

計畫編號：DOH97-DC-2005

行政院衛生署疾病管制局 97 年度科技研究發展計畫

建構南台灣 *C. burnetii* 菌(Q fever)檢驗參考實驗室

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 周郁芳 王姿乃

執行期間：2008 年 1 月 1 日至 2008 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 | |
| 目錄 | (2) |
| 摘要 | (3) |
| 壹、前言 | (7) |
| 貳、材料與方法 | (10) |
| 參、結果 | (16) |
| 肆、討論 | (19) |
| 伍、圖表 | (21) |
| 陸、參考文獻 | (28) |

共 (29) 頁

中文摘要

本年度計畫目的，對人畜共通傳染病及可應用在生物戰劑上--Q fever (*C. burnetii*)建立快速檢驗、分子分型和高危險族群之流行病學調查，預防疾病之爆發保障人民健康安全。

實驗室擬開發及建立以重組蛋白基因為主的免疫酵素分析法 (Recombinant protein based ELISA)。由於 *Coxiella burnetii* 需在活細胞內生長，必須在 P3 等級實驗室培養，具有高危險性和培養難度。因此 ELISA 所需的抗原通常是以重組基因蛋白質為主，可以大量生產重組蛋白外，可挑選宿主免疫反應主要的標的蛋白做為抗原來源，提高試劑的靈敏度及專一性。目前我們根據文獻已成功利用質體表現出 FtsZ, ompA, Ribosomal protein L9, chaperon, RecA, ABC transporter lipoprotein 等 6 重組蛋白質，並利用西方墨點確認其重組蛋白的抗原性。續將 FtsZ, ompA, ABC transporter lipoprotein 重組蛋白吸附在 ELISA 試盤作為抗原，但其靈敏度及專一性須作實驗再予改良。分子分型方面，實驗室針對 QpRS、QpH1、QpDG 及 QpDV 四個質體設計引子進行分型，發現台灣地區的質體以 QpRS 為主要。

流行病學方面，將去年疫調經常從事於與動物有接觸活動的相關職業人員，如動物農場工作者、肉品市場及屠宰場工作者、獸醫師、獸醫院工作人員確定 235 例個案再進行進一步問卷，完成 221 份問卷 (221/235)，經複邏輯回歸分析，工作中接觸過羊之危險性為 4.14 (95%CI=1.69-10.07) 達到顯著意義；在清潔工作場所方面，相較於每週清潔一次者，清潔 2-5 次【OR=0.151 (95% CI=0.05-0.51)】或 6-7 次【OR=0.271 (95% CI=0.09-0.84)】者皆具有顯著的保護作用。另外本年度我們透過農政單位所舉辦的講習訓練，對此特定族群進行 Q fever

衛教。

關鍵詞：Recombinant protein based ELISA、間接免疫螢光抗體法

ABSTRACT

Q fever is a ubiquitous zoonosis caused by *Coxiella burnetii* which can occur in large outbreaks of acute infections and is a possible bioterrorism agent.

The diagnosis of Q fever is difficult and relies mainly on serological examination, the most commonly used method being indirect immunofluorescence assay (IFA). Whole cell antigens are currently used in several serological methods, but are limited due to the hazardous nature of cultivation of *C. burnetii*. In this study, we reported the development of ELISA system that can be used to rapidly detect *C. burnetii* infections in acute-phase blood samples. In the ELISA test, we have been produced FtsZ, ompA, Ribosomal protein L9, chaperon, RecA, ABC transporter lipoprotein recombinant antigens from *C. burnetii* and identified six protein antigens by western blot analysis. These recombinant antigens can be used to detect *C. burnetii* specific antibodies in the serum samples from patients with *C. burnetii* infection. In the future, ELISA will replace traditional IFA method for early diagnosis of *C. burnetii* infection. This improvement will have great impact on the clinical treatment of patients with *C. burnetii* infections. In molecular typing, we designed 4 primer sets were used to detect the QpRS, QpH1, QpDG and QpDV. In Taiwan, QpRS plasmid-specific sequences was identified in 34 (34/105) of the serum samples.

In Taiwan, studies about seroprevalence of *C. burnetii* in certain groups at risk for Q fever infection were lacking. As a result, we undertake this study to

investigate the risk factors for *C. burnetii* infection among these specific populations in southern Taiwan where Q fever is endemic. In order to know the questions, we designed questionnaire and investigated 221 cases from these groups. In multivariate logistic regression analysis, persons with frequent contact with goats had a 4.14 fold odds ratio (95%CI=1.69-10.07) of *C. burnetii* than other groups. Persons with clean the workplace 2-5 times **【OR=0.151 (95% CI=0.05-0.51)】** or 6-7 times **【OR=0.271 (95% CI=0.09-0.84)】** each week is a protection factor of *C. burnetii* infection. Moreover, we teach the knowledge of Q fever among these specific populations in southern Taiwan which classes hold by the agricultural politics unit.

Key words : *Coxiella burnetii* 、 Recombinant protein based ELISA 、 immunofluorescence assay

壹、前言

Q fever(*Coxiella burnetii*)是人畜共通傳染病(zoonosis)，是細胞內寄生之病原菌，其癒後不佳。有發生不明熱、肝炎、如血液培養是陰性但為心內膜炎(endocarditis)、非典型性肺炎(atypical pneumonia)及伴有高燒和類流感等症狀。*C. burnetii* 的型態呈多形性，可為球桿狀、桿狀、球狀等，大小約為寬 0.2 至 0.4 微米、長 0.4 至 1.0 微米，革蘭氏染色陰性，吉耶姆薩氏染色呈藍色。*C. burnetii* 具內孢子樣之結構，對外界抵抗力強，能耐熱及乾燥，對一般消毒劑也有抗性。其抗原有相的變異，在人、動物及壁蝨體內新分離的菌株具有 I 相抗原，毒力較強。經雞胚卵黃囊連續繼代培養後，抗原會變異為 II 相抗原，毒力也會減弱(Fournier, Marrie et al. 1998)。

蟎(ticks)是野生動物至宿主間的傳播媒介，人類感染 Q fever 主要是因為吸入被病原體污染的塵土，或因為飲用病畜的乳汁、污染的水及食入被污染的食物，也有因為破損的皮膚、粘膜接觸污染物而造成。此病原存於動物的尿液、糞便、乳汁，特別是有蹄類家畜的胎衣及羊水。*C. burnetii* 病菌在生物恐怖攻擊中亦是可能被選擇生物戰劑之一，有研究指出在空氣動力學中若有 100 病原菌/每立方公尺，若暴露 30-60 分鐘即有可能吸入肺中而感染。另有研究指出，在強風中 *C. burnetii* 病原菌可由定點源擴散到 11 英里(18.3 公里)外(Ongradi 2002)。

Q fever 疫情在很多國家是不須通報，所以國際間並不很了解其發生率 (incidence)，因為他們也少作疫情監測。在地中海國家中如法國、義大利、以色列和英國或東歐等國家研究報告，其畜牧業者接觸牛、綿羊、山羊等，如特定農夫、獸醫師、屠宰場或實驗室工作人員和現有飼主寵物貓、狗等密切接觸均會有感染之危險，已造成許多公共衛生上之問題(Maurin and Raoult 1999)。國外 Q fever 同一地區發生率也有不同報

告，均不能很準確的反應發生率，因 Q fever 並未有明確和標準症狀。在歐洲好發生於春季和初夏，當時人們喜好戶外運動，也因畜牧農場羔羊出生(含大量病菌羊水)暴露感染，但一般羔羊在十月是出生期高峰，但反而不是最高發生率(Parisi, Fracalvieri et al. 2006)。

Q fever 在台灣是屬於第四類法定傳染病，通報之檢體皆須送本(疾病管制)局檢驗確認。2004、2005、2006 年的通報病例數分別約 1349、1590、1596 例，而其確定病例數分別 98、117、159 例；2005 及 2006 年全國增加病例數為 42 例，主要集中在高雄縣市、屏東縣、台南縣等南部縣市。其中在高雄縣的確定病例 2005 年至 2006 年由 25 例急速增加至 55 例，佔全國該年增加病例之 71%(30/42)，這升高的因素值得探討。

台灣自 1993 年第一個 Q fever 病例報告發表(Wang, Wang et al. 1993)，之後本土 Q fever 相關文獻發表很少，其中又以病例描述居多(Wang, Wang et al. 1993; Ko, Liu et al. 1997; Lee, Ko et al. 2002; Chang, Yan et al. 2004; Chang, Ko et al. 2005)，僅有一篇是以血清學方法檢測南台灣 Q fever 盛行率的調查研究，該調查顯示不論是 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%(Ko, Liang et al. 2000)。到目前為止，台灣地區尚無針對特定危險職業族群作血清學調查研究。

Q fever IFA 檢驗方法具有高靈敏度及高特異性，是血清學診斷標準方法。但本方法必須以依賴眼力個別判讀，執行大量檢體檢測時不僅耗時費力，也易有人為判讀誤差。擬開發試驗建立 ELISA 方法，若由菌體純化作為抗原，*C. burnetii* 需在活細胞內生長，必須在 P3 等級實驗室培養，純化也較困難。Recombinant protein based ELISA 優點是可以

大量生產，可以選擇宿主免疫反應主要的標的蛋白做為抗原來源，提高試劑的靈敏度及專一性。目前以重組蛋白當診斷抗原應用於 Q fever ELISA 免疫診斷試劑，尚無市售商品化產品。

在流行病學方面，我們在去(2007)年 Q fever 的研究計劃中，針對高高屏地區的特定職業族群如獸醫、畜牧業、屠宰業等工作人員 235 人和相關動物如牛、羊等作局部的血清流行病學調查。本研究是延續去年於這些特定的職業族群之檢驗結果，再輔以個案之問卷調查，進行可能的暴露接觸行為分析研究，包括接觸之接生次數、清潔環境次數、工作時處理動物的過程中是否有穿戴防護裝備等行為，從結果分析可能感染 Q fever 之行為模式或危險因子。另藉由聚會講習和衛生教育，教導特定職業族群作好防護和良好衛生習慣，避免感染 Q fever 人畜共通傳染病，維護身體健康。

因應未來新興人畜傳染及潛在恐怖攻擊事件發生之檢測應變單位，在南台灣南區實驗室建立 Q fever 病原體檢驗核心實驗室，並為南台灣熱帶醫學扎根。去(2007)年已建立 Q fever 最標準檢驗程序，提高檢驗效率和精確度。在今(2008)年擬以分子分型方法區分鑑別台灣本土 Q fever 型別，建立資料。另加緊建立免疫酵素分析方法 (ELISA)，篩檢特異性重組蛋白及製備，並測試其功能性。核心實驗室擬長期培養 Q fever 檢驗及研究人員，為台灣 Q fever 防治工作作最大努力。

貳、材料與方法

一、通報病例檢體

(一)血清來源：各縣市通報 Q fever 檢體。

(二)檢體採集

1、病原檢測：用含 Heparin ($10\mu\text{/mL}$) 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 ($2\sim 8^{\circ}\text{C}$) 方式送至疾病管制局研究檢驗中心，以聚合酶連鎖反應 (PCR) 作病原體檢測。

2、抗體檢測：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 ($2\sim 8^{\circ}\text{C}$) 方式送至疾病管制局研究檢驗中心，以間接螢光抗體法 (Indirect Immunofluorescence Assay, IFA) 測其 IgM 及 IgG 抗體，檢驗結果之 IgM $\geq 1:80$ 或 IgG 有 4 倍以上上升者判定為陽性。

(三)採血方法(用於抗體的檢驗)

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。

(四)檢驗方法：IFA 血清檢驗 和 PCR 檢驗

(五)檢驗報告：檢驗結果輸入「傳染病通報系統」

(六)病原分離：全血應保存於 4°C 冰箱內。檢體應分成二份，一份檢驗，另一份留存以備必要時覆檢。其血清檢體量至少 1 ml，應保存於-80°C 冰箱。菌株應保存於-80°C 冰箱內

(七)品質管制：定期進行細胞 Mycoplasma 之檢測及敏感度試驗。菌株分離用細胞株來源、繼代細胞和黴漿菌測試等之紀錄需長期保存。菌株分離及鑑定之觀察紀錄至少保存二年。

二、特定族群檢體採集

(一)血清來源：經高雄縣、高雄市、屏東縣這三縣市之動物防疫機關協助，取得該縣市轄內大部分公務獸醫師、執業獸醫師、動物飼養業者、屠宰業者之資料；並藉由這些從業人員參加該縣市動物防疫機關之講習會議或教育訓練之機會，徵得同意後進行血液採樣。或經調查其意願，直接至所在之工作場所採血；於 2007 年 3 月至 2007 年 6 月間，共計採集 235 名經常與動物接觸相關職業之工作人員，每一接受採血之個體並有問卷之調查，內容包括個人基本資料、職業、過往病史、動物接觸史及接觸動物種類等。

(二)IFA 檢測 Q fever 血清抗體：採得之血清以 IFA 方法檢測 Q fever 血清 IgG 抗體，本研究使用之試劑套組為 Q Fever IgG Kit(Focus Diagnostics, U.S.A)，檢測方法如 Kit 使用說明；簡單來說，將受測血清自 16 倍起，等倍序列稀釋後分別加至已 Coating *C. burnetii* PhaseI 及 PhaseII 抗原之玻片，經 30 分鐘培養後，再加入有螢光標幟之 anti-human IgG 抗體，再經 30 分鐘培養後，移至螢光顯微鏡觀察是否有螢光反應。

(三)判定標準：PhaseI IgG 抗體力價 ≥ 16 且 PhaseII IgG 抗體力價 ≥ 16 ，或者 PhaseII IgG 抗體力價 ≥ 256 以上判定為血清 Q fever 抗體陽性。

(四)資料分析：搜集到的問卷資料以 SPSS 14.0 軟體，單變項卡方檢定 (univariate chi-square analysis) 及多變項 (multivariate logistic regression analysis) 方法分析。

三、檢驗流程

(一)間接免疫螢光法步驟 (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 0.01M 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)聚合酶鏈鎖反應步驟

IS1111 primer set:

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')

(三)免疫酵素分析法 (ELISA) 初步建立

利用具有抗原性的重組蛋白作為抗原，擬發展自行 coated ELISA 檢測盤，初步建立 Q fever 免疫酵素分析法測試。

(1) 製備 96 孔培養盤先吸附山羊抗人 IgM 抗體及 IgG 抗體

(2) 加入 100 μ l 稀釋 100 倍之待測血清、陽性及陰性對照血清，放置 37°C 培養箱 1 小時後清洗四次

(3) 加入 100 μ l 預先混合之重組蛋白及鼠抗 *C. burnetii* 單株抗體，放置 37°C 培養箱 1 小時，同樣方式清洗四次

(4) 加入 100 μ l 稀釋 4000 倍之山羊抗鼠 IgG 抗体-AP (alkaline phosphatase) 結合體，37°C 作用 1 小時，清洗後加入 100 μ l 酵素受質體 PNPP (p-nitrophenylphosphate disodium)，室溫作用 30 分鐘

(5) 利用微量滴定盤分光儀測量吸光度 405 nm 及參考波長 630 nm

(四) 質體分型試驗 (Primer sets)

QpH1_F1 : 5'-TGAGATTAGAACAACCAAGAAATTCAC-3'

QpH1_R1 : 5'-TAGAGTTGACATCGGGTCG-3'

QpRS_F1 : 5'-ATTTCCCCACTTTCTGGTT-3'

QpRS_R1 : 5'-ACTCGTACCCAAAGACTATGA-3'

QpDG_F1 : 5'-TAATTCAAACGCCTAATCAGTGG-3'

QpDG_R1 : 5'-TAAATGCCCGCAATGACC-3'

QpDV_F1 : 5'-AACAGCTTCAACAGCTTTAATAGA-3'

QpDV_R1 : 5'-ATGGTTGAGAGTGTCCAGTA-3'

(五) 特定職業族群 Q fever 血清流行病學調查

疫情資料分析高雄縣市和屏東縣市為好發者 Q fever 疫病地區，因應防疫持續執行高高屏縣市特定職業族群如獸醫師、畜牧業、屠宰業等工作人員，和農家畜養動物者，牛、羊、豬、狗等的 Q fever 血清流行病

學資料，針對危險因子之分析，將利用問卷就 2007 年已採檢之 235 例個案進行訪問。其訪問方式可分下列 3 種：

- (1)、配合農政單位職業宣導時，向有來聽講之個案施行衛教並進行問卷調查。
- (2)、至接至個案工作場所進行面訪。
- (3)、無法面訪者，將以電話聯繫說明，並將問卷寄至個案家中填寫。
- (4)、針對疑似慢性 Q fever 病患持續進行血清學的調查，定期通知疑似慢性 Q fever 病患前往醫院作身體檢查並了解其血清抗體的變化。

(六) 一般族群受試者選擇標準

高高屏地區因登革熱擴大採血而受檢的民眾，挑選 300 名登革熱陰性之血清，檢測其 Q 熱血清抗體，此部分將只進行血清檢驗而不問卷調查，將之視為非特定職業族群的一般民眾的 Q 熱血清盛行率。這些民眾之挑選條件將與 Q 熱高危險族群之性別、年齡及居住地相似為要求條件。

參、結果

一、新診斷方法之開發試驗及建立 Recombinant protein based ELISA

目前文獻利用二維電泳及建構 *Coxiella burnetii* 的 Genomic DNA library 找出具有抗原性的菌體蛋白 (immunodominant antigen) 包含 Hsp60、Cbmip、p1、adaA (acute disease antigen A) gene、ORF01019(ribosomal protein L9)、00518(Lipoprotein)、01633(Lipoprotein)、02428(Com1)、02027(ABC transporter)、01632(Isoleucyl-tRNA synthetase)、02703(IS111A)、02705(Glycine cleavage system T protein)及 02702(Chaperon)(Zhang, Kiss et al. 2004; Chao, Chen et al. 2005)，等目標基因，進一步我們根據文獻中抗原性的強弱從中挑選出十組抗原性強的目標蛋白(表一)，依照純化流程(圖一)採用大腸桿菌(*Escherichia coli*)表現重組蛋白質。首先利用 PCR 得到目標基因的片段。將此 DNA 片段選殖至 pET 表現系統(Novagen)，產生 N 端(或 C 端)為 His-tag 的全長或片段重組蛋白質。再利用 mAb against His-tag 純化之。一共建構了九組表現載體，並成功表現純化六組重組蛋白，並利用西方墨點法(Western blot)，以現存 Q fever 陽性人體血清抓取具有抗原決定位置(immunogenetic domain)之重組蛋白質結果發現其中三組 OmpA、FtsZ 及 ABC transporter lipoprotein 具有抗原性，進一步將這些重組蛋白吸附在 ELISA 試盤作為抗原，實驗結果發現這些重組蛋白的專一性不足，需進一步的改善以提升檢驗的專一性。

二、質體分型試驗

我們分析 2007 及 2008 年 118 個 Q fever 陽性的檢體，例用設計的四組（表二）引子區分 QpRS、QpH1、QpDG 及 QpDG 四種質體。結果發現可分型的質體幾為 QpRS，僅有一例為 QpH1，但本分型方法靈敏度不高(47/118)，仍有多數未能分型。

三、特定職業族群 Q fever 流行病學調查

疫情資料分析高雄縣市和屏東縣市為好發者 Q fever 疫病地區，因應防疫執行高高屏縣市特定職業族群如獸醫師、畜牧業、屠宰業等工作人員，和農家畜養動物者的血清流行病學資料，針對危險因子之分析，利用問卷就 2007 年已採檢之 235 例個案進行訪問，問卷完成率 94%(221/235)。分析結果(表三)，檢驗為 Q fever 陽性者的年齡較小、男性偏高、學歷偏低(大學以上者僅有 28.8%)、每週工作場所清潔次數、工作中接觸過羊(76.3%)、及較高頻率在處理動物時未穿工作服，皆達顯著意義；但與工作中接觸過狗(33.9%)、貓(18.6%)、鳥(16.9%)或接觸過其他動物(8.5%)、幫動物剃毛或修剪毛的比率(3.4%)反而顯著偏低。此外，進一步進行複邏輯回歸分析後（表四），工作中接觸過羊之危險性為 4.14 (95%CI=1.69-10.07) 達到顯著意義；在清潔工作場所方面，相較於每週清潔一次者，清潔 2-5 次【OR=0.151 (95% CI=0.05-0.51)】或 6-7 次【OR=0.271 (95% CI=0.09-0.84)】者皆具有顯著的保護作用。

四、一般族群 Q fever 陽性率結果

2007 年因應防疫需要，預先完成高高屏縣市特定職業族群如獸醫師、畜牧業、屠宰業等工作人員的 Q fever 血清流行、病學資料。發現特定職業族群的 Q fever 抗體陽性率高達 26.4%，今（2008）年度針對高

高屏地區因登革熱擴大採血而受檢的民眾，挑選300名登革熱陰性之血清，檢測其Q fever血清抗體，此部分將只進行血清檢驗而不問卷調查，將之視為非特定職業族群的一般民眾的Q fever血清盛行率。這些民眾之挑選條件將與Q fever高危險族群之性別、年齡及居住地相似為要求條件。測試結果發現，一般族群中Q fever血清陽性率2.7%(8/300)。

肆、討論

目前 Q fever 之實驗室診斷，主要是以血清學 IFA 方法為主，但本法最後必須以肉眼個別的判讀，執行大量檢體檢測時不僅耗時費力，也易有人為判讀之誤差；而 ELISA 方法不僅可進行大量檢體之篩檢，且容易建置成以儀器全自動化方式執行，省時便利、技術簡單易於操作執行。如果再將檢測過程中所使用的全菌體抗原換成適當的、具免疫抗原性之基因重組蛋白，將使此一方法更加便利且易於推廣，不再需要透過 P3 等級之實驗室培養分離出全菌體抗原，改由轉殖基因至 *E. coli* 表現重組蛋白的方法，取得需要的抗原，方便安全且容易大量生產；以重組蛋白當診斷抗原應用於 Q fever ELISA 免疫診斷試劑。

本研究擬建立以酵素免疫分析法為基礎的 Q fever 血清學檢驗方法，偵測病人血清中抗 *C. burnetii* 的 IgM 及 IgG 抗體，用以診斷 Q fever 傳染病。根據文獻已發表的結果，歸納出這些具有抗原性的蛋白質其分別進行純化表現及測試其抗原性，結果發現陰性血清也有抗原性反應，進一步的探討認為或許是人體血清中普遍存在抗 *E. coli* 抗體，一但純化的過程中沒有去除部份的 *E. coli* 中的蛋白質，可能會影響實驗的結果，因此再進一步的實驗中會將 *E. coli* 細胞萃取液加入病人血清中以去除可能存在的抗 *E. coli* 抗體，以增進測試的專一性。另外單株抗體的選擇也是決定檢驗系統品質的重要關鍵，在未來除了使用抗 *C. burnetii* 的單株抗體外，由於目前所表現的重組蛋白質都具有 His-tag，也可選擇使用 Anti-His tag mAb，我們仍將持續測試及篩選最佳的抗體作為檢驗試劑的材料。開發靈敏度及專一性高的檢驗系統，可提供 Q fever 傳染病之快速診斷，使之應用於疾病的早期診斷及流行病學的研究，這對於 Q fever 傳染病之防治工作是極為重要的。

目前 *C. burnetii* 共有五種不同質體形式分別是 QpH1、QpRS、QpDG、QpDV、及無質體，並且發現帶有不同質體的 *C. burnetii* 存在於特定的族群，其中質體 QpH1 第一次是在蝨(tick)中分離出來，之後也可從牛、羊及山羊中分離出來，而質體 QpRS 通常從流產的山羊及慢性 Q fever(chronic Q fever)的病人所分離出來。QpDG 只有從野生的齧齒目動物分離出來，另外有很多從心內膜炎患者體內分離出的 *C. burnetii* 並不具有質體，但進一步分析發現質體插入細菌的染色體中。質體 QpDV 則是發現於乳牛的牛奶，肺炎患者及急性期 Q fever(Zhang, Hotta et al. 1998)，因此質體的分析也許可以提供重要的訊息，應用於流行病學的調查。

本實驗室於 2007 年針對南台灣(高雄縣市及屏東縣)特定職業族群共採集 235 個血清檢體，其中 62 個(26.4%)為 Q fever 抗體陽性；另外於本年度測試一般族群的血清並發現其抗體陽性率僅 2.7% (8/300)，跟特定族群比較具有顯著差異，代表工作上必須與動物接觸該職業族群比一般民眾更容易感染 Q fever。另外於今年度針對 2007 年 235 個個案進行問卷，想進一步分析了解南台灣易感染 Q fever 高危險職業族群行為，共執行 221 份問卷，由結果分析發現若這些職業族群在較高頻率處理動物時具有較高的 Q fever 陽性率，因此在處理動物時需穿工作服加強本身的防護，另外在接觸羊時更需要自我保護，因為工作中接觸過羊是一危險因子。此外，進一步進行複邏輯回歸分析後，每週工作場所清潔 2-5 次或 6-7 次者皆具有顯著的保護作用，代表加強環境清潔其 Q fever 感染的比例有降低的趨勢。此次的問卷結果提供 Q fever 衛教宣導時的重要參考依據。

表一. Q fever 重組蛋白一覽表

| 目標蛋白 | 載體表現 | 純化蛋白 | 抗原性測試 |
|--------------------------------------|------|------|-------|
| Recombinase A | Y | Y | |
| Tu | Y | | |
| Chaperon | Y | Y | |
| Com1 | Y | | |
| FtsZ | Y | Y | Y |
| OmpA | Y | Y | Y |
| ABC transporter lipoprotein | Y | Y | Y |
| Glycine cleavage system T protein | Y | | |
| Isoleucyl tRNA synthetase | | | |
| Ribosomal protein L9 | Y | Y | |

表二. 質體分型所設計之引子

| | | |
|--------------------------|----------------|--------------------------------------|
| QpH1 plasmid_cbhE | QpH1_F1 | 5TGAGATTAGAACAACCAAGAAATTCAC3 |
| | QpH1_R1 | 5TAGAGTTGACATCGGGTCG3 |
| QpRS plasmid_cbbE | QpRS_F1 | 5ATTTCCCCACTTTCTGGTT3 |
| | QpRS_R1 | 5ACTCGTACCCAAAGACTATGA3 |
| QpDG plasmid | QpDG_F1 | 5TAATTCAAACGCCTAATCAGTGG3 |
| | QpDG_R1 | 5TAAATGCCCGCAATGACC3 |
| QpDV plasmid_p18 | QpDV_F1 | 5AACAGCTTCAACAGCTTTAATAGA3 |
| | QpDV_R1 | 5ATGGTTGAGAGTGTCCAGTA3 |

表三. 單變項卡方檢定分析

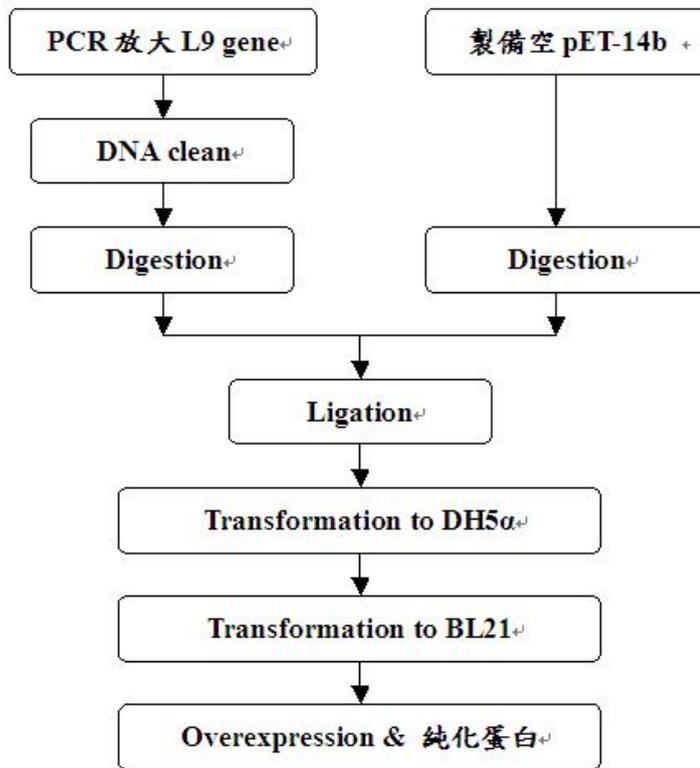
| | | 是 (%) | 否 (%) | P value |
|-----------------------|------|--------------|--------------|---------|
| 年齡 | | 46.9 (±11.3) | 54.7 (±12.2) | <0.0005 |
| 性別 | 男 | 51 (86.4) | 105 (64.8) | 0.003 |
| | 女 | 8 (13.6) | 57 (35.2) | |
| 學歷 | 無 | 0 (0.0) | 3 (1.9) | 0.001 |
| | 國小 | 7 (11.9) | 6 (3.7) | |
| | 國中 | 8 (13.6) | 7 (4.3) | |
| | 高中職 | 14 (23.7) | 17 (10.5) | |
| | 專科 | 13 (22.0) | 50 (30.9) | |
| | 大學 | 11 (18.6) | 44 (27.2) | |
| | 碩士以上 | 6 (10.2) | 35 (21.6) | |
| 接觸動物工作 | 否 | 12 (20.3) | 24 (15.2) | 0.483 |
| | 是 | 47 (79.7) | 134 (84.8) | |
| 家人曾被醫師診斷感染 Q fever | 否 | 59 (100.0) | 155 (98.7) | 0.941 |
| | 是 | 0 (0.0) | 2 (1.3) | |
| 工作場所清潔次數/週 | 0-1 | 15 (27.3) | 13 (9.1) | 0.001 |
| | 2-3 | 7 (12.7) | 34 (23.8) | |
| | 4-5 | 3 (5.5) | 19 (13.3) | |
| | 6-7 | 15 (27.3) | 22 (15.4) | |
| | >8 | 15 (27.3) | 55 (38.5) | |
| 工作中接觸過羊 | 無 | 14 (23.7) | 90 (55.6) | <0.0005 |
| | 有 | 45 (76.3) | 72 (44.4) | |
| 工作中接觸過豬 | 無 | 30 (50.8) | 69 (42.6) | 0.348 |
| | 有 | 29 (49.2) | 93 (57.4) | |
| 工作中接觸過牛 | 無 | 44 (74.6) | 107 (66.0) | 0.297 |
| | 有 | 15 (25.4) | 55 (34.0) | |
| 工作中接觸過狗 | 無 | 39 (66.1) | 59 (36.4) | <0.0005 |
| | 有 | 20 (33.9) | 103 (63.6) | |
| 工作中接觸過貓 | 無 | 48 (81.4) | 74 (45.7) | <0.0005 |
| | 有 | 11 (18.6) | 88 (54.3) | |
| 工作中接觸過鳥 | 無 | 49 (83.1) | 95 (58.6) | 0.001 |
| | 有 | 10 (16.9) | 67 (41.4) | |
| 工作中接觸過鹿 | 無 | 53 (89.8) | 132 (81.5) | 0.200 |
| | 有 | 6 (10.2) | 30 (18.5) | |

| | | | | |
|------------|------------|-----------|------------|---------|
| 工作中接觸過其他 | 無 | 54 (91.5) | 123 (75.9) | 0.017 |
| | 有 | 5 (8.5) | 39 (24.1) | |
| 處理動物是否戴口罩 | 從未 (0 次) | 24 (40.7) | 35 (22.0) | 0.052 |
| | 很少 (1-3 次) | 11 (18.6) | 38 (23.9) | |
| | 偶爾 (4-6 次) | 5 (8.5) | 28 (17.6) | |
| | 經常 (7-9 次) | 6 (10.2) | 30 (18.9) | |
| | 總是 (10 次) | 13 (22.0) | 28 (17.6) | |
| 處理動物是否戴手套 | 從未 (0 次) | 17 (28.8) | 24 (15.4) | 0.147 |
| | 很少 (1-3 次) | 6 (10.2) | 19 (12.2) | |
| | 偶爾 (4-6 次) | 9 (15.3) | 37 (23.7) | |
| | 經常 (7-9 次) | 11 (18.6) | 40 (25.6) | |
| | 總是 (10 次) | 16 (27.1) | 36 (23.1) | |
| 處理動物是否穿工作服 | 從未 (0 次) | 25 (43.1) | 29 (18.5) | <0.0005 |
| | 很少 (1-3 次) | 8 (13.8) | 11 (7.0) | |
| | 偶爾 (4-6 次) | 5 (8.6) | 18 (11.5) | |
| | 經常 (7-9 次) | 9 (15.5) | 28 (17.8) | |
| | 總是 (10 次) | 11 (19.0) | 71 (45.2) | |
| 處理動物是否洗手 | 從未 (0 次) | 3 (5.1) | 2 (1.3) | 0.317 |
| | 很少 (1-3 次) | 0 (0.0) | 1 (0.6) | |
| | 偶爾 (4-6 次) | 0 (0.0) | 3 (1.9) | |
| | 經常 (7-9 次) | 9 (15.3) | 31 (19.7) | |
| | 總是 (10 次) | 47 (79.7) | 120 (76.4) | |
| 吃飯前是否洗手 | 從未 (0 次) | 1 (1.7) | 0 (0.0) | 0.378 |
| | 很少 (1-3 次) | 0 (0.0) | 1 (0.6) | |
| | 偶爾 (4-6 次) | 3 (5.1) | 7 (4.3) | |
| | 經常 (7-9 次) | 12 (20.3) | 24 (14.9) | |
| | 總是 (10 次) | 43 (72.9) | 129 (80.1) | |
| 洗手使用清潔液種類 | 肥皂 | 32 (55.2) | 69 (43.2) | 0.351 |
| | 洗手乳 | 18 (31.0) | 43 (26.9) | |
| | 消毒液 | 3 (5.2) | 10 (6.3) | |
| | 無使用 | 2 (3.4) | 15 (9.4) | |
| | 洗手乳+消毒液 | 2 (3.4) | 5 (3.1) | |
| | 肥皂+洗手乳 | 1 (1.7) | 3 (1.9) | |
| | +消毒液 | | | |
| | 肥皂+洗手乳 | 0 (0.0) | 12 (7.5) | |
| | 肥皂+消毒液 | 0 (0.0) | 3 (1.9) | |
| 處理動物胎盤 | 否 | 34 (57.6) | 102 (65.4) | 0.371 |

| | | | | |
|----------|---|-----------|------------|-------|
| | 是 | 25 (42.4) | 54 (34.6) | |
| 擠奶 | 否 | 52 (88.1) | 152 (94.4) | 0.195 |
| | 是 | 7 (11.9) | 9 (5.6) | |
| 接生 | 否 | 42 (71.2) | 121 (75.2) | 0.665 |
| | 是 | 17 (28.8) | 40 (24.8) | |
| 餵食 | 否 | 38 (64.4) | 105 (65.2) | 1.000 |
| | 是 | 21 (35.6) | 56 (34.8) | |
| 清掃房舍 | 否 | 35 (59.3) | 100 (62.1) | 0.826 |
| 運送動物 | 否 | 43 (72.9) | 133 (82.6) | 0.159 |
| | 是 | 16 (27.1) | 28 (17.4) | |
| 剃毛或修剪毛 | 否 | 57 (96.6) | 131 (81.9) | 0.011 |
| | 是 | 2 (3.4) | 29 (18.1) | |
| 屠宰動物 | 否 | 53 (89.8) | 147 (91.3) | 0.942 |
| | 是 | 6 (10.2) | 14 (8.7) | |
| 食用未消毒的生乳 | 否 | 57 (96.6) | 148 (94.9) | 0.859 |
| | 是 | 2 (3.4) | 81 (5.1) | |

表四. 多變項邏輯回歸分析 Q fever 的危險因子

| | | OR (95%CI) | P value |
|------------|-------|-------------------|---------|
| 年齡 | | 0.99 (0.95-1.03) | 0.536 |
| 性別 | 男 | 1.00 | 0.112 |
| | 女 | 0.38 (0.12-1.25) | |
| 學歷 | 國小以下 | 1.00 | |
| | 國中高中職 | 1.28 (0.27-5.99) | 0.754 |
| | 大專以上 | 0.722 (0.13-4.09) | 0.713 |
| 工作場所清潔次數/週 | 0-1 | 1.00 | |
| | 2-5 | 0.151 (0.05-0.51) | 0.002 |
| | >6-7 | 0.271 (0.09-0.84) | 0.024 |
| 羊 | 無 | 1.00 | 0.002 |
| | 有 | 4.14 (1.69-10.07) | |
| 狗 | 無 | 1.00 | 0.065 |
| | 有 | 0.39 (0.14-1.06) | |
| 貓 | 無 | 1.00 | 0.762 |
| | 有 | 0.82 (0.24-2.89) | |
| 鳥 | 無 | 1.00 | 0.478 |
| | 有 | 0.65 (0.19-2.14) | |
| 其他 | 無 | 1.00 | 0.606 |
| | 有 | 0.73 (0.22-2.41) | |
| 工作服 | 從未 | 1.00 | |
| | 很少偶爾 | 2.16 (0.61-7.64) | 0.232 |
| | 經常總是 | 0.93 (0.32-2.71) | 0.896 |
| 剃毛或修剪毛 | 無 | 1.00 | 0.09 |
| | 有 | 3.11 (0.01-1.36) | |



圖一. Q fever 重組蛋白製備流程

參考文獻

- Bernit, E., J. Pouget, et al. (2002). "Neurological involvement in acute Q fever: a report of 29 cases and review of the literature." *Arch Intern Med* 162(6): 693-700.
- Brouqui, P., H. T. Dupont, et al. (1993). "Chronic Q fever. Ninety-two cases from France, including 27 cases without endocarditis." *Arch Intern Med* 153(5): 642-8.
- Chang, K., W. C. Ko, et al. (2005). "Diffuse abdominal uptake mimicking peritonitis in gallium inflammatory scan: an unusual feature of acute Q fever." *Kaohsiung J Med Sci* 21(11): 522-6.
- Chang, K., J. J. Yan, et al. (2004). "Acute hepatitis with or without jaundice: a predominant presentation of acute Q fever in southern Taiwan." *J Microbiol Immunol Infect* 37(2): 103-8.
- Dupont, H. T., X. Thirion, et al. (1994). "Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence." *Clin Diagn Lab Immunol* 1(2): 189-2007.
- Fournier, P. E., J. Etienne, et al. (2001). "Myocarditis, a rare but severe manifestation of Q fever: report of 8 cases and review of the literature." *Clin Infect Dis* 32(10): 1440-7.
- Fournier, P. E., T. J. Marrie, et al. (1998). "Diagnosis of Q fever." *J Clin Microbiol* 36(7): 1823-34.
- Fournier, P. E. and D. Raoult (2003). "Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever." *J Clin Microbiol* 41(11): 5094-8.
- Gouriet, F., F. Fenollar, et al. (2005). "Use of shell-vial cell culture assay for isolation of

- bacteria from clinical specimens: 13 years of experience." *J Clin Microbiol* 43(10): 4993-5002.
- Klee, S. R., J. Tyczka, et al. (2006). "Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*." *BMC Microbiol* 6: 2.
- Ko, W. C., C. C. Liang, et al. (2000). "Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection in southern Taiwan." *J Formos Med Assoc* 99(1): 33-8.
- Ko, W. C., J. W. Liu, et al. (1997). "Acute Q fever as a cause of acute febrile illness of unknown origin in Taiwan: report of seven cases." *J Formos Med Assoc* 2007(4): 22006-7.
- Lee, H. C., W. C. Ko, et al. (2002). "Clinical manifestations and complications of rickettsiosis in southern Taiwan." *J Formos Med Assoc* 101(6): 385-92.
- Maurin, M. and D. Raoult (1999). "Q fever." *Clin Microbiol Rev* 12(4): 518-53.
- Ongradi, J. (2002). "[Microbial warfare and bioterrorism]." *Orv Hetil* 143(33): 1935-9.
- Parisi, A., R. Fraccalvieri, et al. (2006). "Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR." *Vet Microbiol* 118(1-2): 101-6.
- Wang, J. H., Y. H. Wang, et al. (1993). "Acute Q fever: first case report in Taiwan." *J Formos Med Assoc* 92(10): 917-9.