

計畫編號：MOHW110-CDC-C-315-124303

衛生福利部疾病管制署 110 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 (*Ehrlichia chaffeensis*, SFTSV) 快速檢驗方法

110 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：110 年 1 月 1 日至 110 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	15
四、討論	17
五、結論與建議	18
六、重要研究成果及具體建議	19
七、參考文獻	20
八、圖、表	24

共 30 頁

## 一、中文摘要

人類單核球艾利希氏體症 (human monocytic ehrlichiosis ; HME) 是由查非艾利希氏體 (*Ehrlichia chaffeensis*) 經由蜱蟲媒介感染引起的疾病。由研究發現台灣蜱蟲帶有 *E. chaffeensis*，2018 年台灣也首次發現 HME 病例。故有必要加強人病例的監測，但必需先有 HME 的快速診斷方法的開發研究，幫助防疫工作的進行。另發熱伴血小板減少綜合症(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) 是藉由感染新型布尼亞病毒(SFTSV)的蜱蟲叮咬而致病。SFTS 是一種新興傳染病，最早在 2009 年中國大陸的河北與河南省被報導，近年在韓國與日本也陸續發現 SFTS 及死亡病例。2019 年台灣首次發現本土病例，因此開發診斷試劑與監測 SFTS 的境外移入及調查本土是否存在病毒，對防疫有很大的幫助。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，為目前所亟需。本計劃主要目標在建立 *Ehrlichia chaffeensis* 及 SFTSV 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，同時製備具有高親和力的單株抗體，使診斷系統更具快速、靈敏度與專一性高，對傳染病的防治將有極大幫助。

關鍵詞：人類單核球艾利希氏體症、發熱伴血小板減少綜合症、point of care 篩檢

## 二、英文摘要：

Human monocytic ehrlichiosis (HME) is a tick-borne disease caused by *Ehrlichia chaffeensis*. Recent studies reported that *Ehrlichia chaffeensis* has been found in several tick species and small mammals in Taiwan. We reported the first human case of *Ehrlichia chaffeensis* infection in Taiwan in 2019. Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is an emerging infectious disease. SFTS caused by the bite of ticks infected with SFTS virus. SFTS was initially reported in Henan and Hebei in mainland China in 2009. Subsequently, SFTS cases were reported by South Korea and Japan. In 2019, we reported the first human case of SFTSV infection in Taiwan. To develop the diagnostic system, we will clone the *Ehrlichia chaffeensis* and SFTSV major antigens including TRP120, P28 and Nucleoprotein (full-length and truncated DNA fragment) for the production of recombinant proteins in an *E.coli* protein expression system. Subsequently, the high-affinity antigen will be determined by patients' serum and used to construct the diagnostic system (enzyme immunoassay and immuno-chromatography analysis). The second specific aim is to generate monoclonal antibodies targeting the rickettsial major antigens. The main objective of this project is establishment of a rapid diagnostic system, including immunochromatography test and ELISA; enable rapid detection of *Ehrlichia chaffeensis* and SFTSV infections and the diagnostic tests can be used in the early diagnosis and epidemiological studies of infectious diseases.

*Key words:* *Ehrlichia chaffeensis*, Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, rapid diagnostic test

## 貳、計劃內容

### 一、前言

#### 一、人類單核球艾利希氏體症 (**human monocytic ehrlichiosis;**

#### **HME**) :

艾利希氏體 (*Ehrlichia spp.*) 是一種絕對細胞內寄生的立克次體，對人畜皆具有病原性。在 1986 年發現查非艾利希氏體 (*Ehrlichia chaffeensis*) 引起 HME。HME 主要是由被感染蜱叮咬所引起的傳染病。*Ehrlichia spp.* 不僅會感染人也會感染家畜(狗、牛、羊等)。

*Ehrlichia* 主要感染顆粒球(嗜中性球)、單核球、紅血球及血小板等。大部份受感染的人無症狀或症狀輕微，主要症狀是發燒、頭痛、肌肉關節疼痛、腸胃道不適、肝脾腫大、淋巴結腫大、偶有出現皮膚斑疹。少數會發展成呼吸衰竭、腎衰竭、中樞神經症狀。

台灣在2018年首次發現HME病例。但*Ehrlichia chaffeensis*在台灣的感染情形目前尚無流行病學調查與相關研究。依據最新科學文獻報導TRP120為*Ehrlichia chaffeensis*表面抗原可以作為potential diagnostic marker, 同時也是細胞內intramembranous fibrillary matrix的一個重要component,對pathogen的attachment與entry扮演重要角色；另外P28亦為*Ehrlichia chaffeensis* outer membrane protein對免疫小鼠具有提供保護的免疫效能，且在韓國的研究顯示大多感染*Ehrlichia chaffeensis*的病人血

清可辨識到P28抗原，因此本計劃將選殖*Ehrlichia chaffeensis*之主要抗原TRP120, P28基因片段，在*E. coli*系統下表現TRP120, P28重組蛋白質，用以篩選出最佳的高親和性抗原，以建構酵素免疫分析法及免疫色層分析法。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*Ehrlichia chaffeensis*之防治工作是極為重要。

目前HME的實驗室診斷主要有三種方法：(1) 血清學方法為免疫螢光染色法(IFA)，但這種方法需要螢光顯微鏡，且須受過訓練的專員操作，需要較高的時間與人力。(2) 顯微鏡下觀察病人血液的peripheral blood-stained smears在monocyte內是否出現桑胚囊 (morulae)來判定,但通常只有在急性期檢體才能觀察，且不易偵測到。(3) PCR方法偵測血液、組織等檢體之細菌核酸分子(16S rRNA gene, operon GroESL, P28 gene, Trp120 gene)，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。雖然近年來，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，但因血液中的菌體數量很少，有偽陰性的疑慮。

目前在台灣對*Ehrlichia chaffeensis*感染所引起的HME研究與臨床診斷極為有限，HME現今所面臨最大的挑戰是如何在感染的早期快速

診斷出，使能及早治療，因此對*Ehrlichia chaffeensis*相關研究，應先建置一個簡單又有效的快篩檢測系統。

## 二、發熱伴血小板減少綜合症(severe fever with thrombocytopenia syndrome)：

發熱伴血小板減少綜合症(SFTS)是被 severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV)感染的蜱蟲所叮咬而引起一種傳染病。SFTSV 最早在 2009 年中國大陸河北與河南省被報導，2010 年中國大陸 CDC 對 6 個省份進行 SFTSV 監測，共發現了 12 株不同 SFTSV strains，後續中國大陸從南到北的 16 個省份也陸續監測到 SFTSV 的蹤跡。由於 SFTSV 的臨床症狀為發熱和腸道不適症，並伴有血小板和白血球減少，故於 2010 年將此疾病命名為 SFTS。

近年在韓國與日本也陸續發現 SFTS。在動物血清流行病學的調查，病例所在的牛、羊、狗、豬、雞皆可測到 SFTSV 抗體，顯示這些動物都可被 SFTSV 感染，因此一般認為蜱與這些動物都可能是 SFTSV 的宿主，另外人與人之間也可能藉由血液或體液接觸而感染。

SFTS 早期的臨床症狀包括發熱和腸道不適症，並伴有血小板和白血球減少，晚期會發展成漸進式的多重器官衰竭至死，死亡率達 12-30%，其中以中老年人居多。值得注意的是，在日本及南韓在近年皆

陸續發現 SFTS 病患及死亡病例，其中在日本個案的死亡率高達 55% 已明顯高於中國大陸。依據近年文獻報導 SFTSV 病原體能在感染蜱內及動物宿主進行基因變異重組，重新 reassortment 進行快速演化，且目前尚無有效藥物治療及疫苗可以預防 SFTS。台灣鄰近國家包括中、日、韓及越南陸續發現 SFTSV，台灣與這些國家往來十分密切，因此建置開發診斷系統對 SFTSV 的防治扮演極為重要的角色。

台灣在2019年使用real-time RT-PCR方法，首次發現人感染SFTSV病例。實驗室尚未開發完整的SFTS血清學診斷方法，且目前也無良好的市售檢驗試劑，故亟需開發可靠的SFTS抗體檢測方法。依據日本文獻報導Nucleoprotein (NP)可以作為diagnostic marker，該研究顯示感染SFTSV的病人血清對NP抗原有強的抗體反應。因此本計劃將選殖SFTSV之主要抗原NP，在*E. coli*系統下表現該重組蛋白質，用以篩選出最佳的高親和性抗原，以建構酵素免疫分析法及免疫色層分析法。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。

因此本計劃將選殖*Ehrlichia chaffeensis*與 SFTSV之主要抗原蛋白質，在細菌系統下表現TRP120, P28與Nucleoprotein重組蛋白質（全長基因及剪接片段），篩選出最佳的高親和性抗原。同時免疫小鼠製備單

株抗體作為診斷抗原的依據，此外將建置(1) 酵素免疫分析法，因具有高的靈敏度、特異性、再現性與可自動化的優點。(2) 免疫色層分析法檢驗方法，因具有即時性，不需特殊的儀器，操作簡便，能迅速得到檢測結果。並研發提高試驗的靈敏度及專一性。使能在病人急性期全血或血清中快速檢驗出病原抗體，有助於快速檢測出傳染病病源，可對及早給予病人正確的醫療照顧，並進行防疫措施，這對新興人畜共通傳染病原體之防治工作是極為重要。

本計劃第一年(2020年) 選殖*Ehrlichia chaffeensis*主要抗原蛋白質(P28)，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ELISA檢驗平台，可做篩檢，以利即早確認與治療。今年為第二年針對主要抗原P28製備單株抗體與初步建置ICT快篩，結果篩選P28單株抗體皆為高力價能於western blotting, ELISA, 偵測到抗原，且以IFA方法能檢測出感染的細胞，ICT快篩可初步用來篩檢疑似個案，能偵測到病人血清中抗體。明後年(2022-2023年)我們將朝向研發發熱伴血小板減少綜合症(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) 快速檢驗方法之建置，期許未來能加速新興傳染疾病快速診斷，及時提供醫療的診治，與疫情防治之政策參考依據。

## 二、材料與方法

- 1. 檢體及細菌株:** 血液檢體來源為通報自疾病管制署之新興人畜共通傳染病原體傳染病之疑似病例血液。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。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。不同期血清，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，建立免疫保護力及免疫病理機轉之相關性。經實驗室確診為陽性反應之檢體將加以分裝，儲存於-80°C冷凍櫃長久保存。
- 2. 血液標本及細胞培養製備新興人畜共通傳染病原體核酸:** 血液標本及細胞培養製備*Ehrlichia chaffeensis*, SFTSV核酸：首先將含抗凝血劑之全血檢體加入4 mL 10X PBS洗滌，接著緩慢加入5 mL Ficoll-paque ( Amersham Bioscience, Sweden, Cat. No. 17-1440-

02)，離心2500xg 25分鐘，取上清液加入6 mL 10X PBS洗滌，離心2000xg 10分鐘，丟棄上清液，以細胞培養液回溶後即完成檢體前處理步驟。取前一步驟完成前處理檢體200 µl，以QIAmp DNA blood Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 51106) 萃取立克次體細胞內核酸。分別加入20 µl Proteinase K與200 µl Lysis buffer (AL) 放入1.5 mL離心管，震盪混合，56 °C水浴槽靜置10分鐘。加入200 µl 96-100 %乙醇震盪均勻混合，以抽氣方式通過含砂土-膠膜的管柱 (Column)，檢體中核酸會結合於膜上。加入清洗液 (AW1) 750 µl，抽氣一分鐘，清洗膜上所吸附的雜質，重複本動作三次。再以清洗液 (AW2) 750 µl作第二次清洗，抽氣一分鐘，重複兩次。完成抽氣後在抽氣一分鐘，徹底去除膜上所殘留的酒精。最後將管柱放在新的1.5 mL離心管上，加入75 µl萃取液 (AE)靜置10分鐘，以8000xg離心轉速離心1分鐘，離心管中的液體即為欲萃取之核酸。

- 3. 引子(Primer)的設計與合成與聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)：** 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。以*Ehrlichia chaffeensis*, SFTSV核酸為

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 MgCl<sub>2</sub>、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增幅放大之產物片段，須以DNA電泳確認產物大小。以DNA sequencing確認基因正確，方能進一步表現及純化重組蛋白質。

- 4. p28重組蛋白質之製備與純化：**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。用PCR得到P28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，抽取該菌液蛋白質大量表現純化，製成更高靈敏度、高專一性的酵素免疫診斷抗原。
- 5. 蛋白質電泳(SDS-PAGE)及西方墨點法(Western blot)：**純化之樣品以8%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 blue 染色方式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 Semi-phor 半乾式轉移槽，將蛋白質樣品由膠體轉移至硝酸纖維膜上，加入 5% 脫脂奶粉溶液於纖維膜上，震盪 30 分鐘後以 0.1% Tween20/PBS 清洗之後加入經過適當稀釋的抗體於纖維膜上，在 37°C 保溫箱中作用 2 小時，以 0.1% Tween20/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。加入適當稀釋之 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 抗體，在 37°C 保溫箱中作用 1 小時，以 0.1% Tween20/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。將 TMB 置於纖維膜上，震盪 5-10 分鐘，待其呈色後以去離子水洗淨纖維膜上，並觀察染色情形。

**6. Indirect IgM/ IgG ELISA :**以 0.25 $\mu$ g/well 的重組蛋白質在 4°C 下隔夜吸附(coating)在 96 孔微量效價盤上。再用 100 $\mu$ l 之 1% 牛血清白蛋白緩衝液( 1% Bovine serum albumin in PBS )於 37°C 下進行 1 小時。以 PBS 清洗後，加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照組血清 100 $\mu$ l，37°C 下反應 1 小時。以 PBS 清洗後，加入 1:1000 稀釋之山羊抗人 IgM 或 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合體，於 37°C 反應 1 小時。以 PBS 清洗後，加入 100 $\mu$ l 酵素受質體 PNPP (p-nitrophenyl-phosphate)，在

37°C 作用 30 分鐘，再用微量效價盤判讀儀 (microplate reader) 以波長 405 nm 測吸光度。

7. **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(*Ehrlichia chaffeensis*, SFTSV)的感染，研發並提高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 *Ehrlichia chaffeensis* 以 P28 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 P28 蛋白質表現與純化 (**Fig 1A**)；所表現 P28 重組蛋白質可以用 40 mM imidazole 與 60 mM imidazole 所純化。所純化 P28 可以用特異性抗體 anti-his tag monoclonal antibody 亦可偵測辨識 P28 (**Fig 1B, line 1**)，*Ehrlichia chaffeensis* 感染的病人血清亦能辨識到 P28 片段蛋白質 (**Fig 1B, line 2**)，另以恙蟲病人血清 (**Fig 1B, line 3**)，地方性斑疹傷寒病人血清 (**Fig 1B, line 4**)，登革熱感染病人血清 (**Fig 1B, line 5**)，*Anaplasma phagocytophilum* 感染病人血清 (**Fig 1B, line 6**)，正常血清(**Fig 2B, line 7**)則無法辨識，顯示所表現出的 P28 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。
2. 純化出來的 P28 coating 在 ELISA strip 進行 ELISA 測試結果，以 commercial IFA 作平行比對，先以 12 個陰性血清實驗測試結果顯示具備特異性: Home-made sensitive 為 **Fig 2A**, specificity 為 **Fig 2B**，未來將繼續研發改善 ELISA 靈敏度及專一性。
3. 進行 *Ehrlichia chaffeensis* ELISA 快篩系統的分析方法確效，以 intra-precision 及 inter-precision 分別進行 6 次試驗，結果如 **Fig 3A**。統計分析 analytic parameter 得到結果如 **Fig 3B**，結果發現 CV 值皆小於 0.01，顯示 ELISA 平台很穩定。

4. 純化透析 P28 protein 對小鼠進行免疫，先將 P28 進行透析後以 SDS-PAGE 及分光光度計確認純度與濃度 (**Fig 4A**)，再將所純化 P28 進行 Western blotting 確認被 anti-his tag monoclonal antibody 所辨識 (**Fig 4B**)。
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 5**) 進行測試，結果 4 隻小鼠的血液經稀釋至 51200 倍，仍保有高 titer, 顯示免疫過程具有高效益 (mock control 為無免疫小鼠的血清)。
6. 以 ELISA 進行 screening 單株抗體，共 screening 600 多個 hybridoma clones 篩選到數株單株抗體具有高力價 (**Fig 6A**)。另以 plot 圖分析所篩選到的 clone 具有高效價的單株抗體 (**Fig 6B**)。
7. 經過 3 次 limit dilution subclone, 總共篩選到具有高親和力的單株抗體，總共完成 8 株 *Ehrlichia chaffeensis* 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 P28 (**Fig 7A**)，進一步分析 heavy chain 及 light chain 的特性，發現所製備單株抗體為 IgG2b 及 kappa chain (**Fig 7B**)，且可以用 IFA 偵測到病原體(*Ehrlichia chaffeensis*) (**Fig 8**)。
8. 進一步建置 ICT 方法快篩 *Ehrlichia chaffeensis* 感染的病人。結果發現所免疫色層快篩試劑可偵測到 *Ehrlichia chaffeensis* 感染的病人血清 IgM (**Fig 9**)。
9. 綜上目前已完成：

- (1) *Ehrlichia chaffeensis* 重要的表面抗原 P28 蛋白質表現純化與特異性分析，該特異性抗體 anti-his tag monoclonal antibody 可偵測辨識 P28.
- (2) *Ehrlichia chaffeensis* 感染的病人血清亦能辨識到 P28,正常血清則無法辨識，顯示 P28 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。
- (3) 完成製備 *Ehrlichia chaffeensis* 主要抗原 P28 多株抗體高力價達 51200X。
- (4) 完成製備 *Ehrlichia chaffeensis* 主要抗原 P28 單株抗體，用 ELISA 方法能被特異性 P28 抗原所確認及辨識；用 Western blotting 方法能被特異性 P28 抗原確認及辨識。
- (5) 完成建置 *Ehrlichia chaffeensis* IgM and IgG 酵素免疫分析法。
- (6) 建置 ICT 方法快篩 *Ehrlichia chaffeensis* 感染的病人。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 *Ehrlichia chaffeensis* 感染之傳染病防治工作是極為重要。

#### 四、討論

目前 *Ehrlichia chaffeensis* 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，不需在生物安全等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 *Ehrlichia chaffeensis* 主要抗原 P28 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 *Ehrlichia chaffeensis* 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 *Ehrlichia chaffeensis* 菌株主要抗原 P28 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 *Ehrlichia chaffeensis* home-made ELISA 與 gold 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 *Ehrlichia chaffeensis* 菌株主要抗原 P28 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 *Ehrlichia chaffeensis* 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 *Ehrlichia chaffeensis* P28 表現與純化，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、鼓勵醫師通報立克次體傳染病等防疫措施，可及早發現 *Ehrlichia chaffeensis* 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、参考文献：

1. Bakken JS, et al. 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? JAMA 272:212–218.
2. Bakken JS, et al. 1996. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. JAMA 275:199–205.
3. Brouqui P, Dumler JS, Lienhard R, Brossard M, Raoult D. 1995. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. Lancet 346:782–783.
4. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. 1994. Identification of granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J. Clin. Microbiol. 32:589–595.
5. Dumler JS, et al. 2005. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. Emerg. Infect. Dis. 11:1828–1834.
6. Dunning Hotopp JC, et al. 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. PLoS Genet. 2:e21. doi:10.1371/journal.pgen.0020021.
7. Bakken JS, Dumler JS. 2000. Human granulocytic ehrlichiosis. Clin. Infect. Dis. 31:554–560.
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. Ijeuru Chikeka, Armando J. Matute, J. Stephen Dumler, Christopher W. Woods, Orlando Mayorga, Megan E. Reller Use of Peptide-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay followed by Immunofluorescence Assay To Document *Ehrlichia chaffeensis* as a Cause of Febrile Illness in Nicaragua. Journal of Clinical Microbiology June 2016 Volume 54 Number 6. P1581-5
10. NORIO OHASHI, NING ZHI, YILAN ZHANG, AND YASUKO RIKIHISA. Immunodominant Major Outer Membrane Proteins of *Ehrlichia chaffeensis* Are Encoded by a Polymorphic Multigene Family INFECTION AND IMMUNITY, Jan. 1998, p. 132–139
11. Yan Ge and Yasuko Rikihisa Surface-Exposed Proteins of *Ehrlichia chaffeensis* INFECTION AND IMMUNITY, Aug. 2007, p. 3833–3841
12. Vsevolod L. Popov, Xue-jie Yu & David H. Walker The 120 kDa outer membrane protein of *Ehrlichia chaffeensis* : Preferential expression on dense-core cells and gene expression in *Escherichia coli* associated with attachment and entry *Microbial Pathogenesis* 2000; 28: 71–80
13. XUE-JIE YU,<sup>1</sup> PATRICIA CROCQUET-VALDES,<sup>1</sup> LOUIS C. CULLMAN,<sup>2</sup> AND DAVID H. WALKER<sup>1</sup> The Recombinant 120-Kilodalton Protein of *Ehrlichia chaffeensis*, a Potential Diagnostic Tool JOURNAL OF CLINICAL

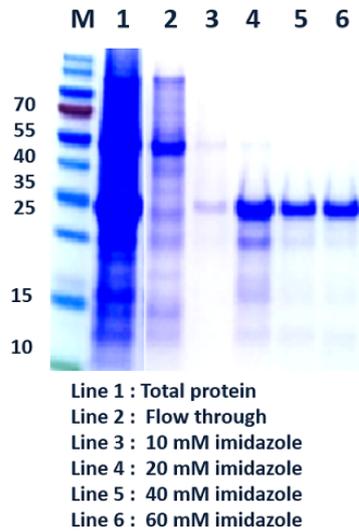
MICROBIOLOGY, Nov. 1996, p. 2853–2855

14. Hayasaka D, Fuxun Y, Yoshikawa A, Posadas-Herrera G, Shimada S, Tun MM, Agoh M, Morita K. Seroepidemiological evidence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infections in wild boars in Nagasaki, Japan. *Trop Med Health*. 2016 Apr 3;44:6. doi: 10.1186/s41182-016-0009-6. eCollection 2016.
15. Kurihara S, Satoh A, Yu F, Hayasaka D, Shimojima M, Tashiro M, Saijo T, Takazono T, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Yanagihara K, Mukae H, Saijo M, Morita K, Kohno S, Izumikawa K. The world first two cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome: An epidemiological study in Nagasaki, Japan. *J Infect Chemother*. 2016 Jul;22(7):461-5.
16. Fukuma A, Fukushi S, Yoshikawa T, Tani H, Taniguchi S, Kurosu T, Egawa K, Suda Y, Singh H, Nomachi T, Gokuden M, Ando K, Kida K, Kan M, Kato N, Yoshikawa A, Kitamoto H, Sato Y, Suzuki T, Hasegawa H, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antigen Detection Using Monoclonal Antibodies to the Nucleocapsid Protein. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Apr 5;10(4):e0004595
17. Liu JW, Zhao L, Luo LM, Liu MM, Sun Y, Su X, Yu XJ. Molecular Evolution and Spatial Transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Based on Complete Genome Sequences. *PLoS One*. 2016 Mar 21;11(3):e0151677.
18. Fu Y, Li S, Zhang Z, Man S, Li X, Zhang W, Zhang C, Cheng X. Phylogeographic analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from Zhoushan Islands, China: implication for transmission across the ocean. *Sci Rep*. 2016 Jan 25;6:19563. doi: 10.1038/srep19563.
19. Xing X, Guan X, Liu L, Zhan J, Jiang H, Liu L, Li G, Xiong J, Tan L, Xu J, Jiang Y, Yao X, Zhan F, Nie S. Natural Transmission Model for Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Bunyavirus in Villages of Hubei Province, China. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Jan;95(4):e2533.
20. Kim KH, Yi J, Kim G, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, South Korea, 2012. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:1892–4.
21. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, et al. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. *J Infect Dis*. 2014;209:816–27.
22. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med*. 2011;364:1523–32.
23. Li Z, Hu J, Bao C, et al. Seroprevalence of antibodies against SFTS virus infection in farmers and animals, Jiangsu, China. *J Clin Virol*. 2014;60:185–9.
24. Liu Q, He B, Huang SY, Wei F, Zhu XQ. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, an emerging tick-borne zoonosis. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:763–72.

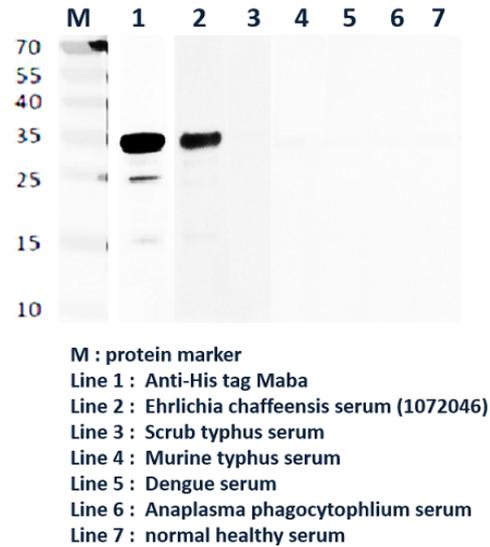
25. Liu S, Chai C, Wang C, et al. Systematic review of severe fever with thrombocytopenia syndrome: virology, epidemiology, and clinical characteristics. *Rev Med Virol.* 2014;24:90–102.
26. Hayasaka D, Shimada S, Aoki K, et al. Epidemiological survey of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Nagasaki, Japan. *Trop Med Health.* 2015;43:159–64.
27. Yu F, Du Y, Huang X, et al. Application of recombinant severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleocapsid protein for the detection of SFTSV-specific human IgG and IgM antibodies by indirect ELISA. *Virology.* 2015;12:117.
28. Xianguo Wang,<sup>1</sup> Quanfu Zhang,<sup>2</sup> Fen Hao,<sup>1</sup> Xunian Gao,<sup>3</sup> Wei Wu,<sup>2</sup> Minyao Liang,<sup>3</sup> Zhihua Liao,<sup>3</sup> Shuhong Luo,<sup>1</sup> Weiwen Xu,<sup>1</sup> Dexin Li,<sup>2</sup> and Shiwen Wang<sup>2</sup> Development of a Colloidal Gold Kit for the Diagnosis of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection *BioMed Research International* Volume 2014, Article ID 530621, 6 pages
29. Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi<sup>1\*</sup>, Tomoki Yoshikawa<sup>1</sup>, Hideki Tani<sup>1</sup>, Satoshi Taniguchi<sup>1</sup>, Takeshi Kurosui<sup>1</sup>, Kazutaka Egawa<sup>1</sup> Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antigen Detection Using Monoclonal Antibodies to the Nucleocapsid Protein *PLOS Neglected Tropical Diseases* *PLoS Negl Trop Dis* 10(4): e0004595. doi:10.1371/journal.pntd.0004595

## 八、圖、表

### A. SDS-PAGE of expression



### B. Western blotting of specificity



**Figure 1** *Ehrlichia chaffeensis* 重要抗原 P28 蛋白質表現、純化與特異性分析(A) 以 SDS-PAGE 呈現的所表現純化 P28;(B) P28 用 Anti-his tag monoclonal Ab 可辨識純化 P28 (line1), *Ehrlichia chaffeensis* 感染病人血清(line 2)偵測辨識, 而恙蟲病人血清(line 3), 地方性斑疹傷寒病人血清(line 4), 登革熱感染病人血清 (line 5), *Anaplasma phagocytophilum* 感染病人血清 (line 6), 正常血清(line 7)則無法辨識, 顯示所表現出的 P28 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	Serum no	ELISA		IFA		Western	
			Ehrlichia (p28)		Egrlichia chaffeensis		Ehrlichia chaffeensis	
			PNPP 30min		Focus slide		P28	
			IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
1	5	1090087	1.004	0.157	128	-	-	-
	16	1090207	2.195	0.184	128	-	-	-
2	5	1090212	0.198	1.039	32	64	-	+
	19	1090283	0.291	1.368	32	64	-	+
3	4	1090221	2.133	0.105	128	-	-	-
	19	2090287	2.912	0.177	128	-	-	-

## B. Specificity

No	serum no	ELISA (P28)		IFA (Focus)	
		IgM	IgG	IgM	IgG
1	1090213	0.115	0.118	-	-
2	1090214	0.192	0.214	-	-
3	1090215	0.116	0.155	-	-
4	1090216	0.14	0.145	-	-
5	1090219	0.088	0.14	-	-
6	1090220	0.082	0.151	-	-
7	1090223	0.085	0.14	-	-
8	DN 63930	0.159	0.185	-	-
9	CK 56676	0.11	0.23	-	-
10	AP 1083317	0.149	0.377	-	-
11	TF 1090822	0.207	0.176	-	-
12	OT 1090782	0.14	0.134	-	-

mean	0.13	0.18
SD	0.04	0.07
mean+3SD	0.25	0.39

**Figure 2.** 純化出來的 P28 coating 在 ELISA strip 進行 ELISA 測試結果，以 gold standard method IFA 作平行比對，(A)為陽性檢體，(B)為陰性檢體。結果顯示 IgM, IgG ELISA 的 sensitive, specificity 成效良好。

**A.**

Ehrlichia chaffeensis P28 ELISA	serum no	P28 ELISA IgM(1/2000)								
		1x	2x	3x	4x	5x	6x	mean	SD	CV
Ec 1	1071296	1.596	1.553	1.504	1.404	1.521	1.574	1.525	0.068	0.0017
Ec 12	1092511	3.604	3.253	3.725	3.459	3.747	3.532	3.553	0.184	0.0047
Ec 15	1092935	3.573	3.360	3.736	3.459	3.749	3.323	3.533	0.184	0.0047
Ec 17	1093041	3.093	3.160	3.018	3.332	3.042	2.840	3.081	0.163	0.0042
Ec 20	1093112	3.526	3.309	3.704	3.546	3.784	3.539	3.568	0.165	0.0042
1080266 (Ot +)	1080266	0.227	0.167	0.218	0.199	0.227	0.089	0.188	0.053	0.0014
1080277 (Ot +)	108027	0.234	0.202	0.207	0.215	0.222	0.086	0.194	0.054	0.0014
Normal serum	NC	0.061	0.059	0.058	0.056	0.061	0.053	0.058	0.003	0.0001

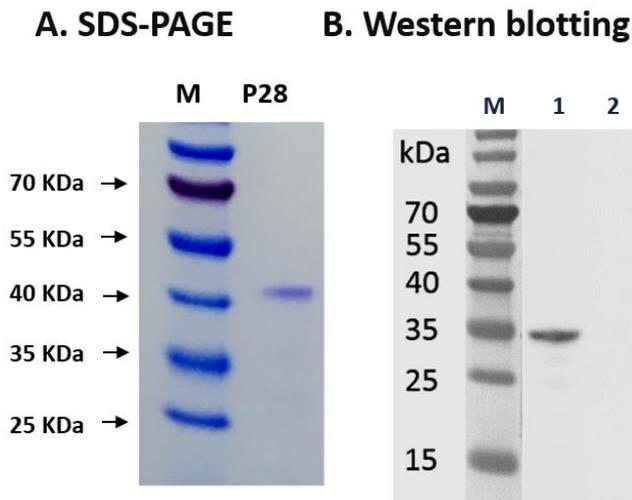
Ehrlichia chaffeensis P28 ELISA	serum no	P28 ELISA IgG(1/5000)								
		1x	2x	3x	4x	5x	6x	mean	SD	CV
Ec 1	1071296	0.156	0.163	0.159	0.17	0.284	0.275	0.201	0.061	0.0016
Ec 12	1092511	0.354	0.363	0.278	0.33	0.313	0.327	0.328	0.030	0.0008
Ec 15	1092935	0.131	0.125	0.128	0.155	0.233	0.201	0.162	0.045	0.0012
Ec 17	1093041	0.208	0.261	0.179	0.282	0.107	0.12	0.193	0.072	0.0018
Ec 20	1093112	0.259	0.276	0.439	0.306	0.241	0.246	0.295	0.075	0.0019
1080266 (Ot +)	1080266	0.107	0.114	0.38	0.162	0.058	0.058	0.147	0.121	0.0031
1080277 (Ot +)	108027	0.102	0.105	0.124	0.1	0.06	0.065	0.093	0.025	0.0006
Normal serum	NC	0.089	0.095	0.088	0.092	0.055	0.059	0.080	0.018	0.0005

**B.**

Ehrlichia chaffeensis P28 ELISA	serum no	P28 ELISA IgM(1/2000)								
		1x	2x	3x	4x	5x	6x	mean	SD	CV
Ec 1	1071296	1.034	1.118	1.124	1.147	1.115	1.118	1.109	0.039	0.0010
Ec 12	1092511	3.483	3.405	3.438	3.199	3.462	3.370	3.393	0.103	0.0026
Ec 15	1092935	3.485	3.319	3.430	3.238	3.458	3.304	3.372	0.099	0.0025
Ec 17	1093041	3.069	2.953	3.009	2.894	2.875	2.965	2.961	0.072	0.0018
Ec 20	1093112	3.324	3.214	3.397	3.218	3.433	3.348	3.322	0.091	0.0023
1080266 (Ot +)	1080266	0.187	0.202	0.202	0.192	0.192	0.200	0.196	0.006	0.0002
1080277 (Ot +)	108027	0.193	0.212	0.189	0.205	0.175	0.162	0.189	0.019	0.0005
Normal serum	NC	0.107	0.103	0.094	0.088	0.083	0.098	0.096	0.009	0.0002

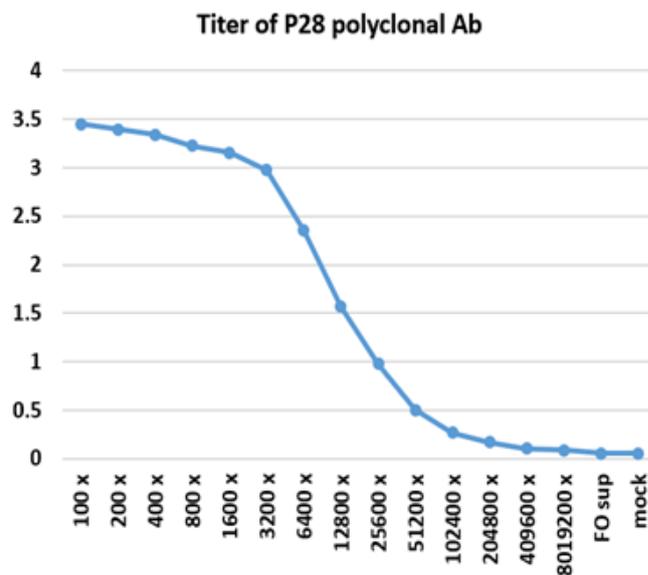
Ehrlichia chaffeensis P28 ELISA	serum no	P28 ELISA IgG(1/5000)								
		1x	2x	3x	4x	5x	6x	mean	SD	CV
Ec 1	1071296	0.217	0.23	0.231	0.221	0.204	0.254	0.226	0.017	0.0004
Ec 12	1092511	0.349	0.35	0.338	0.344	0.355	0.399	0.356	0.022	0.0006
Ec 15	1092935	0.119	0.118	0.114	0.119	0.12	0.131	0.120	0.006	0.0001
Ec 17	1093041	0.153	0.178	0.159	0.182	0.166	0.204	0.174	0.018	0.0005
Ec 20	1093112	0.266	0.395	0.333	0.346	0.296	0.333	0.328	0.044	0.0011
1080266 (Ot +)	1080266	0.133	0.135	0.131	0.132	0.139	0.158	0.138	0.010	0.0003
1080277 (Ot +)	108027	0.111	0.104	0.119	0.107	0.114	0.125	0.113	0.008	0.0002
Normal serum	NC	0.111	0.123	0.113	0.116	0.112	0.132	0.118	0.008	0.0002

**Figure 3** 分析方法確效 P28 ELISA. (A) Inter-and (B) Intra Precision of Ehrlichia chaffeensis P28 ELISA.



**Figure 4** P28 透析後以 SDS-PAGE 及分光光度計確認純度與濃度 (A); 所純化 P28 進行 Western blotting 確認被 anti-his tag monoclonal antibody 所辨識 (B) Line1 : anti His tag antibody; Lane 2: normal health serum。

Dilute fold	OD405
100 x	3.452
200 x	3.3935
400 x	3.3405
800 x	3.2255
1600 x	3.1565
3200 x	2.974
6400 x	2.3525
12800 x	1.5665
25600 x	0.978
51200 x	0.499
102400 x	0.2645
204800 x	0.17
409600 x	0.104
8019200 x	0.0885
FO sup	0.056
mock	0.0515



**Figure 5** 以 ELISA 進行測試 4 隻免疫 P28 的小鼠血液經稀釋至 51200 倍，仍保有高 titer

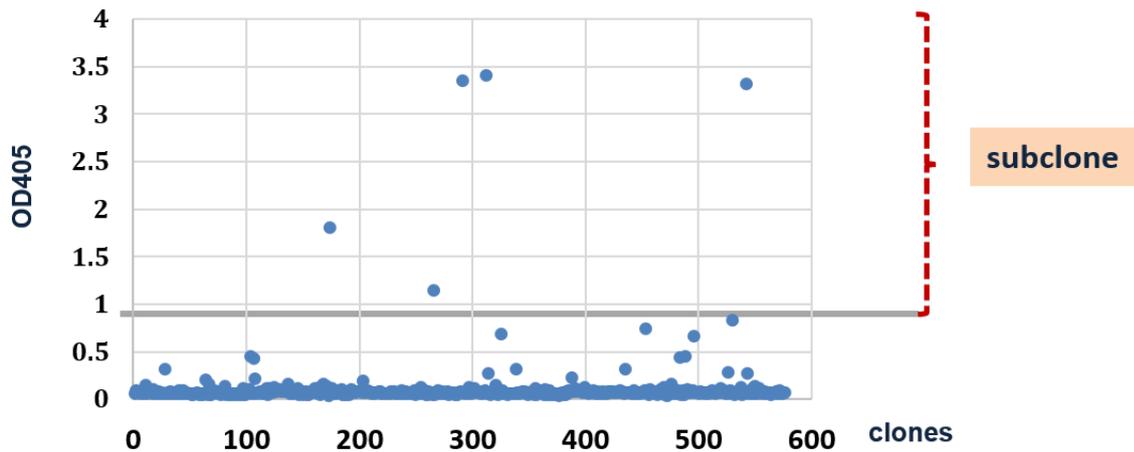


Figure 6 ELISA 進行測試第一次 fusion 共 screening 600 多個 hybridoma clones 篩選到數株單株抗體具有高力價之 plot 圖分析結果。

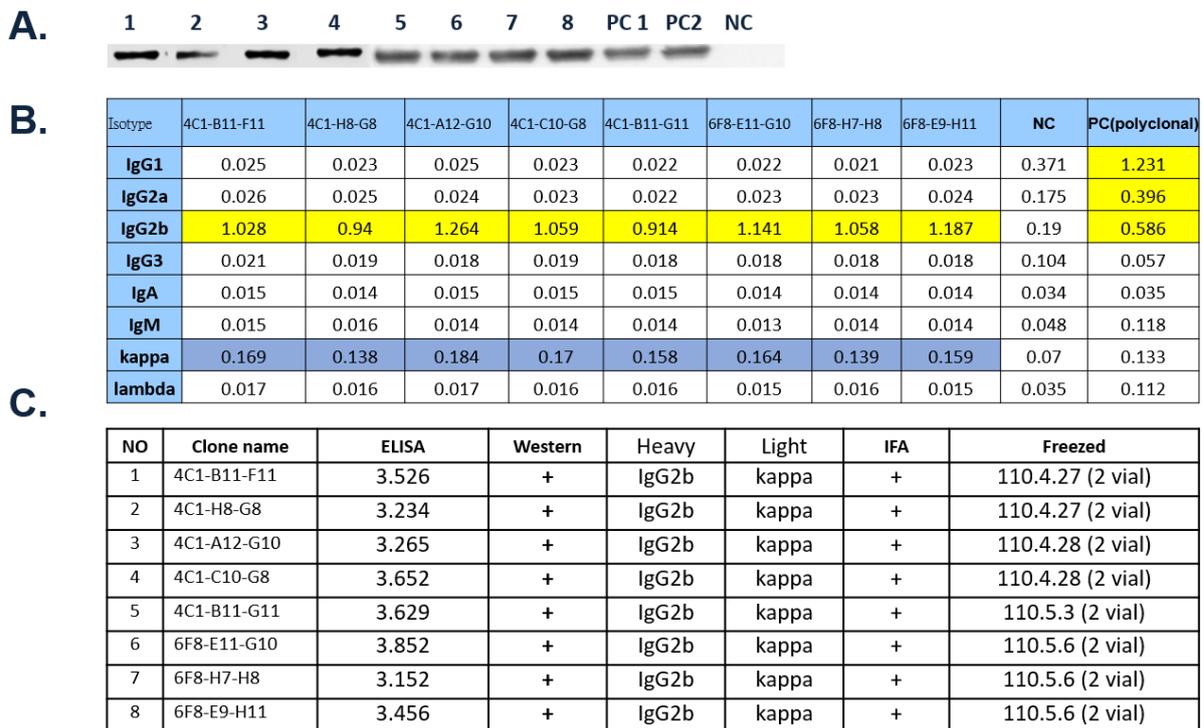
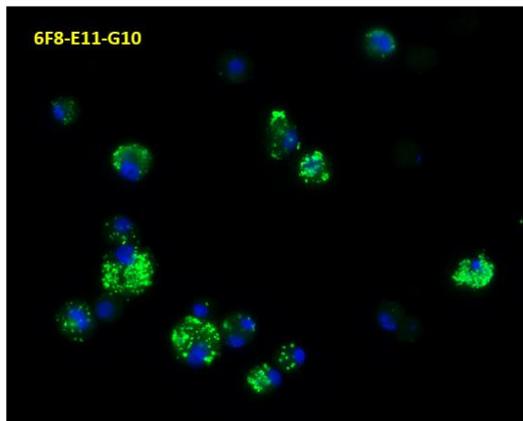
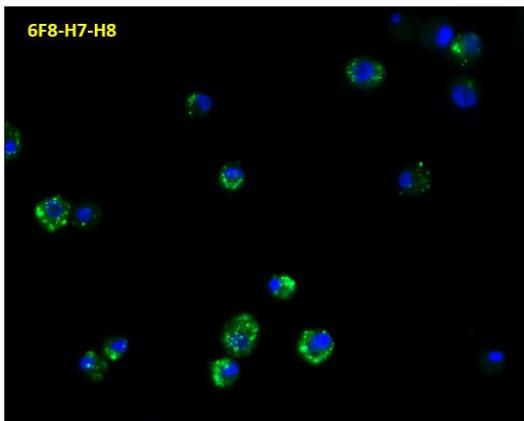
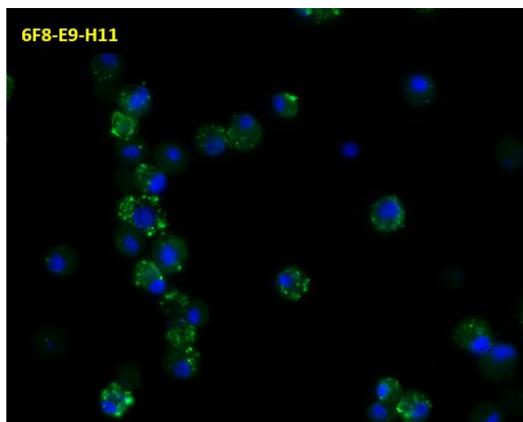
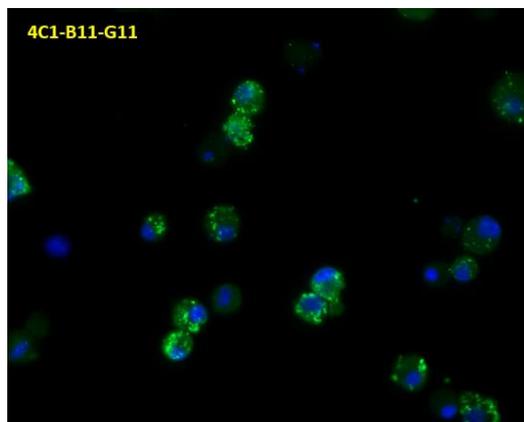
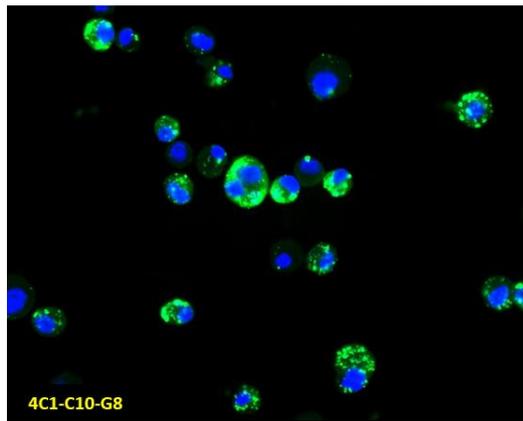
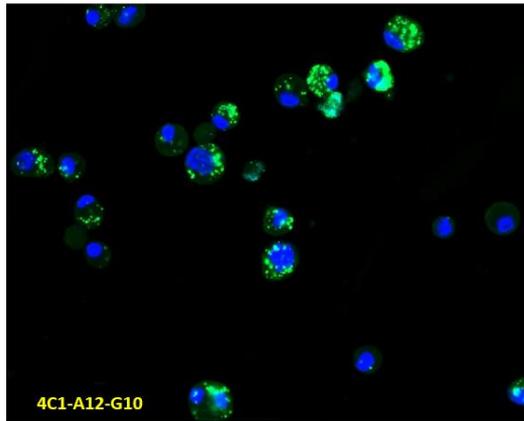
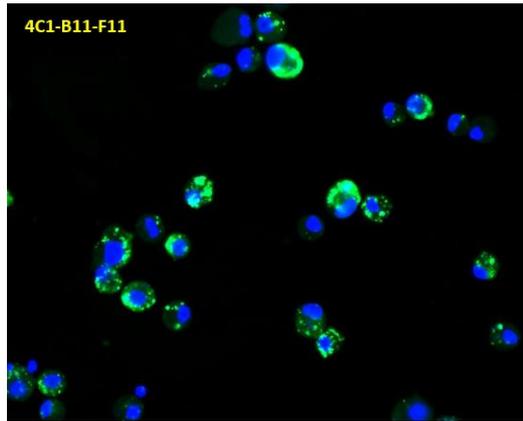
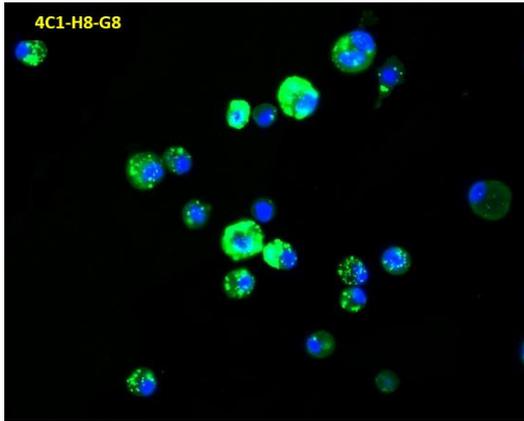
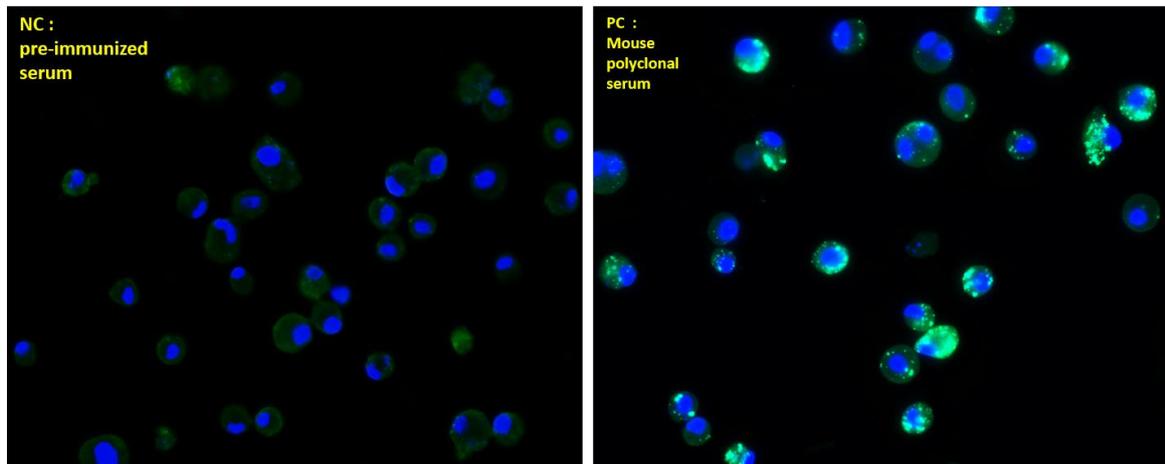


Figure 7 綜整單株抗體 (A) 以 Western blotting 確認辨識能偵測到特異性蛋白質 P28 (B) 分析 heavy chain 及 light chain 的特性，分別為 IgG2b 及 kappa chain (C) 單株抗體可以用 IFA 偵測到病原體(*Ehrlichia chaffeensis*)。





**Figure 8** 製備單株抗體可用 IFA 偵測到被 *Ehrlichia chaffeensis* 感染的細胞，綠色標示為 FITC-label *Ehrlichia chaffeensis*-P28。藍色標示為 DAPI-label 細胞核。



**Figure 9** 建置 ICT 方法快篩 *Ehrlichia chaffeensis* 感染的病人。免疫色層快篩試劑可偵測到 *Ehrlichia chaffeensis* 感染的病人血清 IgM。

## 110 年度科技研究計畫期末執行進度審查意見回復表

計畫名稱：開發新興人畜共通傳染病原體(*Ehrlichia chaffeensis*, SFTSV)快速檢驗方法

計畫主持人：舒佩芸研究員

填報日期：110.12.5

\*修正處請在報告中以紅字標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處頁碼
1	Preparing reagents for IF or ICT diagnosis of <i>Ehrlichia chaffeensis</i> or SFTS.	謝謝委員建議與肯定。	無
2	<i>Ehrlichia chaffeensis</i> and SFTA diagnosis capacity is needed for Taiwan CDC. They generated many mAbs against <i>Ehrlichia chaffeensis</i> p28 antigens.	謝謝委員建議與肯定。	無
3	These mAbs allowed them to conduct IF and ICT now. Preliminary results appeared to be working.	謝謝委員的肯定。	無
4	It needs to confirm the sensitivity and specificity of current <i>Ehrlichia chaffeensis</i> assays.	謝謝委員建議，有關 <i>Ehrlichia chaffeensis</i> 檢驗皆依據分生及血清學的檢驗結果判讀，以確認所建置系統的敏感度與專一性效能。	無
5	Again, it is imperative to demonstrate the assays helpful in controlling	謝謝委員的肯定。	無

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處頁碼
	infections, or in reducing diseases morbidities or mortalitieis.		
6	May need to mention any progress in the assay for SFTS.	謝謝委員建議。本計畫為分年規劃進行不同人畜共通傳染病原體的快速檢驗方法的開發，110 年係執行 <i>Ehrlichia chaffeensis</i> 快速檢驗方法的開發。111 年開始規劃執行 SFTSV 快速檢驗試劑的執行與開發。	無
7	<i>Ehrlichia</i> 單株抗體製作有應用價值。	謝謝委員的肯定。	無
8	ELISA 初步建置成功，但請釐清 p28 的結構 (conformation)，否則 ELISA 表現堪慮，請用可溶性 p28 發展 ELISA。	P28 為 <i>Ehrlichia</i> 最重要的 outer membrane protein 也是主要抗原的蛋白質，ELISA 系統是以 dialysis 的 P28 作為 coating antigen, 先期建置仍以傳統血清學 IFA 作為 gold standard 平行比對確認。另以此抗原所製備出的單株抗體除具備高力價且能偵測到感染的細胞具特异性。	無
9	請補充說明此快篩方法之應用價值。	送驗立克次體的疑似檢體實驗室先以恙蟲病、地方型斑疹傷寒、斑點熱立克次體檢驗方法確認，然而有些檢驗結果為陰性，為進一步確認病人是何種傳染病感染，因此建置新興人畜傳染病快篩，以 ICT 方式快篩感染	無

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處頁碼
		種類，能提供精準醫療與疫情防治參考。	
10	相關研究成果具有創新性，有發展快速檢驗之潛力，可考慮技術移轉廠商製造檢驗試劑。	謝謝委員的肯定。	無
11	對新興人畜共通蟲媒傳染病之監測具有助益。	謝謝委員的肯定。	無

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 110 年 12 月 23

日前至 GRB 系統完