

計畫編號：DOH92-DC-1105

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

恙蟲病血清抗體及核酸診斷系統之建立

研究報告

執行機構：國立台灣大學獸醫學系

計畫主持人：潘銘正

研究人員：林卉宜，林念農

執行期間：92年1月1日至92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

目次

中文摘要	5
英文摘要	6
前言	7
材料與方法	9
結果	14
討論	16
結論與建議	19
參考文獻	20
附表	22
附圖	25

表次

表 1	<i>O. tsutsugamushi</i> 56kDa 基因之 PCR 引子序列	22
表 2	363 隻鼠類樣本之恙蟲病血清抗體總陽性率與幾何平均力價	22
表 3	363 隻鼠類樣本在各鼠種之恙蟲病血清抗體陽性率與幾何平均力價與顯著性試驗	23
表 4	r56 ELISA 之 Cutoff 值。敏感性、特異性與準確率	24

圖次

圖 1	恙蟲病間接螢光抗體檢測 (a)陽性結果在視野中，菌體帶有綠色螢光(b)陰性結果	25
圖 2	恙蟲病 Nested Polymerase Chain Reaction 具型別特異性之引子對	25
圖 3	363 隻鼠類樣本之恙蟲病血清抗體力價分布	26
圖 4	本實驗齧齒類樣本血清抗體陽性率之地理分布	27
圖 5	本實驗鼠類樣本 Gilliam 型之幾何平均力價與地理分布	28
圖 6	本實驗鼠類樣本 Karp 型別之幾何平均力價與地理分布	29
圖 7	本實驗鼠類樣本 Kato 型別之幾何平均力價與地理分布	30
圖 8	Gilliam、Karp、Kato 三種型別之幾何平均力價與在各採樣地點之差異性	31
圖 9	以液相層析儀純化 r56 蛋白。280 nm UV 之吸收圖譜	32
圖 10	液相層析純化後產物以 SDS-PAGE 確認	33
圖 11	ELISA 之 OD 值與 IFA 力價比較	34
圖 12	以 IFA 力價為 Gold standard 之 Cutoff 針對 ELISA 結果所繪的 ROC	35

一、中文摘要：

恙蟲病為患者遭帶有病原 *Orientia tsutsugamushi* 之恙蟲幼蟲(mite)叮咬，所引起之急性傳染病。野生齧齒類為最主要的保菌儲主。臺灣於 1955 年即將本病列為通報傳染病，各縣市至今均有病例報告。本實驗收集 363 個齧齒類樣本，以 Gilliam, Karp 與 Kato 三種抗原(血清型)分別進行間接免疫螢光抗體檢驗與病原分離。以了解台灣地區齧齒類動物恙蟲病流行病學之地理分布、主要鼠種與主要之病原血清型別。結果其總血清抗體陽性率為 60%。Karp 與 Kato 抗體力價大於 Gilliam。地理分布以台灣東南部與澎湖群島陽性率較高。小黃腹鼠為陽性率最高的鼠種 (86.6%)。恙蟲病標準診斷，是使用全菌抗原進行間接免疫螢光抗體檢驗。然而台灣每年約三千位疑似病患，且本菌屬於人畜共通傳染病，操作活菌具危險性，故提供無病原性抗原作為快速的初步抗體診斷有其必要。本試驗利用 *O. tsutsugamushi* 56 KDa 外膜蛋白質基因選殖於表現載體 pET11a，在 BL21 大腸桿菌株中表現重組蛋白作為酵素連結免疫吸附法之抗原以作為恙蟲病之初步診斷。選取 183 個大鼠與 81 個小鼠血清樣本進行試驗，以間接免疫螢光抗體力價大於等於 320 倍為陽性時，檢測小鼠樣本之敏感性為 80%、特異性為 79%。檢測大鼠樣本之敏感性為 73%、特異性為 72%。

中文關鍵詞：恙蟲病、間接螢光抗體測定、酵素連結免疫吸附法

二、英文摘要：

Tsutsugamushi disease, also known as Scrub typhus or chigger-borne typhus, is an acute infectious disease that occurs when humans are bitten by larval mites (chiggers) harboring the etiological agent *Orientia tsutsugamushi*. The wild rodents are the most important reservoir keeping the pathogen. In Taiwan, Scrub typhus has designated as a reportable communicable disease since 1955, and all counties had reported confirmed cases. In this study, we collected around 363 rodent sera from 7 harbors and 6 fields. Serum samples were screened for antibody by indirect immunofluorescence assay (IFA) using antigen (Gilliam, Karp and Kato serotypes). The sera antibody positive rate is 60%. Antibody titers of prototype strains Karp and kato are higher than Gilliam, also high in southeast Taiwan and Pescadores Islands. In rodent species, *Rattus losea* has highest positive rate (86.6%) than other species. Using the whole-cell antigen for IFA is the standard method of scrub typhus diagnosis. However, *O. tsutsugamushi* is a zoonotic pathogen and almost 3,000 suspect patients every year in Taiwan. It is essential to provide a non-hazardous antigen for preliminary antibody detection. The gene encoding 56 KDa outer membrane protein of *O. tsutsugamushi* was cloned into the expression vector pET11a. The recombinant protein expressed in *Escherichia coli* BL21 is used as antigen for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to screen 183 rat and 81 mouse sera. Sensitivity and specificity are 80% and 79% in mouse samples, 73% and 72% in rat samples, respectively by using IFA titre 1:80 as cutoff.

Keywords: Scrub typhus, *Orientia tsutsugamushi*, Indirect fluorescence antibody assay, enzyme-linked immunosorbent assay

三、前言：

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 (larval trombiculid mites) 叮咬，所引起之急性傳染性疾病。在臨床症狀中，造成包括發熱、焦痂 (eschar)、紅疹與淋巴腺病 (lymphadenopathy) 等症狀 [Kawamura *et al.*, 1995]。若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% [Kawamura *et al.*, 1995 ; Tsay *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000]。本病原為絕對細胞內寄生，主要在宿主細胞之細胞質內增殖。在傳染途徑方面，*Orientia tsutsugamushi* 與恙蟲為共生關係，可造成恙蟲幼蟲與寄生宿主野生齧齒類之間的感染。或藉由垂直感染至恙蟲子代。人類感染是藉由含病原之恙蟲幼蟲叮咬而造成 [Kawamura *et al.*, 1995]。病原型別除了 Gilliam, Karp 與 Kato 三種標準株外，各地還有超過三十種不同血清型之分布。治療方面，氯黴素與四環黴素類之抗生素有顯著之療效並可完全治癒。叢林性斑疹傷寒之地理分佈，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 [Kawamura *et al.*, 1995]。雖然恙蟲病可藉由抗生素治療而痊癒，但由於錯誤之診斷與抗生素選用不當，世界上每年均有零星致死之案例發生。而台灣在 1955 年即將此病列為通報傳染病，現歸類為第三類乙種傳染病。各縣市均有病例發生但主要在金門縣、台東縣、花蓮縣、南投縣、澎湖縣等地區 [Chen *et al.*, 1993]。

本實驗於七個港區與六處田野，收集 363 個齧齒類樣本，以 Gilliam、Karp 與 Kato 三種抗原(血清型)分別進行間接免疫螢光抗體檢驗與病原分離。以了解台灣地區齧齒類動物恙蟲病流行病學之地理分布、主要鼠種與主要之病原血清型別。恙蟲病標準診斷，是使用全菌抗原進行間接免疫螢光抗體檢驗。然而台灣每年約三千位疑似病患，且本菌屬於人畜共通傳染病，操作活菌具危險性，故提供無病原性抗原作為快速的抗體篩檢有其必要。本試驗利用 *O. tsutsugamushi* 56 KDa 外膜蛋白質基因選殖於表現載體 pET11a，在 BL21 大腸桿菌株中表現重組蛋白作為酵素連結免疫吸附法之抗原以作為恙蟲病之快速診斷。

四、材料與方法：

恙蟲病血清診斷系統建立

1.動物樣本收集

港區鼠類血清樣本來自於行政院衛生署疾病管制局，自 1998 到 1999 年港區鼠疫桿菌監測計畫。採樣地點包括基隆 (Keelung)、台北 (Taipei)、台中 (Taichung)、高雄 1 區 (Kaosiung 1)、高雄 2 區 (Kaosiung 2)、花蓮 (Hualien)、蘇澳 (Suao)等七個港區。田野樣本於台北市 (Taipei city)、玉里 (Yuli)、阿里山 (Alishan)、馬公 (Makung)、馬祖 (Matsu)、金門 (Kinman) 等六處田野，其中玉里與離島是每年病例數較高的地區因此列為主要的採樣地點。採樣步驟以 Sharman 捕鼠籠捕捉野生鼠類。紀錄鼠種、捕鼠日期與捕捉地點後，進行採血。收集血清，並以無菌操作收集肝臟與脾臟樣本。

2.血清抗體偵測

(1)抗原選定與培養

本實驗選擇恙蟲病病原 *Orientia tsutsugamushi* 之三種標準型別 Gilliam、Karp 與 Kato 作為抗體偵測的抗原。取凍存之已感染 *Orientia tsutsugamushi* 之 L929 細胞，迅速解凍，加入 BS-MEM (含 2% bovine serum) 至 2 mL。以乳化器打破細胞，離心 1000xg 5 分鐘，取上清液。再取培養 1-2 天，已生成單層之 L929 細胞株的 25T 培養瓶，棄掉培養液，以 MEM 清洗細胞兩次。每個培養瓶加入 0.5 mL 上清液，再加入 7 mL BS-MEM。置於 37 °C 培養箱 2 小時，每隔 30 分鐘搖晃一次。以磷酸緩衝溶液(PBS)

清洗三次，加入 7 mL BS-MEM，置於 37 °C 培養箱培養。每日刮取部份細胞，以吉薩(Giemsa stain)染色觀察 *Orientia tsutsugamushi* 生長情形。待所有細胞中均有 *Orientia tsutsugamushi* 生長時，棄掉培養液只留 1 mL。再將細胞刮下，連同培養液凍存於 -80 °C。

抗原玻片製備。取凍存之已感染 *Orientia tsutsugamushi* 之 L929 細胞，迅速解凍。加入少許 PBS。以乳化器打破細胞，離心 1000xg 5 分鐘，取上清液。上清液離心 15000xg 5 分鐘，去掉上層，加入等量 PBS 混合均勻。再次離心 15000xg 5 分鐘，去掉上層，加入少量 PBS 混合均勻。以 Giemsa stain 檢查濃度，400 倍視野中約含 2000 個菌體。少量分裝後供製作抗原玻片用，剩餘者凍存於 -80 °C。以微量滴管將 *Orientia tsutsugamushi* 點於螢光用玻片之孔穴中並風乾。以 -20 °C 丙酮固定 10 分鐘後風乾。將抗原玻片保存於 -80 °C。

(2)間接螢光抗體檢測

取出抗原玻片，加入 PBS (含 2% goat serum)，潤濕 10 分鐘。將血清以 PBS 自 1:20 起共 6 階段 4 倍連續稀釋至 1:20,480。將稀釋血清滴至抗原玻片上。置 37 °C 濕盒中作用 60 分鐘。再以 PBS 清洗玻片，每次 5 分鐘，清洗三次。加入 FITC 標定之山羊抗大鼠或山羊抗小鼠 IgG (cappel® Part no. 55503, 55745)。置 37 °C 濕盒中作用 30 分鐘。PBS 清洗玻片，每

次 5 分鐘，清洗三次。加入包埋劑 PPDA solution 並蓋上蓋玻片。最後以螢光顯微鏡 400 倍鏡檢。判定抗體力價。

(3)力價判定

血清經稀釋至 320 倍後，螢光顯微鏡 400 倍視野鏡檢下，菌體仍帶有綠色螢光者，判定為陽性(圖 1)。

重組外膜蛋白抗原 (r56) 之表現與純化

使用由美國海軍醫學研究所 (Naval Medical Research Institute, Bethesda, Maryland, U.S.A.) 分讓之 *Escherichia coli* 菌株 BL21 (含 *Orientia tsutsugamushi* Karp strain recombinant protein (r56) gene之表現載體pWM1) (Ching et al., 1998)。取 1 mL 的菌液置入已含 Ampicillin 之 LB 中，37°C 培養至 OD₆₀₀ 0.5 時加入 1 mM IPTG 隔夜培養 16-18 小時。收集細菌後置於冰上以超音波打碎每次 20 秒共 6 次。離心 8000xg，30 分鐘。沉澱物以 Buffer A (with 2 M urea) 混合後震盪 10 分鐘，再離心 15000xg 取沉澱物以 Buffer A (with 4 M urea) 混合後震盪 10 分鐘，再離心 15000xg 取沉澱物。最後以 Buffer A (with 8 M urea) 溶解後，以液相層析儀 (liquid chromatography)，與離子交換管柱 (DEAE-column)，純化 r56 蛋白。溶劑為 Buffer B，NaCl 梯度由 0.0-2.0 M，流速 1 mL/min，30 分鐘。並以 280 nm UV 偵測。純化後產物以 SDS-PAGE 確認 r56 存在。以含 4 M Urea 的 Buffer A，室溫下透析純化產物 30 分鐘。再以含

2 M Urea的Buffer A，室溫下透析純化產物30分鐘。再以Buffer A，室溫下透析純化產物30分鐘。最後以Buffer A，4°C下透析純化產物16-18小時，恢復r56之結構。最終產物以Bio-Rad[®] Protein assay kit 定量並作為ELISA之抗原。

發展恙蟲病酵素連結免疫吸附法檢驗套組並評估其敏感性與特異性

將純化之 r56 蛋白作為抗原，加入 96 孔平底微量盤中 25 μ L (5 μ g/mL)

在 4 °C 下隔夜使抗原附著。以 PBS (含 1% Bovine serum albumin)潤濕

1 小時。再以 PBS 清洗兩次每次 5 分鐘。

(1)血清樣本收集

隨機選取港區與田野之齧齒類血清樣本。並配合鼠種選擇二次抗體。

(2)ELISA 抗體檢測

一次抗體為齧齒類之血清樣本，以PBS稀釋400倍。取25 μ L加入微量盤置於室溫1小時後，以含0.1% Triton X-114 (Sigma Chemical)的PBS洗4次。微量盤中加入25 μ L Peroxidase-conjugate goat anti Rat (或goat anti mouse) IgG置於室溫1小時，再以含0.1% Triton X-114的PBS洗4次，最後以PBS清洗一次。加入25 μ L 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (ABTS)呈色液。於室溫下作用15分鐘後，以405 nm波長讀取結果。

(3)統計方法

以 IFA 結果作為 Gold standard 評估 ELISA 結果。T test 計算 OD405 與 IFA 力價的關係。以 Receiver-Operator Curve，平均值加兩倍標準偏差，與 Two-graph Receiver-Operator Curve 計算 ELISA 之 Cutoff 值。[Ching, *et*

al., 1998, 2001; Göbel, *et al.*, 1995]

針對台灣恙蟲病分離株設計具特異性之引子以核酸增幅法加以分型

(1)病原分離

取抗體陽性老鼠之脾臟。乳化後腹腔注射於 ICR 小鼠。並在接種後 1、2、5、7 日腹腔注射免疫抑制劑 Cyclophosphamide (0.2 mg/g weight)。取接種小鼠之脾臟。同樣方式接種於健康小鼠上，繼代三次。若分離成功，感染小鼠可見其脾臟腫大與腹水，腹腔巨嗜細胞及脾臟細胞在 Giemza stain 下可見 *Orientia tsutsugamushi* 之生長。再將脾臟細胞或腹腔巨嗜細胞與 L929 細胞株共同培養。

(2)病原型別鑑定

以 Kawamura 等(1995)所設計之 Nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR)偵測病原分離之 L929 細胞株，確定分離的結果並加以分型(圖 2)。將感染 *Orientia tsutsugamushi* Gilliam、Karp、Kato 標準株的 L929 細胞以沸水煮 5 分鐘後，上清液即為陽性對照之 DNA 樣本。第一次 PCR 使用 Primer34 及 Primer55 引子。目標基因: 56 kDa protein gene。第二次 PCR 使用具型別特異性之引子加以分型(94 5' , 94 2'-57 2'-70 2 x 30 cycles , 72 7')。

五、結果：

恙蟲病之 ELISA 抗體檢測開發：

液相層析儀純化 r56 蛋白。以 280 nm UV 偵測下。在 NaCl 梯度開始上升的 8 分鐘後，出現一高峰 (圖 9)。純化後產物以 SDS-PAGE 確認。在分子量 41000 的位置附近可看到 r56 蛋白存在(圖 10)濃度為 0.3 mg/mL。ELISA 結果方面，將 OD405 與 IFA 力價比較。大鼠樣本與小鼠樣本中，OD405 平均值隨抗體力價上升而上升且有統計上的意義 (圖 11)。以 IFA 力價 0、20、80 為 Gold standard 之 Cutoff 值，針對 ELISA 結果所繪的 Receiver-Operator Curve，可見以 IFA 力價小於等於 80 倍為陰性之 Gold standard 有最好的鑑別能力 (圖 12)。再以平均值加兩倍標準偏差 (mean+2SD)，與 Two-graph Receiver-Operator Curve (TG-ROC)計算 ELISA 之 OD405 Cutoff 值作為參考，結果在大鼠樣本 Mean+2SD 的敏感性為 23%、特異性為 100%、準確率為 0.65，大鼠樣本 TG-ROC 的敏感性為 72%、特異性為 75%、準確率為 0.74。小鼠樣本 Mean+2SD 的敏感性為 35%、特異性為 100%、準確率為 0.84，小鼠樣本 TG-ROC 的敏感性為 80%、特異性為 79%、準確率為 0.79。最後參考 TG-ROC 之最低值，以提高敏感性並作為本實驗決定之 Cutoff 值。結果在大鼠樣本的敏感性為 73%、特異性為 72%、準確率為 0.72。小鼠樣本的敏感性為 80%、特異性為 79%、準確率為 0.79 (表 4)。

臺灣地區恙蟲病之血清抗體診斷：

本實驗於七個港區與六處田野共收集 363 個齧齒類血清樣本，在間接免疫螢光染色抗體力價大於等於 320 倍為陽性下，總陽性率為 60%。Gilliam type 陽性率 40%；幾何平均力價 115 倍。Karp type 陽性率 43.8%；幾何平均力價 205 倍。Kato type 陽性率 56.2%；幾何平均力價 363 倍 (表 2)。三

種標準型別的力價分布 Kato type 與 Karp type 高於 Gilliam type 三者有顯著性差異 ($p < 0.05$) (圖 8)。地理分佈方面，各地陽性率，港區樣本基隆 50%、台北 74.3%、台中 64%、高雄 1 區 42.9%、高雄 2 區 77%、花蓮 90.2%、蘇澳 25.6%。田野樣本台北市 19%、玉里 88.3%、阿里山 75%、馬公 93.8%、馬祖 62.5%、金門 77%。抗體力價分布，田野樣本大於港區樣本並有顯著性差異 ($p < 0.05$) (圖 9)。Gilliam type 在玉里、花蓮有最高的抗體力價，其次為馬公、金門、台北市、阿里山、高雄 2 區、基隆、台中、台北港區，最低者為、高雄 1 區、蘇澳、馬祖(圖 5)。Karp type 在玉里、花蓮、馬公有最高的抗體力價其次為高雄 2 區、金門、阿里山、基隆、蘇澳、高雄 1 區、台中，最低者為台北市、台北港區、馬祖(圖 6)。Kato type 在玉里、花蓮、馬公有最高的抗體力價其次為高雄 2 區、金門、台中、台北市、基隆、台北港區、高雄 1 區，最低者為蘇澳、阿里山、馬祖 (圖 7)。三種型別在各採樣地點的抗體分佈上，玉里、花蓮、馬公、阿里山三型別力價分佈無差異性，高雄 1 區、高雄 2 區、蘇澳、馬祖力價分佈 Kato 與 Karp type 大於 Gilliam type，基隆、台北港區、台中力價分佈 Kato type 大於 Karp 與 Gilliam type，台北市則 Kato 與 Gilliam type 大於 Karp type (圖 8)。在鼠種方面，共有六種鼠種，分別是 *Bandicota indica*、*Rattus losea*、*R. norvegicus*、*Mus formosanus*、*M. musculus* 與 *Suncus murinus*。其中數量以 *R. norvegicus* 最多(174 隻, 47.9%)，但在陽性率與抗體力價分布上以 *Rattus losea* 為最高(86.6%)。以採樣地點作為區集後，*Rattus losea* 抗體力價仍大於其他鼠種並有顯著性差異 ($p < 0.05$) (表 3)。病原分離方面，選取間接螢光染色法高抗體力價者之脾臟樣本共 35 個。經過分離程序後再以 Nested PCR 偵測，結果並無分離到恙蟲病病原。

六、討論：

本試驗利用 *O. tsutsugamushi* 56 KDa 外膜蛋白質基因選殖於表現載體 pET11a，在 BL21 大腸桿菌株中表現重組蛋白時，可大量製備不具感染性的抗原蛋白在產量與純度上優於由病原菌萃取抗原，並利於大量診斷試劑製備與研發 [Ching, *et al.*, 1998]。且應用於酵素連結免疫吸附法時，以單一抗原來偵測血清抗體，將有助於減少非特異性反應以提高試驗的特異性。恙蟲病以 IFA 為診斷試驗時，須具備至少三種標準型別，各地也具有數十種地方分離株 [Kawamura *et al.*, 1995; Tamura *et al.*, 1995]。在結果中，OD405 平均值隨抗體力價上升而上升。在大鼠樣本的敏感性為 75%、特異性為 72%、準確率為 0.72。小鼠樣本的敏感性為 80%、特異性為 79%、準確率為 0.79。本實驗是以鼠類血清樣本進行，在結果上與以人類血清進行的試驗結果 [Ching, *et al.*, 1998] 敏感性、特異性稍差。原因可能為採樣過程中樣品的溶血容易發生，造成較高的背景值的緣故。由於本實驗希望以酵素連結免疫吸附法作為恙蟲病快速的篩檢診斷，因此選擇以較低的 Cutoff 值，來提升本實驗的敏感性。結果 r56 ELISA 在多種型別的流行地區亦具有快速診斷的能力，可用於恙蟲病在鼠類的田野調查。且在操作過程上酵素連結免疫吸附法可同時偵測大數量的血清樣本，並得到客觀的觀測值。

臺灣在診斷恙蟲病病患所使用的抗體力價標準較日本高而低於泰國〔Chen *et al.*, 1995 ; Ching *et al.*, 1998 〕。臺灣的齧齒類族群中，普遍存在恙蟲病抗體。且相較於日本，有較高的抗體力價。因此選擇較高的力價標準，較易於臺灣地區在地理分佈與流行鼠種，在恙蟲病流行病學上的分析。

臺灣由患者分離的恙蟲病病原型別，Chen 等在 1995 年分離 15 株 Gilliam 型、10 株 Karp 型與 8 株不明型別之病原菌。在 1997 年由 247 位病患中，分離到 71 株包含 Kurok 型 34 株、Karp 型 6 株、Gilliam 型 2 株，並將 28 株不明型別命名為 Taiwan A-F 六型〔Chen *et al.*, 1999 〕。Tamura 等人在 1997 年於花蓮、澎湖等地野生齧齒類分離出 Taiwan Gilliam I 與 Taiwan Karp I-VI 型分離株。但本實驗結果在鼠類血清抗體力價的表現上，高力價傾向於 Karp 與 Kato 型，Gilliam 型則較低，卻與上述分離結果不同，可能臺灣鼠種的感染菌株在抗原性上可能與前兩者相似。陽性樣本常同時具有多種型別的抗體陽性，因此不同型別的重複感染在臺灣齧齒動物十分常見。本實驗以三種標準型別進行分析，將來若加入臺灣本地的分離株為抗原，將可更清楚了解恙蟲病在鼠類流行的全貌。

相較於恙蟲病在臺灣病患的流行病學調查，季節分布上，春夏兩季出現高峰。臺灣在季節分布上較不明顯 7-10 月最多，但在清明節後常有病例的增加。職業趨向上，以軍人、農民、伐木工人與林區作業人員為主。

男性多於女性，年齡分布在 21-60 歲 [Chen *et al.*, 1993] 而研究地區主要為離島與花東等高發生率地區為主。針對本病傳播主要環節的野生鼠類，其疾病流行病學與臺灣全島的大規模調查則較少。由陽性結果可知港區樣本力價分佈低於田野樣本，符合本疾病的傳播模式 [Kawamura *et al.*, 1995]，田野樣本有比較高的機會藉由恙蟲叮咬而感染。雖然三型別之力價分佈在地理位置上有些許不同，但在臺灣東南部花蓮、屏東與離島澎湖、金門，都有較高的陽性率與抗體力價，則與臺灣人類病例分佈相似 [Chen *et al.*, 1999]，保菌儲主的血清學分佈可以反映到人類病例的表現。高陽性率與高抗體力價地區如花蓮、玉里、馬公、金門，三型別之力價差異較小，而基隆、台北港區與台中則是以 Kato type 為主。台北市卻是以 Gilliam 與 Kato 為主。雖然 *R. norvegicus* 在本實驗中有最多的數量。但在陽性率與抗體力價分布上以 *Rattus losea* 為最高(86.6%)。以採樣地點作為區集後，*Rattus losea* 抗體力價仍大於其他鼠種並有顯著性差異。臺灣在恙蟲病針對鼠種盛行率的資料較少，且集中於離島地區。*Rattus losea* 為金門地區主要鼠種，且具有最高的陽性率(61.1%) [Chen *et al.*, 1999] 則與本實驗結果類似。因此 *Rattus losea* 應為臺灣地區主要的恙蟲病病原儲主其次為 *Bandicota indica*。

七、結論與建議：

- 1、 IFA 檢驗方法並不適合做大量第一線篩選用，而應該為做最後確診用，否則非常的費時耗材，所以建議先由適當 ELISA 快速檢驗試劑做篩選，再進一步進行 IFA 確診。
- 2、 由於各地方流行之血清型並不相同，故進口國外之快速檢驗試劑使用並不能一體適用，而且價格昂貴，因此有必要儘速自行發展適合本土且價格合理的快速檢驗試劑。
- 3、 恙蟲病以臨床症狀作為診斷的誤判機率甚高，必須以實驗室的檢驗結果作為輔助。但間接螢光抗體檢驗、間接過氧化酵素試驗與早期的酵素連結免疫吸附法均需要操作活菌作為抗原，因此具有危險性。利用 *O. tsutsugamushi* 56 KDa 外膜蛋白質基因選殖於表現載體 pET11a，在 BL21 大腸桿菌株中表現重組蛋白時，可大量製備不具感染性的抗原蛋白。且以單一種抗原來偵測血清抗體，將有助於減少非特異性反應以提高試驗的特異性。在操作過程上酵素連結免疫吸附法可同時偵測大數量的血清樣本，並得到客觀的觀測值。臺灣為恙蟲病的流行地區，且每年都有大量恙蟲病疑似病患，以 r56 做為酵素連結免疫吸附法之抗原，將有助於恙蟲病的實驗室診斷。將來以臺灣分離株基因進行 56 KDa 外膜蛋白質基因選殖，混和多型別的重組蛋白研發單一步驟的診斷試劑或套組，如 Latex agglutination test 或 Lateral flow test 亦為本實驗的未來發展方向。

八、參考文獻：

1. Chen HL, Chen HY, Horng CB. Surveillance of scrub typhus in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 1993; 26: 166-70.
2. Chen HL, Chiu SC, Chen HY, Wang GR. Molecular typing of Taiwanese *Orientia tsutsugamushi* isolates by restriction fragment profile. *J Microbiol Immunol Infect* 1999; 32: 68-72.
3. Chen YC, Chao TY, Chin JC. Scrub typhus-associated hemophagocytic syndrome. *Infection* 2000; 28: 178-9.
4. 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* 2001; 8:409-14.
5. 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* 1998; 5:519-26.
6. Göbel P, Greiner M, Sohr D. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J Immuno Methods* 1995; 185: 123-132.
7. Kawamura A, Tanaka H, Tamura A. *Tsutsugamushi disease*. 1995; University of Tokyo Press, Tokyo.
8. 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* 1997; 150: 225-31.

9. 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 1995; 45: 589-91.
10. Tsay RW, Chang FY. Serious complications in scrub typhus. J Microbiol Immunol Infect 1998; 31: 240-4.

九、附表：

表 1 *O. tsutsugamushi* 56kDa 基因之 PCR 引子序列。

Name	Oligonucleotide sequence 5'→3'
Primer34	TCAAGCTTATTGCTAGTGCAATGTCTC
Primer55	AGGGATCCCTGCTGCTGTGCTTGCTGCG
Primer10	GATCAAGCTTCCTCAGCCTACTATAATGCC
Primer11	CTAGGGATCCCGACAGATGCACTATTAGGC
PrimerKp	ACAATATCGGATTTATAACC
PrimerKr	CACCGGATTTACCATCATAT
PrimerKw	ATGCTGCTATTGATACAGGC
PrimerKt	GAATATTTAATAGCACTGGA
PrimerGl	CTTTATATCACTATATATCTT
PrimerFSF2	GATTCCACAAGTAGTTCAGGG
PrimerFSF1	ACAAGTAGTTCAGGG

[Kawamura *et al.*, 1995]

表 2 363 隻鼠類樣本之恙蟲病血清抗體總陽性率與幾何平均力價



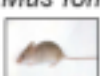
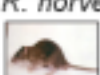


Positive rate	Percentage (number/total)
Total	60% (218/363)
Gilliam type*	40% (145/363)
Karp type**	43.8% (159/363)
Kato type***	56.2% (204/363)

* Geometric mean of Gilliam =115

** Geometric mean of Karp =205

*** Geometric mean of Kato =363

表 3 363 隻鼠類樣本在各鼠種之恙蟲病血清抗體陽性率與幾何平均力價與顯著性試驗。

Rodent species	N (%)	Indirect Total	Immunofluorescence Gilliam	assay Karp	Kato	Duncan***
<i>Rattus losea</i> 	67 (18.5)	86.6%	1736* (76%)**	1810 (73.1%)	2706 (79%)	A
<i>Bandicota indica</i> 	56 (15.4)	76.8%	290 (52%)	453 (57.1%)	905 (71%)	B
<i>Mus formosanus</i> 	21 (5.8)	61.9%	189 (57%)	189 (52.4%)	299 (62%)	C
<i>R. norvegicus</i> 	174 (47.9)	51.7%	43 (20%)	105 (33.3%)	197 (49%)	D
<i>Suncus murinus</i> 	34 (9.4)	35.3%	27 (21%)	54 (23.5%)	77 (35%)	E
<i>M. musculus</i> 	11 (3)	18.2%	14 (0%)	49 (9.1%)	32 (9%)	E

* Geometric mean

** Positive rate

*** Duncan Mutiple range test

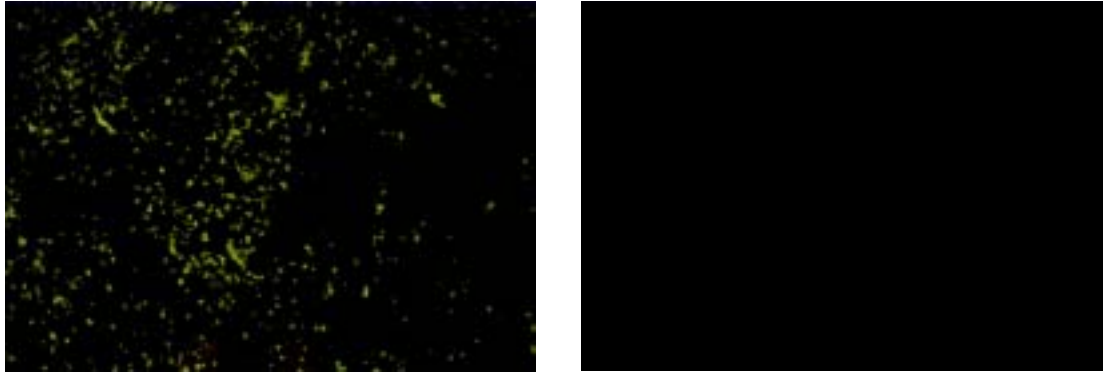
文字不相同者，相互之間具有顯著性差異， $p < 0.05$ 。

表 4 r56 ELISA 之 Cutoff 值。敏感性、特異性與準確率。

	Rat			Mice		
	Mean+2SD	TG-ROC*	Arbitrary	Mean+2SD	TG-ROC	Arbitrary
Cutoff (OD)	0.55	0.428	0.421	0.65	0.522	0.522
Sensitivity	23%	72%	73%	35%	80%	80%
Specificity	100%	75%	72%	100%	79%	79%
Accuracy	0.65	0.74	0.72	0.84	0.79	0.79

*Two-graph ROC

十、附圖：

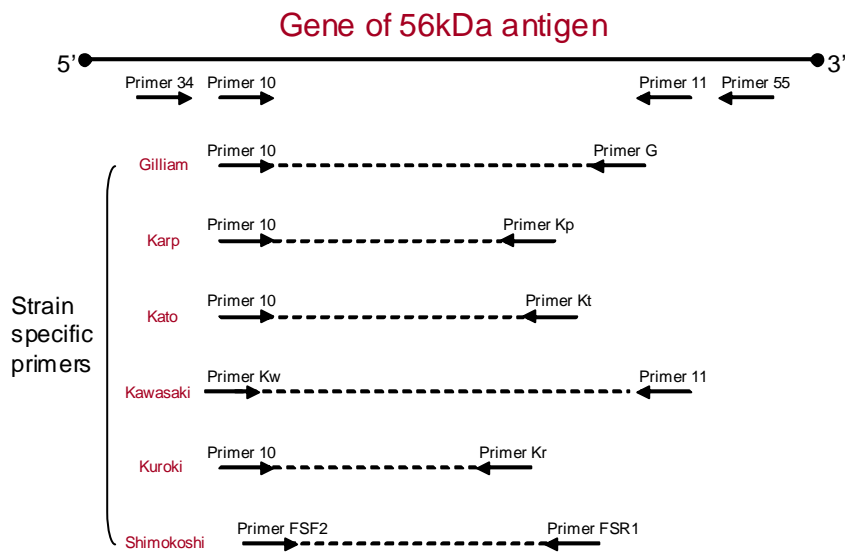


(a)

(b)

圖 1 恙蟲病間接螢光抗體檢測。

(a)恙蟲病陽性結果在視野中，菌體帶有綠色螢光(b)恙蟲病陰性結果在視野中，菌體不帶有綠色螢光



[Kawamura *et al.*, 1995]

圖 2 恙蟲病 Nested Polymerase Chain Reaction 具型別特異性之引子對。

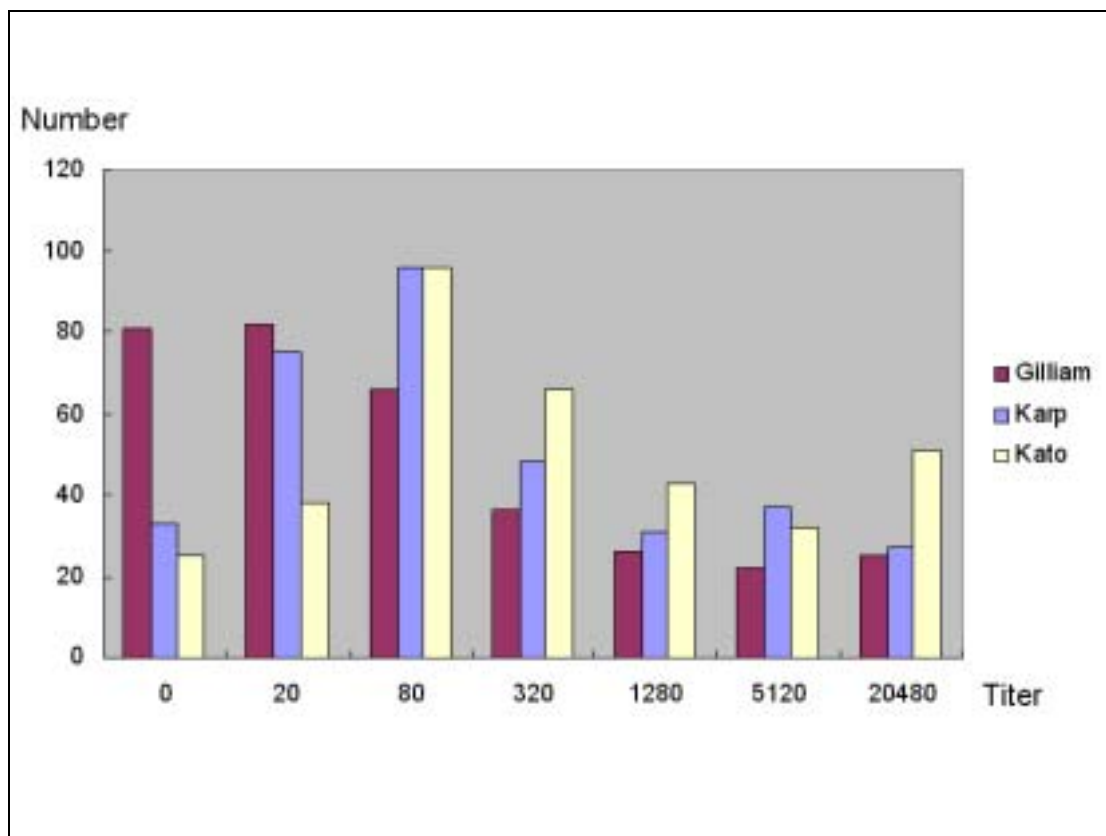


圖 3 363 隻鼠類樣本之恙蟲病 IFA 血清抗體力價分布。
 橫軸為 IFA 抗體力價，縱軸為樣本個數。■為 Gilliam 型，■為 Karp 型，□為 Kato 型。

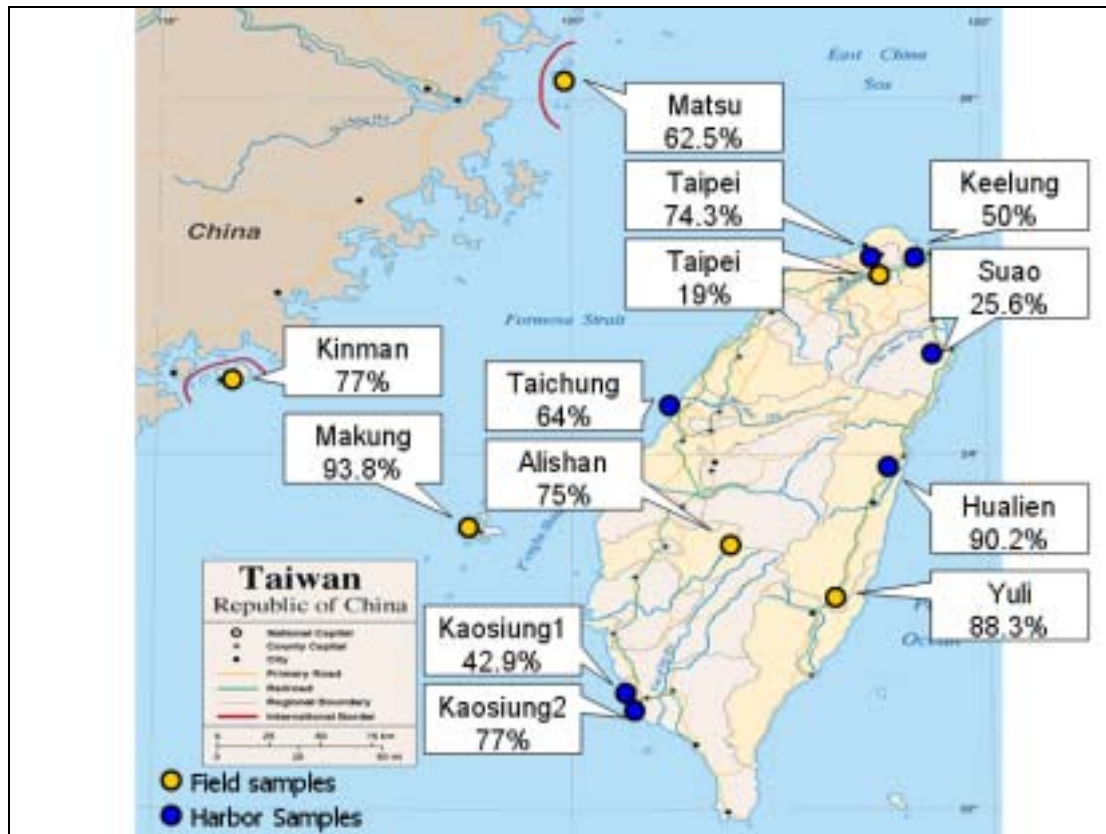


圖 4 本實驗齧齒類樣本血清抗體陽性率之地理分布。

● 田野樣本。 ● 港區樣本。

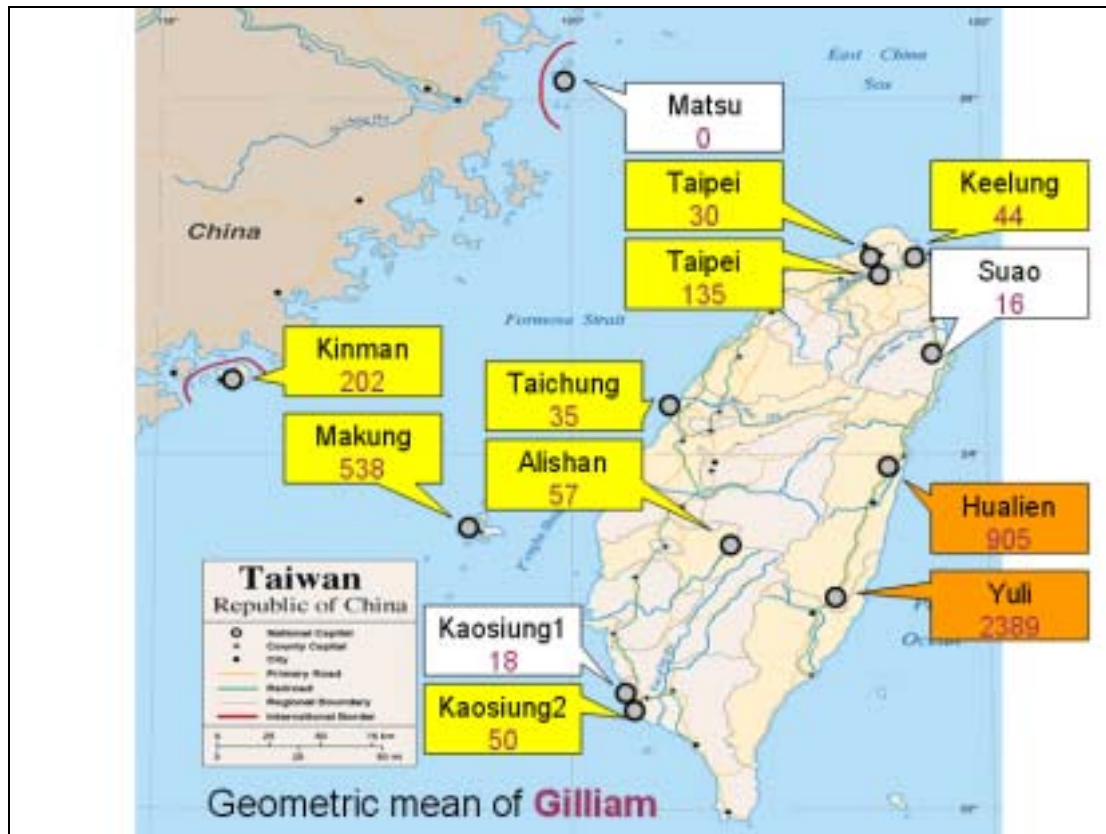


圖 5 本實驗鼠類樣本 Gilliam 型別之幾何平均力價與地理分布。抗體力價差異以不同顏色表示，■ ■ □三者間有顯著性差異， $p < 0.05$ ，框內數字為幾何平均力價。

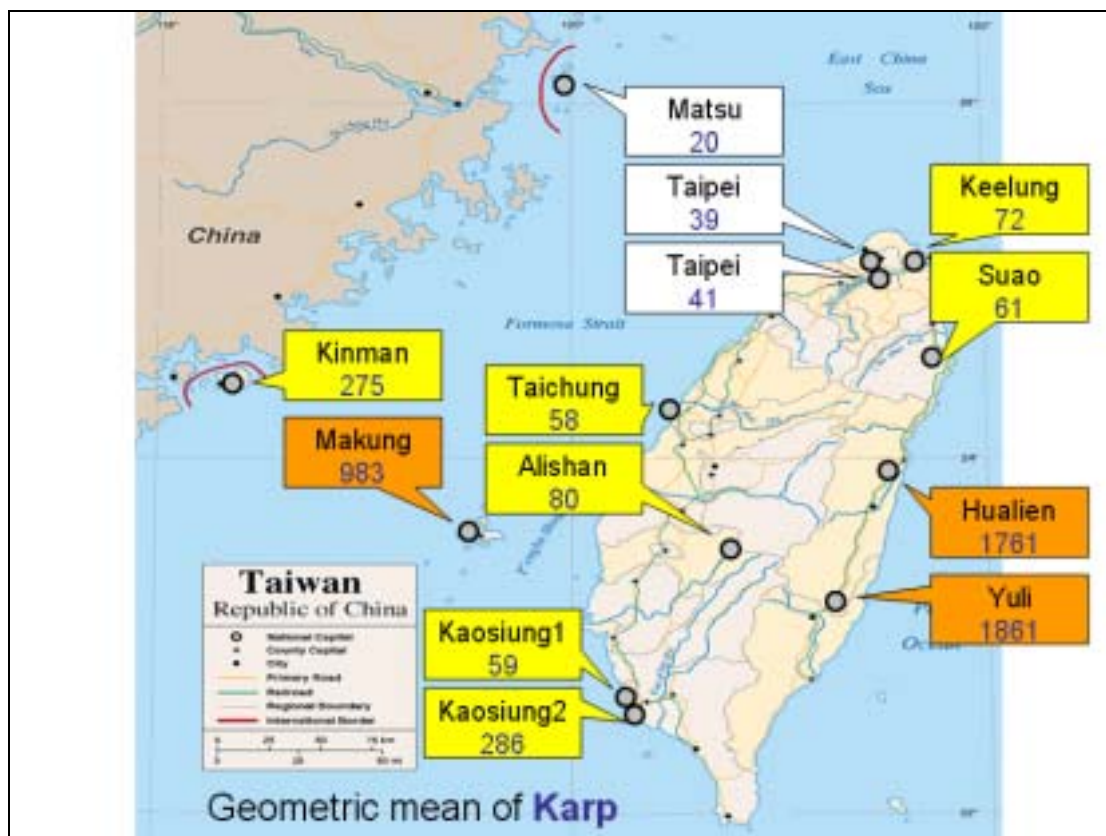


圖 6 本實驗鼠類樣本 Karp 型別之幾何平均力價與地理分布。抗體力價差異以不同顏色表示，■ ■ □三者間有顯著性差異， $p < 0.05$ ，框內數字為幾何平均力價。

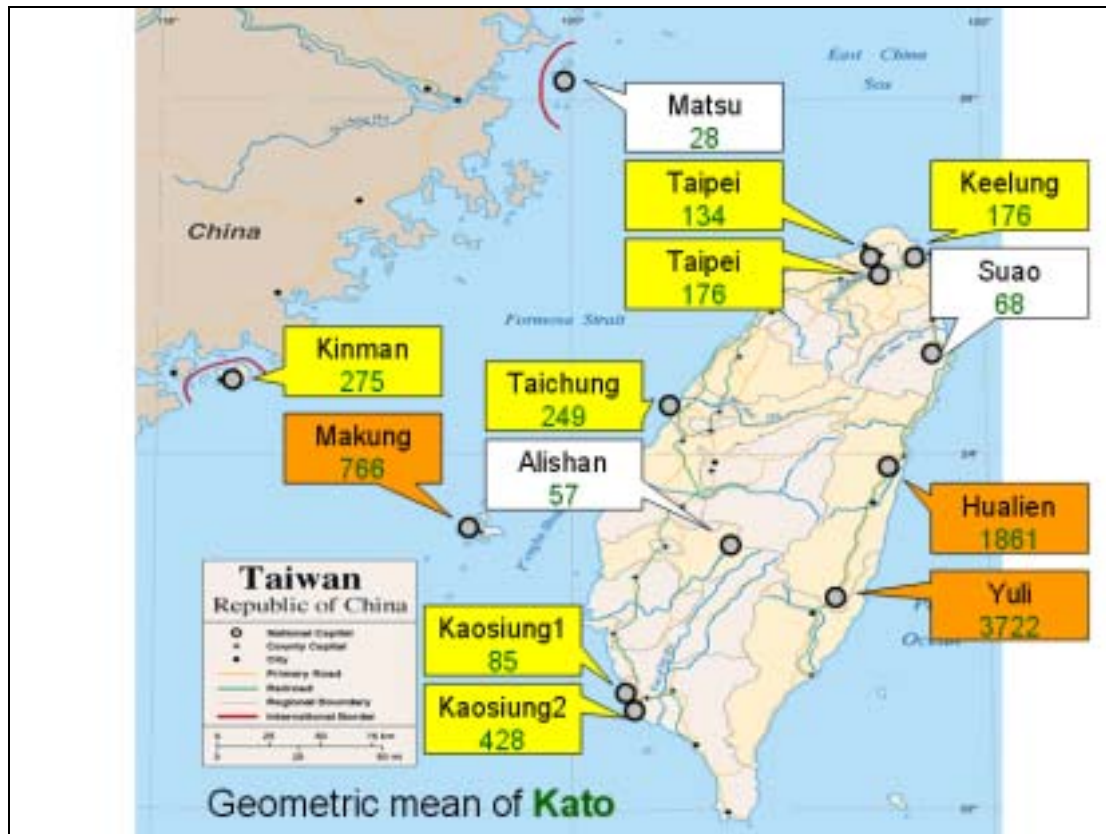


圖 7 本實驗鼠類樣本 Kato 型別之幾何平均力價與地理分布。
 抗體力價差異以不同顏色表示，■ (三者間有顯著性差異， $p < 0.05$ ，框內數字為幾何平均力價。

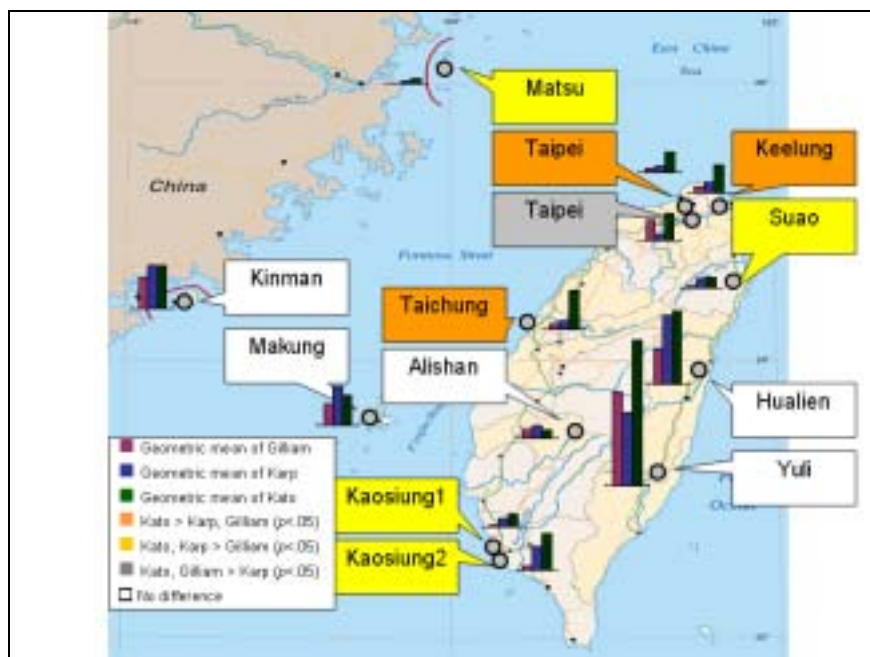


圖 8 Gilliam、Karp、Kato 三種型別之幾何平均力價與在各採樣地點之差異性。

(Kato > Karp 與 Gilliam, (Kato 與 Karp > Gilliam, (Kato 與 Gilliam > Karp , (無顯著性差異。 $p < 0.05$

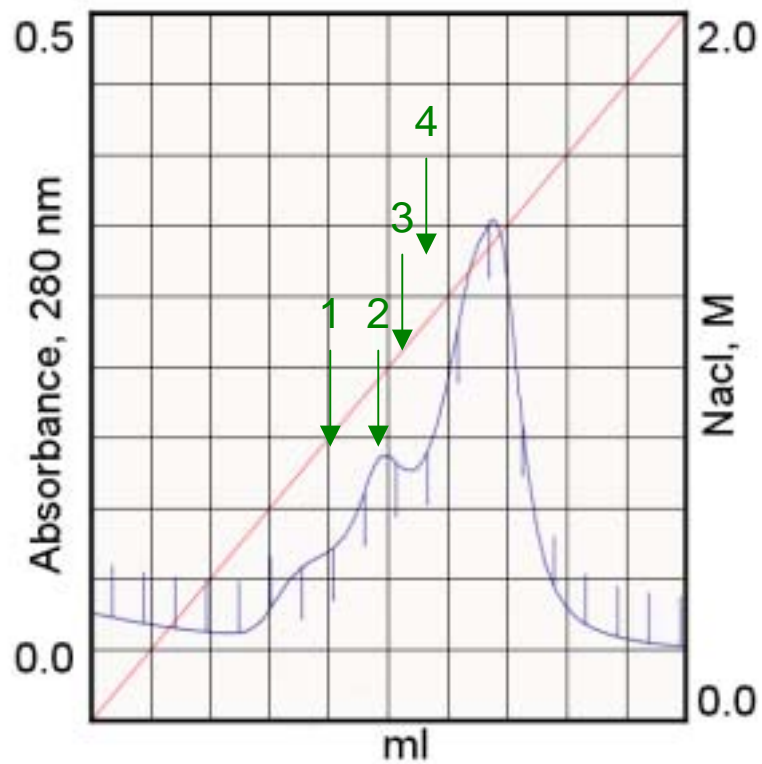


圖 9 以液相層析儀純化 r56 蛋白。280 nm UV 之吸收圖譜。
 -為 280 nm UV 之吸收圖譜，參考左方縱軸。-為 NaCl 濃度梯度，
 參考右方縱軸。綠色箭頭為 SDS-page 樣本收集處。

Marker 1 2 3 4

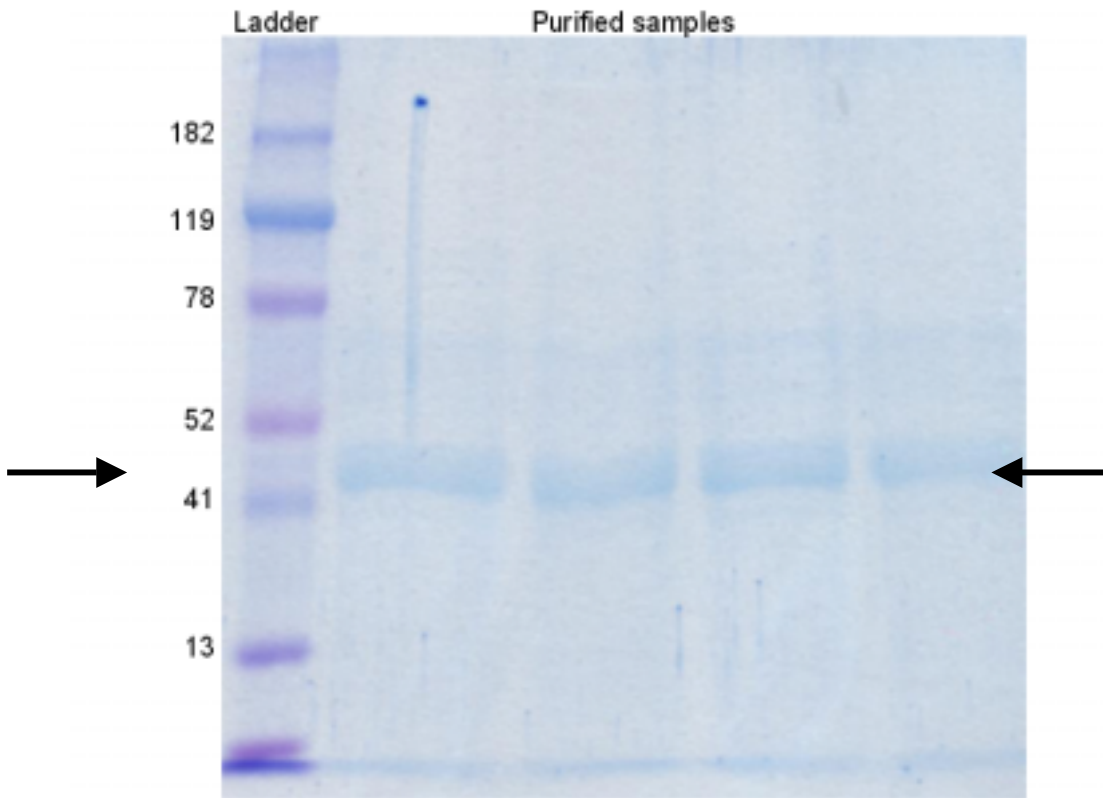


圖 10 液相層析純化後產物以 SDS-PAGE 確認。

液相層析吸收圖譜高峰位置取樣(參考圖 15)進行 SDS-PAGE (Lanes 1-4)。在箭頭處可看到 r56 蛋白質存在。

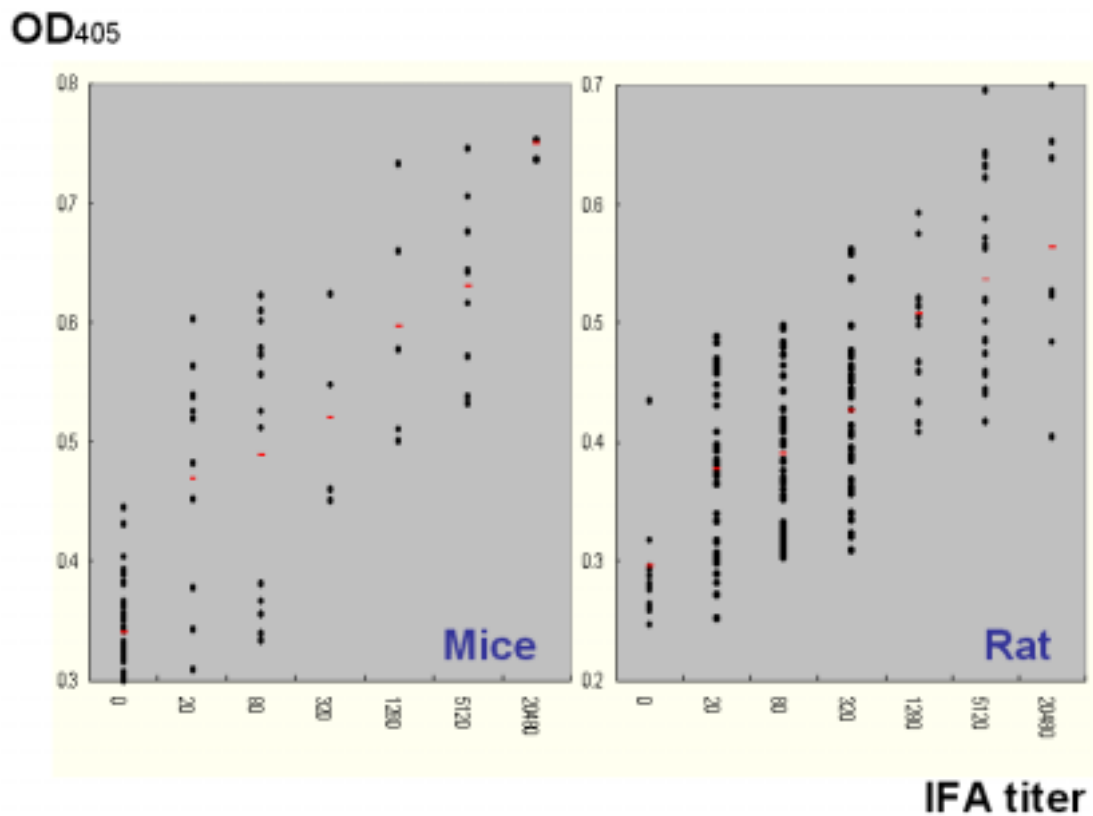


圖 11 ELISA 之 OD 值與 IFA 力價比較。

在大鼠樣本與小鼠樣本中，平均值隨抗體力價上升而上升， $p < 0.05$ (—為各力價之 OD405 平均值)。橫軸為樣本之 IFA 力價，縱軸為 ELISA 在 OD405 之吸收度。

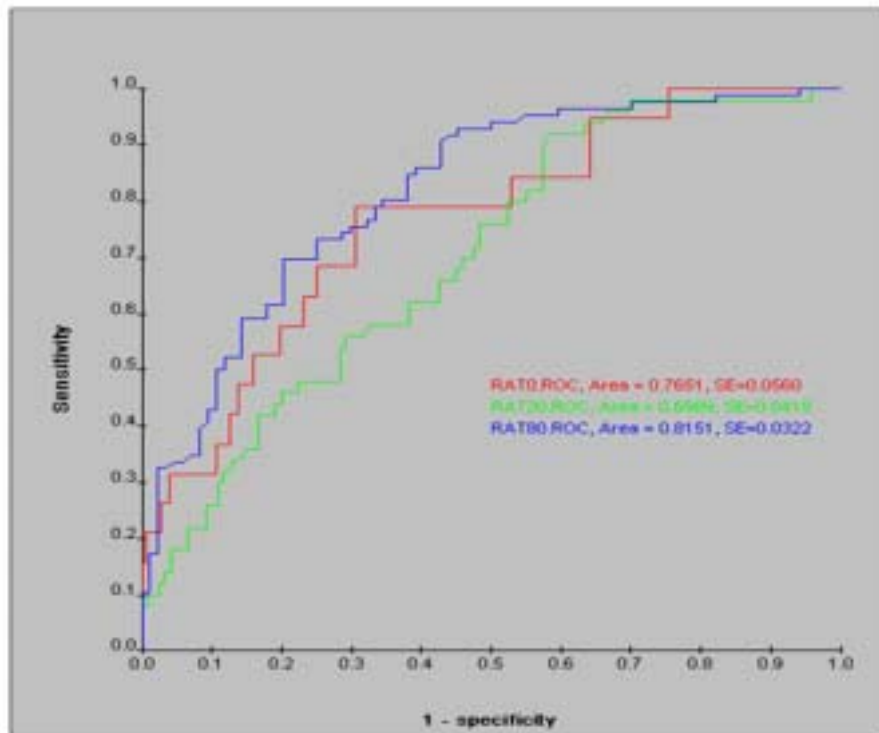


圖 12 以 IFA 力價為 Gold standard 之 Cutoff 針對 ELISA 結果所繪的 Receiver-Operator Curve[0 (-)、20 (-)、80 (-)]。

以 80 倍作為 IFA Gold standard 之 Cutoff 值,曲線下方面積大於其他兩者,因此在 ELISA 結果上有較好的鑑別度。