (至8/12)	陽性率	1~13 days	70(+)/593 (11.8 %)
		1~7 days	54(+)/421 (12.8%)
		8~13 days	16(+)/172 (9.3%)
Sensitivity		1~13 days	57(+)/80 (71 %)
		1~7 days	45(+)/60 (75%)
		8~13 days	12(+)/20 (60%)

表四、利用斑疹傷寒立克次體專一性引子可偵測斑疹傷寒病人血液檢體之病

原體核酸分子

PBMC 編號	發病日	居住地	Q-PCR (17 kD)	Sequence
L940315	12	屏東縣	38	R. typhi
L940394	8	台北縣	41	R. typhi
L950281	8	台北縣	41	R. typhi
L950939	8	高雄市	40	R. typhi
L951269	10	高雄縣	37	R. typhi

表五、利用斑點熱立克次體專一性引子偵測非洲斑點熱病人血液檢體之病原  
體核酸分子

傷口拭子、焦痂檢體：(發病日 95/04/22；採檢日 95/05/05；14病日)

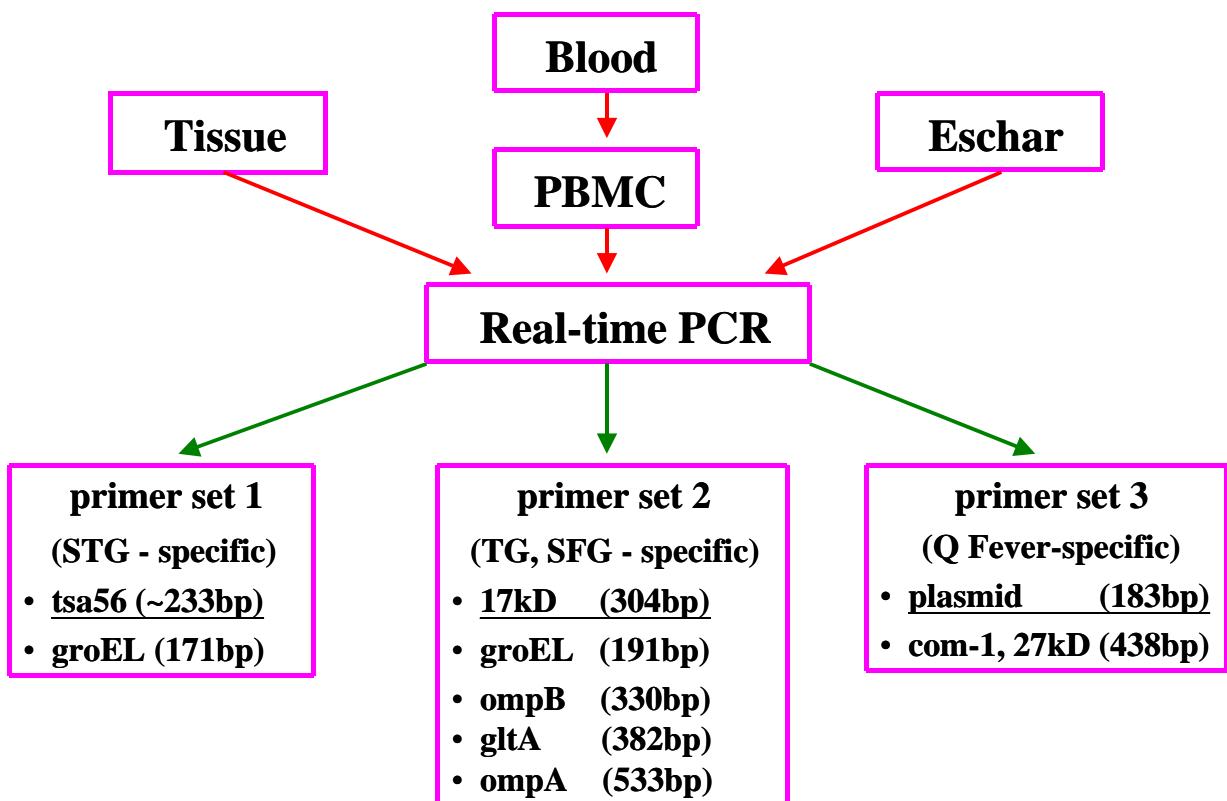
Gene	Length	Name	NCBI Blast Results
groEL (F1R2)	133bp	E950514 (Eschar)	GeneBank 無 R. africae 序列 R. conorii 133/133 (100%) ; R. rickettsii 131/133 (98%) ; R. japonica 132/133 (99%)
17kD (F8R12)	247bp	E950514 (Eschar) Sw950514 (Swab)	GeneBank 無 R. africae 序列 R. conorii & R. rickettsii 242/243 (99%) ; R. japonica 239/243 (98%)
ompA (70F602R)	491bp	Sw950514 (Swab)	R. africae 491/491 (100%) ; R. conorii 477/494 (96%) ; R. rickettsii 474/491 (96%) ; R. japonica 461/491 (93%)
ompB (F22R25)	273bp	Sw950514' (Swab)	R. africae 273/273 (100%) ; R. conorii 270/273 (98%) ; R. rickettsii 268/273 (98%) ; R. japonica 266/273 (97%)
gltA (877F1258R)	341bp		

PC : R. japonica

NC : NTC

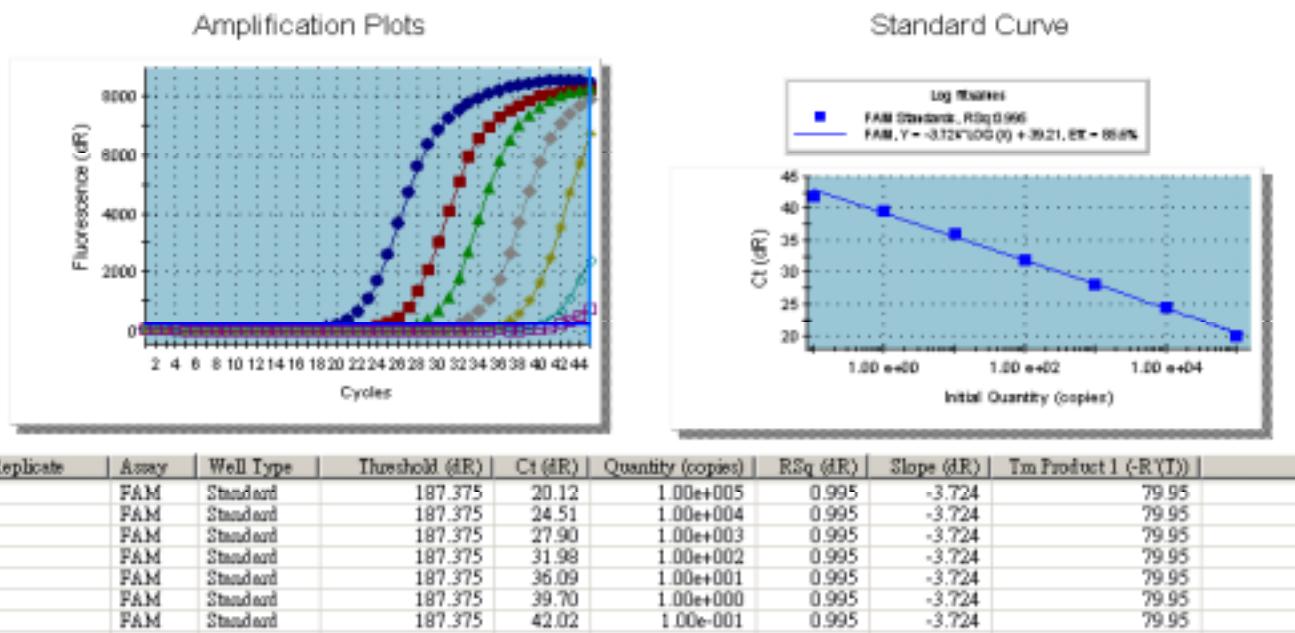
圖一、立克次體實驗室分子檢測流程圖：

## Real-time PCR



圖二、恙蟲病立克次體螢光定量 PCR 檢測及靈敏度測試：

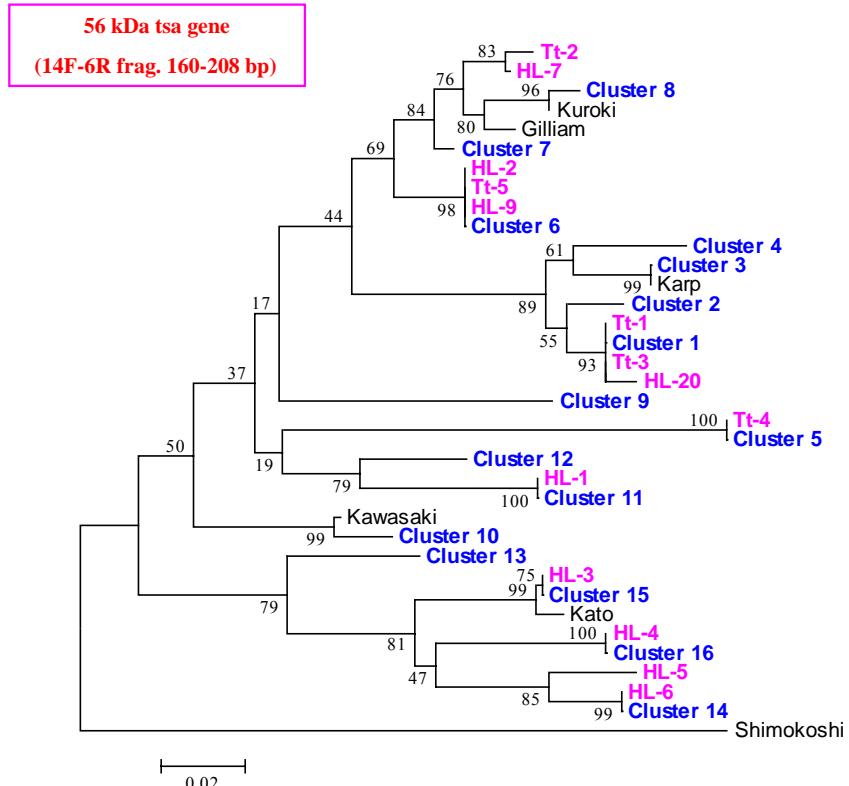
## Plasmid with groEL Gene-Karp



Sensitivity: Ct=38, 2.11 copies/Rxn

圖三、*O. tsutsugamushi* 立克次體原型菌株與病人檢體中之菌株，利用引子組 RST-14F-6R 擴增出之 PCR 產物核酸定序及演化分析結果

**Phylogenetic tree based on *Tsa56* gene sequences of *Orientia tsutsugamushi* strains tested  
(111 PBMC in 16 Clusters)**



	KM	TP	TPC	KH	KHC	TC	TCC	HC	HCC	TY	TN	PH	PT	LC	NT	CY	CH	HL	Total
Cluster 1	26	1	2	2	6	1		1	1	3	1	1	1					46	
Cluster 2		1																1	
Cluster 3													1					1	
Cluster 4						1												1	
Cluster 5	1				2													3	
Cluster 6	9	3			1	5		1						1	3	2		25	
Cluster 7																1		1	
Cluster 8	1	2														1		4	
Cluster 9							1								1			2	
Cluster 10				1												1	2		
Cluster 11					1													1	
Cluster 12												2						2	
Cluster 13												1						1	
Cluster 14														1				1	
Cluster 15	3																	3	
Cluster 16	5		1	3	7	1												17	
Total	45	7	4	9	19	3	1	1	1	3	1	1	5	1	5	2	2	1	111

#### 圖四、非洲斑點熱病原體核酸定序結果：

##### **GroEL (133bp)**

CATCTTAATTGAGAAAAAATTATCAAATTACAACCGATGTTACCTATACTTGAGGCTGTAGTACAATCACAAACGCC  
TCTATTAAATTATTGCTGAGGATGTTGAGGGCGAAGCTTGCACGCTTGTA

##### **17kD (247bp)**

TAAGGGCAAAGGACAGCTTGGAGTAGGTGAGGTGCATTACTGGAGCAGTCTGGGACAATCGGTGAGGT  
ATGGATGAACAGGGATAGAAGACTTGCAGAGCTACCTCACAGAAAGCTTAGAAACAGCTCTAGTGGTAGTAACGTAGA  
ATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCC  
GTGAATAC

##### **ompA (491bp)**

TTATTTCAAAAAGCAATAACAACAAGGTCTAAAGCCGCTTATTCAACCACCTCAACCCGAGCGATAATGCTGAGTAGTAG  
CGGGGCACTCGGTGTTGCTGCAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTGATAATGTTGGCAATAATAATT  
GGAATGAGATAACGGCTGCAGGGTAGCTAATGGTAATCCTGCTGGCAGTCCTCAAAACAATTGGGCATTACTACGGT  
GGTATTACTATCACTGCAGATGCAGCCGATCGTATTACGGCTATAATGTTGAGGTACTACTCCGTAGGTCT  
AAATATTGCTCAAAATACCGTTGGTTCGATTATAACGGGAGGTAACTTGTGCTGTTACTATTACTGCCGGCAAAA  
GCTTAACTTTAACGGTAATAATGCTGTTGCTCAAATCATGGTTTGATGCTCCTGCCATAATTATAACAGGTTAGGA  
AATATAGCTTT

##### **ompB (273bp)**

CTGATACACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTTAGCTGGTTATAAGCTAAAACCACCGGTGCGTAATCGGTTAGATACG  
CTAGCTAACGATAACTTAATGATAGGTGCTGCTATTGGTATCACTAAAACGTATATAAAACCCAAGATTATAAGAAAGG  
TGATAAAACCGACGTTAACGGTTCTCATTCTCTATATGGTGCCTGAGCAGCTGTTAAGAACTCTTGCTCAAGGTA  
GTGCAATATTAGCTTAAACCAAGTGAAGAACAA