

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-122303

衛生福利部疾病管制署 108 年署內科技研究計畫

計畫名稱：開發新興人畜共通傳染病原體(*Anaplasma spp.*、
R. felis)快速檢驗方法

108 年 度 研 究 報 告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：舒佩芸研究員

研究人員：楊素鈴、王若羽、陳湘妃

執行期間：108 年 1 月 1 日至 108 年 12 月 31 日

目 錄

	頁碼
封面	
目錄	
壹、摘要	
一、中文摘要	3
二、英文摘要	4
貳、本文	
一、前言	5
二、材料與方法	10
三、結果	14
四、討論	16
五、結論與建議	17
六、重要研究成果及具體建議	18
七、參考文獻	19
八、圖、表	21

共 31 頁

一、中文摘要

人類顆粒細胞無形體病(human granulocytic anaplasmosis; HGA)是由人畜共通傳染病原體嗜吞噬球無形體 (*Anaplasma phagocytophilum*) 感染引起的疾病。藉由感染的蜱蟲叮咬所造成的疾病。目前台灣雖未發現 HGA 病例，但由研究發現台灣許多蜱蟲帶有 *A. phagocytophilum*，故有必要開發 HGA 的快速診斷方法，幫助防疫工作的進行。另外斑點熱(spotted fever) 是斑點熱立克次體 (*Spotted fever group rickettsiae*; SFGR)感染所引起的疾病。SFGR 可感染許多種類的節肢動物，再經由節肢動物叮咬傳至人或哺乳動物。全球每年都有許多斑點熱病例發生。台灣在 2005 年首次發現人感染 *Rickettsia felis* 的病例。由研究發現，台灣的貓蚤及鼠蚤帶有 *R. felis* 病原體，但因 *R. felis* 感染的症狀不易與其他急性傳染病區分，故人的病例數很有可能被低估。上述傳染病在疾管署實驗室尚未建立完整的檢驗系統。臺灣位處亞洲地區交通樞紐，易受全球新興傳染病威脅，開發傳染病快速檢驗技術，為目前所需。本計劃主要目標在建立 *Anaplasma spp.* 及 *R. felis* 的快速診斷方法，優點是能在短時間內判讀、不需特別儀器操作，可進行 point of care 篩檢，對傳染病的防治有極大幫助。目前已完成 *Anaplasma spp.* 的 IgM 及 IgG ELISA 檢驗技術，以及成功表現 *R. felis* 重組蛋白質並建置成 ELISA 檢驗平台，使能在病人急性期全血或血清中快速檢驗出病原抗體，應用於疾病的早期診斷及流行病學的研究，這對立克次體傳染病之防治工作是極為重要。

關鍵詞：無形體病、嗜吞噬球無形體、斑點熱群立克次體

二、英文摘要：

Human granulocytic anaplasmosis (HGA) is a tick-borne diseases caused by *Anaplasma phagocytophilum*. Although no human cases have been reported in Taiwan, *A. phagocytophilum* has been found in several tick species and small mammals in Taiwan. *Spotted fever group rickettsiae* (SFGR) are zoonotic pathogens which cause spotted fever in human and animals. Spotted fever disease is found throughout the world. We previously reported a patient infected with *R. felis* in 2005. In addition, several *Rickettsia spp.* have been also found in small mammals in Taiwan. The main objective of this study is to develop rapid diagnostic tests for the detection of *Anaplasma spp.* and *R.felis* infections. In this study, we have successful set up ELISA system for *Anaplasma spp.* detection. And also expressed ompA recombinant protein as *R. felis* diagnostic marker, enable rapid confirms the Rickettsial infection and is used in the early diagnosis and epidemiological studies to control Rickettsial diseases.

Key words: *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia felis*,

貳、計劃內容

一、前言

一、嗜吞噬細胞無形體 (*Anaplasma phagocytophilum*) :

嗜吞噬細胞無形體 (*Anaplasma phagocytophilum*) 是一種絕對細胞內寄生的細菌。Human granulocytic anaplasmosis (HGA) 主要是由感染病菌的蜱叮咬所引起，*A. phagocytophilum* 不只會感染人也會感染家畜 (馬、狗、牛、羊等)，在2006年大陸安徽省也發現HGA也能經由感染的血液或呼吸懸浮造成院內感染。

Anaplasma phagocytophilum 感染所引起的臨床症狀與一般細菌或病毒感染的症狀極為類似，會出現發燒、頭痛、肌肉痛、冷顫、腹痛、咳嗽、皮膚紅疹、白血球減少症 (Leukopenia) 或血小板減少 (症) thrombocytopenia 等，其臨床症狀為非特異性，極不易判別。

1994年，美國最早提出病例研究報告，後續也陸續在歐洲、亞洲 (China, Japan and South Korea) 及美洲等地也有案例。其臨床症狀與某些病毒性疾病相似，容易發生誤診。HGA若沒有及時給予正確治療，將會導致嚴重的呼吸困難、出血、多重器官衰竭、腦神經病變等。

Li H, Zhou Y 等人曾於2011年發表研究指出HGA在大陸河北與湖南省的致死率高達26.5% (The clinical characteristics and outcomes of patients with human granulocytic anaplasmosis in China. Int J Infect Dis 2011. 15:

e859-e866)。在大陸發生的第一個HGA病例即因非特異性的臨床症狀被誤診為出血熱而延誤治療致死。

依據文獻報導從事農作及畜牧業(動物飼育人員)約8.8%的血清帶有 *A. phagocytophilum* antibodies，中國大陸在2008年也發佈 Guidelines for prevention and control of human granulocytic anaplasmosis 及在2009年又公告 Urgent information on further prevention and control of anaplasmosis。因此我國也應對該病原體加強檢驗監控。由於在鄰近國家(China, Korea, Japan)皆有發現被Anaplasma感染的案例，且臺灣位處亞洲地區交通樞紐，台灣血蜱，及長角血蜱為*A. phagocytophilum*感染源。易受該病原傳染威脅，爰此開發此快速檢驗技術，為目前所亟需。流行病學主要分布在歐亞美非洲皆有案例報導，鄰近國家主要發生在中國大陸、韓國、日本及東南亞區域。

目前在臨床上較急迫的是如何對*A. phagocytophilum*及早快速診斷，以提供有效治療，是目前的一大挑戰。

HGA的實驗室診斷主要有三種方法:

(1) 血清學檢驗: 免疫螢光染色法 (MIF)，這種方法需要螢光顯微鏡，且須受過訓練的專員操作，需要較多的時間與人力。且需病人的配對血清，進行抗體4倍上升，以確定感染。醫護人員需對病患進行二

採血清，但常因病患不願配合，不易取得第二次採血的檢體。

(2) 顯微鏡檢驗：觀察病人血液的peripheral blood-stained smears在中性顆粒細胞(neutrophilic granulocytes)內是否出現桑胚囊 (morulae)來判定，但通常只有在acute-phase才能觀察到，且不易偵測到。

(3) PCR方法：偵測病人血液、組織等檢體之細菌核酸分子(16S rRNA gene, msp2 gene, msp4 gene等)，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。近年來，螢光定量PCR方法已被廣泛的使用於多種傳染病的常規檢驗，是目前分子診斷中極有效的檢驗方法。由於檢體中病原體數量稀少，通常檢測的陽性率不高。

在台灣，HGA並非法定傳染病，對*A. phagocytophilum*感染所引起的研究與臨床診斷極為有限，HGA所面臨的最大挑戰是如何在感染的早期快速的診斷出來，使能及早治療，因此疾管署實驗室積極對*A. phagocytophilum*開發易操作，且高靈敏度及專一性的快速檢測試劑。

二、貓蚤斑點熱立克次體 (*Rickettsia felis*)

貓蚤斑點熱立克次體 (*Rickettsia felis*) 可感染貓蚤 (*Ctenocephalides felis*)，當被 *R. felis* 感染的貓蚤叮咬，會引起貓蚤斑點熱疾病。由於許多病原體(例如 leptospirosis, murine typhus, dengue fever) 的感染都會引發類似的症狀，如發燒、頭痛、冷顫、咳嗽、皮膚出現紅疹、噁心與嘔吐等，難於區別，因此常見貓蚤斑點熱立克次體的誤診或

延誤治療時機。

目前貓蚤斑點熱立克次體實驗室的診斷主要是依靠下列三種方法：

(1)免疫螢光染色法：為目前標準的檢驗方法。此方法需要螢光顯微鏡，且須受過訓練的專員操作，需要耗費較多的時間與人力。本方法和前述*A. phagocytophilum*相似，需病人的配對血清，進行抗體4倍上升，以確定感染。醫護人員需對病患進行二採血清，但常因病患不願配合，不易取得第二次採血的檢體。

(2) PCR 與real time PCR方法：螢光定量PCR方法已被廣泛的使用於多種傳染病的常規檢驗，是目前分子診斷中極有效的檢驗方法。但需要高規格的儀器設備與專業人員的操作。由於檢體中病原體數量稀少，通常檢測的陽性率不高。

根據Jorge E.在2008年Am. J. Trop. Med. Hyg文獻期刊報導*Rickettsia felis*外膜蛋白outer membrane protein A (omp A) 可應用於貓蚤斑點熱立克次體之血清學診斷。本計畫將從*Rickettsia felis*外膜蛋白omp A進行選殖表現純化，利用此抗原應用於ELISA及ICT系統，並研發提高診斷的正確性及即時性，研發建置一套完整的*Rickettsia felis*快速診斷系統，以期能在病人急性期可以早期診斷並即時給予正確治療。

本計劃第一年(2018年) 選殖*Anaplasma phagocytophilum*主要抗原

蛋白質(MSP2) ，在細菌系統下表現重組蛋白質，篩選出最佳的高親和性抗原，建置酵素免疫分析法。今年也成功表現*R. felis*重組蛋白質ompA並建置成ELISA檢驗平台，可做篩檢，以利即早確認與治療。

二、材料與方法

- 1. 檢體及細菌株：**檢體來源為通報至疾病管制署立克次體傳染病之疑似病例檢體。全血及血清檢體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。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。病人血清及血液檢體包括急性期(症狀出現後0-7天)、早恢復期(症狀出現後8-13天)、晚恢復期(症狀出現後14-30天)之檢體。病人檢體收集後，將進行病原分離、血清學及分子生物學之實驗室診斷以確認感染源。不同發病期採取的血清檢體，將用以分析病人對各種抗原之抗體反應，如抗體之效價、種類、特異性及動力學變化等。經實驗室確診為陽性之檢體將加以分裝，儲存於 -80 °C 冷凍櫃長久保存。
- 2. 菌株分離法：**檢體為病患急性期（1~7病日）含heparin(10U/mL)之全血，分離出周邊血液單核細胞（PBMC），再將其接種至L929或HEL 細胞株 (shell-vial細胞培養瓶)。每隔3~4天更換培養液，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。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。所有實驗過程應於P3實驗室生物安全操作台內操作, 慎防感染自己及他人。培養基中不可添加四環黴素及氯黴素等抗生素。

3. *Anaplasma phagocytophilum* Msp2, *R. felis* OmpA引子 (Primer)

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，引子(Primer)的設計與合成將依不同抗原選定，進行PCR。

4. 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)以*Anaplasma*

phagocytophilum, *R. felis* genome為template，設計不同的primers

加入反應試劑內，進行PCR反應。取1ul cDNA加入含有2X buffer

Mix(50mM KCl、10mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、0.1% Triton-X

100、dNTP mixture 1mM)、5 units *Taq* polymerase 共50uL，於

94°C變性(denature)10分鐘後，以94°C：30秒、60°C：30秒、72

°C：1分鐘，進行30次反應 (上述反應依不同primer特性而有不

同的溫度及反應設定)，最後在72°C作用10分鐘。經PCR增幅放

大之MSP2產物片段，須以DNA電泳確認產物大小。及DNA

sequencing確認基因正確方能進一步表現及純化重組蛋白質。

5. 重組蛋白質之製備與純化：主要是以大量表現*Anaplasma*

phagocytophilum, *R.felis* 菌體膜上的蛋白質MSP2, OmpA為標的，構築質體（pET-47B plasmid）表現其基因重組蛋白質。由於大腸桿菌可提供便宜、快速且能大量生產蛋白質的多種優點，本計畫將採用大腸桿菌表現重組蛋白質。首先利用PCR得到MSP2 gene或OmpA genes的DNA片段。將此DNA片段選殖至pET表現系統(Novagen)，產生N端為His-tag的全長或片段重組蛋白質。將質體構築完成後，轉殖至蛋白質表現系統BL-21（DE3），以1 mM IPTG誘導標的蛋白質產生。抽取該菌液蛋白質後，再將純化後收集之蛋白質溶液混合後，以His-resin方法，得到純化之重組蛋白質。發展ELISA檢驗試劑，製成更高靈敏度、高專一性的酵素免疫診斷試劑。

- 6. 蛋白質電泳(SDS-PAGE)及西方墨點法(Western blot)：**純化之樣品以10-12%梯度的正十二烷硫酸鈉一聚丙烯醯胺膠體，在電壓165伏特之下做電泳分離45分鐘，之後以Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 進行染色分析蛋白質電泳的情況。純化之樣品經過蛋白質電泳後，利用transferred onto an iBlot® 2 nitrocellulose regular stacks by iBlot® 2 gel transfer device (Thermo Fisher Scientific) 進行西方墨點法，將蛋白質樣品由膠體轉移至NC纖維膜上，加入合適的血清抗體(1: 100

dilution)或anti-poly-His tag monoclonal antibody (Sigma) 作用1小時後.以0.1%Tween20/PBS清洗 最後加入IgG-HRP secondary antibody 與呈色劑以蛋白質分析儀 ImageQuant LAS 4000 mini biomolecular imager進鑑定

- 7. Indirect IgM and IgG ELISA :**先以2.5 µg/ml, 100 µl/well MSP2 或 ompA recombinant protein在4°C下隔夜吸附(coating)在96孔微量效價盤上約16-18小時。再用100 µl之4% 牛血清白蛋白緩衝液 (4% BSA-PBS)於37°C下進行1小時blocking作用。以PBST清洗3次後，加入1:100稀釋好的待測血清及對照血清反應1小時。再以PBST清洗3次後，加入1:2000稀釋之山羊抗人IgM或1:5000稀釋之山羊抗IgG抗体-鹼性磷酸酶結合體，於37°C反應1小時。加入酵素受質體，於室溫作用30分鐘，再以波長405 nm測吸光度。
- 8. ELISA 最適化研究：**改進 ELISA 之靈敏度(sensitivity)及專一性 (specificity)，以提高鑑別診斷之可靠性，分辨不同新興人畜共通傳染病原體(*Anaplasma spp*, *R.felis*) 的感染，研發並提高靈敏度及專一性的 ELISA 檢驗試劑。

三、 結果

1. 依據文獻報導目前 *Rickettsia felis* 感染的診斷是以 ompA 抗原作為 diagnosis marker (因具有高度抗原性) , 本研究已完成最重要的抗原 ompA 蛋白質表現與純化(**Fig 1 A**); 所純化 ompA 可以用特異性抗體 anti-his tag monoclonal antibody 偵測辨識, 另以 *Rickettsia felis* 感染的病人血清亦能辨識到 ompA 片段蛋白質, 而正常血清則無法辨識, 顯示所表現出的 ompA 具有抗原的特異性能被專一性抗體及病人血清所確認及辨識 (**Fig. 1 B**)。
2. 純化出來的 ompA coating 在 ELISA strip 進行 ELISA 測試結果, 以 commercial ELISA 作平行比對, 用 3 個陽性血清及 8 個陰性血清實驗測試結果: Home-made sensitive 為 **Table 1A**, specificity 為 **Table 1B**, 未來將繼續研發改善 ELISA 靈敏度及專一性。
3. 另外以所建置的 ompA ELISA 進行 retrospective study, 以 gold standard IFA 作平行比對。結果測得有 3 對 paired-sera 的 ompA ELISA 有陽性, 第一對血清 1072265A, 1072265B IFA IgM 分別為 <40, 320 有 4 倍上升 (**Fig. 2**); 第二對血清 1080220A, 1080220B IFA IgM 分別為 80, 320 也有 4 倍上升 (**Fig. 3**); 第三對血清 1080410A, 1080410B IFA IgM 皆為 320 (**Fig. 4**), 亦已達陽性的判定標準。這樣的結果顯示 ELISA 的 IgM 的 sensitivity 與 IFA 結果有一致性, 另以 Western blotting (ompA) 做評估比對, 也發現

ELISA 與 Western blotting 結果亦相符合。

4. 純化透析 ompA protein 對小鼠進行免疫，先將 ompA 進行透析後以 SDS-PAGE 及分光光度計確認純度與濃度 (**Fig. 5A**)，再將所純化 ompA 進行 Western blotting 確認被 anti-his tag monoclonal antibody 所辨識(**Fig. 5B**)。
5. 最後再對小鼠進行四次免疫，製備融合瘤細胞；取得 spleen 前先以 ELISA (**Fig.6**) 進行測試，結果 4 隻小鼠的血液經稀釋至 12800 倍，仍保有高 titer, 顯示免疫過程具有高效益 (mouse 5 為 mock control 為無免疫小鼠的血清)。
6. 以 ELISA 進行 screening 單株抗體，第一次 fusion 共 screening 400 多個 hybridoma clones 篩選到數株單株抗體具有高力價 (**Fig. 7A**)。另以 plot 圖分析所篩選到的 clone 具有高效價的單株抗體 (**Fig. 7B**)。
7. 進行第二次 fusion 共 screening 400 多個 hybridoma clones 篩選到數株單株抗體具有高力價 (**Fig. 8A**)。另以 plot 圖分析所篩選到的 clones 具有高效價的單株抗體 (**Fig. 8B**)。
8. 經過 3 次 limit dilution subclone, 總共篩選到具有高親和力的單株抗體 (**Fig. 9A**)，總共完成 16 株 *Rickettsia felis* 特異性單株抗體的製備，製備單株抗體可用 Western blotting 確認辨識到特異性蛋白質 ompA (**Fig. 9B**)。

9. 綜上目前已完成: *Rickettsia felis* 重要的抗原 ompA 蛋白質表現純化與特异性分析，該特异性抗體 anti-his tag monoclonal antibody, *Rickettsia felis* 感染的病人血清亦能辨識到 ompA, 正常血清則無法辨識，顯示 ompA 具有抗原的特異性能被專一性抗體及病人血清所確認及辨識。另外完成製備 *Rickettsia felis* 主要抗原 ompA 多株抗體及單株抗體。最後完成建置 *Rickettsia felis* IgM and IgG 酵素免疫分析法，使能在病人急性期全血或血清中快速檢驗出病原抗體，應用於疾病的早期診斷及流行病學的研究，這對立克次體傳染病之防治工作是極為重要。

四、 討論

目前 *R.felis* 的實驗室診斷以免疫螢光染色法為診斷依據，除了需要有經驗的技術人員，尚須有精密的螢光顯微鏡儀器設備。若以免疫螢光染色法進行診斷，除了需經有經驗、受過專業訓練的技術人員判定之外，實驗的判讀也常因人為主觀的判定而有爭議，此外也會耗費大量人力及較長的檢驗時間來完成，實著不易，且無法客觀標準定量。

本計畫完成建立 ELISA 系統以 *E.coli* 大量製備 immunodominant protein，不需在三級實驗室即可量產獲得 diagnostic antigen。本方法具備生物安全性且易於純化等優勢，並能自動化大量快速檢測，迅速得到檢測結果。

最後我們也完成製備 *R.felis* 主要抗原 ompA 的單株抗體，可在疾病早期偵測病原體，及早診斷，給予病人正確的醫療照顧，對 *R.felis* 傳染病之防治工作極為重要。

五、 結論與建議

本計畫已完成表現及純化 *R.felis* 菌株主要抗原 ompA 重組蛋白質，此重組蛋白質的抗原專一性及特異性可用 anti-his Ab 專一性抗體及病人血清確認其抗原性。

將所建置的 *R.felis* home-made ELISA 與 golden standard IFA 做平行比對，結果顯示 home-made ELISA 的 sensitive 和 specificity 與 IFA 具有一致性與關聯性。

本研究結果顯示 *R.felis* 菌株主要抗原 ompA 具有做為 diagnostic antigen 潛能，可以做為自動快速檢測之抗原，可以在病人急性期全血或血清中快速檢驗出病原抗體，可應用於疾病的早期診斷及流行病學的研究，這對新興人畜共通 *R.felis* 傳染病之防治工作極為重要。

六、重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

本計畫已完成建置 *R. felis* ompA 表現與純化，同時製備高特異性的單株抗體，也完成建置 indirect IgG 及 IgM ELISA 系統。結果顯示具有優異的敏感性與特異性，較傳統的 IFA 方法安全穩定，亦可自動化篩選出疑似檢體，有效縮短檢驗時間，可以在疾病早期診斷，及早進行防疫措施。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

加強衛教宣導、鼓勵醫師通報等防疫措施，可及早發現 *R. felis* 傳染病，對於非特異性、無症狀之患者，能及早進行篩檢診斷，避免病患延誤就醫減少惡性病情發展。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

由於國際間交通往來頻繁、氣候變遷等因素，各種人畜共通傳染病如恙蟲病、地方性斑疹傷寒、發熱伴血小板減少綜合症、斑點熱、人粒細胞無形體、艾利希氏體症、病蜱媒腦炎病毒等已成為目前全球公共衛生防疫上的重大問題，建議應積極加強境外及本土人畜共通傳染病之監測。

七、 參考文獻：

1. Bakken JS, Dumler JS. 2000. Human granulocytic ehrlichiosis. Clin. Infect. Dis. 31:554–560.
2. Bakken JS, et al. 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? JAMA 272:212–218.
3. Bakken JS, et al. 1996. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. JAMA 275:199–205.
4. Brouqui P, Dumler JS, Lienhard R, Brossard M, Raoult D. 1995. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. Lancet 346:782–783.
5. Dumler JS, et al. 2005. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. Emerg. Infect. Dis. 11:1828–1834.
6. Keysary A, et al. 2007. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in Israel. Emerg. Infect. Dis. 13:1411–1412.
7. Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, et al. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. Emerg Infect Dis 2005;11:1828–34.
8. Demma LJ, Holman RC, McQuiston JH, Krebs JW, Swerdlow DL. Epidemiology of human ehrlichiosis and anaplasmosis in the United States, 2001-2002. Am J Trop Med Hyg 2005;73:400–9.
9. Zhang L, Liu Y, Ni D, Li Q, Yu Y, Yu XJ, et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. JAMA 2008;300:2263–70.
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Anaplasma phagocytophilum* transmitted through blood transfusion—Minnesota, 2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2008;57:1145-8.
11. Zavala-Velázquez JE, Ruiz-Sosa JA, Sánchez-Elias RA, Becerra-Carmona G,

- Walker DH, 2000. *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatán. *Lancet* 356: 1079–1080.
12. Bouyer DH, Stenos J, Crocquet-Valdes P, Moron CG, Popov VL, Zavala-Velázquez JE, Foil LD, Stothard DR, Azad AF, Walker DH, 2001. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 339–347.
13. Zavala-Castro J, Small M, Keng C, Bouyer DH, Zavala-Velázquez JE, Walker DH, 2005. Transcription of the *Rickettsia felis ompA* gene in naturally infected fleas. *Am J Trop Med Hyg* 73: 662–666.
14. Zavala-Velázquez J, Laviada-Molina H, Zavala-Castro J, Perez- Osorio C, Becerra-Carmona G, Ruiz-Sosa JA, Bouyer DH, Walker DH, 2006. *Rickettsia felis*, the agent of an emerging infectious disease: report of a new case in Mexico. *Arch Med Res* 37: 419–422.
15. Calic SB, Walker DH. *Rickettsia felis* in the Americas, 2006. *Ann NY Acad Sci* 1078: 156–158.
16. Oteo JA, Portillo A, Santibáñez S, Blanco JR, Pérez-Martínez L, Ibarra V, 2006. Cluster of cases of human *Rickettsia felis* infection from Southern Europe (Spain) diagnosed by PCR. *J Clin Microbiol* 44: 2669–2671.

八、圖、表

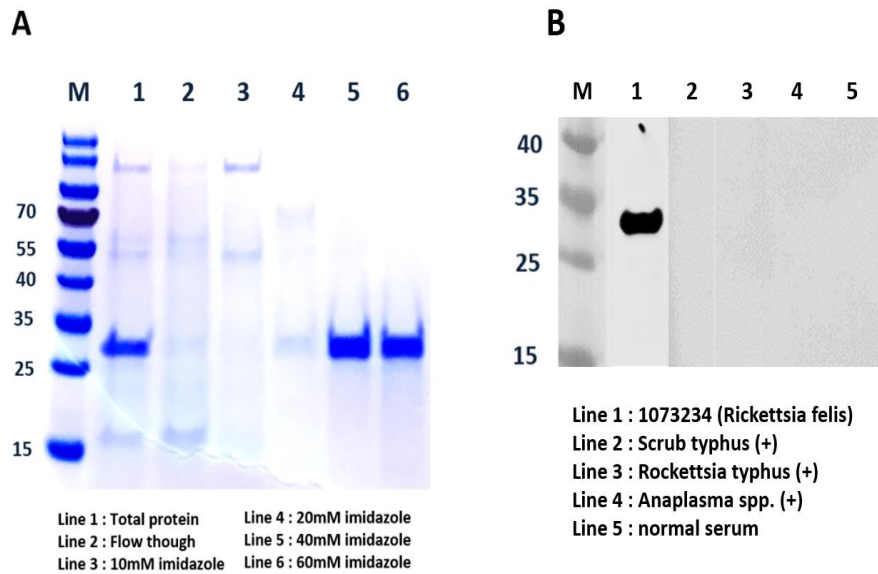


Fig. 1. *R. felis* 最重要的抗原 ompA 蛋白質表現 (Fig 1A) 與具特異性 (Fig. 1B)，顯示所表現出的 ompA 具有抗原的特異性能被專一性抗體及病人血清所確認及辨識。

(A) Sensitivity

NO	病日	WB	ELISA		ELISA	
		R.felis	R.felis (1)		R.felis	
		ompA	ELISA cdc		focus (ompB)	
		GAM	IgM	IgG	IgM (>1.1)	IgG (>1.2)
1	19	GAM +	1.057	0.629	1.76	1.46
2	7	M +	0.61	0.41	1.03	0.12
3	16	G +	0.63	0.75	1.21	1.43

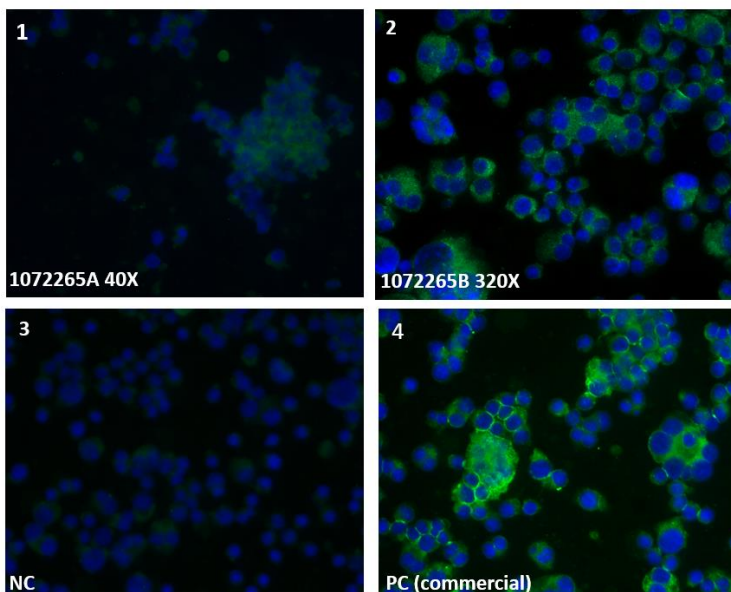
(B) Specificity

NO	WB	ELISA		ELISA	
	R.felis	R.felis (1)		R.felis	
	ompA	ELISA cdc		focus (ompB)	
	GAM	IgM	IgG	IgM (>1.1)	IgG (>1.2)
1	-	0.08	0.23	0.45	0.22
2	-	0.37	0.32	0.63	0.24
3	-	0.35	0.65	0.67	0.27
4	-	0.12	0.43	0.36	0.22
5	-	0.09	0.31	0.63	0.22
6	-	0.09	0.26	0.88	0.13
7	-	0.10	0.33	0.29	0.09
8	-	0.10	0.30	0.77	0.30

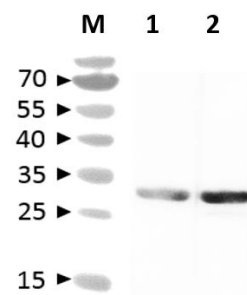
Cut-off	IgM	IgG
mean	0.16	0.35
SD	0.12	0.13
mean+3SD	0.53	0.75

Table 1 . 純化出來的 ompA 進行 ELISA 測試結果，以 In vitro diagnosis 的 ELISA 作平行比對，(A)為陽性檢體，(B)為陰性檢體。IgM, IgG ELISA 的 sensitive, specificity 成效良好。

A. IFA Result



B. Western blotting



Lane 1: 1073154 (一採)
 Lane 2: 1073231 (二採)
 *1 Ab (2hr): serum 1:50
 *2 Ab (1hr): anti-human IgM 1:2000
 *Scan: 30sec

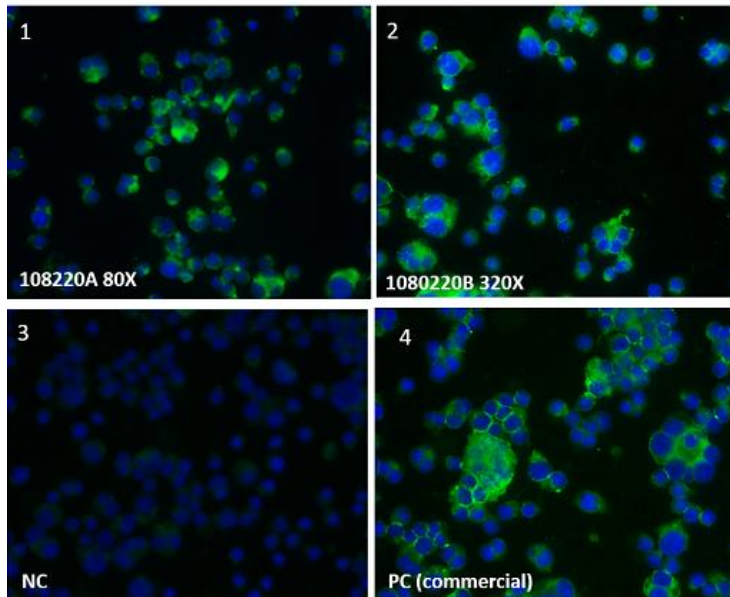
C. ELISA Result

No	血清號	檢體編號	居住縣市	性別	年齡	病日	Western blotting	ELISA (CDC)		ELISA (CDC)		IFA (CDC)	IFA (Fuller Kit)	
								<i>R. felis</i>		<i>R. felis</i>		<i>R. felis</i>	<i>R. felis</i>	
								ompA IgM	ompA IgG	ompB IgM	ompB IgG	IgM	IgM 64X	IgG 64x
1	1073154	1072265A	新竹市	F	28	7	+	0.314	0.25	0.693	0.244	0	-	-
	1073231	1072265B	新竹市	F	28	36	+	0.687	0.246	1.762	0.348	320	+	-

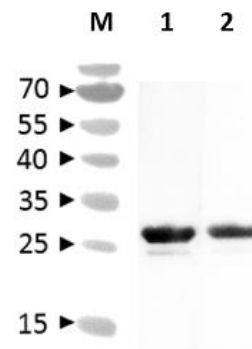
* OT positive

Fig.2 分析第一對血清 1072265A, 1072265B 結果。當配對血清 ELISA IgM 為 0.314, 1.762, IFA IgM 分別為 <40, 320, IgM 有 4 倍上升已達陽性的判定標準, 另外以 Western blotting (ompA) 結果發現, 二採血清可以明顯偵測到 ompA 主要抗原, 再次證明所建置 ELISA system 可以偵測到 *R. felis* 感染的病人。

A. IFA Result



B. Western blotting



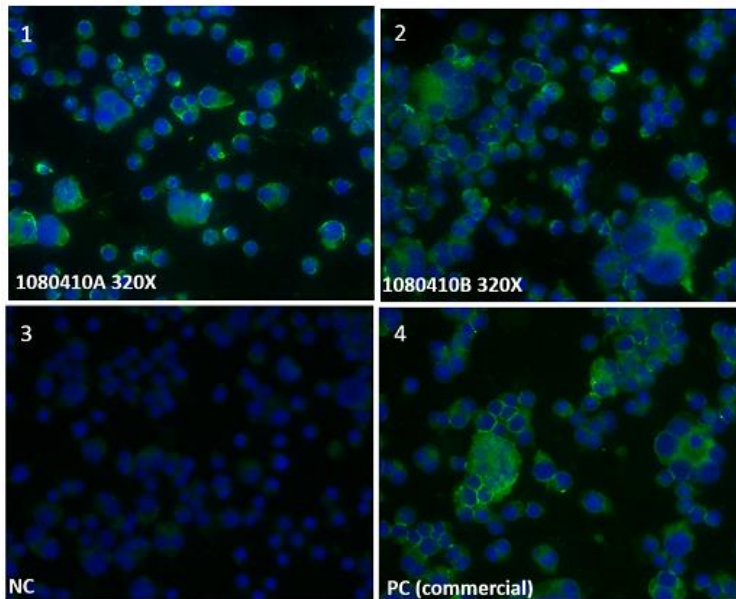
Lane 1: 1080330 (一採)
 Lane 2: 1070402 (二採)
 *1 Ab (2hr): serum 1:50
 *2 Ab (1hr): anti-human IgM 1:2000
 *Scan: 30sec

C. ELISA Result

No	血清號	血清檢體編號	居住縣市	性別	年齡	病日	Western blotting	ELISA (CDC)		ELISA (CDC)		IFA (CDC)	IFA (Fuller Kit)	
								<i>R. felis</i>		<i>R. felis</i>		<i>R. felis</i>	<i>R. felis</i>	
								ompA IgM	ompA IgG	ompB IgM	ompB IgG	IgM	IgM 64x	IgG 64x
2	1080330	1080220A	新北市	M	32	2	+	0.897	0.204	0.119	0.148	80	-	-
	1080402	1080220B	新北市	M	32	14	++	1.342	0.313	0.421	0.248	320	+	-

Fig.3 第二對血清 1080220A, 1080220B 結果。配對血清 ELISA IgM 分別為 0.897, 1.342，此時 IFA IgM 分別為 80 與 320, IgM 抗體有 4 倍上升，亦已達陽性的判定標準，另外以 Western blotting (omp A) 結果發現，配對血清皆可以偵測到 ompA 主要抗原，也再次證明用 ELISA 可以明確偵測出 *R. felis* 感染的病人血清抗體。

A. IFA Result



B. Western blotting



Lane 1: 1080582 (一採)
 Lane 2: 1070708 (二採)
 *1 Ab (2hr): serum 1:50
 *2 Ab (1hr): anti-human IgM 1:2000
 *Scan: 30sec

C. ELISA Result

No	血清號	血清檢體編號	居住縣市	性別	年齡	病日	Western blotting	ELISA (CDC)		ELISA (CDC)		IFA (CDC)	IFA (Fuller Kit)	
								<i>R. felis</i>		<i>R. felis</i>		<i>R. felis</i>	<i>R. felis</i>	
								ompA IgM	ompA IgG	ompB IgM	ompB IgG	IgM	IgM 64X	IgG 64x
3	1080582	1080410A	高雄市	M	39	13	+	2.471	1.129	1.135	0.568	320	+	-
	1080708	1080410B	高雄市	M	39	32	+	2.086	1.929	0.893	0.63	320	+	-

Fig.4 第三對血清 1080410A, 1080410B 結果。配對血清 ELISA IgM 分別為 2.471, 2.086，此時 IFA IgM 分別為 320 與 320，另外以 Western blotting (omp A)結果也發現，血清 IgM 可以明顯偵測到 ompA 主要抗原。顯示所建置 ELISA system 能和 Western blotting, IFA 相符合且能明確定量偵測出被感染者的血清抗體。

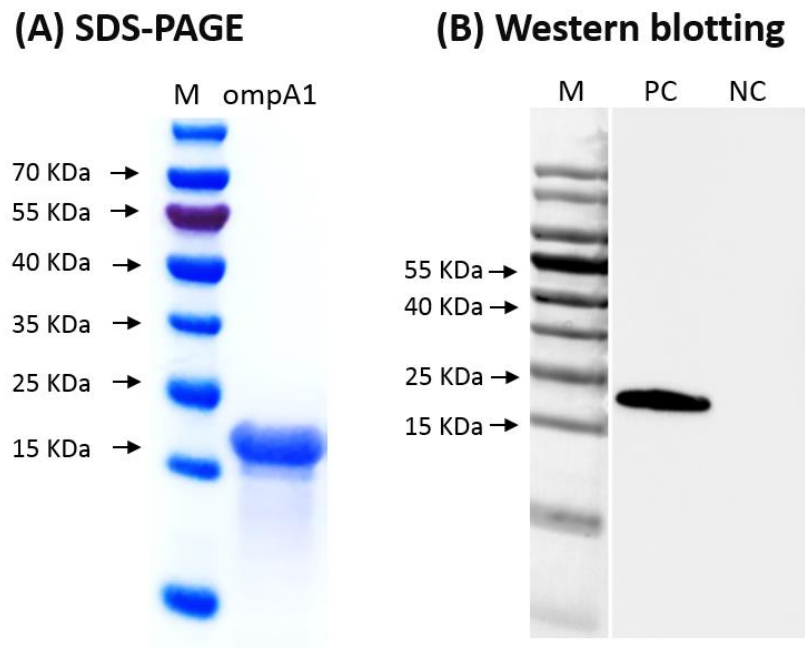


Fig. 5 OmpA 進行透析後以 SDS-PAGE 及分光光度計確認純度與濃度 (A)；
所純化 ompA 進行 Western blotting 確認被 anti-his tag monoclonal antibody
所辨識 (B)。

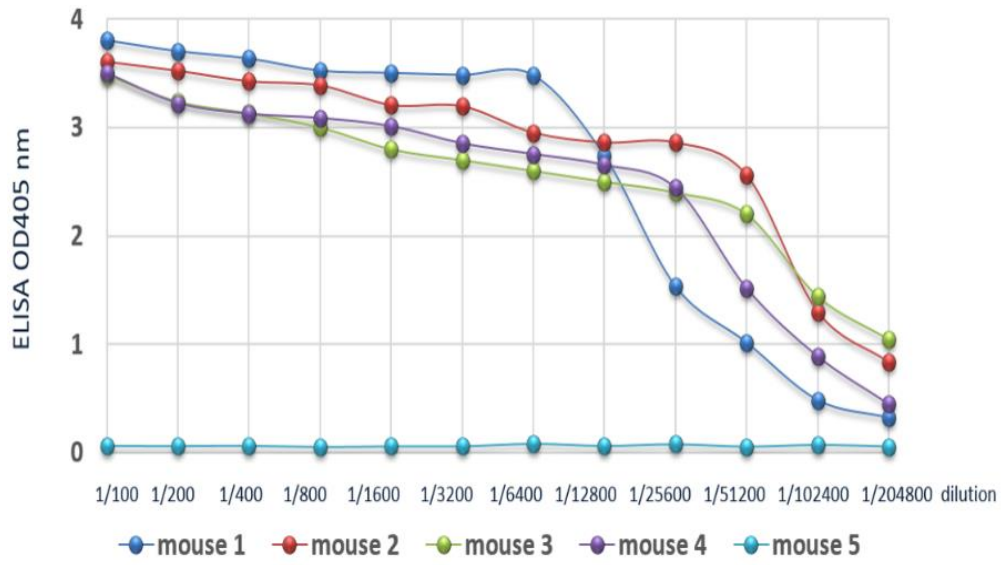


Fig.6. ELISA 進行測試 4 隻免疫 ompA 的小鼠血液經稀釋至 12800 倍，仍保有高 titer

(A)

ELISA of ompA hybridoma-1 (first fusion)

plate 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.173	2.313	3.141	1.833	3.126	2.484	3.308	1.904	2.345	2.603	1.757	0.054
B	2.391	2.066	1.829	2.515	2.972	3.545	0.865	1.623	2.436	3.44	1.948	0.047
C	2.414	2.587	1.932	3.38	3.457	1.951	2.206	3.246	2.135	1.724	1.467	0.052
D	2.422	1.999	2.363	1.624	1.455	2.239	2.191	1.668	1.662	2.223	1.7	0.06
E	1.017	2.152	1.624	1.776	2.187	1.918	1.812	1.7	1.531	1.485	1.424	0.05
F	1.844	1.594	1.413	2.815	2.269	2.187	1.796	2.629	1.474	1.253	2.076	0.057
G	2.812	2.255	2.135	2.229	2.581	1.576	2.049	1.382	2.168	1.759	1.908	3.557
H	2.966	2.658	2.767	1.878	2.47	2.076	3.074	2.334	2.481	1.655	2.23	3.573

ELISA of ompA hybridoma-1 (first fusion)

plate 4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.377	1.569	2.789	1.321	2.789	2.013	2.429	3.108	1.767	2.938	2.378	2.791
B	2.535	2.099	2.737	1.584	2.665	2.153	1.659	2.132	1.839	2.718	2.434	1.228
C	2.455	1.379	2.191	1.593	1.479	1.099	2.096	2.084	1.279	2.018	1.807	1.46
D	2.803	2.356	1.87	3.335	1.797	2.43	1.407	1.798	1.853	1.526	2.827	2.612
E	2.191	2.405	2.572	0.432	2.147	1.742	1.404	2.805	1.786	1.762	3.073	2.159
F	1.09	1.667	3.602	1.988	2.309	2.36	2.314	1.333	1.481	2.939	2.352	3.391
G	2.434	1.419	1.822	1.886	1.839	2.708	2.05	2.246	0.806	2.87	2.445	2.123
H	2.383	2.53	3.659	1.529	1.341	3.104	1.054	3.052	2.513	2.573	3.333	3.208

ELISA of ompA hybridoma-1 (first fusion)

plate 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.867	1.053	1.704	2.641	2.552	2.541	1.863	3.089	2.705	1.678	1.416	1.718
B	3.354	1.732	2.069	1.697	1.21	2.8	1.281	1.754	1.222	1.136	2.579	1.234
C	1.652	2.292	1.141	2.609	2.268	1.346	1.351	1.038	0.803	1.214	1.398	2.021
D	1.918	1.381	1.743	1.753	2.946	1.38	1.502	1.779	0.48	1.705	2.603	1.078
E	1.66	1.962	1.356	1.526	1.995	2.009	1.571	2.286	1.514	1.757	2.231	2.542
F	1.68	1.129	2.095	1.783	2.325	1.921	2.481	1.911	2.079	1.341	2.008	1.372
G	2.376	1.387	3.08	2.719	2.41	2.837	1.944	3.415	1.521	1.235	1.19	2.278
H	3.167	2.54	3.268	2.09	2.147	2.777	2.809	1.869	1.687	1.732	2.6	1.721

ELISA of ompA hybridoma-1 (first fusion)

plate 5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.868	2.605	3.354	3.015	2.802	1.572	0.061	2.635	2.661	2.111	1.862	3.372
B	2.476	2.164	2.964	3.323	2.46	2.919	2.323	1.859	2.53	1.525	1.738	2.632
C	2.41	2.246	2.324	1.901	1.813	1.552	3.486	3.197	2.427	1.648	2.592	2.646
D	2.982	2.665	1.997	1.913	2.131	2.318	2.729	1.86	1.813	2.231	2.787	1.663
E	2.758	2.648	3.186	3.324	2.213	3.012	1.923	1.405	2.519	3.811	2.144	3.187
F	3.002	2.026	3.092	2.612	2.954	2.463	3.168	1.93	1.418	2.689	2.079	3.229
G	2.492	2.338	3.127	3.288	2.3	2.492	2.312	3.003	2.111	2.449	1.828	2.505
H	3.423	2.988	3.226	2.613	2.749	1.836	2.393	3.498	2.971	2.432	2.812	2.249

ELISA of ompA hybridoma-1 (first fusion)

plate 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.355	1.644	1.455	0.584	3.423	1.812	2.343	1.876	0.677	3.454	2.892	1.818
B	3.461	1.714	1.767	3.3	3.331	1.979	2.56	2.65	1.776	1.926	1.054	1.153
C	1.725	2.572	2.581	2.667	3.523	1.523	2.286	1.37	0.611	2.048	1.937	1.048
D	2.663	1.315	1.918	3.359	1.399	2.651	2.302	2.649	1.737	1.646	2.069	0.813
E	2.227	2.817	2.903	3.061	1.418	2.363	1.235	0.854	0.492	2.41	2.102	3.229
F	2.633	2.699	1.943	2.262	1.516	1.206	3.028	1.868	1.425	2.129	1.883	1.03
G	3.103	2.457	2.015	2.218	3.337	2.93	2.526	2.042	3.544	2.573	1.804	2.134
H	1.674	2.811	2.704	3.063	3.514	2.809	1.115	1.504	2.91	1.813	1.604	2.502

ELISA of ompA hybridoma-1 (first fusion)

plate 6	1	2	3	4
A	3.138	3.312	2.669	2.978
B	2.966	2.705	3.215	2.618
C	3.013	3.181	1.476	0.05
D	2.726	3.162	1.477	0.051
E	2.186	2.889	1.831	0.051
F	2.094	2.374	1.465	0.068
G	2.184	2.19	1.282	3.355
H	2.605	2.812	3.39	3.346

(B)

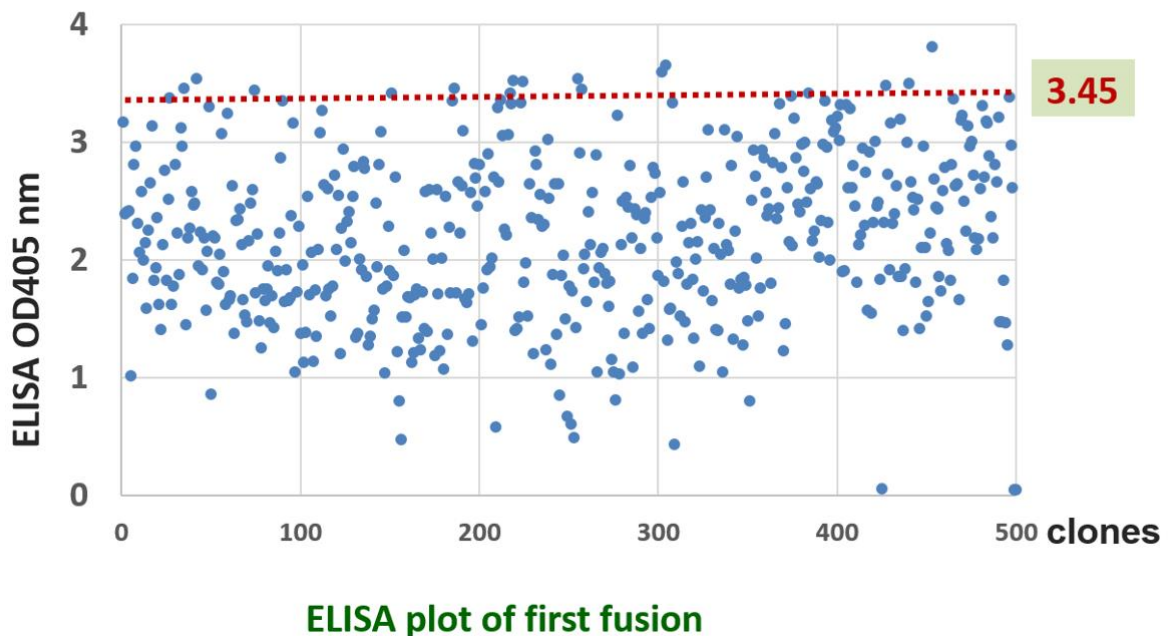


Fig.7. (A) ELISA 進行測試第一次 fusion 共 screening 400 多個 hybridoma clones 篩選到數株單株抗體具有高力價。(B) plot 圖分析的結果。

(A)

ELISA of ompA hybridoma-2 (second fusion)

plate 7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.397	3.259	0.144	0.17	0.218	0.23	0.182	3.5	0.226	0.443	0.161	0.06
B	0.202	0.249	0.117	0.249	0.21	0.315	0.18	0.199	0.175	0.159	0.207	0.057
C	0.881	0.245	0.512	0.134	0.233	0.176	0.225	0.155	0.149	0.169	0.187	0.057
D	0.199	0.189	0.284	0.187	3.023	0.154	0.106	0.171	0.141	0.194	0.124	0.055
E	0.145	0.169	0.419	0.199	0.624	0.236	0.318	0.12	0.19	0.852	0.193	0.053
F	0.195	0.221	0.334	0.316	0.133	0.314	0.158	0.142	0.237	0.222	0.383	0.052
G	0.747	0.342	0.308	0.134	0.259	0.15	0.137	0.168	0.226	0.153	0.286	3.301
H	0.282	0.398	0.809	0.428	0.192	0.145	0.177	0.129	0.115	0.228	0.364	3.367

plate 8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.204	0.571	0.172	0.26	0.178	0.168	0.16	0.203	0.176	0.15	0.195	0.168
B	0.17	0.277	0.162	0.446	0.182	0.243	0.116	0.216	0.24	0.167	0.509	0.288
C	0.168	0.683	0.184	0.49	0.165	0.163	0.09	0.136	0.179	0.153	0.197	0.607
D	0.141	0.202	0.175	0.132	0.185	0.209	0.17	0.411	0.475	0.48	0.169	0.203
E	0.176	0.189	0.136	0.098	0.197	0.136	0.123	0.43	0.137	0.169	0.24	1.111
F	0.176	0.174	0.237	0.195	0.155	0.128	0.488	0.122	0.413	0.173	0.222	0.234
G	0.252	0.218	0.277	0.15	0.168	0.191	0.302	0.642	0.223	3.269	0.424	0.169
H	0.4	0.267	0.15	0.311	0.362	0.142	0.25	0.133	1.223	0.229	0.588	0.201

plate 9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.665	0.326	0.224	0.177	0.236	0.226	0.354	0.41	0.213	0.207	0.304	0.441
B	0.558	0.351	0.204	0.355	0.462	3.622	0.246	0.226	0.21	0.211	0.163	0.828
C	0.205	3.142	0.206	0.25	0.369	0.253	0.129	0.501	0.269	0.211	0.251	0.197
D	0.365	0.288	0.568	0.263	0.425	0.195	0.118	0.301	0.171	0.252	0.225	0.396
E	0.17	3.086	0.185	0.392	0.193	0.152	0.249	0.214	0.224	0.214	0.158	0.224
F	0.371	0.205	0.177	0.306	0.205	0.18	0.21	0.37	3.663	0.183	0.178	0.25
G	0.339	0.189	0.146	0.343	0.211	0.339	0.342	0.173	0.187	0.187	0.222	0.365
H	0.218	0.179	0.189	0.39	0.314	0.217	0.194	0.462	0.261	0.206	0.377	0.187

ELISA of ompA hybridoma-2 (second fusion)

plate 10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.181	0.214	3.175	0.168	0.346	0.196	0.204	0.088	0.185	0.443	0.224	0.279
B	3.655	0.216	0.222	0.128	0.565	0.104	0.125	0.077	0.169	0.085	0.24	0.408
C	0.709	0.168	0.231	0.238	0.322	0.514	1.655	0.094	0.136	0.155	0.371	0.143
D	0.168	2.09	0.192	2.68	0.2	0.104	3.471	0.072	0.167	3.761	0.303	0.247
E	0.254	0.259	0.258	0.298	0.143	0.166	1.003	0.079	0.157	0.167	0.23	0.229
F	0.166	0.208	0.163	3.272	0.318	0.153	0.147	0.321	0.156	0.386	0.238	0.211
G	0.276	0.181	0.272	3.372	0.287	1.124	0.35	0.2	0.192	0.266	0.18	0.175
H	0.773	0.679	0.261	0.241	0.283	0.288	0.146	0.11	0.136	0.11	0.403	0.219

plate 11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.313	0.261	0.221	0.491	0.272	0.194	0.191	0.194	0.242	0.181	0.118	0.148
B	0.32	0.287	0.106	0.135	0.21	0.217	0.132	0.209	0.196	0.628	0.206	0.225
C	0.214	0.708	0.11	0.133	0.233	0.663	0.18	0.221	0.511	0.147	0.203	0.388
D	0.195	0.253	0.145	0.881	0.384	0.377	0.272	0.202	0.776	0.205	0.191	0.509
E	0.292	0.17	0.155	0.108	0.243	0.311	0.217	0.494	0.208	0.174	0.145	0.187
F	0.152	2.84	0.314	0.141	0.281	0.225	0.177	0.496	0.18	0.19	0.324	0.195
G	1.008	0.25	0.132	0.14	0.49	0.232	0.449	0.284	0.156	0.1	0.196	0.211
H	0.305	0.21	0.193	0.325	0.198	0.246	0.437	0.241	0.183	0.154	0.162	0.156

(B)

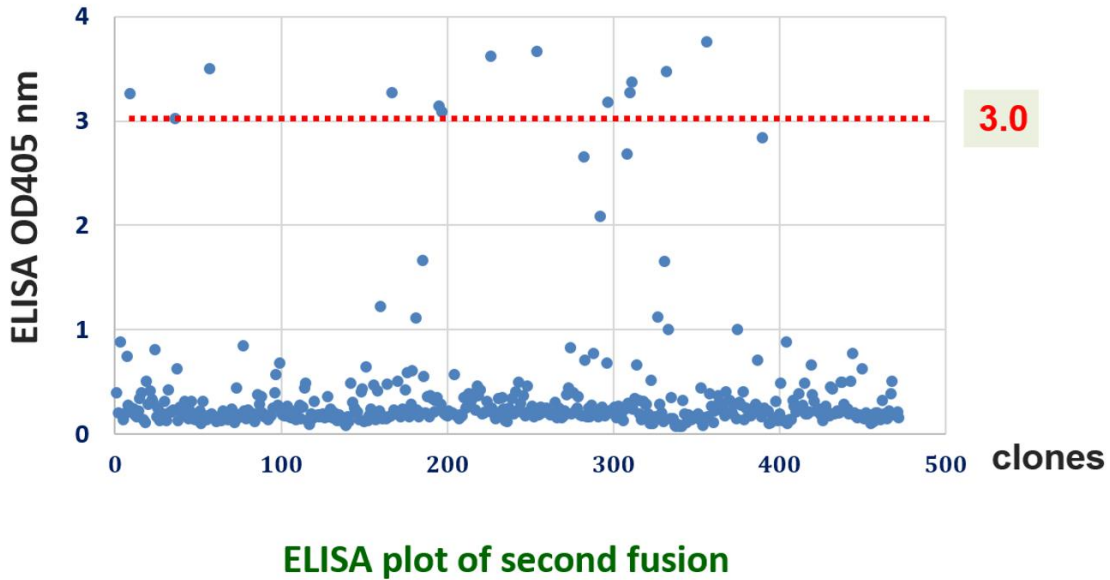


Fig.8. (A) ELISA 進行測試第二次 fusion 共 screening 400 多個 hybridoma clones 篩選到數株單株抗體具有高力價。(B) plot 圖分析的結果。

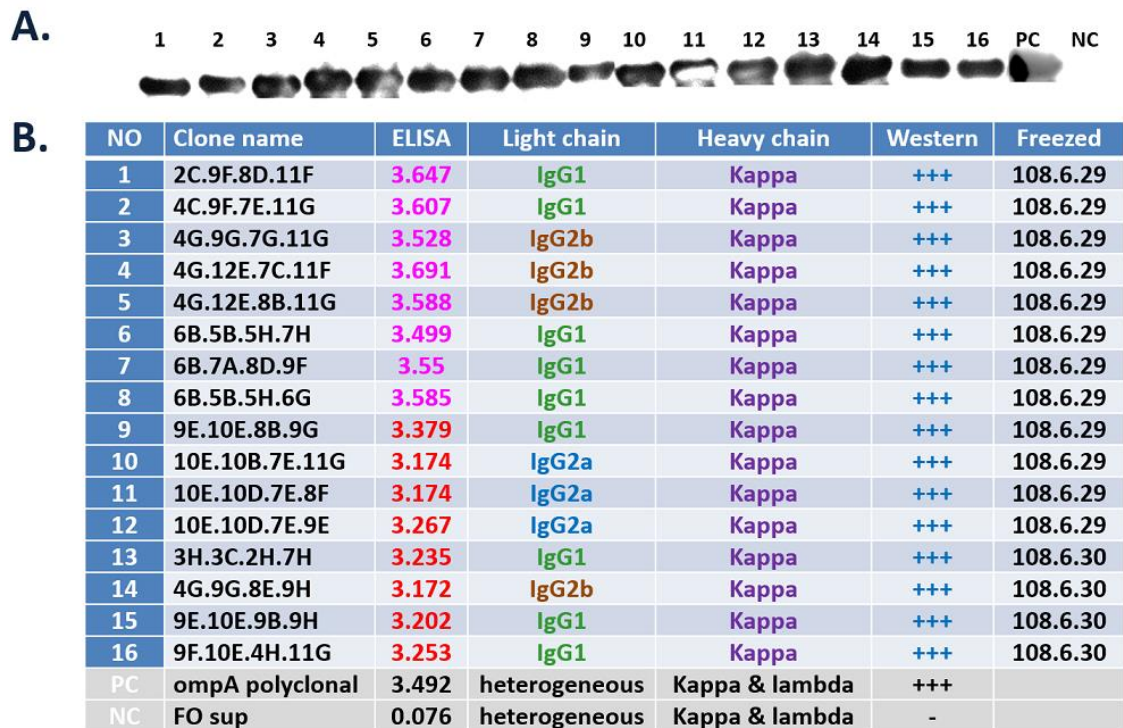


Fig. 9 .綜整 ompA monoclonal antibodies 的 ELISA, western blotting 結果

(A) Western blotting 確認特異性單株抗體可以偵測到特異性蛋白質 ompA ;

(B) 表列為目前完成冰存第三代 subclones 的 hybridoma 彙整 .

衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫

期末審查意見回復

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-122303

計畫名稱：開發新興人畜共通傳染病原體(*R.felis*, *Anaplasma spp.*)快速檢

驗方法

計畫主持人：舒佩芸

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	利用 <i>R. felis</i> 菌株主要抗原 ompA 做為開發安全生產、具臨床正確診斷實用價值之檢測試劑，結果證實可行，具開發潛力	謝謝委員的意見與肯定	無
2	為新開發之貓蚤斑點熱立克次氏體抗體檢測技術。	謝謝委員的意見與肯定	無
3	蟲媒傳染病引起的健康威脅因國際交通便捷，有日益增加的，開發可供臨床快速精確檢測之試劑，有利於即早正確診斷、正確醫療，守護國人健康。同時可開發為具商業價值之產品行銷國際。	謝謝委員的意見與肯定	無
4	ompA ₁ 的 diversity 的如何？	<i>Rickettsia felis</i> 的 ompA 蛋白質序列在不同 strain 間高度相似，序列相似度為 99.35-100%。而 <i>Rickettsia felis</i> 的 ompA 蛋白質	無

		<p>序列與相近的立克次體 spotted fever group，例如:<i>Rickettsia rickettsii</i>、<i>Rickettsia japonica</i>、<i>Rickettsia Massiliae</i> 等，序列相似度僅有 55.69-71.66%。此結果顯示，此研究以 <i>Rickettsia felis</i> 的 ompA 作為開發，具有專一性。</p>	
--	--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

備註:請將此表單附在期末報告後方，如有修正期末報告內容請註明頁碼，並務必至 GRB 系統完成資料抽換。