

計畫編號：DOH98-DC-2023

行政院衛生署疾病管制局 98 年度科技研究發展計畫

建構南台灣 *C. burneti* 菌(Q熱)檢驗參考實驗室

ELISA之建置及Q FEVER菌體培養

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：林立人

協同主持人：施文儀 舒佩芸 洪敏南 林建州 陳建成

研究人員：林栢杉 侯閔議 吳金雀 蕭文絜 王詠中

執行期間：2009 年 1 月 1 日至 2009 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

	頁碼
封面	
目錄	(2)
摘要	(3)
壹、前言	(7)
貳、材料與方法	(11)
參、結果	(16)
肆、討論	(19)
伍、圖表	(23)
陸、參考文獻	(40)

共 (41) 頁

中文摘要

本計畫之目的在對 Q 熱(Q fever)病原菌 *Coxiella burnetii*，建立高效能之篩檢技術以及對感染者的血清流行病學追蹤調查，以達到早期偵測、早期診斷及預防保障人民健康安全。

Q fever 判定的標準方法為間接螢光抗體(Indirect immunofluorescent antibody, IFA)之檢驗，雖然有高度的靈敏性，但在專一性上仍有交叉反應(cross-reaction)的疑慮，再加上 IFA 需依賴視力觀察來判定，因此判定標準在不同檢驗者間也有差異。除此之外，由於 IFA 需依賴人力來進行判定，因而並不適用於大量的篩檢。為此，本實驗室擬開發適用於自動化篩檢的酵素免疫分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。目前市面上僅有一家商業化以 *C. burnetii* 菌體作為抗原的 Q fever ELISA 檢驗試劑，但以重組蛋白 (Recombinant protein) 作為抗原的 ELISA 篩檢試劑則尚未被開發。本實驗室選用 ABC transporter lipoprotein、ompA、FtsZ、recA、chaperonin、ribosomal protein L9 以及 com1 等七種不同重組蛋白測試。初測時其靈敏度低(<30%)，但在改良緩衝液後可提高靈敏度至 70-80%。另外，發現「動物血清」是造成靈敏度提昇的主要原因，在未使用重組蛋白為抗原的情況下，仍可有效的區別 Q fever 陽性與陰性血清。進而，經由交叉比對測試立克次體或登革熱感染者的血清後，顯示其對 Q fever 檢驗有相當高的靈敏度，推測此現象對 Q fever 感染的血清學有關。除了可應

用於 Q fever 篩檢技術的發展，也值得更深入去探討。

對疑似慢性 Q fever 的個案和本(2009)年度高屏地區急性 Q fever 確診病患進行血清學的追蹤結果顯示：所有 24 位血清學疑似慢性 Q 熱的個案在未接受治療下，經過 2 年至 5 年的追蹤並未出現慢性 Q fever 臨床症狀，且其血清學也無呈現顯著的進展變化($\geq 4X$ increment)，反而是有 5 位的抗體有顯著下降，其中 3 位的抗體甚至已達正常範圍內，這暗示台灣的血清呈現疑似慢性 Q 熱感染者似乎不需立即予以治療，長期追蹤抗體甚至有反轉之可能。至於 19 位急性 Q 熱患者於發病後半年的血清追蹤結果雖然均無呈現慢性感染，但也許仍須將追蹤時間延長，以決定何時可以在這群人安全的解除追蹤。

關鍵詞：Q fever、*Coxiella burnetii*、酵素免疫分析、血清流行病學。

ABSTRACT

Q fever is a ubiquitous zoonotic disease caused by an obligate intracellular pathogen *Coxiella burnetii*, which occurs outbreaks of acute infections and is also a possible bioterrorism agent. To better understand and prevent the disease, in this study we aim at developing high-throughput diagnostic technique and sero-epidemiological surveillance.

Currently, the reference technique for Q fever diagnosis is indirect immunofluorescent antibody assay (IFA), which is highly sensitive but sometimes lacks of specificity due to cross-reaction. Furthermore, since the diagnosis is mainly relied on eyesight, resultant inconsistency occurs among technicians and is not suitable for high-throughput and automatic screen. To solve this issue, it is feasible to replace IFA with ELISA. However, there is only one ELISA kit for Q fever diagnosis that is commercially available currently, in which the antigen is based on formalin-treated *C. burnetii* while recombinant protein-based is not available now. Hence, we aim to develop a Q fever ELISA diagnostic kit that is suitable for high-throughput and automatic screen.

In this study, several recombinant proteins including ABC transporter lipoprotein, ompA, FtsZ, recA, chaperonin groEL, ribosomal protein L9 and com1 were used in ELISA test. The results showed that these antigens had low sensitivity (<30 %) at first, but afterward we greatly improved the sensitivity up to 70-80 % by modifying buffering system we used. Furthermore, our results suggested that animal sera used in the study were the major factors that improved diagnostic sensitivity, and even when no recombinant antigens were used, we still could differentiate positive sera from negative sera. In addition, by

cross-compared with sera from rickettsia and viral infections, our result still showed that it is highly specific for Q fever. Therefore, we speculated that this phenomenon was probably related to serology of Q fever infection, and it might be helpful in the development of ELISA diagnostic assay and worth of further studying.

For epidemiological surveillance, we performed the follow-up surveillance of several chronic Q fever-like cases and all cases that were diagnosed with acute Q fever in the southern region of Taiwan this year. For chronic Q fever-like patients, the results indicated that without any medication, no chronic Q fever-like symptoms presented and there was no significant progression of serology among all these cases during the two to five years of surveillance. Furthermore, five of them showed great decrease of antibody titers. Among the five cases, three of them had seroconversion to a normal range, suggesting that in Taiwan, instant medication was not needed for chronic Q fever-like patients, and their antibody titers can reverse to a normal range in the long-term period. For the 19 acute Q fever patients, although the serology did not manifest like chronic infection after half a year of surveillance, prolonged surveillance was still needed to make sure whether they were safe from chronic infection.

Key words : Q fever 、 *Coxiella burnetii* 、 ELISA 、 Serological epidemiology ◦

壹、前言

Query fever (Q fever)為一種廣泛流行的人畜共通傳染病(zoonosis)，其致病原為貝氏考克斯菌(*Coxiella burnetii*)，屬於絕對細胞內寄生之病菌。有發燒、肝炎、心內膜炎(endocarditis)、非典型性肺炎(atypical pneumonia)及類流感等症狀出現。型態呈球桿狀、桿狀或球狀等多型性，大小約寬 0.2 至 0.4 微米、長 0.4 至 1.0 微米，革蘭氏染色呈陰性，吉耶姆薩氏 (Giemsa) 染色呈藍色。具有內孢子樣之結構，對外界環境有相當強的抵抗力能耐熱及乾燥，對一般消毒劑也有抗性。具有相的變異，分別是 phase I 以及 phase II 兩種。其中由人體、動物及壁蝨體內新分離的菌株具有 phase I 的抗原相，擁有較長的脂聚糖分子 (Lipopolysaccharide, LPS)，也具有較強的致病力。相對的，在經由細胞或雞胚卵黃囊連續繼代培養後，其抗原相會由 phase I 轉換成 phase II，此時細胞會呈現較短的 LPS 分子，且其致病能力也相對減弱¹⁻²。

C. burnetii 存在於動物的尿液、糞便、乳汁、胎衣及羊水中，特別是有蹄類的家畜動物如牛跟羊，蟎(ticks)是在野生動物與宿主間的傳播媒介，人類感染 Q fever 的主要途徑是吸入被病原體污染的塵土、飲用病畜的乳汁、食入被污染的水及食物，可經由破損的皮膚及粘膜接觸污染物而造成感染。

國外對於 Q fever 在同一地區的發生率也有不同報告，因為其並未有明

確的標準症狀，因此便無法很準確的反應出其發生率。許多國家 Q fever 屬於不須通報的疾病，再加上他們也鮮少作疫情監測，因此國際間對其發生率（incidence）並不是非常了解。在歐洲，Q fever 好發生於春季和初夏，因為當時正處於畜牧農場羔羊出生的時刻，而人們又喜好戶外運動，因此容易因為與含大量病菌的羊水接觸而感染，然而一般羔羊的出生期高峰為十月，但此時卻不是發生率最高的時候⁴。在一些地中海國家中如法國、義大利、以色列、英國和東歐等國家的研究報告中指出，經常性接觸牛、綿羊、山羊等畜牧業者、特定農夫、獸醫師、屠宰場或實驗室工作人員都是容易感染族群；另有研究指出，與寵物貓、狗有密切接觸的飼主亦有感染之危險，顯示出 Q fever 已造成許多國家公共衛生上之問題¹。*C. burnetii* 菌在亦是一種生物戰劑，有研究指出在空氣動力學中每立方公尺若有 100 個病原菌存在，於此環境下暴露 30 至 60 分鐘後即有可能吸入肺中而造成感染。在強風中 *C. burnetii* 病原菌可由定點源擴散到 11 英哩(18.3 公里)外³，這種低劑量卻具有高感染力及高傳播力更加顯現了 *C. burnetii* 在生物戰劑中有相當的應用價值。

在台灣 Q fever 疾病屬於第四類的法定傳染病，通報之檢體須送本(疾病管制)局檢驗確認。Q fever 於 2004 至 2008 年累積通報病例為 7830 例，確定病例數為 613 例，本(2009)年至 10 月通報病例數為 1358 例，確定病例數為 77 例(表一、圖一)。確定病例主要集中在台南縣市及高高屏等南部地區，

佔所有確定病例的 72.46 %，其中確定病例於 2006-07 年達到高峰期，2008-09 年確定病例數則有顯著下降。台灣第一個 Q fever 病例報告發表於 1993 年⁵，之後本土相關文獻即很少發表，其中又以病例的描述居多⁵⁻⁹，僅有一篇是以血清學方法檢測南台灣盛行率的研究，該研究顯示不論是 357 個位於鄉下的一般就醫病患血清，以及 259 個至城市醫院作一般健康檢查之個體血清，其血清陽性率皆約等於 4.2 %¹⁰。本實驗室於 2007-08 年間，曾針對「台灣南部地區特定職業族群進行血清學研究」。研究結果顯示，工作上必須與動物接觸的職業族群比一般民眾更容易感染 Q fever，而在危險因子的分析中“經常接觸羊”是本群體感染之危險因子，故在南台灣，推測養羊場可能 Q fever 重要的感染源之一¹¹。

IFA (Indirect immunofluorescent antibody assay)血清學檢驗是目前 Q fever 檢驗的標準方法。然而本方法必須以依賴視力個別判讀，在執行大量檢體檢測時不僅耗時費力，在不同檢驗人員間也有個別判讀的誤差。要突破這種困境，最適合的就是以 ELISA 方式進行篩檢，可以進行自動化以及大量篩檢克服人為誤差。目前，市面上僅有一家澳洲廠商(Inverness Medical Innovations Australia Pty Ltd, Panbio)所開發商品化 Q fever ELISA 篩檢套組，以福馬林處理過的 *C. burnetii* 作為抗原。由於 *C. burnetii* 屬於第三級危險群的微生物，其培養與操作需在生物安全第三級的實驗室內進行，不僅需要昂貴的實驗設備，生物危害性也較高，因此以 *C. burnetii* 作為抗原並不是

適用一般實驗室；相對的，若以重組蛋白（Recombinant）作為抗原，不僅只需要一般實驗室設施即可操作，其生物危害性也比操作菌體還要低，因此以重組蛋白來開發 ELISA 檢驗方式也是各實驗室努力想要達成的目標。然而，雖然已經有多篇的研究指出部份 *C. burnetii* 蛋白具有良好的抗原性，但是其在 ELISA 的應用上卻無法達到足夠的檢驗靈敏度¹²。因此，在研究中計畫利用這些已被確認具有抗原性的蛋白，並致力於改善其檢驗的靈敏度，來開發 Q fever 的 ELISA 檢驗方法。

在流行病學方面，於 2007-08 年的研究計劃中，已針對高高屏地區的特定職業族進行血清流行病學調查，研究其發生率與高危險因子。在本年度則針對歷年 Q fever 慢性患者及本年度新增急性病例進行血清學的追蹤，分析其感染 Q fever 後血清學進展變化，以便探討 Q fever 在急性感染以及慢性感染間病程發展的相關性。這些研究結果將可作為未來在防疫與公共衛生宣導政策上制定的依據，也可以對這些患者提供更完善的疾病資訊與就醫協助，以維護國民身體健康。

貳、材料與方法

一、檢體來源

(一) 血清來源：

1. 各縣市通報 Q fever 病例。

2. 特定病例：

2.1. 曾經感染 Q fever 患者

2.1.1. 7 名 Q fever 血清學陽性個案 (南台灣 Q FEVER 高危險職業族群血清流行病學調查研究, 2006 年)。

2.1.2. 17 名血清學疑似呈現慢性 Q fever 個案 (Serological follow-up surveillance of acute Q fever, Taiwan, 2007 年)。

2.2. 本(2009)年度 1-5 月高屏地區所有新發生急性 Q fever 確診病患。

(二) 檢體採集

1. 血液採集：用含 Heparin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 EDTA 的採血器採取病人 14 病日內之的急性期血液 5 mL，於當日以冷藏 (2~8 $^{\circ}\text{C}$) 方式送至疾病管制局研究檢驗中心，用於聚合酶鏈鎖反應。

2. 血清採集：採取病人的急性期及恢復期血清各 2~3 mL，置於 4 mL 的螺旋蓋血清瓶中，於當日內以冷藏(2~8 °C)方式送至疾病管制局研究檢驗中心，用於 IFA 檢驗。

(三) 採血時機

1. 第 1 次採血(A 血清)日為發病日後<7 天內，第 2 次採血(B 血清)日訂為發病日 14 天後。
2. 若第 1 次採血(A 血清)日為發病日後>7 天後，第 2 次採血(B 血清)日與第一次採血日隔 7 天。
3. 慢性 Q fever 血清學追蹤於間隔 6 個月後再次採血。
4. 急性 Q fever 血清學追蹤於發病 6 個月後再次採血。

二、檢驗方式

(一) 間接免疫螢光法 (indirect immunofluorescence antibody, IFA)

1. 將抗原玻片取出，風乾。
2. 將患者血清以 3 % NYS (3%(w/v)normal hen's egg yolk sac in PBS)做等倍稀釋。
3. 將稀釋血清滴至抗原玻片上。
4. 置 37°C 潮濕水箱中作用 30 分鐘。
5. PBS(phosphate buffer solution)沖洗玻片後，將玻片浸於 PBS

中，5 分鐘後再換一次 PBS，並浸泡 5 分鐘。

6. 以蒸餾水沖洗玻片，風乾。
7. 加 FITC (Fluorescein isothiocyanate)-goat anti-human antibody (IgG、IgM 或 IgA+G+M)置 37 °C 潮濕水箱中作用 30 分鐘。
8. 以 PBS 沖洗玻片後，將玻片浸於 PBS 中 5 分鐘後再換一次 PBS，並浸泡 5 分鐘。
9. 以蒸餾水沖洗玻片風乾。
10. 加 pH 8.0 之 0.01 M PBS:甘油=1:1 之緩衝液及蓋玻片。
11. 以螢光顯微鏡 400 倍鏡檢。

(二) 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

1. IS1111 引子(primers)

QF9: 5'- TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGTC-3'

QF10: 5'-CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC-3'

QF11: 5'-GAG CGA ACC ATT GGT ATC G-3'

QF12: 5'-CTT TAA CAG CGC TTG AAC GT-3'

2. 聚合酶鏈鎖反應條件 (PCR conditions)

2.1. 首先以 94 °C 解離 30 秒，依序從 66 °C 至 62 °C 每降 1 °C 進行黏合 30 秒及 72 °C 增幅 60 秒，之後再以 61 °C 進行 10 個循環的黏合及增幅反應。

2.2. 在前述反應完成後，以 94 °C 解離 30 秒，54 °C 黏合 30 秒及

72 °C 增幅 60 秒的條件進行 35 個循環的反應。

三、判定標準

(一) 急性 Q fever 病例：

IgM 抗體力價大於 1:80 或著是 IgG 抗體力價有 4 倍上升。

(二) 慢性 Q fever 病例：

IgG 抗體對抗 phase I 抗原的力價大於 1:800。

四、酵素免疫分析法 (ELISA)

Indirect ELISA

1. 於 96 孔 ELISA 微量盤上加入適量 50 μL 的抗原蛋白液，置於 37 °C 培養箱過夜，於隔天加入 100 μL 的甲醇(methanol)處理 10 分鐘後瀝乾備用。
2. 加入 100 μL 遮蔽試劑，於室溫下作用 30 分鐘。
3. 去除遮蔽試劑，並加入 100 μL 200 倍稀釋的人體血清，於 37 °C 作用 30 分鐘。
4. 以 400 μL PBS-T 緩衝液(Phosphate buffer saline contained 0.05 % Tween-20)清洗四次，並加入 100 μL 稀釋 1000 倍之山羊抗人 IgG AP(alkaline phosphatase)酵素鏈結抗體，於 37 °C 作用 30 分鐘。
5. 以 400 μL PBS-T 緩衝液清洗四次清洗後加入 100 μL 酵素受質 pNpp (p-nitrophenylphosphate disodium)，於 37 °C 避光作用 30 分

鐘。

6. 利用微量滴定盤分光儀測量吸光度 405 nm 及參考波長 620 nm。

Capture ELISA

1. 於 96 孔 ELISA 微量盤上固定山羊抗人 IgG 以及 IgM 抗體。
2. 加入 100 μ L 遮蔽試劑，於室溫下作用 30 分鐘。
3. 去除遮蔽試劑，並加入 100 μ L 200 倍稀釋的人體血清，於 37 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘。
4. 加入 100 μ L 重組蛋白液，於 37 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘。
5. 以 400 μ L PBS-T 緩衝液清洗四次，並加入 100 μ L 稀釋 1000 倍小鼠抗 Histidine 標誌抗體，於 37 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘。
6. 以 400 μ L PBS-T 緩衝液清洗四次，並加入 100 μ L 稀釋 1000 倍之山羊抗小鼠 IgG AP(alkaline phosphatase)酵素鏈結抗體，於 37 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘。
7. 以 400 μ L PBS-T 緩衝液清洗四次清洗後加入 100 μ L 酵素受質 pNpp (p-nitrophenylphosphate disodium)，於 37 $^{\circ}$ C 避光作用 30 分鐘。

8. 利用微量滴定盤分光儀測量吸光度 405 nm 及參考波長 620 nm。

參、結果

一、ELISA 檢驗方法之研究測試

(一) Q fever 抗原之選擇

挑選 *C. burnetii* 抗原性蛋白，包含 ABC transporter lipoprotein、ompA、FtsZ、recA、ribosomal protein L9、chaperonin groEL 以及 com1¹³⁻¹⁴，本實驗室以原核蛋白表現系統(*E. coli*)製造所需要的重組蛋白。

(二) ELISA 方法之選擇

選用 Indirect 或 Capture ELISA，比較其靈敏性與專一性。實驗結果顯示兩者的專一性可達 90 % 以上，但在靈敏度上則為 Indirect (30%) > Capture，因此選擇 Indirect ELISA 方式進行後續實驗 (表二、圖二、表三、圖三)。

(三) ELISA 檢驗條件之測試

為了改善 Indirect ELISA 靈敏度過低的缺點，試換實驗中所使用的 blocking buffer 及 diluent buffer。比較測試 bovine serum albumin (BSA)、non-fat milk 及 casein 三種不同 buffer 蛋白，其中以 casein

buffer 其陽性血清的吸光值有顯著的提昇(圖四)。

以 casein buffer 對 7 種重組蛋白再次進行 ELISA 測試，除 90 % 的專一性外，有效的將靈敏度提昇至約 80 % (表四、圖五)。

(四) 影響因子之分析

7 種不同重組蛋白應有不同的抗原性，但卻顯示一致高特異性及靈敏度的實驗結果。再檢視 casein buffer 是否為含有 2.5 % 的兔子血清所造成，比較有、無添加兔子血清之試驗。結果顯示，添加兔子血清之後，靈敏度確實有顯著提昇，且單獨使用兔子血清也有同樣的效果。顯示兔子血清確實是提昇檢驗靈敏度的一個重要因子。特別的是，未使用重組蛋白的對照組竟然也具有區分陽性陰性血清的效果，其效果甚至優於使用重組蛋白，其原理因素目前尚無法得知，有待後續研究探討(表五、圖六)。

(五) 不同動物血清之比較

兔子血清可以提昇檢驗的靈敏度，是否其它動物血清有同樣效果。進一步，添加測試兔、山羊、豬、雞、馬、胎牛和新生牛等不同動物血清。實驗結果，其檢驗靈敏度有類似的效果約為 70-80 %，而專一性則達 90 % 以上(表六、圖七)。

(六) 不同疾病血清之比較

除動物血清可提高靈敏度外，Q fever 血清是否可能非專一性結合，分別比較了立克次體 (地方性斑疹傷寒、恙蟲病)及病毒 (登革熱病毒)感染患者的血清。結果顯示，除了 Q fever 陽性血清之外，其他血清的吸光值都非常的低，顯示 Q fever 具有相當高的專一性，然而其原理則有待進一步探討(表七、圖八)。

二、Q fever 血清流行病學追蹤

(一) 2006-08 年疑似慢性 Q FEVER 的個案追蹤

24 位疑似慢性 Q FEVER 的個案再次進行追蹤，其中 5 位(21%) 呈現顯著的下降(>4X decrease) 另外 3 位力價降至<1:800 (表八)。

(二) 本年度發生急性 Q FEVER 確診個案追蹤

直至本年度 11 月份止，19 位高屏地區新增急性 Q FEVER 確診病患，半年(6 個月)後之追蹤診斷。其中有 4 件個案的 IgG phase II 力價有上升趨勢，1 件個案出現 IgG phase I 力價=1：640 (表九)。

肆、討論

Q fever 是以血清學 IFA 為診斷標準，但本方法缺點，除不易執行大量檢檢測外，耗時費力也易有人為誤判。而 ELISA 方法可進行大量檢體之篩檢，可建置自動化檢測方式，技術簡單、省時便利及低成本。檢測過程中所使用基因重組蛋白，不再需要透過 BSL-3 等級之實驗室培養分離出全菌體抗原，方便安全且容易大量生產。

以原核表現系統製造並純化出 ABC transporter lipoprotein、ompA、FtsZ、recA、chaperonin、ribosomal protein L9 以及 com1 等七種具有抗原性的蛋白。整體檢驗的專一性都有達到 90 % 以上，但靈敏度上卻不超過 30 %，其並無法有效區分陽性與陰性血清的差異，這個結果與目前已發表的文獻結果類似。

然而在後續實驗中使用 casein buffer 進行 ELISA 實驗，所有重組蛋白所做出來的吸光值的數據都相似。然而，不同蛋白因為序列結構不同，其抗原性也大相逕庭，本實驗所使用的 casein buffer 中可能含有某種特殊的物質，才會造成這種一致現象。發現在本實驗中所使用的 casein buffer 內含有 2.5 % 的兔子血清，竟然可以提高檢驗的靈敏性。為了確認，便比較有無添加血清的 casein buffer 之間是不是有什麼不同。實驗結果就如所推測，兔子血清確實就是提升檢驗靈敏度的主要原因，與 casein buffer 無關。意外是，

未含重組蛋白的對照組可區分陽性與陰性血清的效果，其效果甚至比實驗組還來得好。

除了兔子血清之外，也另外分析了其他來源的動物血清，結果都顯示即使血清的來源不同，也都會有類似的效果，於是便推測在這些動物血清中可能含有專一性極高的 Q fever 目標抗原。然而在數次後續的實驗中，以西方墨點法分析這些動物血清，試圖尋找這個具特異性的抗原，結果卻都無抗體抗原反應之帶狀，因此便懷疑這種結果是不是由非專一性結合所引起的，於是便加以比較 Q fever 陽性血清與恙蟲病、地方性斑疹傷寒以及登革熱感染陽性血清，以釐清此方式對 Q fever 檢驗的專一性。然而實驗結果同樣讓人感到意外，因為在所有的血清當中，確實只有 Q fever 陽性血清的吸光值有顯著上升，顯示此方式對於 Q fever 感染的篩檢具有相當高的專一性，而對於類似疾病的立克次體感染與病毒感染則不具專一性。同時，在數次實驗中，發現在同時不使用重組蛋白與動物血清的情況下，Q fever 感染的陽性血清在檢驗中即可與陰性血清有所區分，惟有實驗的吸光值略低，但是在使用動物血清後即可以明顯提升陽性血清的吸光值，顯現當 Q fever 感染血清與動物血清同時存在時，即可有效提高檢驗的靈敏度。對於這種現象，假設可能與 Q fever 感染的血清學有關，亦即是當病人感染 Q fever 後，其體內所產生的抗體對於 ELISA microtiter plate 就有較高的吸附能力，而在同時加入動物血清一起作用時，可以更有效的提高其吸附力，

因此即使在未使用重組蛋白做為抗原的狀況下，陽性與陰性血清也可以明顯的區分出來。若是此假設為真，這原理對於未來將開發相關的篩檢試劑會有很大的幫助，然而到目前為止還尚未有類似原理可以支持我們的假設，未來我們將分為兩個方向進行研究，一是分析不同的 ELISA 檢驗試盤，以釐清 ELISA 檢驗試盤之材質與表面塗料是否會影響本實驗的結果；在另一方面，我們將利用免疫沉澱或著是管柱層析的方式，來探討動物血清中是否有任何蛋白會與病人的抗體結合而造成此現象。

在 Q fever 血清流行病學的追蹤上，針對第一部分 24 位血清學呈現疑似慢性 Q fever 的個案再次進行追蹤，經過 2 至 5 年的追蹤並未出現慢性 Q fever 臨床症狀，且其血清學也無呈現顯著的進展($\geq 4X$ increment)變化，反而是有 5 位的抗體有顯著下降，其中 3 位的抗體甚至已達正常範圍內。這個結果暗示台灣的血清呈現疑似慢性 Q 熱感染者似乎不需立即予以治療，長期追蹤抗體甚至有反轉之可能，此血清學呈現慢性感染之臨床意義仍需進一步研究。

除此之外，針對本(2009)年度 1-5 月高屏地區所有新發生急性 Q fever 確診病患進行發病 6 個月後的血清學追蹤，發現在 19 件檢體中並無疑似慢性 Q fever 的血清學特徵，但是針對 IgG phase II 力價有上升趨勢的個案必須留意後續血清學的變化。另外出現 IgG phase I 力價等於 1:640 的個案也須一併注意後續血清學的進程變化。由於國外的研究認為感染六個月後的

血清學追蹤若呈陰性，則可以不需再追蹤，但本研究仍計畫對這些個案於感染一年後再次追蹤，以確定本國感染者是否適用國外的追蹤原則，以避免遺漏可能的慢性感染者，並據以決定該時間點(6 個月)的檢驗陰性預測值，倘若追蹤後有發現異常個案，考量本研究中所有疑似慢性感染者的狀況，也許感染後一年再追蹤會是更好的選擇。

表一、2004-2009 年 Q fever 通報病例數及確定病例數

年份	通報病例數	確定病例數
2004	1328	98
2005	1527	112
2006	1558	154
2007	1677	157
2008	1740	92
2009**	1358	77

* 資料來源：疾病管制局 Taiwan CDC

** 2009 年資料統計至 10 月 22 日

表二、Indirect ELISA 檢驗之靈敏性與專一性

Recombinant protein	Sensitivity (%)	Specificity (%)
ABC lipoprotein	25.00	94.74
ompA	25.00	94.74
recA	18.75	92.11
FtsZ	27.78	95.45
Ribosomal protein L9	11.11	95.45
chaperonin	0.00	100.00

- * 靈敏性(sensitivity)：陽性血清吸光值大於閾值之數量/陽性血清數量。
- * 專一性(specificity)：陰性血清吸光值小於閾值之數量/陰性血清數量。
- * 閾值(cutoff value)：陰性血清吸光平均值 + 兩倍標準差。

表三、Capture ELISA 檢驗之靈敏性與專一性

	Sensitivity (%)	Specificity (%)
IgG	6.25	93.33
IgM	0.00	93.33

- * 靈敏性(sensitivity)：陽性血清吸光值大於閾值之數量/陽性血清數量。
- * 專一性(specificity)：陰性血清吸光值小於閾值之數量/陰性血清數量。
- * 閾值(cutoff value)：陰性血清吸光平均值 + 兩倍標準差。

表四、採用 casein buffer 之 ELISA 測試結果

Recombinant protein	Sensitivity (%)	Specificity (%)
ABC lipoprotein	81.25%	95.74%
ompA	81.25%	91.49%
Com1	81.25%	97.87%
chaperonin	81.25%	95.74%
FtsZ	83.33%	93.62%
recA	81.25%	93.62%
Ribosomal protein L9	81.25%	93.62%

- * 靈敏性(sensitivity)：陽性血清吸光值大於閾值之數量/陽性血清數量。
- * 專一性(specificity)：陰性血清吸光值小於閾值之數量/陰性血清數量。
- * 閾值(cutoff value)：陰性血清吸光平均值 + 兩倍標準差。

表五、兔子血清對 ELISA 之影響

Blocking agent	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Casein buffer	4.17	95.74
Casein buffer with 2.5% RS	56.25	93.62
2.5 % RS	62.50	97.87
2.5 % RS (no protein)	77.08	95.74

* RS : Rabbit serum

* 靈敏性(sensitivity) : 陽性血清吸光值大於閾值之數量/陽性血清數量。

* 專一性(specificity) : 陰性血清吸光值小於閾值之數量/陰性血清數量。

* 閾值(cutoff value) : 陰性血清吸光平均值 + 兩倍標準差。

表六、不同動物血清對 ELISA 之結果

Serum source	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Rabbit	72.92	93.62
Goat	81.25	95.74
Chicken	81.25	93.62
Porcine	66.67	97.87
Fetal bovine	68.75	97.87
Newborn calf	72.92	97.87
Horse	81.25	95.74

- * 靈敏性(sensitivity)：陽性血清吸光值大於閾值之數量/陽性血清數量。
- * 專一性(specificity)：陰性血清吸光值小於閾值之數量/陰性血清數量。
- * 閾值(cutoff value)：陰性血清吸光平均值 + 兩倍標準差。

表七、動物血清和 Q fever、斑疹傷寒、恙蟲病及登革熱血清之靈敏性比較

	Query Fever	Endemic			Dengue Fever	Specificity (%)
		typhus Fever	Scrub Fever			
Sensitivity (%)					Specificity (%)	
Rabbit serum	87.50	25.00	10.00	0.00	95.65	
Chicken serum	83.30	15.00	20.00	45.45	95.65	
Goat serum	70.83	0.00	5.00	13.64	95.65	
Porcine serum	66.70	10.00	15.00	13.64	95.65	
Newborn calf serum	70.83	10.00	0.00	0.00	95.65	
Fetal bovine serum	62.50	10.00	5.00	13.64	91.30	
Horse serum	87.50	35.00	25.00	63.64	100.00	

* 靈敏性(sensitivity)：陽性血清吸光值大於閾值之數量/陽性血清數量。

* 專一性(specificity)：陰性血清吸光值小於閾值之數量/陰性血清數量。

* 閾值(cutoff value)：陰性血清吸光平均值 + 兩倍標準差。

表八、疑似慢性 Q fever 病患之血清學追蹤結果

Case No.	Anti-phase I IgG level at notification	Interval 1 (month)	The 1 st follow-up	Interval 2 (month)	The 2 nd follow-up
1	0	14	5120	21	1280 [#]
2	0	14	2560	21	320 [*]
3	0	19	2560	20	2560
4	0	6	5120	18	1280 [#]
5	160	20	1280	18	1280
6	0	9	2560	18	1280
7	0	12	1280	20	1280
8	0	9	1280	19	640
9	0	37	1280	19	2560
10	160	36	1280	21	2560
11	1280	39	1280	20	2560
12	0	12	1280	20	640
13	0	17	1280	18	2560
14	0	16	1280	21	160 [*]
15	320	31	1280	19	2560
16	320	18	1280	19	2560
17	0	17	2560	20	640 [#]

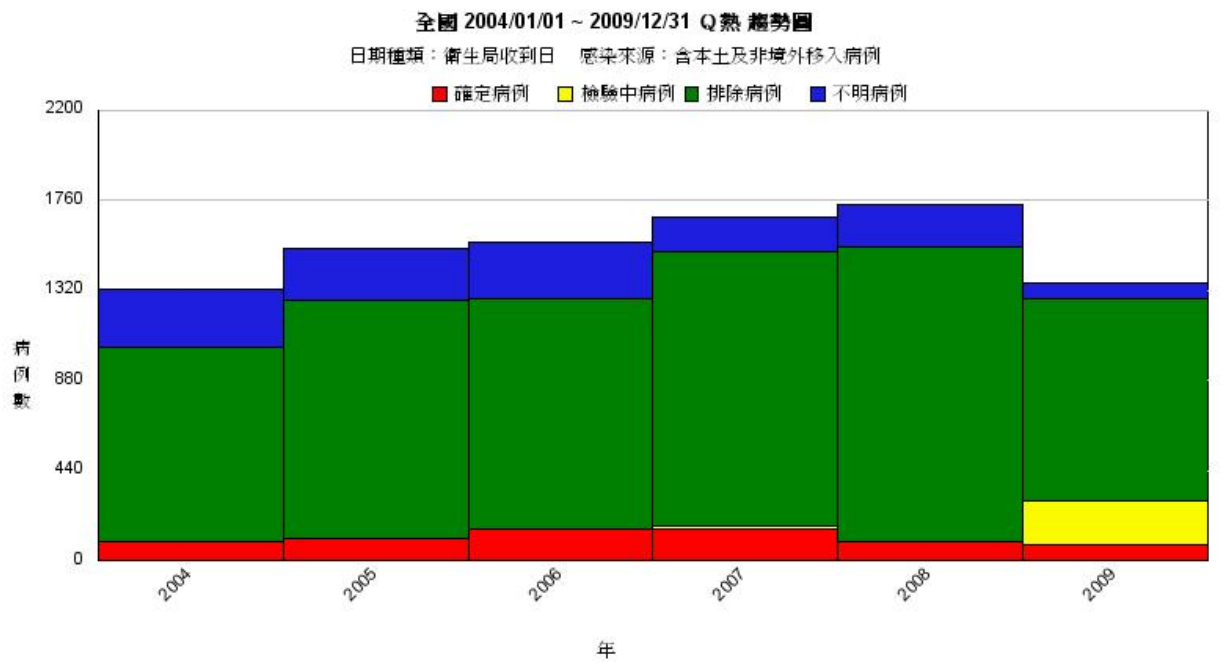
*: eightfold decrease

#: fourfold decrease

Case No.	1 st Anti-phase I		2 nd Anti-phase I	
	IgG level	interval (month)	IgG level	
18	5120	25	5120	
19	2560	25	2560	
20	2560	25	1280	
21	5120	25	5120	
22	1280	24	2560	
23	2560	24	2560	
24	10240	24	10240	

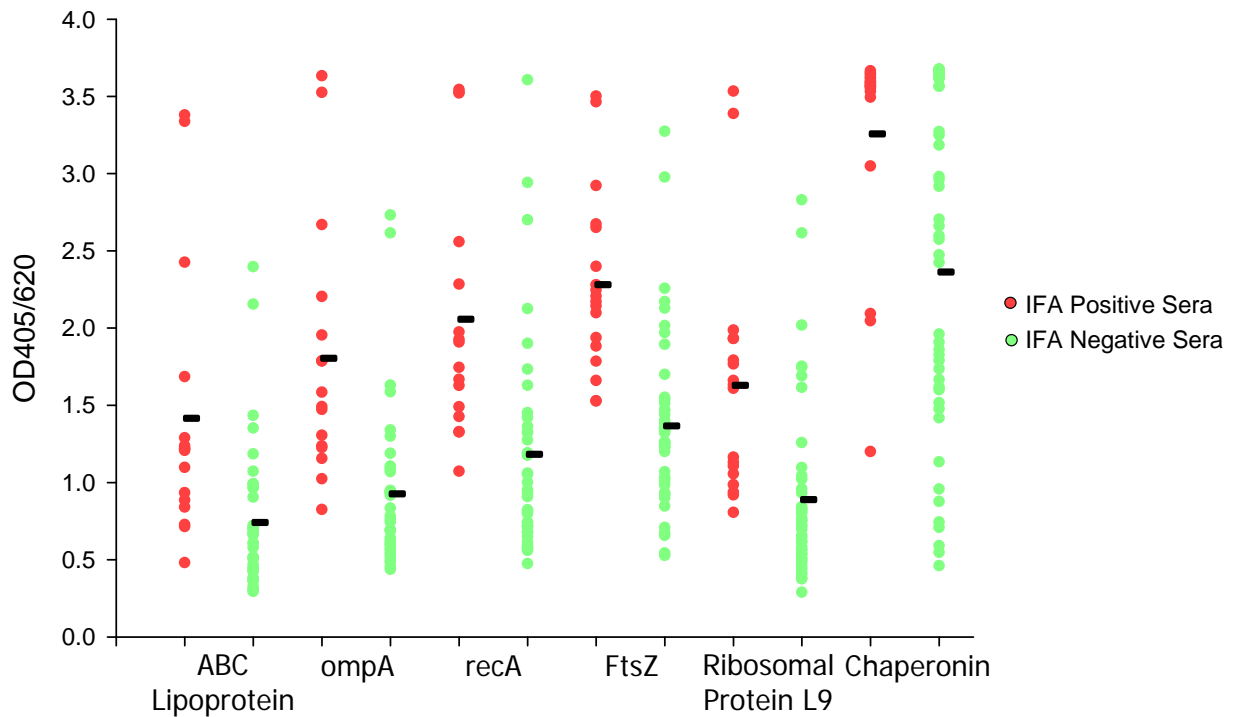
表九、急性 Q fever 病患發病 6 個月後之血清學追蹤結果

Case No.	1 st anti-phase I IgG lever	1 st anti-phase II IgG lever	2 nd anti-phase I IgG lever	2 nd anti-phase II IgG lever
1	0	2560	0	1280
2	0	2560	0	640
3	0	640	0	640
4	0	2560	0	2560
5	0	320	0	2560
6	0	320	0	80
7	0	>2560	0	>2560
8	0	>2560	0	>2560
9	0	>2560	0	640
10	0	640	0	>2560
11	0	320	0	2560
12	0	>2560	640	>2560
13	0	2560	0	640
14	0	320	0	320
15	0	1280	0	1280
16	0	640	0	2560
17	0	1280	0	1280
18	0	640	0	640
19	0	320	0	1280



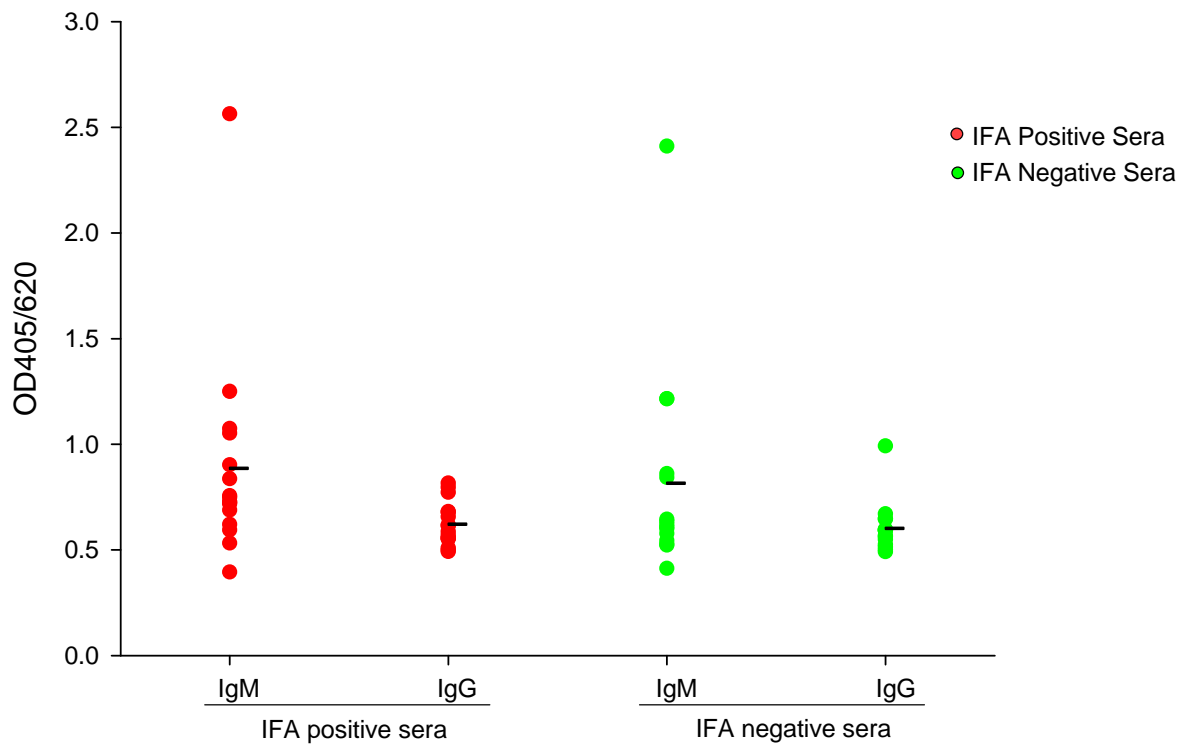
資料來源：疾府管制局 Taiwan CDC 2009/10/22

圖一、2004-2009 年 Q fever 通報病例趨勢圖



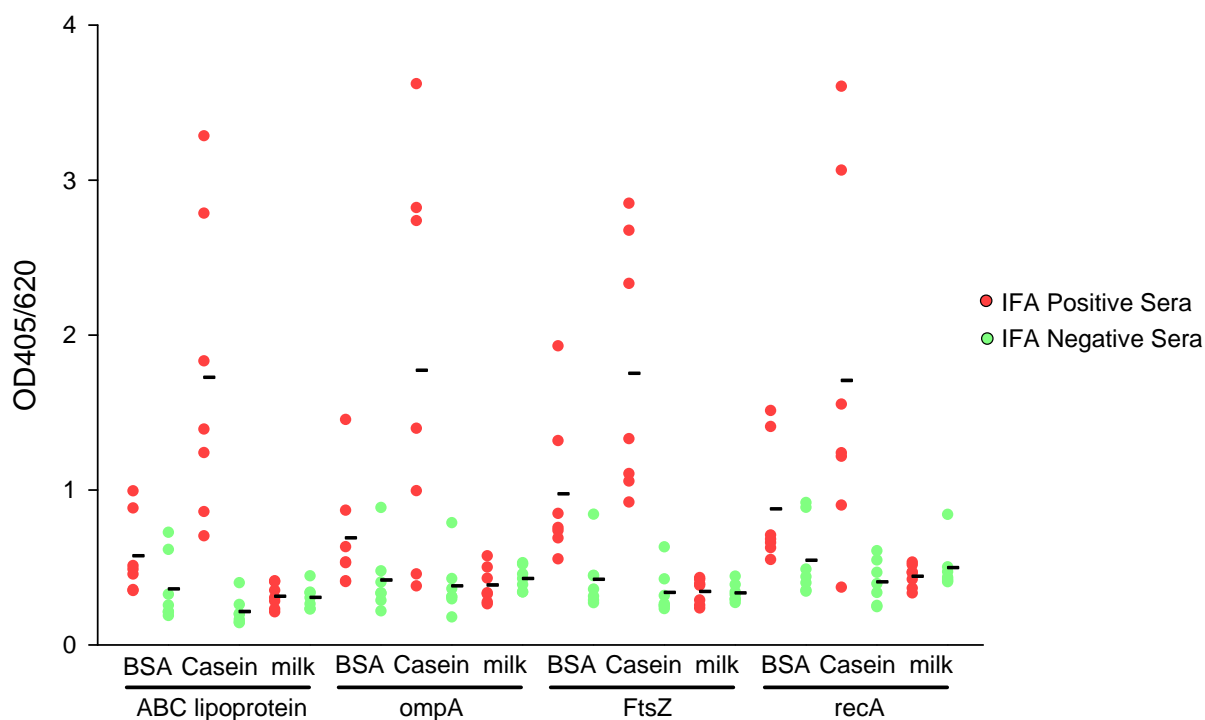
圖二、Indirect ELISA 檢驗結果

將不同的重組蛋白固定於 96 孔盤後，以 indirect ELISA 方式進行檢驗。圖中紅色點代表 Q fever 陽性血清的吸光值，綠色點代表 Q fever 陰性血清的吸光值，而黑色短線則表示該群體的平均吸光值。



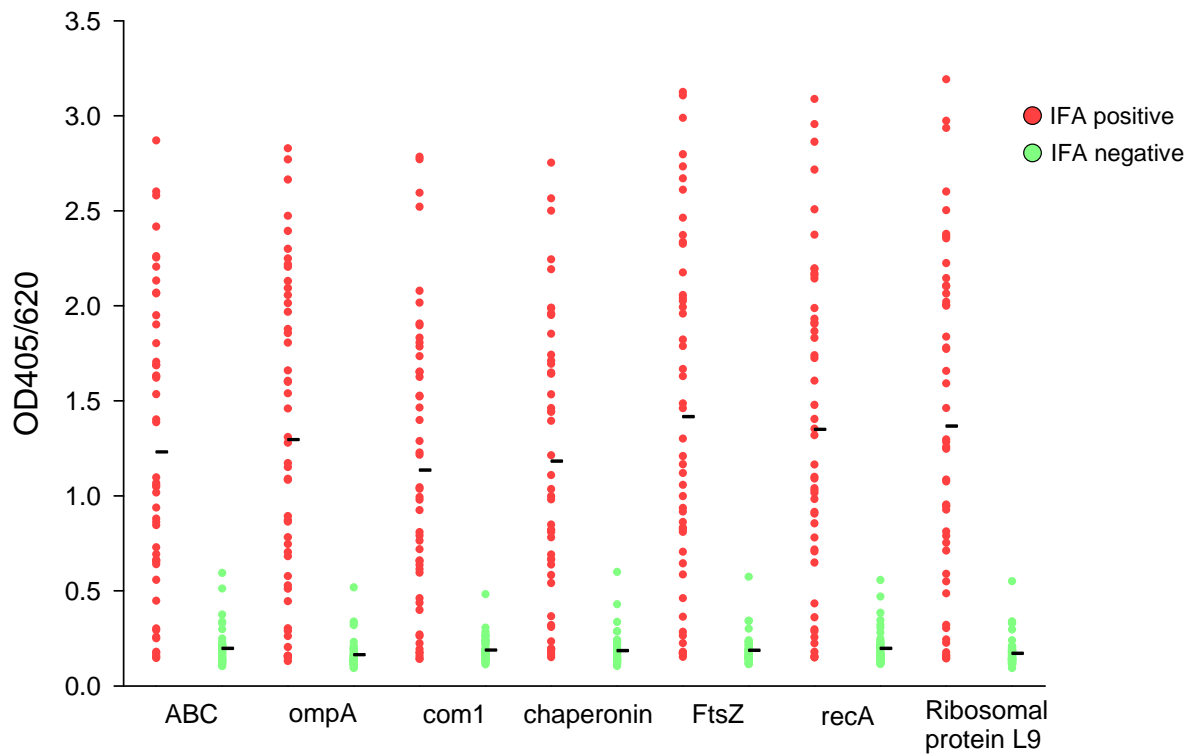
圖三、Capture ELISA 檢驗結果

以事先固定在 96 孔盤上的抗體抓取人類 Q fever 陽性及陰性血清中的 IgM 及 IgG，然後進行 capture ELISA。圖中紅色點代表 Q fever 陽性血清的吸光值，綠色點代表 Q fever 陰性血清的吸光值，而黑色短線則表示該群體的平均吸光值。



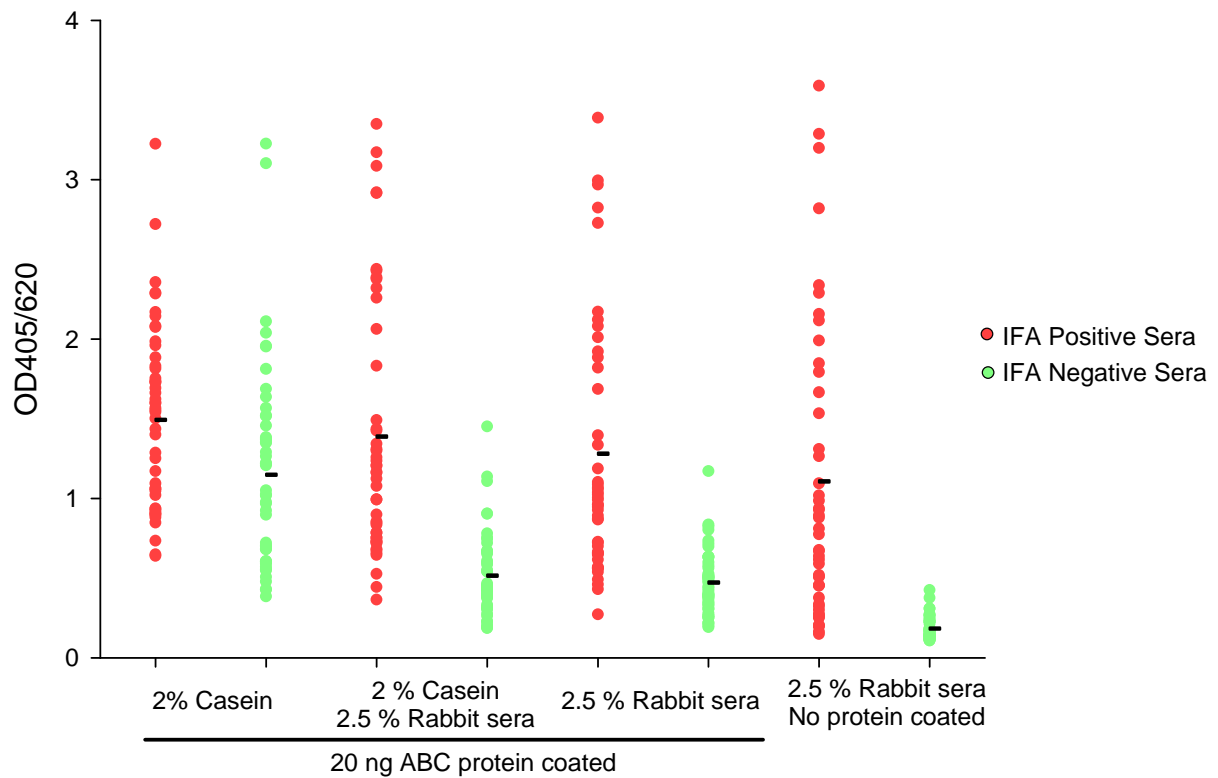
圖四、不同 blocking buffer 與 diluent buffer 之比較

將不同的重組蛋白固定於96孔盤後，以 indirect ELISA 方式比較 BSA、casein 及 non-fat milk 三種不同的緩衝溶液。圖中紅色點代表 Q fever 陽性血清的吸光值，綠色點代表 Q fever 陰性血清的吸光值，而黑色短線則表示該群體的平均吸光值。



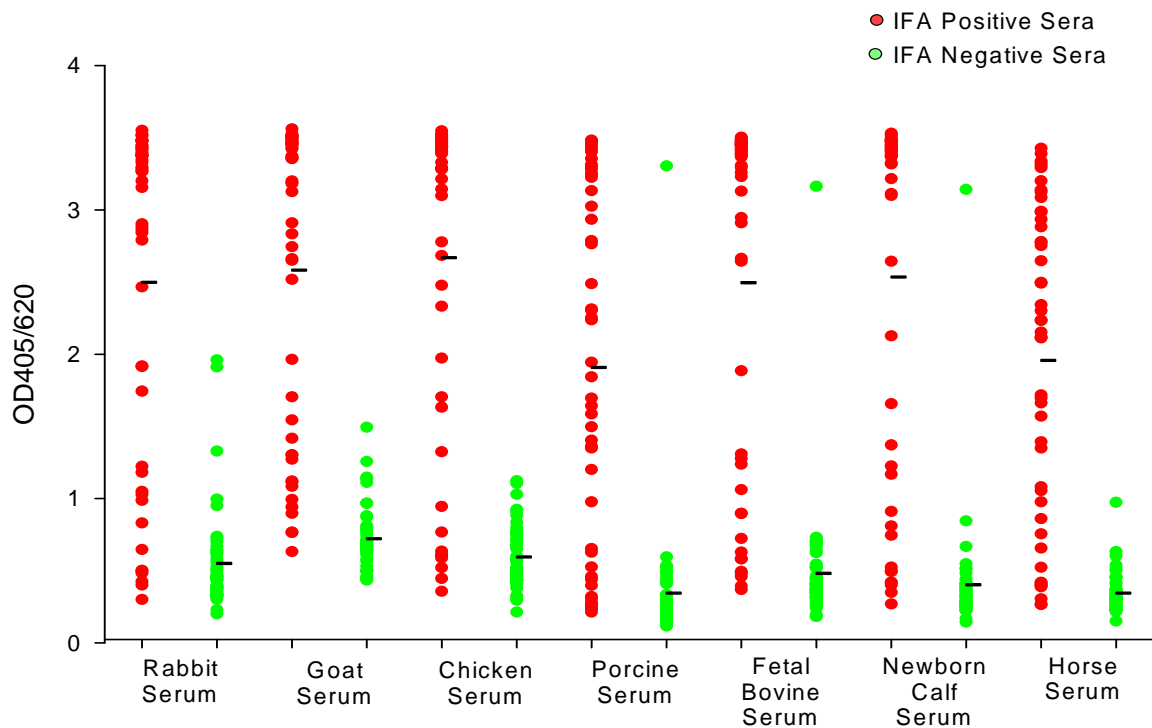
圖五、改良後的 ELISA 檢驗結果

將不同的重組蛋白固定於 96 孔盤後，以 casein 緩衝溶液進行 indirect ELISA。圖中紅色點代表 Q fever 陽性血清的吸光值，綠色點代表 Q fever 陰性血清的吸光值，而黑色短線則表示該群體的平均吸光值。



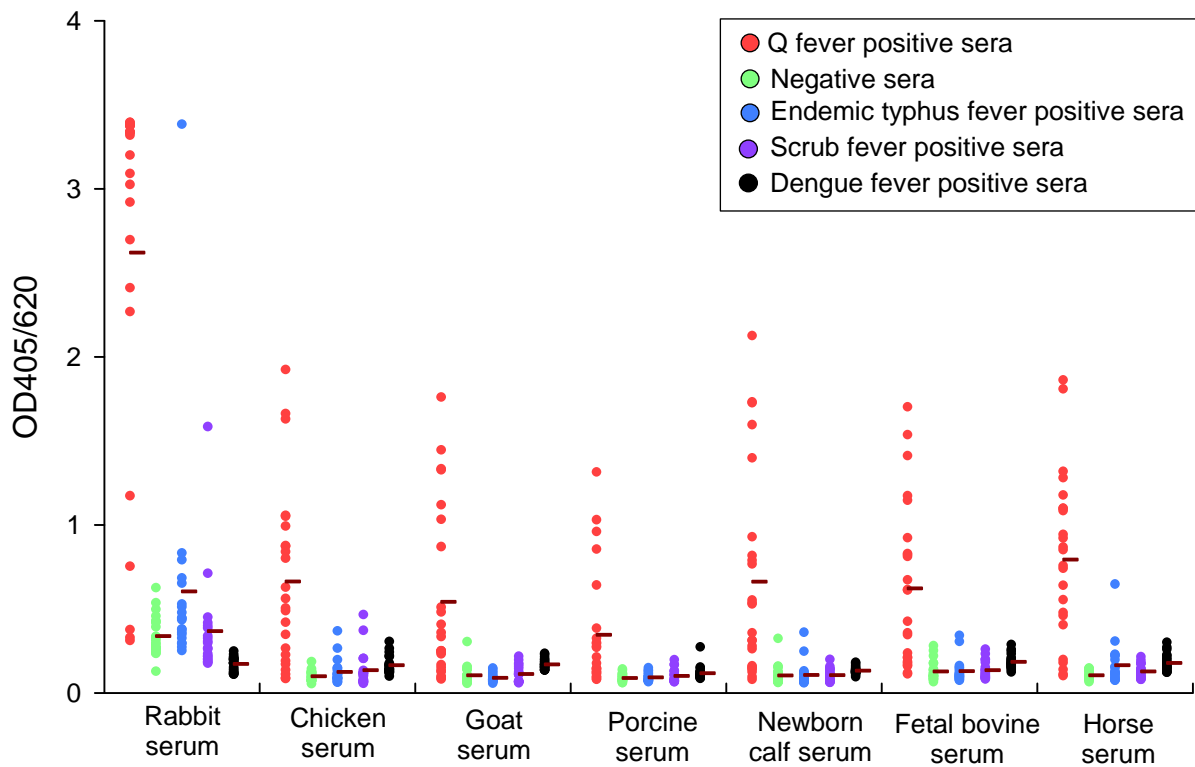
圖六、兔子血清對 ELISA 結果影響之比較

以 ABC lipoprotein 為抗原，比較有無兔子血清的 casein 緩衝溶液對 ELISA 結果的影響。圖中紅色點代表 Q fever 陽性血清的吸光值，綠色點代表 Q fever 陰性血清的吸光值，而黑色短線則表示該群體的平均吸光值。



圖七、不同動物血清之比較

用不同來源的動物血清做為緩衝溶液，並以未固定任何重組蛋白的 96 孔盤進行 ELISA 檢驗。圖中紅色點代表 Q fever 陽性血清的吸光值，綠色點代表 Q fever 陰性血清的吸光值，而黑色短線則表示該群體的平均吸光值。



圖八、立克次體及登革病毒感染血清交叉比對之結果

用不同來源的動物血清做為緩衝溶液，並以未固定任何重組蛋白的 96 孔盤來比較感染 Q fever、地方性斑疹傷寒、恙蟲病及登革熱的病人血清。圖中紅色點代表 Q fever 陽性血清的吸光值，綠色點代表 Q fever 陰性血清的吸光值，藍色、紫色、及黑色點則分別代表地方性斑疹傷寒、恙蟲病及登革熱陽性血清的吸光值，而咖啡色短線則表示該群體的平均吸光值。

參考文獻

1. Maurin MRaoult D: Q fever. *Clinical microbiology reviews* 1999;12:518-53.
2. Tissot-Dupont HRaoult D: Q fever. *Infectious disease clinics of North America* 2008;22:505-14, ix.
3. Ongradi J: [Microbial warfare and bioterrorism]. *Orvosi hetilap* 2002;143:1935-9.
4. Parisi A, Fraccalvieri R, Cafiero M, et al: Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. *Veterinary microbiology* 2006;118:101-6.
5. Wang JH, Wang YH, Cheng DL, et al: Acute Q fever: first case report in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 1993;92:917-9.
6. Chang K, Ko WC, Li BF, et al: Diffuse abdominal uptake mimicking peritonitis in gallium inflammatory scan: an unusual feature of acute Q fever. *The Kaohsiung journal of medical sciences* 2005;21:522-6.
7. Chang K, Yan JJ, Lee HC, et al: Acute hepatitis with or without jaundice: a predominant presentation of acute Q fever in southern Taiwan. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 2004;37:103-8.
8. Ko WC, Liu JWChuang YC: Acute Q fever as a cause of acute febrile illness of unknown origin in Taiwan: report of seven cases. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 1997;96:295-7.
9. Lee HC, Ko WC, Lee HL, et al: Clinical manifestations and complications of rickettsiosis in southern Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 2002;101:385-92.
10. Ko WC, Liang CC, Chen HY, et al: Seroprevalence of *Coxiella burnetii*

infection in southern Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 2000;99:33-8.

11. Chang CC, Lin PS, Hou MY, et al: Identification of Risk Factors of *Coxiella burnetii* (Q fever) Infection in Veterinary-Associated Populations in Southern Taiwan. *Zoonoses and Public Health* 2009.
12. Beare PA, Chen C, Bouman T, et al: Candidate antigens for Q fever serodiagnosis revealed by immunoscreening of a *Coxiella burnetii* protein microarray. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1771-9.
13. Zhang G, Kiss K, Seshadri R, et al: Identification and cloning of immunodominant antigens of *Coxiella burnetii*. *Infection and immunity* 2004;72:844-52.
14. Chao CC, Chen HW, Li X, et al: Identification, cloning, and expression of potential diagnostic markers for Q fever. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005;1063:76-8.