

封面樣式

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-112302

衛生福利部疾病管制署 107 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

107 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、駱俊宇、陳湘妃

執行期間：107 年 1 月 1 日至 107 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	18
五、結論與建議	19
六、重要研究成果及具體建議	20
七、參考文獻	21
八、圖、表	23

共 33 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。目前已成功表現 MSP2 重組蛋白質並組合成 IgM 及 IgG ELISA 檢測試劑。

關鍵詞：無形體病、嗜吞噬球無形體、斑點熱群立克次體、point of care 篩檢

## 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.

*Key words:* *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia felis*, rapid diagnostic test

## 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。目前已成功表現MSP2重組蛋白質並組合成ELISA檢測試劑。

## 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 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 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-鹼性磷酸酶結合体，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*, *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 *A. phagocytophilum* 感染的診斷是以 MSP2 抗原作為 diagnosis marker (因具有高度抗原性) , 本研究已完成 MSP2 蛋白質表現與純化 (**Fig 1A**); 所純化 MSP2 可以用特異性抗體 anti-his tag monoclonal antibody 偵測辨識, 另以 *Anaplasma phagocytophilum* 感染的病人血清亦能辨識到 MSP2 片段蛋白質, 而正常血清、恙蟲病人血清、地方性斑疹傷寒病人血清則無法辨識, 顯示所表現出的 MSP2 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. 1B**)。
2. 將所純化出來的 MSP2 coating 在 ELISA strip 進行 ELISA 測試結果, 以 IFA 作為 golden standard 作平行比對, 用 3 個陽性血清及 10 個陰性血清實驗測試結果: Home-made IgM ELISA 的 sensitive 為 100 %, specificity 為 100 %。Home-made IgG 的 ELISA sensitive 為 100%, specificity 為 100% (**Table 1**)。
3. 在 Table 1 的 1070109 和 1070225 為同一個病人的配對血清, 發病日分別為第 15、26 天, 我們曾在今年 7 月將此配對血清送至美國 USUHS, Dr. Dulmer 實驗室 (Dr. Dulmer 是目前國際上研究 *Anaplasma phagocytophilum* 的專家學者) 做螢光染色分析比對, 結果 IgG 抗體有 4 倍上升, 顯示我國已有 *Anaplasma phagocytophilum* 感染的案例(**Fig. 2**)。

4. 另外以所建置的 MSP2 ELISA 進行 retrospective study，以 gold standard IFA 作平行比對 (IFA IgM cut-off 值 $\geq 20$  或 IFA IgG cut-off 值 $\geq 64$ ，判為陽性)。結果測得 107 年有 4 對 paired-sera 的 MSP2 ELISA 有陽性 (Table 2)，第一對血清 1070984A, 1070984B IFA IgG 分別為 64, 512, 有 4 倍上升；第二對血清 1070843A, 1070843B IFA IgG 分別為 64, 256, 也有 4 倍上升；第三對血清的二採 1071610B IFA IgM 為 40, IgG 為 64, 已達陽性的判定標準；第四對血清的二採 1071440B IFA IgM 分別 80, 亦已達陽性的判定標準。這樣的結果顯示 ELISA 的 IgM, 與 IgG 的 sensitivity 與 IFA 結果有一致性，另以 Western blotting (MSP2) 做評估比對，也發現 ELISA 與 Western blotting 結果亦相符合。
5. 我們進一步分析第一對血清 1070984A, 1070984B 結果 (Fig. 3)。當配對血清 ELISA IgG 為 0.484 與 3.344，IFA IgG 分別為 64 與 512，IgG 有 4 倍上升已達陽性的判定標準，另外以 Western blotting (MSP2) 結果發現，二採血清可以明顯偵測到 MSP2 主要抗原，再次證明用 ELISA system 可以診斷出 *A. phagocytophilum* 感染的病人。
6. 另外第二對血清 1070843A, 1070843B 結果 (Fig. 4)。配對血清 ELISA IgG 分別為 2.12 與 3.166，此時 IFA IgG 分別為 64 與 256，IgG 抗體有 4 倍上升，亦達陽性的判定標準。另外以 Western blotting (MSP2) 結果發現，

配對血清皆可以偵測到 MSP2 主要抗原，也再次證明用 ELISA system 可以診斷出 *A. phagocytophilum* 感染的病人。

7. 第三對血清 1071610A, 1071610B 結果 (Fig. 5)。配對血清 ELISA IgM 分別為 2.312 與 3.401，此時 IFA IgM 分別為 <20 與 40，且二採 IFA IgG 為 64 已達陽性的判定標準，另外以 Western blotting (MSP2) 結果發現，二採血清 IgM 可以明顯偵測到 MSP2 主要抗原。
8. 第四對血清的配對血清 1071440A, 1071440B IgM ELISA 分別為 1.511 與 2.49, IFA IgM 分別為 <20 與 80，亦已達陽性的判定標準。另外以 Western blotting (MSP2) 結果做評估，結果發現 ELISA 與 Western blotting 亦相符合具有一致性，顯示所建置 ELISA system 能和 Western blotting, IFA 結果相吻合且能明確定量偵測出被感染者的血清抗體。
9. 將純化透析 MSP2 protein 對 5 隻小鼠進行免疫，首先將 MSP2 進行透析後，以 SDS-PAGE 及分光光度計確認純度與濃度 (Fig. 7A)，再將所純化 MSP2 進行 Western blotting 確認被 anti-his tag monoclonal antibody 所辨識 (Fig. 7B)，最後再對小鼠進行四次免疫，製備融合瘤細胞；取得 spleen 前以 ELISA 進行測試，結果 5 隻小鼠的血液經稀釋至 12,800 倍，仍保有高 titer，顯示免疫過程具有高效益的效果 (Fig. 7C)。最後所挑到的單株抗體可以用 IFA 偵測到被 *Anaplasma phagocytophilum* 感染的 HL60



細胞 (Fig. 8)。

10. 最後將所篩選到的高力價單株抗體，每株皆進行 3 次 subclone，總共得到 24 株高力價單株抗體，每株單株抗體皆可用 Western blotting 確認辨識到特異性蛋白質 MSP2，且每一株抗體亦可用 IFA 偵測到被 *A. phagocytophilum* 感染的 HL60 細胞 (Fig. 9)。顯示我們所製備的單株抗體具有特異性，能有效診斷出 *A. phagocytophilum* 病原體。

#### 四、 討論

目前 *A. phagocytophilum* 及 *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 MSP2，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 *A. phagocytophilum* 主要抗原 MSP2 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 *A. phagocytophilum* 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 *A. phagocytophilum* 菌株主要抗原 MSP2 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、*A. phagocytophilum* 專一性抗體及病人血清確認其抗原性。

將所建置的 *A. phagocytophilum* 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 MSP2 具有做為 diagnostic antigen 潛能，可以做為自動快速檢測 *A. phagocytophilum* 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 *A. phagocytophilum* 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 *Anaplasma phagocytophilum* MSP2 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 *Anaplasma phagocytophilum* 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

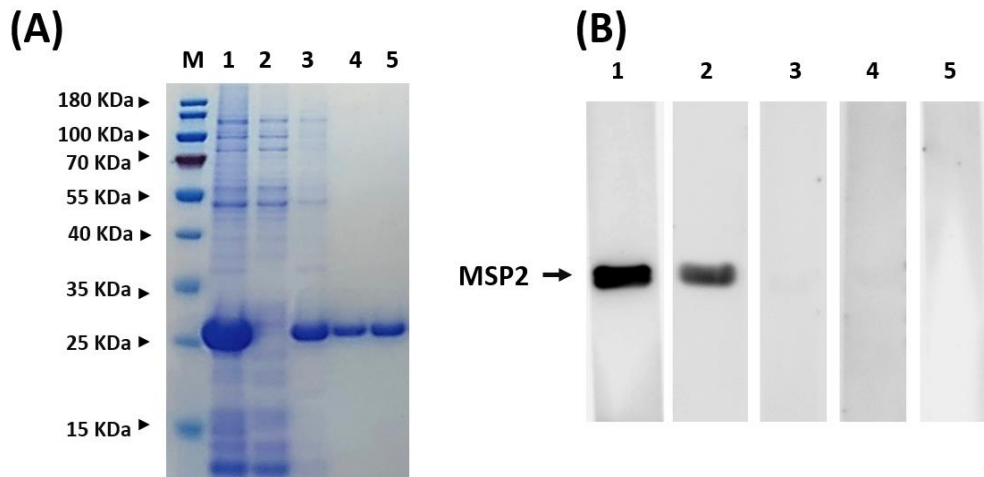
由於國際間交通往來頻繁、氣候變遷等因素，各種人畜共通傳染病如恙蟲病、地方性斑疹傷寒、發熱伴血小板減少綜合症、斑點熱、人粒細胞無形體、艾利希氏體症、病蜱媒腦炎病毒等已成為目前全球公共衛生防疫上的重大問題，建議應積極加強境外及本土人畜共通傳染病之監測。

## 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** *Anaplasma phagocytophilum* 抗原 MSP2 重組蛋白表現、純化與特異性分析 (A) 以 SDS-PAGE 呈現所表現的 MSP2 與純化; (B) MSP2 可以用特異性抗體 anti-his tag monoclonal antibody (line 1), *Anaplasma phagocytophilum* 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), 正常血清 (line 5) 則無法辨識，顯示所表現出的 MSP2 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。

## 1. Sensitivity : IgM and IgG 100%

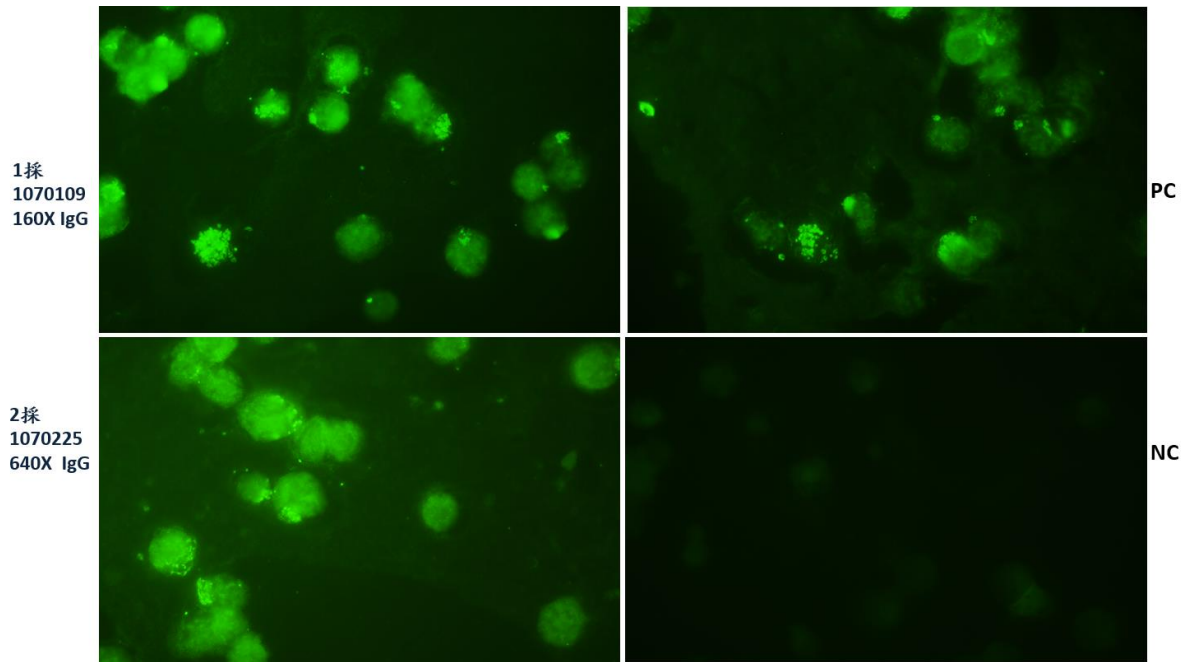
No	Serum no	Onset day	Msp2 ELISA IgM	Msp2 ELISA IgG	Focus IFA IgM	Focus IFA IgG (USUSH)	PCR
1	1060731	23	3.392	1.369	320	160 (80) weak positive	-
2	1070109	15	0.501	1.025	160	320 (160)	+
3	1070225	26	0.344	0.408	160	320 (640)	

## 2. Specificity : IgM and IgG 100%

AP(-)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PC	NC
IgM	0.083	0.156	0.116	0.125	0.236	0.158	0.186	0.255	0.289	0.295	3.456	0.125
IgG	0.134	0.204	0.192	0.188	0.231	0.137	0.211	0.112	0.225	0.139	1.386	0.215

**Table.1** 純化的 MSP2 coating 在 ELISA strip 進行 ELISA，以 IFA 作為 golden standard 作平行比對，用 3 個陽性血清及 10 個陰性血清實驗測試，Home-made IgM ELISA 的 sensitive 為 100%，specificity 為 100%。Home-made IgG 的 ELISA sensitive 為 100%，specificity 為 100%

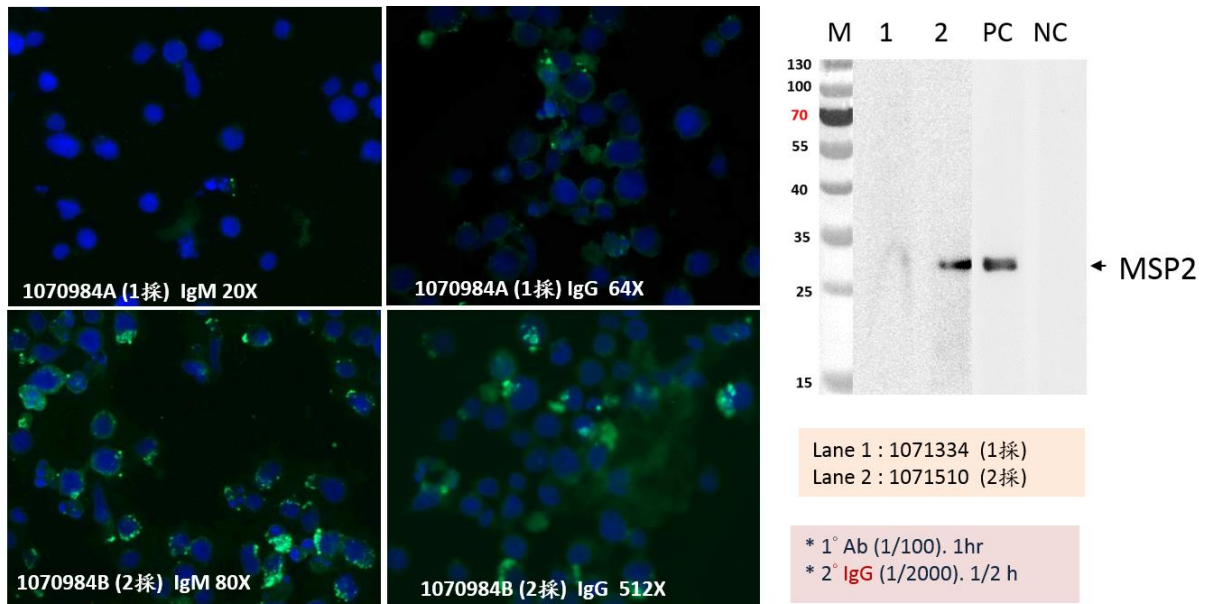




**Fig.2** 1070109 和 1070225 為同一個病人的配對血清，發病日分別為第 15、26 天，進行螢光染色分析，結果 IgG 抗體有 4 倍上升，顯示我國已有 *Anaplasma phagocytophilum* 感染的案例。

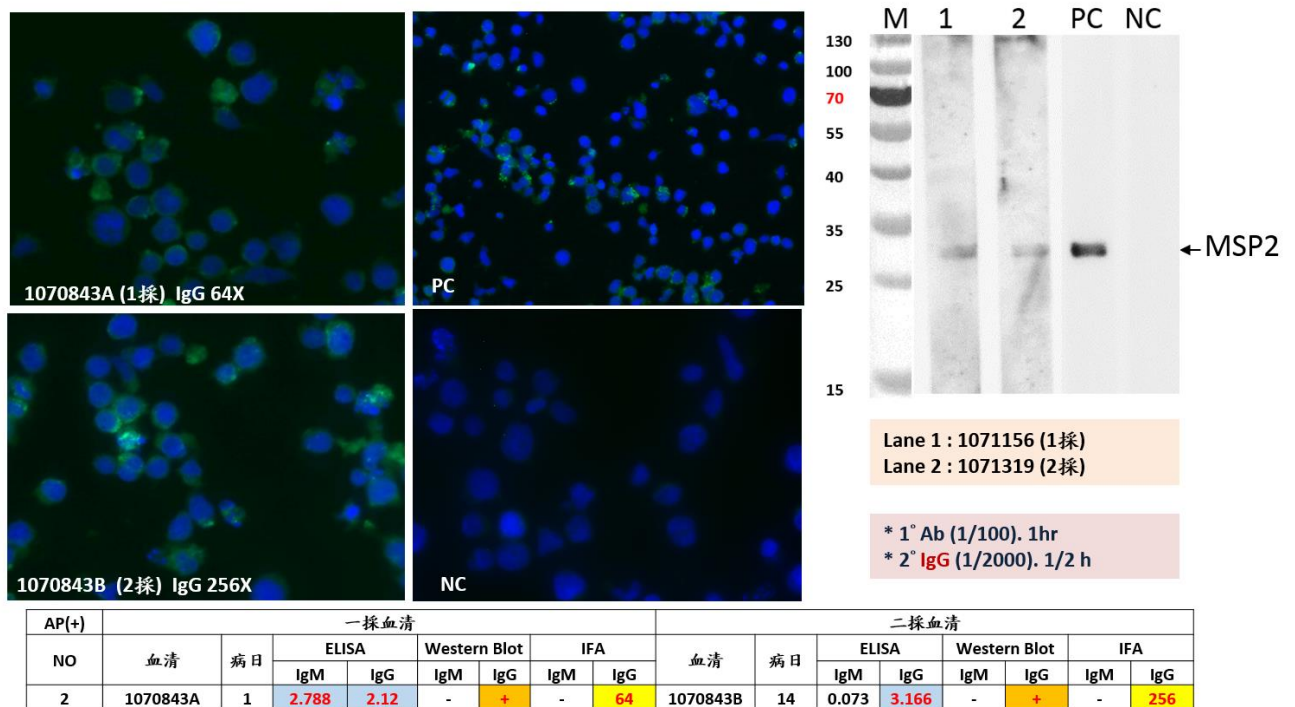
AP(+)		一採血清							二採血清							
NO	血清編號	病日	ELISA		Western Blot		IFA		血清編號	病日	ELISA		Western Blot		IFA	
			IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG			IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
1	1070984A	1	0.212	0.484	-	+	-	64	1070984B	15	0.707	3.344	+	++	80	512
2	1070843A	1	2.788	2.12	-	+	-	64	1070843B	14	0.073	3.166	-	+	-	256
3	1071610A	2	2.312	0.253	+	-	-	-	1071610B	15	3.401	0.397	+++	-	40	128
4	1071440A	7	1.511	0.111	+	-	-	-	1071440B	15	2.49	0.126	+	-	80	-

**Table.2** 以所建置的 MSP2 ELISA 進行 retrospective study，以 gold standard IFA 作平行比對，結果顯示 ELISA 的 IgM, 與 IgG 的 sensitivity 與 IFA 結果有一致性，另外以 Western blotting (MSP2) 做評估比對，也發現 ELISA 與 Western blotting 結果亦相符合，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。

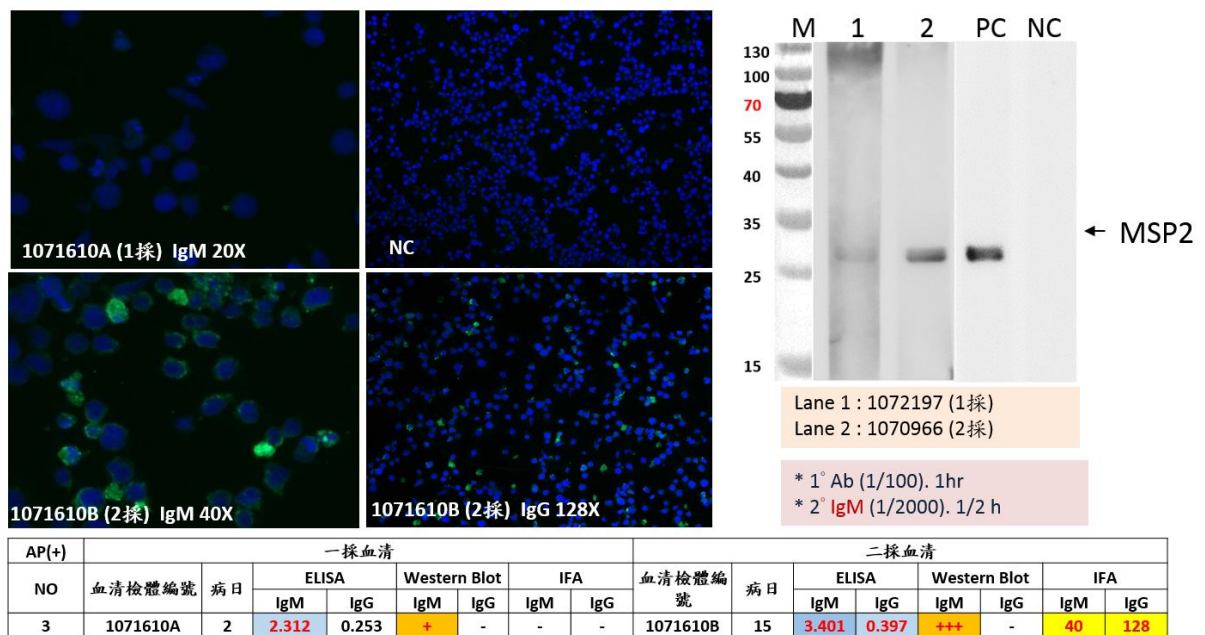


AP(+)	一採血清								二採血清								
	NO	血清	病日	ELISA		Western Blot		IFA		血清	病日	ELISA		Western Blot		IFA	
				IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG			IgM	IgG	IgM	IgG		
1	1070984A	1	0.212	0.484	-	-	-	64	1070984B	15	0.707	3.344	+	++	80	512	

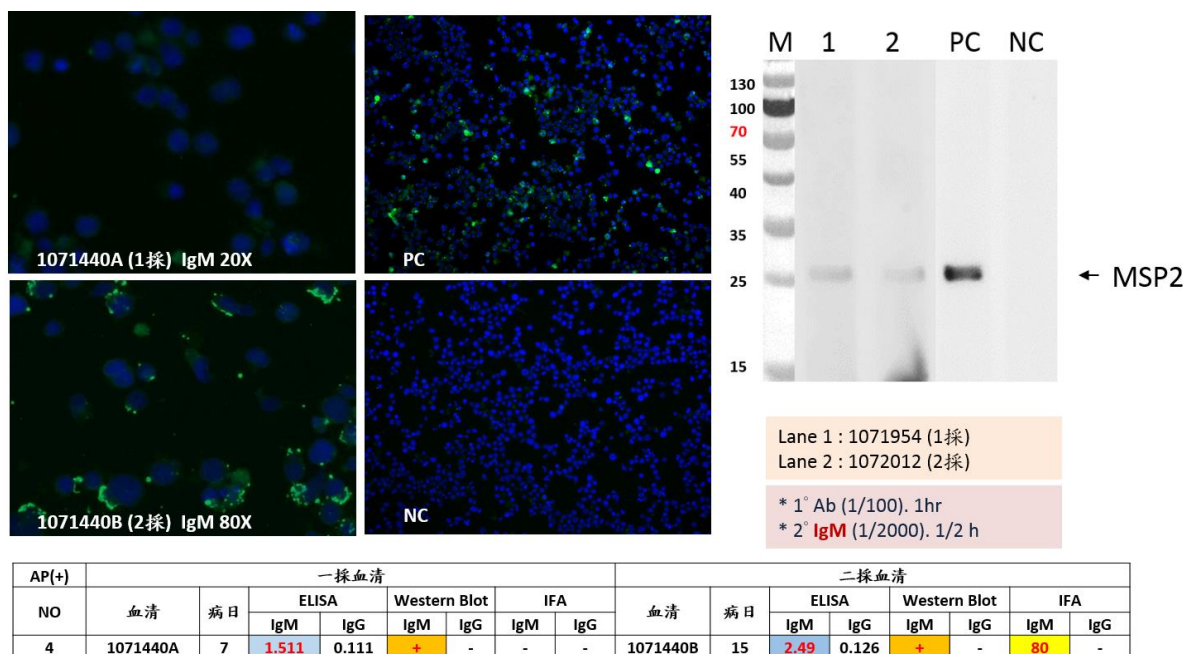
**Fig.3** 分析第一對血清 1070984A, 1070984B 結果。當配對血清 ELISA IgG 為 0.484, 3.344, IFA IgG 分別為 64, 512, IgG 有 4 倍上升已達陽性的判定標準，另外以 Western blotting (MSP2)結果發現，二採血清可以明顯偵測到 MSP2 主要抗原，再次證明所建置 ELISA system 可以偵測到 *Anaplasma phagocytophilum* 感染的病人。



**Fig.4** 第二對血清 1070843A, 1070843B 結果。配對血清 ELISA IgG 分別為 2.12, 3.166，此時 IFA IgG 分別為 64 與 256, IgG 抗體有 4 倍上升，亦已達陽性的判定標準，另外以 Western blotting (MSP2) 結果發現，配對血清皆可以偵測到 MSP2 主要抗原，也再次證明用 ELISA 可以明確偵測出 *Anaplasma phagocytophilum* 感染的病人血清抗體。



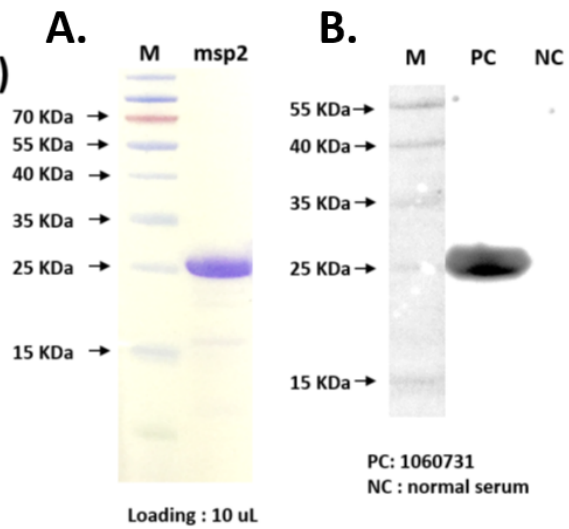
**Fig.5** 第三對血清 1071610A, 1071610B 結果。配對血清 ELISA IgM 分別為 2.312, 3.401，此時 IFA IgM 分別為 <20 與 40，且二採 IFA IgG 為 128, 已達陽性的判定標準，另外以 Western blotting (MSP2) 結果也發現，二採血清 IgM 可以明顯偵測到 MSP2 主要抗原。顯示所建置 ELISA system 能和 Western blotting, IFA 相符合且能明確定量偵測出被感染者的血清抗體。



**Fig.6** 第四對血清的配對血清 1071440A, 1071440B IgM ELISA 分別為 1.511, 2.49, IFA IgM 分別為 <20, 80, 亦已達陽性的判定標準，另外以 Western blotting (MSP2) 結果做評估，結果發現 ELISA 與 Western blotting 亦相符合具有一致性。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。

■ 107.3.13 樂斯科送來5隻

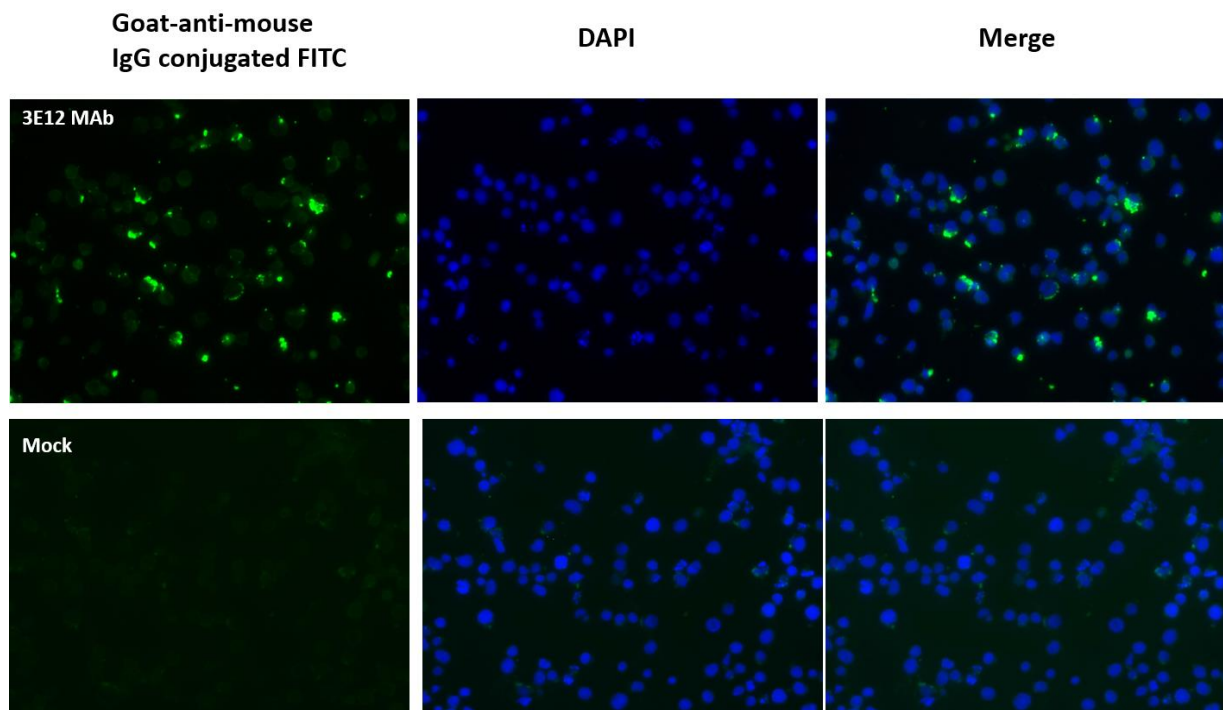
- 107.3.28 immunized msp2 (1)
- 107.4.11 booster msp2 (2)
- 107.5.1 booster msp2 (3)
- 107.5.16 booster msp2 (4)
- 107.5.21 test serum titer
- 107.5.22 hybridoma fusion
- 107.6.8 booster (5)
- 107.6.11 booster (6)
- 107.6.13 test serum titer
- 107.6.14 hybridoma fusion



C.

IgG	mice 1	mice 2	mice 3	mice 4	mice 5	MOCK
100 X	3.579	3.411	3.568	3.441	3.481	0.056
200 X	3.527	3.26	3.576	3.435	3.548	0.053
400 X	3.525	3.247	3.619	3.407	3.469	0.055
800 X	3.52	3.259	3.63	3.474	3.566	0.06
1600 X	3.519	3.277	3.547	3.403	3.408	0.053
3200 X	3.509	3.215	3.561	3.443	3.479	0.07
6400 X	3.5	2.307	3.576	3.093	3.461	0.072
12800 X	3.233	1.549	3.616	2.814	3.291	0.062

**Fig.7** MSP2 進行透析後以 SDS-PAGE 及分光光度計確認純度與濃度(A) 再將所純化 MSP2 進行 Western blotting 確認能被 anti-his tag monoclonal antibody 所辨識 (B)。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 進行測試，結果 5 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的成果(C)。



**Fig. 8** 本計畫所製備 MSP2 單株抗體可以偵測到被 *Anaplasma phagocytophilum* 感染的 HL60 細胞



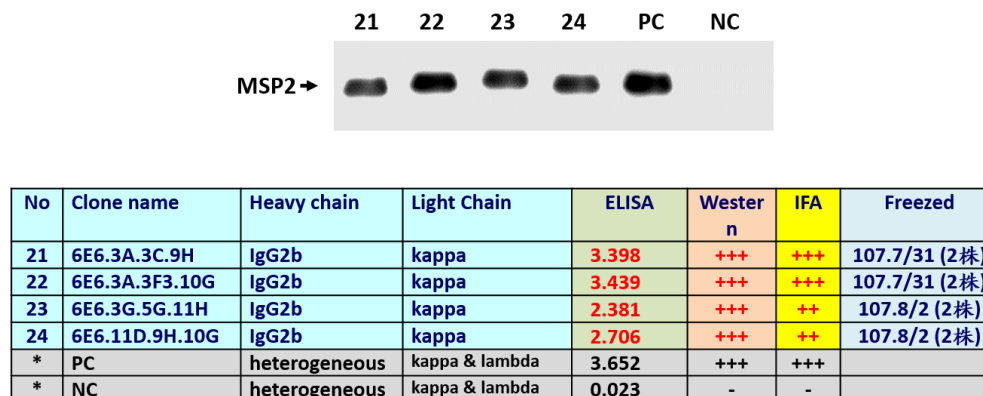
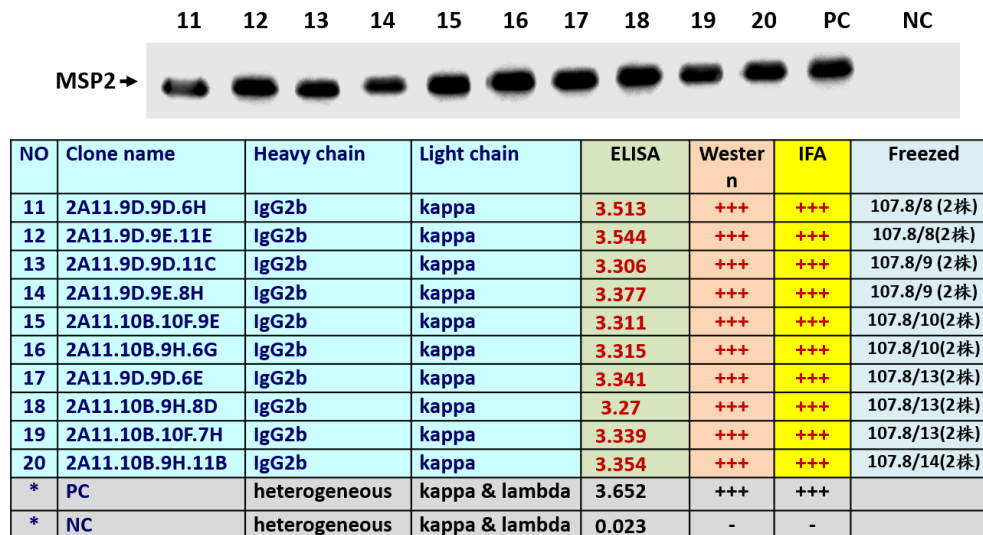
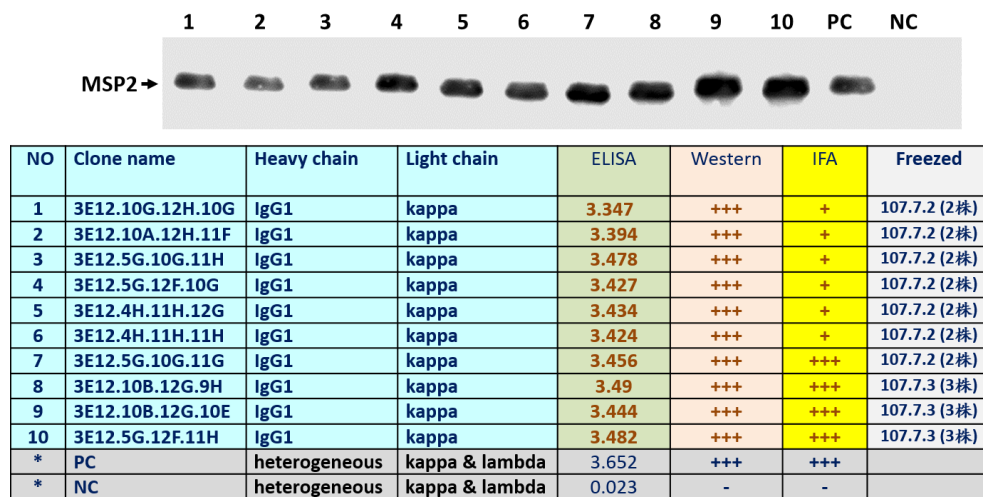


Fig. 9 綜整 MSP2 monoclonal antibodies 的 ELISA, western blotting, IFA 結果

## 疾病管制署 107 年度科技研究計畫期末報告審查意見回復表

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-112302

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

計畫單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：舒佩芸研究員

審查意見	意見回復	報告修正內容 (頁數)
對傳染病防治與檢測發展有幫助，符合需求。	謝謝委員的意見。	無修正
陽性血清可否偵測到病原體的 DNA，急性期的病人測的到嗎？	陽性血清可以偵測到急性期病人病的原體的 DNA。	無修正
報告宜指出研發的需求及流行學的分布。	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 <i>A. phagocytophilum</i> 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	補充修正 P6

	東南亞區域。	
為何選擇 MSP2?	<p>因 MSP2 具有高度抗原性，依據文獻報導目前 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 感染的診斷是以 MSP2 抗原作為 diagnosis marker，本研究純化 MSP2 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。</p>	無修正
希望 ELISA 可符合 LDT 需求，且與國外進行交互確效試驗。	謝謝委員的意見。	無修正
成功檢出 <i>Anaplasma spp.</i> 感染之血清，十分重要，在臨近國家皆有病例的狀況下，發展試劑有其必要性，下一步可考慮接受臨床檢體。	<p>謝謝委員的意見。目此開發試劑已用來篩檢疑似立克次體病人血清，若為陽性會進一步通報防疫醫師及相關防治作為。</p>	無修正