

計畫編號：DOH96-DC-2010

行政院衛生署疾病管制局 96 年度科技研究發展計畫

立克次體傳染病快速鑑別診斷系統之建立

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：舒佩芸

研究人員：黃智雄、呂琇瑩、蔡坤憲、余勝凱、陳宗佑、王珮茹

執行期間：96 年 1 月 1 日至 96 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	1
目錄	2
中文摘要	3-4
英文摘要	5-6
前言	7-11
材料與方法	12-17
結果	18-23
討論	24-25
結論與建議	26
參考文獻	27-31
表	32-39
圖	40-43

中文摘要

由於國際間交通往來日益頻繁，全球氣候也因溫室效應影響，使得各種新興及再浮現傳染病，尤其是病媒性傳染病，在全世界散佈情形正急速增加，發生頻率也愈趨頻繁與嚴重。立克次體傳染病屬於病媒性傳染病，在台灣亦有逐年增加的趨勢。目前立克次體的實驗室診斷以免疫螢光染色法為主，以抗體陽轉或成對血清抗體 4 倍上升為診斷依據，但因需要有經驗的技術人員及較長的檢驗時間，所以近年來 PCR 及 ELISA 檢驗方法是許多實驗室積極開發的目標。本計畫的目標在建立一套完整的立克次體傳染病快速診斷系統，包括螢光定量 PCR 及 ELISA 檢驗方法，能在病人急性期全血或血清中檢驗出病原核酸分子及抗體，使治療工作更具成效。本實驗室利用近年來新開發的螢光定量 PCR 方法，已成功建立出一套以 SYBR Green I 螢光染劑為基礎的即時螢光定量 PCR 檢驗系統，能快速偵測恙蟲病、流行性及地方性斑疹傷寒及斑點熱立克次體傳染病之核酸分子。我們以立克次體 16S rDNA，恙蟲病立克次體 *Orientia tsutsugamushi* 56kDa type-specific antigen 及 groEL gene，斑疹傷寒及斑點熱 17 kDa gene 及 gene D 等之核酸序列設計出可偵測病人血液中立克次體之引子，再配合螢光定量 PCR 產物核酸定序，可以區分不同種類及基因型別(strain)的立克次體，目前已用於疾病管制局之例行性檢驗。在 ELISA 的檢驗方法，由於立克次體需在活細胞內生長，菌體產量較少，難以大量培養，純化也較困

難，因此 ELISA 所需的抗原通常是以重組基因蛋白質為主，其優點除了可大量生產外，也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。我們已成功表現恙蟲病立克次體 *Orientia tsutsugamushi*，Karp、Kato 及 Gilliam 三種血清型別之 tsa 56 kDa gene 的重組蛋白質，斑疹傷寒及斑點熱之 omp B gene 的重組蛋白質作為抗原來源。並挑選出適合用於 ELISA 檢測之單株抗體，建立 Capture IgM/IgG 及 Indirect IgM/ IgG 方法，並持續進行靈敏度及專一性之改良。未來可應用於疾病的早期診斷及流行病學的研究，這對於立克次體傳染病之防治工作是極為重要的。

中文關鍵詞

立克次體，恙蟲病，斑疹傷寒，斑點熱，螢光定量 PCR 方法，酵素免疫分析法

ABSTRACT

Because of the international traffic exchanges become more frequent and greenhouse effect of global climate impact, the spread of vector-borne diseases have expanded rapidly around the world with increased intensity and severity. Similarly, the tendency of these infectious diseases has increased in Taiwan in recent years. Although molecular diagnosis based on polymerase chain reaction (PCR) method and ELISA had been developed for years, laboratory diagnosis of Rickettsial infections was largely relied on serological assay detecting antibody serum conversion between acute and convalescent phase serum samples by immunofluorescence staining. In this study, we reported the development of a real-time SYBR Green I-based quantitative PCR system and ELISA system that can be used to rapidly detect Rickettsial infections in acute-phase blood samples. For scrub typhus fever, two sets of *O. tsutsugamushi*-specific primer pairs against conserved sequences in the 56kDa outer membrane protein gene and *groEL* gene were successfully designed and used for routine diagnosis of scrub typhus in Taiwan CDC. The amplification product from real time SYBR Green I-based quantitative PCR were further sequenced to differentiate various serotypes of *O. tsutsugamushi*. For typhus fever and spotted fever group, primer pairs against conserved sequences in the *groEL* gene, 17 kDa protein gene and gene D were designed and used to detect epidemic typhus, endemic typhus and spotted fever infections. In addition, primers which targeting 16S rDNA were designed and can be used to detect scrub typhus, typhus group and spotted fever group rickettsia. All these primers had been used for routine diagnosis of rickettsial infections in Taiwan CDC. In the ELISA test, we have been successfully produced 56 kDa recombinant antigens from karp, Gilliam and Kato strains of *Orientia tsutsugamushi* and Omp B and OmpA recombinant antigens from *Rickettsia japonica* of spotted fever group. These recombinant antigens can be used to detect rickettsial specific antibodies in the serum samples from patients with rickettsial

infection. In the future, real time quantitative PCR and ELISA will replace traditional IFA method for early diagnosis of Rickettsial infection. This improvement will have great impact on the clinical treatment of patients with Rickettsial infections.

Key words: Rickettsia, scrub typhus, typhus group, spotted fever group, Real-Time SYBR Green I-based PCR, ELISA

前言

立克次體為革蘭氏陰性、絕對細胞內寄生的細菌，可分為 3 個群 (group)：(一)恙蟲病 Scrub typhus group (STG)；(二)斑疹傷寒群 Typhus group (TG)；及(三)斑點熱群 Spotted fever group (SFG) (19,24,26,33)。

台灣的立克次體傳染病主要有恙蟲病及地方性斑疹傷寒 (1-3, 25,32)。恙蟲病(又稱叢林型斑疹傷寒)，為患者遭帶有病原 *Orientia tsutsugamushi* 之恙蟲幼蟲叮咬，所引起的急性傳染性疾病 (1,2,19)。恙蟲病的潛伏期約 1-2 週，通常為 9-12 天，特徵為在螫口處形成特有的無痛性洞穿式潰瘍性焦痂 (eschar)，主要臨床症狀包括發熱、頭痛、肌肉酸痛、紅疹與淋巴結病變等症狀。在缺乏治療的情形下，可能造成患者的無尿、肺水腫與心衰竭。本病的死亡率依地區、立克次體株、感染史與治療與否有關，有 1-30% 之差異，但若經正確診斷適當用藥則死亡率可低於 1%。恙蟲病之地理分佈，北由日本北部與俄羅斯東部，南至澳洲北部與西太平洋群島，西至阿富汗均有病例發生 (5,6,11,23,30)。雖然恙蟲病可藉由抗生素治療而痊癒，但由於錯誤的診斷與抗生素的選用不當，世界上每年仍有零星致死的案例發生。而台灣在 1955 年即將此病列為通報傳染病，現歸類為第三類傳染病。台灣地區的恙蟲病近年來每年約有 250-400 個確定病例，在各縣市均有病例報告，但主要是在金門縣、台東縣、花蓮縣、高雄縣市及南投縣，發生月份以每年 5 月至 10 月較多，感染的年齡層多為 20~29 歲。台灣地

區的傳播媒介主要為地里恙蟎(*Leptotrombidium deliensis*) (25,32)。恙蟲的動物宿主主要為啮齒類(rodent)，哺乳類(羊、豬、狗、貓)，鳥類(鳥、雞)等，其中又以啮齒類為最主要的宿主。

地方性(鼠蚤型)斑疹傷寒為 *Rickettsia typhi* 引起的疾病，其病程和人蝨型(流行性)斑疹傷寒類似，有頭痛、惡寒、疲勞、發燒、全身性疼痛和出疹等現象，但病情較流行性斑疹傷寒溫和(13,35)。在各年齡層的致死率依年齡增加而遞增，但均小於1%。在缺乏蝨子的侵襲、季節性的分布和疾病的散發性等因素，均有助於和人蝨型斑疹傷寒區別。實驗室診斷通常用 IFA 法，病人血清先和不同的立克次體抗原吸附，以作為鑑別性診斷。或用細胞培養方法分離病原體，再以 IFA 鑑定。流行通常發生在有大量老鼠存在，且人與鼠居住在同一棟建築物的地區，季節性的尖峰在夏末和秋天。台灣地區有散發性病例，日據時期又稱為兩週熱。傳染窩為鼠類和一些小哺乳類動物，在自然界以鼠—蚤—鼠的循環方式維持傳播，此時鼠為傳染窩(通常為屋頂鼠 *Rattus rattus* 和溝鼠 *R. norvegicus*)。地方性斑疹傷寒立克次體在老鼠為不顯性感染，傳染方式為具有傳染性的鼠蚤(通常為 *Xenopsylla cheopis*) 在吸血時排出立克次體而污染了叮咬部位或其他新鮮的皮膚傷口，進而造成感染，偶爾也有因吸入了乾的蚤糞而感染的病例。小袋鼠、貓和其他野生或家中動物均可受感染，通常具有自限性，但這些動物可傳播具有傳染性的蚤類給人類。貓蚤(*Ctenocephalides*

felis)也是一種可能的媒介，一旦感染，在蚤體中終生維持(可長至一年)。人感染後潛伏期約1—2週，通常為12天，並不會直接由人傳染給人。如因災難而導致人口聚集、衛生條件不良，且人、鼠和蚤密集共存時，有可能發生流行，且在這種狀況下，一般會併有其他疾病同時流行。

班點熱是一種由立克次體引起的人畜共通傳染病，當人類受到寄生在狗或齧齒類動物身上的蜱叮咬，如果蜱帶有致病性的立克次體，就會因此被感染。國內多年來並無班點熱病例報告，國外主要病例多分佈在地中海周圍國家、印度、非洲及美洲等地(4,11,15,20,21,37)。所有班點熱立克次體均由蜱所傳播，只有 *R. akari* 由恙蟎，*R. felis* 由跳蚤所散播。引起人類班點熱之立克次體有十幾種，包括 *R. conorii* 引起 Boutonneus fever、Marseilles fever，*R. sibirica* 引起 North Asian tick typhus，*R. australis* 引起 Queensland tick typhus，*R. japonica* 造成 Japanese spotted fever，*R. rickettsia* 造成 Rocky Mountain spotted fever 等。班點熱在台灣的感染情形有待於利用高靈敏度及高專一性的檢驗方法調查。

立克次體實驗室的診斷方法主要分為三類：(i) 細菌分離及培養；傳統的方法將菌種或檢體接種到實驗動物如天竺鼠、大白鼠、倉鼠或雞胚胎等，但目前以細胞培養方法最為常用。培養出之細菌可再以細菌型別特異性(serotype-specific)之單株抗體做免疫螢光染色，以確知被感染細菌之血清型(5,19)，但因檢體需接種至細胞株培養至少10天後才能進行免疫螢

光染色判讀，檢驗流程耗費時日是其缺點；(ii) PCR 方法；可以偵測血液、組織等檢體之細菌核酸分子，可縮短檢驗時間，提升確診時效 (12,,13,16,17,18,27,29)。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。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，因為具有更靈敏（可測得 10 copy DNA）、更快速（5 小時內完成）、及低污染率的優點，將逐漸取代傳統 Nested PCR 方法，成為分子診斷的新標準。(iii) 血清學方法；傳統的方法如 Weil-Felix test，其原理為立克次體病人產生之抗體可與腸細菌 *Proteus* 屬的菌種有交叉結合反應 (cross-reaction)，如 Typhus group (*Rickettsia prowazekii*, *R. typhi*) 及 *R. rickettsii* 可與 *P. vulgaris* OX19 反應，Spotted fever group 之菌種可與 *P. vulgaris* OX2 反應，*O. tsutsugamushi* 則可與 *P. mirabilis* OXK 反應。但此方法缺乏靈敏度及專一性，且有高的偽陽性及偽陰性機率，並不建議使用。目前最常用的立克次體血清學診斷方法為微量免疫螢光染色法 (Indirect microimmunofluorescence, MIF)，這種方法的可信度較高，但在區分不同 Spotted fever group 菌種時，仍有困難。此外，酵素免疫分析法 (ELISA) 因具有高的靈敏度、特異性、再現性與可自動化的優點，是目前許多實驗室正在努力開發的方法 (7-9,14,34,36)。在細菌感染初期時，病人血清中的 IgM 抗體對所感染的菌種具有較高的專一性，而對不同種的

細菌的結合能力較弱，可以利用為區分菌種的型別之用。所以開發 IgM 檢測方法，有助於病人的早期診斷及菌種型別區分的方法，是未來發展的方向之一。立克次體感染之血清學診斷極為複雜，如恙蟲病的致病原 *O. tsutsugamushi*，目前已發現有許多 strains 或 isolates (10,22,31,33)，病人感染後，並不產生對不同 strain 具有交叉保護作用的抗體，故病人可能重複被不同 strain 的細菌感染，造成診斷的困難。建立一套完整的分子診斷及血清鑑別診斷系統，能在病人急性期全血或血清中準確的早期診斷出病原核酸分子，區分不同細菌型別感染，分辨初次或多次感染將有助於疾病的治療及防治。

材料與方法

(一) 血液檢體及細菌株：血液檢體來源為通報自疾病管制局之各種立克次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。細菌株為疾病管制局歷年來立克次體分離方法所得者。原型菌株 (prototype)，Gilliam、Karp、Kato 等為購自 ATCC。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。

(二) 立克次體分離法：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 天更換培養基，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。

(三) 由血液標本及細胞培養製備立克次體 DNA：以 ROCHE High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat. No. 11 796 828 001) 萃取病人檢體全血或細胞培養之細菌 DNA 核酸。首先取加抗凝血劑之全血 200 μ l，與 200 μ l 之 Binding Buffer 均勻混合後，再加入 40 μ l Proteinase K，以震盪器混合均勻，置於 70°C 水浴槽加熱 10 分鐘。再加入 isopopanal 100 μ l 均勻混合後，加到 High Pure Filter Tube 以 8,000 x g 離心 1 分鐘。置換 High Pure Filter Tube 至新的 Collection Tube 後，加入 500 μ l 之 Inhibitor Removal Buffer，以 8,000 x g 離心 1 分鐘。再置換 High Pure Filter Tube 至新的 Collection Tube 後，加入 500 μ l 之 Wash Buffer，以 8,000 x g 離心 1 分鐘，重複此步驟再 wash 一次。置換 High Pure Filter Tube 至新的 Collection Tube 後，以 13,000 x g 離心 1 分鐘，將 High Pure Filter Tube 上殘留的廢液甩乾淨。最後將 High Pure Filter Tube 放至新的 eppendorf，加入 75 μ l 預熱 70°C 的 Elution Buffer，靜置 10 分鐘，以 8,000 x g 離心 1 分鐘，eppendorf 中的液體即為欲萃取之 DNA。

(四) 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。引子的選擇可依據 Primer Express software (PE Applied Biosystems Inc., Foster City, CA)。理論上螢光定量 PCR 的靈敏度可以到達 1~10 copies/reaction，可藉由核酸引子之設計及純化、檢體核酸的萃取及純化、反應試劑之選擇、反應條件之修正等，改善系統之靈敏度及專一性。目前立克次體已有多種基因序列可供參考及比對，其中以 *Citrate synthase*、*OmpA*、*OmpB* 及 *groEL* 等基因序列，是最常被作為區分斑疹傷寒、斑點熱等菌種之用 (26,28,31)。*O. tsutsugamushi* 則可利用 56-kDa type-specific antigen (tsa) 及 *groEL* 等基因序列作為偵測病原體及區分菌種血清型別之用 (25,31)。

(五) SYBR Green 即時螢光定量聚合酶連鎖反應 (SYBR Green Real-time PCR Reaction)：使用 QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 μ l 的 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，最後加入 5 μ l 檢體 DNA，反應最終體積為 50 μ l。再進行 SYBR Green PCR 反應：95°C 15 分鐘，45 次循環之 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 38 秒 (讀取螢光值)。熔點曲線分析 (Melting curve analysis)：PCR 反應完成後，再進行熔點曲線分析：95°C, 1 分鐘、65°C, 30 秒，再進行 45 次循環，每次循環比前次溫度 +0.5°C/30 秒/循環。

(六) **單株抗體之製備、純化與分析**：本計畫將收集各種立克次體特異性之單株抗體。單株抗體之來源將由不同管道取得，包括購買、自行生產或以合作研究方式取得。將分別用於不同型式 ELISA 開發，進行鑑別診斷及細菌分型研究。單株抗體將以 BALB/c 小白鼠之腹水方式生產，再以 protein A sepharose 4B Fast Flow 親和力管柱 (Pharmacia Biotech) 純化。

(七) **基因重組蛋白質之製備與純化**：主要是以大量表現於恙蟲病立克次體細胞膜上的蛋白質，如 *O. tsutsugamushi* 的 tsa56kD 及斑疹傷寒、斑點熱之 omp A、omp B gene 為標的，構築質體 (plasmid) 表現其基因重組蛋白質。由於大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 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 (*Escherichia coli*) 表現重組蛋白質。首先利用 PCR 得到 tsa56kD gene 或 omp A、omp B genes 的 DNA 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。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，利用 AKTA 液相色層分析儀 (LPLC) 將不同分子量分子加以分離，再將純化後收集之蛋白質溶液混合後，以梯度透析及 PEG 濃縮等方法，得到純化之重組蛋白質。再利用 mAb against His-tag (正對照組)、老

鼠抗立克次體單株抗體等，決定重組蛋白質是否帶立克次體抗原決定位置(Western blot, Immuno-precipitation)。再大量表現、純化之，並利用 ELISA 的方法評估其發展 ELISA 檢驗試劑之可能性。並將有潛力的各種重組蛋白質片段，做適當的混合(cocktail)，製成更高靈敏度、高專一性的酵素免疫診斷試劑。

(八) **Capture IgM/IgG 酵素免疫分析法**:先以 100 μ l 抗人 IgM 或 IgG 特異性之山羊 IgG (goat IgG against Human IgM or IgG)在 4 $^{\circ}$ C 下隔夜吸附 (coating)在 96 孔微量效價盤上。吸附完成後以磷酸緩衝液 (PBS)清洗，再用 200 μ l 之 1% 牛血清白蛋白緩衝液(1% Bovine serum albumin in PBS)於 37 $^{\circ}$ C 下進行 1 小時 blocking 作用。以 PBS 清洗後，加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照組血清 100 μ l 反應 1 小時。清洗後，加入 100 μ l 細胞培養的細菌抗原 (Gilliam, Karp, Kato, etc.) 或基因重組抗原，在 37 $^{\circ}$ C 下反應 1 小時。以 PBS 清洗後，加入 1/1000 (v/v) 稀釋之抗立克次體之單株抗体 100 μ l。反應 1 小時後，加入 1:1000 稀釋之山羊抗鼠 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合體 100 μ l，於 37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時。以 PBS 清洗後，加入 100 μ l 酵素受質體 PNPP (p-nitrophenyl-phosphate)，在室溫作用 30 分鐘，再用微量效價盤判讀儀 (microplate reader) 以波長 405 nm 測吸光度。

(九) **Indirect IgM and IgG ELISA:**先以 $5\ \mu\text{g/ml}$, $100\ \mu\text{l/well}$ of 單株抗体在 4°C 下隔夜吸附(coating)在 96 孔微量效價盤上。再用 $200\ \mu\text{l}$ 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 blocking 作用。以 PBS 清洗後，將立克次體抗原稀釋後加入，在 37°C 下反應 1 小時。以 PBS 清洗後，加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照血清反應 1 小時。再加入 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。最後加入酵素受質體 PNPP，於室溫作用 30 分鐘，再以波長 405 nm 測吸光度。

(十) **ELISA 最適化研究：**改進 ELISA 之靈敏度(sensitivity)及專一性(specificity)，可以提高鑑別診斷之可靠性，分辨不同立克次體的感染，取代目前 MIF 方法。高靈敏度及專一性的 ELISA 檢驗試劑可應用於流行病學的研究，才能得到真正可靠的血清抗體陽性率，這也是目前研究上努力的目標。

結果

- (1) 以 SYBR Green 螢光定量 PCR 方法偵測立克次體核酸分子：恙蟲病、斑疹傷寒及斑點熱病原體引子的核酸序列如表一所示。引子組 RST-14F-6R 是依據 *O. tsutsugamushi* tsa-56kDa 基因序列所設計，RST-25F-26R 依據 *groEL* heat shock protein 基因序列所設計出，RR-F1-R2 是依據斑疹傷寒及斑點熱病原體之 *groEL* heat shock protein 基因序列所設計出，RR-F8-R12 則是依據斑疹傷寒及斑點熱病原體之 17 kDa gene 序列所設計出。此四組引子可偵測到所有恙蟲病、斑疹傷寒及斑點熱病原體，目前已利用此四組引子，作為疾管局例行性分子檢驗。因為所有的 PCR 檢測均採用相同的實驗步驟，所以相同反應條件可同時用來偵測恙蟲病、斑疹傷寒及斑點熱立克次體之核酸分子。2007 年 1-10 月實驗室共有 1055 支檢體作例行性 PCR 檢驗，陽性有 140 件，陽性率為 13.3%，其中斑疹傷寒及斑點熱有 10 件。表二所示為部份恙蟲病立克次體 PCR 陽性病例，以引子組 RST-14F-6R 反應，所得的陽性 PCR 產物之大小約為 212-260 bp，此核酸序列位於 tsa 56-kDa gene variable domain I (VD I) 的位置，在不同 *O. tsutsugamushi* serotype 間的差異很大，可以用來區分不同 strain 之用。由 Blast 結果得知，台灣恙蟲病立克次體除了包括本土特有的基因型外，尚有與東南亞國家相似的基因型。表三所示為 2007 年 10

月底為止所偵測之斑疹傷寒及斑點熱立克次體 PCR 陽性病例，引子組 RR-F8-R12 所得的陽性 PCR 產物，以核酸定序方法可比較各陽性檢體長度為 247 bp 的核酸序列。由 Blast 結果得知，有 1 株斑點熱立克次體，核酸序列與 *R. japonica* 最接近。有 9 株地方性斑疹傷寒立克次體。

(2) **開發 SYBR Green 螢光定量 PCR 使用之引子**：17kDaF2-R1 是依據斑疹傷寒及斑點熱立克次體之 17 kDa gene 序列所設計出，geneDF1-R1 是依據斑疹傷寒及斑點熱立克次體之 gene D 序列所設計，16SrDNAOTF7-R6 是依據恙蟲病立克次體 16S rDNA 序列所設計出，可同時偵測恙蟲病、斑疹傷寒及斑點熱立克次體之核酸分子。表四所示為立克次體引子組之專一性及靈敏度之比較，將 17kDaF2-R1 及 geneDF1-R1 兩組引子混合在同一反應，可同時偵測 TG 及 SFG，靈敏度較 RR-F8-R12 為高，約可增加 2-5 倍，且對 TG 及 SFG 具有專一性。引子組 16SrDNAOTF7-R6 則可同時偵測恙蟲病、斑疹傷寒及斑點熱病原體之核酸分子且靈敏度與目前所使用之引子組 RST-14F-6R 及 RR-F8-R12 相當，可取代目前所使用之引子，用於篩檢所有的恙蟲病、斑疹傷寒及斑點熱立克次體。圖一為利用 RST-14F-6R 引子組偵測 Karp strain 之標準曲線圖，Ct 值為 38 時，detection limit 為 1-5 copies/reaction。其餘引子組的 detection limits 均

在 1-10 copies/Reaction 以下。

- (3) **螢光定量 PCR 陽性產物核酸序列分析**：以引子組 RST-14F-6R 所得的陽性 PCR 產物之大小約為 212-260 bp，以核酸定序方法可比較各陽性檢體長度約為 160-208 bp 的核酸序列。此核酸序列位於 tsa 56-kDa gene variable domain I (VDI)的位置，在不同 *O. tsutsugamushi* serotype 間的差異很大，可以用來區分不同 serotype 之用。圖三所示為 2007 年 1 至 10 月所收集的 99 支檢體 PCR 陽性產物定序結果之分析；可將序列區分為 4 個 clusters，Karp-like、Gilliam-like、Kawasaki-like 及 Kato-like clusters。Karp-like cluster 為最大的一群，共包含 54 支檢體，佔了總數的 54.5%，是 2007 年偵測到數量最多的菌種，分佈於金門、高雄、台北、桃園、南投等地區，也是分佈最廣的菌株。其次是 Kato-like cluster，共有 21 支檢體，佔總數的 21.2%，主要分佈於金門、高雄、花蓮、台北等地。Gilliam-like cluster，共有 19 支檢體，佔總數的 19.2%，主要分佈於金門、台中、台北等地。Kawasaki-like cluster 共有 5 支檢體，佔總數的 5.1%，分佈於台東、高雄、宜蘭。此外，也發現一些較特殊的菌種只出現在高雄、南投等地。

- (4) **表現 *Orientia tsutsugamushi* Karp, Gilliam 及 Kato 56kD 基因之片段或全長的重組蛋白質**：由於台灣恙蟲病立克次體之基因型別複雜（表二及圖二），為提高恙蟲病 ELISA 檢驗之靈敏度，除了表現 Karp strain

之重組蛋白質外，本研究亦表現 Gilliam 及 Kato 56kD 基因之片段的
重組蛋白質。圖三所示為本研究表現之 *Orientia tsutsugamushi* Karp
56kD 基因全長或片段的重組蛋白質之基因圖譜。為增加 ELISA 的靈
敏度亦表現 Gilliam 2-4 (158-1488bp)及 Kato 2-4 (158-1488) 56kD 基因
之片段重組蛋白質。表五所示為利用 Karp 56kD 基因全長或片段的重
組蛋白質及 9-1 單株抗體組成之 Indirect ELISA 測試 6 組恙蟲病確定
病例陽性成對血清檢體及 6 組恙蟲病陰性成對血清檢體之測試結
果。結果顯示，重組蛋白質 2-4 及 2-3 所得的靈敏度最佳，將以重組
蛋白質 2-4 為主，作後續 ELISA 之測試。

- (5) 利用表現之 *Orientia tsutsugamushi* Karp、Gilliam 及 Kato 56kD 基因
(2-4)片段的重組蛋白質開發恙蟲病 ELISA 檢驗試劑：Karp、Gilliam
及 Kato 56kD 基因片段 2-4 的重組蛋白質包含 56kD 基因 158-1488 片
段，缺乏 N 端 53 個胺基酸序列及 C 端 37 個胺基酸序列，但範圍仍
涵蓋蛋白質內 4 個抗原變異區 (Variable Domain I-IV)。所使用之單
株抗體包括 (i) 9-1 mAb：為恙蟲病立克次體之通用抗體，對 Karp,
Gilliam 及 Kato 均有結合反應；(ii) Anti-His tag mAb：可與重組蛋白
質 N 端之 His-tag 作用。表六所示為利用 Karp、Gilliam 及 Kato 56kD
基因片段 2-4 的重組蛋白質及 9-1 單株抗體組成之 Indirect ELISA，
測試 8 組恙蟲病確定病例陽性成對血清檢體及 4 組恙蟲病陰性成對血

清檢體之結果。由結果顯示，Karp 重組蛋白質所得的靈敏度最佳，Gilliam 次之，但兩者有互補作用。將 Karp，Gilliam 及 Kato 重組蛋白質混合，三者之間有互補及相加作用。以 Anti-His tag mAb coating 時，對 Karp 重組蛋白質吸附較差，但對 Gilliam 的效果則很好(表七)。

(6) 表現 *Rickettsia japonica* omp A 及 omp B 基因的重組蛋白質：斑疹傷寒及斑點熱立克次體之 outer membrane proteins，Omp A 及 Omp B，是宿主免疫反應主要的標的蛋白質，最適合作為 ELISA 試劑的抗原來源。圖四所示為 Omp A 及 Omp B 之片段或全長基因圖譜。目前我們已成功表現及純化出 Omp A-S1(4904-6093 bp，43 kDa)、Omp A-L1(4008-6627 bp，94 kDa)、Omp B-S1(2122-3521 bp，50 kDa)及 Omp B-L1(1446-3523 bp，72 kDa)基因片段的重組蛋白質。

(7) 利用表現之 *Rickettsia japonica* omp A 及 omp B 基因的重組蛋白質開發斑疹傷寒及斑點熱 ELISA 檢驗試劑：表八為利用 Omp B-S1 及 Omp B-L1 重組蛋白質為抗原，以老鼠血清檢體，測試 ELISA 的靈敏度及專一性。結果顯示 IFA 與 ELISA 結果並不符合，由於 IFA 是以完整的 *R. rickettsii* 細菌作為抗原，ELISA 則使用 *R. japonica* Omp B 基因片段之重組蛋白質作為抗原，所以兩者之靈敏度與專一性均有差異。斑疹傷寒、斑點熱立克次體 Omp A 與 Omp B 重組蛋白質之表現仍在積極進行，而且因現有的斑疹傷寒、斑點熱立克次體的商用 ELISA

檢測試劑仍有靈敏度與專一性的問題需要改進，目前仍在積極研發斑疹傷寒、斑點熱立克次體自動化 ELISA 檢測系統。

討論

目前立克次體之實驗室診斷，主要是以血清學 IFA 方法為主 (8,9,13,26,38,42)。在急性期血清中，因抗體尚未大量產生，主要必需靠菌種分離及 PCR 檢驗，因此我們建立了快速、靈敏度及專一性高的螢光定量 PCR 方法，取代目前大部分實驗室所使用的 Nested PCR 方法偵測立克次體特異性核酸序列。本計畫利用螢光定量 PCR 方法，結合特殊的引子偵測恙蟲病、斑疹傷寒及斑點熱立克次體。在恙蟲病方面，引子組 RST-14F-6R 及 RST-25F-26R 可同時偵測所有不同血清型的 *O. tsutsugamushi* 菌體，可以作為篩檢恙蟲病病人陽性檢體之用。由於 *O. tsutsugamushi* 血清型種類繁多，本研究採用核酸定序方法，藉著直接定序 PCR 陽性產物來確定血清型別。由核酸序列分析發現，引子組 RST-14F-6R 所得之 PCR 陽性產物定序結果可區分不同血清型別的 *O. tsutsugamushi* 菌體。

在斑疹傷寒方面，引子組 RR-F1-R2 及 RR-F8-R12 可偵測到所有斑疹傷寒及斑點熱之病原體，可作為篩檢斑疹傷寒及斑點熱病人陽性檢體之用。若再直接定序 PCR 陽性產物，則可以區分立克次體菌種。此外亦開發出新的引子組 17kDaF2-R1 及 geneDF1-R1 兩組引子混合在同一反應，可同時偵測 TG 及 SFG，靈敏度較 RR-F8-R12 為高。引子組 16SrDNAOTF7-R6 則可同時偵測恙蟲病、斑疹傷寒及斑點熱病原體之核

酸分子，可取代目前使用之引子。本研究設計出恙蟲病、斑疹傷寒及斑點熱立克次體之引子，配合 SYBR Green I 螢光定量 PCR 方法，不但靈敏度高，而且步驟簡單、易操作，是非常適合立克次體的分子診斷方法。

本研究亦建立以酵素免疫分析法為基礎的立克次體血清學檢驗方法，偵測病人血清中抗立克次體的 IgM 及 IgG 抗體，用以診斷立克次體傳染病。首先表現恙蟲病病原體主要外套膜重組蛋白，56 kD，除了 karp strain 外，也表現 Gilliam 及 Kato 之重組蛋白以增加檢驗的靈敏度。此外也表現斑疹傷寒及斑點熱立克次體之 Omp A 及 Omp B 重組蛋白，建立斑疹傷寒及斑點熱 ELISA 檢測試劑，目前已有一些成效。單株抗體的選擇也是決定檢驗系統品質的重要關鍵，除了使用抗立克次體的單株抗體外，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，可提供立克次體傳染病之快速診斷，使之應用於疾病的早期診斷及流行病學的研究，這對於立克次體傳染病之防治工作是極為重要的。此外，我們應用 shell-vial 方法，成功的自病人血液分離出病原體，建立立克次體之菌種銀行，這對未來檢驗試劑之開發及提供疫苗研發的方向及政策都有莫大的貢獻。

結論與建議

由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，建立一套完整的病媒性傳染病診斷系統（血清學及分子診斷），監測台灣地區已知存在的立克次體傳染病是十分重要的。本計畫完成 Real-time PCR 分子診斷，具有高靈敏度及專一性。並建立高靈敏度、高特異性之恙蟲病立克次體血清學診斷系統，除了對病患的早期治療有很大的幫助外，對防治的工作也極為重要。

參考文獻

1. 陳慧玲、謝國珍、陳豪勇等。由病人血液中分離台灣地區 *Rickettsia tsutsugamushi* 之探討。台灣醫誌。94 (suppl2) :S112-119, 1995。
2. 謝國珍、陳慧玲、陳豪勇等。以聚合酶連鎖反應來判定恙蟲病立克次氏菌之血清型。中華民國微生物及免疫學雜誌。29(2):116-121, 1996。
3. 陳堃生、劉永慶、顏慕庸等。鼠蚤型斑疹傷寒:南台灣三病例報告。中華民國感染症醫學會雜誌。6(2):145-150, 1995。
4. 陳慧玲、陳豪勇、鍾兆麟等。金門地區鼠體內斑點熱抗體之初步篩檢。中華民國微生物及免疫學雜誌。30(2):55-61, 1997。
5. Chang WH, Kang JS, Lee WK, Choi MS, Lee JH. Serological classification by monoclonal antibodies of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated in Korea. J Clin Microbiol 28:685-688, 1990.
6. Chang WH. Current status of tsutsugamushi disease in Korea. J Korean Med Sci 10:227-238, 1995.
7. Ching WM, Wang H, Eamsila C, Kelly DJ, Dasch GA. Expression and refolding of truncated recombinant major outer membrane protein antigen (r56) of *Orientia tsutsugamushi* and its use in enzymed-linked immunosorbent assays. Clin Diagn Lab Immunol 5:519-526, 1998.
8. Ching WM, Rowland D, Zhang Z, Bourgeois AL, Kelly D, Dasch GA, Devine PL. Early diagnosis of scrub typhus with a rapid flow assay using recombinant major outer membrane protein antigen (r56) of *Orientia tsutsugamushi*. Clin Diagn Lab Immunol 8:409-414, 2001.
9. Coleman RE, Sangkasuwan V, Suwanabun N, Eamsila C, Mungviriyaya S,

- Devine P, Richards AL, Rowland D, Ching WM, Sattabongkot J, Lerdthusnee K. Comparative evaluation of selected diagnostic assays for the detection of IgG and IgM antibody to *Orientia tsutsugamushi* in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 67:497-503, 2002.
10. Enatsu T, Urakami H, Tamura A. Phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* strains based on the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. *FEMS Microbiol Lett* 180:160-169, 1999.
 11. Fournier PE, Fujita H, Takada N, Raoult D. Genetic identification of *Rickettsiae* isolated from ticks in Japan. *J Clin Microbiol* 41:2176-2181, 2002.
 12. Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Yamamoto S, Kawamura Jr A. Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31:1637-1640, 1993.
 13. Higgins JA, Radulovic S, Noden BH, Troyer JM, Azad AF. Reverse Transcriptase PCR Amplification of *Rickettsia typhi* from Infected Mammalian Cells and Insect Vectors. *J Clin Microbiol* 36: 1793-1794, 1998.
 14. Jang WJ, Huh MS, Park KH, Choi MS, Kim IS. Evaluation of an immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Orientia tsutsugamushi* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:394-398, 2003.
 15. Jang WJ, Kim JH, Choi YJ, Jung KD, Kim YG, Lee SH, Choi MS, Kim IS, Walker DH, Park KH. First serologic evidence of human spotted fever group *Rickettsiosis* in Korea. *J Clin Microbiol* 42:2310-2313, 2004.
 16. Jiang, J., T. C. Chan, J. J. Temenak, G. A. Dasch, W. M. Ching, and A. L. Richards. 2004. Development of a quantitative real-time polymerase

- chain reaction assay specific for *Orientia tsutsugamushi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 70:351-6.
17. Jiang J, Temenak JJ, Richards AL. Real-time PCR duplex assay for *Rickettsia prowazekii* and *Borrelia recurrentis*. Ann N Y Acad Sci 990:302-310, 2003.
 18. Kawamori, F., M. Akiyama, M. Sugieda, T. Kanda, S. Akahane, S. Yamamoto, N. Ohashi, and A. Tamura. 1993. Two-step polymerase chain reaction for diagnosis of scrub typhus and identification of antigenic variants of *Rickettsia tsutsugamushi*. J. Vet. Med. Sci. 55: 749-55
 19. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. J Clin Microbiol 35:2715-2727, 1997.
 20. Mahara F. Japanese spotted fever: report of 31 cases and review of the literature. Emerg Infect Dis 3:105-111, 1997.
 21. Mediannikov OY, Sidelnikov Y, Ivanov L, Mokretsova E, Fournier PE, Tarasevich I, Raoult D. Acute tick-borne Rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian far east. Emerg Infect Dis 10:810-817, 2004.
 22. Oaks EV, Rice RNM, Kelly DJ, Stover CK. Antigenic and genetic relatedness of eight *Rickettsia tsutsugamushi* antigens. Infect Immun 57:3116-3122, 1989.
 23. Odorico DM, Graves SR, Currie B, Catmull J, Nack Z, Ellis S, Wang L, Miller DJ. New *Orientia tsutsugamushi* strain from scrub typhus in Australia. Emerg Infect Dis 4: 641-4, 1998.
 24. Ohashi N, Fukuhara M, Shimada M, Tamura A. Phylogenetic position of *Rickettsia tsutsugamushi* and the relationship among its antigenic variants

- by analyses of 16S rRNA gene sequences. FEMS Microbiol Lett 125: 299-304, 1995.
25. Qiang Y, Tamura A, Urakami H, Makisaka Y, Koyama S, Fukuhara M, Kadosaka T. Phylogenetic characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan according to the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. Microbiol Immunol 47:577-583, 2003.
 26. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev 10:694-719, 1997.
 27. Saisongkorh W, Chenchittikul M, Silpapojakul K. Evaluation of nested PCR for the diagnosis of scrub typhus among patients with acute pyrexia of unknown origin. Trans R Soc Trop Med Hyg 98:360-366, 2004.
 28. Sekeyova, Z., V. Roux, and D. Raoult. 2001. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1353-1360.
 29. Singhsilarak T., W. Leowattana, S. Looareesuwan, V. Wongchotigul, J. Jiang, A. L. Richards, G. Watt. 2005. Detection of *Orientia tsutsugamushi* in clinical samples by quantitative real-time polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72:640-1.
 30. Shirai A, Coolbaugh JC, Gan E, Chan TC, Huxsoll DL, Groves MG. Serologic analysis of scrub typhus isolates from the Pescadores and Philippine Islands. Jpn J Med Sci Biol 35: 255-9, 1982.
 31. Stover CK, Marana DP, Dasch GA, Oaks EV. Molecular cloning and sequence analysis of the sta58 major antigen gene of *Rickettsia tsutsugamushi*: Sequence homology and antigen comparison of sta 58 to the 60-kilodalton family of stress proteins. Infect Immun 58:1360-1368, 1990.

32. Tamura A, Ohashi N, Koyama Y, Fukuhara M, Kawamori F, Otsuru M, Wu PF, Lin SY. Characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan by immunofluorescence and restriction fragment length polymorphism analyses. FEMS Microbiol Lett 150: 225-31, 1997.
33. Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Miyamura S. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 45: 589-91, 1995.
34. Tay ST, Rohani MY, Ho TM, Devi S. Expression of recombinant proteins of *Orientia tsutsugamushi* and their applications in the serodiagnosis of scrub typhus. Diag Micro Infect Dis 44:137-142,2002.
35. Tselentis Y, Psaroulaki A, Maniatis J, Spyridaki I, Babalis T. Genotypic identification of murine typhus *Rickettsia* in rats and their fleas in an endemic area of Greece by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Am J Trop Med Hyg 54: 413-7, 1996.
36. Wang YC, Jian TY, Tarn LJ, Hung YW, Chao HY, Ji DD, Liu HW. Development of a recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay and its applications in field surveillance of rodent mice for presence of immunoglobulin G against *Orientia tsutsugamushi*. Clin Diagn Lab Immunol 10:451-458, 2003.
37. Zhang JZ, Fan MY, Wu YM, Fournier PE, Roux V, Raoult D. Genetic classification of “*Rickettsia heilongjiangii*” and *Rickettsia hulinii*,” two Chinese spotted fever group Rickettsiae. J Clin Microbiol 38:3498-3501, 2000.

表一、立克次體 SYBR Green 螢光定量 PCR 所使用之引子

Primer	Nucleotide sequence	Gene	Specificity
RST-14F	CCA TTT GGT GGT ACA TTA GCT GCA GGT	<i>Tsa 56</i>	<i>O. tsutsugamushi</i>
RST-6R	TCA CGA TCA GCT ATA CTT ATA GGC A	<i>Tsa 56</i>	<i>O. tsutsugamushi</i>
RST-25F	CTT TGC AAC GAA TCG TGA AAA GAT GAT TAC	<i>GroEL</i>	<i>O. tsutsugamushi</i>
RST-26R	GTA AGA GCT TCT CCG TCT ACA TCA TCA GCA	<i>GroEL</i>	<i>O. tsutsugamushi</i>
RR-F1	AAA ATG GTT GCT GAG CTT GAA AAT CCT TT	<i>GroEL</i>	Rickettsia group (TG, SFG)
RR-R2	ACT TTC AAA CCA CCA CGT AAT CTA TTG AC	<i>GroEL</i>	Rickettsia group (TG, SFG)
RR-F8	GGC GGY GCA TTA CTT GGT TCT CAA TTC GG	17-kD	Rickettsia group (TG, SFG)
RR-R12	GTT TTC CSC CTA TTA CAA CTG TTT GAG T	17-kD	Rickettsia group (TG, SFG)
17kDaF2	GCA TTA CTT GGT TCT CAA TTC GG	17-kD	Rickettsia group (TG, SFG)
17kDaR1	CGC CAT TCT ACG TTA CTA CCR C	17-kD	Rickettsia group (TG, SFG)
geneDF1	ACT GCC CAC TAC GAA GAA GGA CCA	Gene D	Rickettsia group (TG, SFG)
geneDR1	ACG CTC TGY CCT TGG TTT AGT TCT	Gene D	Rickettsia group (TG, SFG)
16sRNAOTF7	CCA GYG GGT RAT GCC GGG AAC TAT	16S rDNA	STG, TG, SFG
16sRNAOTR6	GGC AGT GTG TAC AAG GCC CGA GAA	16S rDNA	STG, TG, SFG

表二、利用恙蟲病立克次體專一性引子可偵測恙蟲病病人血液檢體之病原體

核酸分子

DNA 編號	恙蟲病 (ST)		
	qPCR	Sequencing	BLAST
	14F-6R	14F-6R	14F-6R
	(Tsa 56)	(Tsa 56)	most closely related strain
L960003	37(79.45)	183	Kuroki,Boryong
L960021	34(79.45)	183	Kuroki,Boryong
L960035	33(79.45)	183	Kuroki,Boryong
L960039	35(78.85)	184	yeo-joo(99%),Matsuzawa(99%)
L960057	35(78.95)	183	Kuroki,Boryong
L960059	35(79.45)	183	Kuroki,Boryong
L960063	32(79.45)	183	Kuroki,Boryong
L960065	37(79.45)	166	Akita-7,Omagari,CDC Kato,Kato
L960129	39(78.95)	183	Kuroki,Boryong
L960204	39(79.95)	166	Akita-7,Omagari,CDC Kato,Kato
L960231	37(78.85)	166	TW381,TW521
L960256	32(78.95)	160	TW381,TW521
L960271	41(79.45)	184	UT329
L960293	31(79.45)	208	UT150,332,316,167,76,Taitung1,3,TWyu81,TW201
L960298	34(79.45)	184	UT329,125,144,196
L960308	35(79.95)	184	Hualien-2,8,9,10,Taitung-5,TW461
L960312	38(79.35)	184	UT329
L960321	36(79.45)	160	Hualien-6
L960325	38(79.95)	184	UT329
L960329	32(78.95)	184	Hualien-12,TW45R,TW73R
L960335	36(79.45)	208	UT150,332,316,167,76,Taitung1,3,TWyu81,TW201
L960344	35(78.95)	166	TWyu11,TW44R,TW62R,Hualien4
L960358	44(80.35)	166	Akita-7,Omagari,CDC Kato,Kato
L960368	40(79.45)	166	Hualien-3
L960376	29(79.95)	208	UT150,332,316,167,76,Taitung1,3,TWyu81,TW201
L960388	28(79.95)	184	Hualien8,10,9,2,TW431,Taitung5
L960397	31(79.95)	208	UT150,332,316,167,76,Taitung1,3,TWyu81,TW201
L960398	33(79.45)	166	TWyu11,TW44R,TW62R,Hualien4
L960426	33(78.95)	166	TWyu11,TW44R,TW62R,Hualien5
L960433	32(79.85)	208	UT150,332,316,167,76,Taitung1,3,TWyu81,TW201
L960434	34(79.95)	180	UT150,332,316,167,76,Taitung1,3,TWyu81,TW201
L960444	28(80.45)	184	Hualien8,10,9,2,TW431,Taitung5
L960451	33(79.95)	184	Hualien8,10,9,2,TW431,Taitung5
L960452	35(79.95)	208	UT150,332,316,167,76,Taitung1,3,TWyu81,TW201
L960461	32(79.95)	208	UT150,332,316,167,76,Taitung1,3,TWyu81,TW201
L960469	36(79.45)	184	Hualien8,10,9,2,TW431,Taitung5
L960474	34(79.45)	208	UT150,332,316,167,76,Taitung1,3,TWyu81,TW201
L960476	33(79.45)	184	Hualien8,10,9,2,TW431,Taitung5
L960477	35(78.45)	166	TWyu11,TW44R,TW62R,Hualien4
L960479	32(78.95)	184	Hualien8,10,9,2,TW431,Taitung5
L960480	32(77.95)	166	TWyu11,TW44R,TW62R,Hualien4
L960481	32(79.45)	208	UT150,332,316,167,76,Taitung1,3,TWyu81,TW201
L960484	37(80.45)	169	Hualien-1
L960490	29(79.95)	184	Hualien8,10,9,2,TW431,Taitung5
L960491	28(79.95)	184	Hualien8,10,9,2,TW431,Taitung5
L960492	29(79.95)	184	Hualien8,10,9,2,TW431,Taitung5
L960504	34(79.45)	184	Hualien-2,8,9,10,Taitung-5,TW461
L960505	35(79.95)	184	Hualien-2,8,9,10,Taitung-5,TW461
L960549	30(79.95)	183	Kuroki,Boryong
L960550	36(78.45)	166	TWyu11,TW44R,TW62R,Hualien4
L960571	36(79.45)	184	Hualien-12,TW45R,TW73R
L960577	34(79.95)	184	Hualien-2,8,9,10,Taitung-5,TW461
L960582	37(79.95)	208	UT150,332,316,167,76,Taitung1,3,TWyu81,TW201
L960583	32(80.45)	208	UT150,332,316,167,76,Taitung1,3,TWyu81,TW201
L960585	32(79.95)	184	Hualien-2,8,9,10,Taitung-5,TW461

表三、利用斑疹傷寒立克次體專一性引子可偵測斑疹傷寒病人血液檢體之病原體核酸分子

DNA 編號	BLAST		
	F8-R12	F8-R12	F1-R2 & F8-R12
	(17kD)	(17kD)	(100% match)
L960020	41(81.45)	247	R.japonica
L960087	40(80.45)	247	R.typhi
L960098	38(80.45)	247	R.typhi
L960213	32(79.45)	247	R.typhi
L960239	35(80.45)	247	R.typhi
L960338	38(80.45)	247	R.typhi
L960431	40(79.45)	247	R.typhi
L960508	32(79.45)	247	R.typhi
L960958	34(79.45)	247	R.typhi
L961049	36(79.95)	247	R.typhi

表四、利用立克次體專一性引子偵測恙蟲病、斑疹傷寒、斑點熱之病原體

核酸

Disease Group	Species (strain)	14F6R	F8R12	F2R1&F1R1	F7R6
		tsa 56 kD gene	17 kD gene	17 kD&Gene D	16S rDNA
		STG	TG&SFG	TG&SFG	STG&TG&SFG
Scrub Typhus Group (STG)	<i>O. tsutsugamushi</i> (Karp)	18.02(78.5)	No Ct	No Ct	16.17(82.5)
	<i>O. tsutsugamushi</i> (Kato)	17.8(80.5)	No Ct	No Ct	17.52(82.5)
	<i>O. tsutsugamushi</i> (Gilliam)	20.37(78.5)	No Ct	No Ct	19.93(82.5)
	<i>O. tsutsugamushi</i> (Kawasaki)	23.56(78.5)	No Ct	No Ct	23.58(82.5)
	<i>O. tsutsugamushi</i> (Shimokoshi)	29.74(78.5)	No Ct	No Ct	29.67(82.5)
Typhus Group (TG)	<i>R.typhi</i>	No Ct	18.49(80.5)	17.75(79.5)	19.06(82.5)
	<i>R.prowazekii</i>	No Ct	26.32(80.5)	24.59(80.5)	25.81(82.5)
Spotted Fever Group (SFG)	<i>R.felis</i>	No Ct	18.06(80.5)	17.09(80.5)	18.38(82.5)
	<i>R.honei</i>	No Ct	21.01(80.5)	18.72(80.5)	21.49(83.55)
	<i>R.helvetica</i>	No Ct	18.84(80.5)	16.83(80.5)	19.09(82.5)
	<i>R.sibirica</i>	No Ct	15.08(80.5)	13.74(80.5)	15.32(82.5)
	<i>R.japonica</i>	No Ct	18.25(80.5)	16.29(80.5)	18.27(82.5)
	<i>R.conorri</i>	No Ct	19.06(80.5)	15.9(80.5)	18.17(83.55)
Q fever	<i>C. burnetii</i>	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
Negative Control	NTC	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct

表五、*Orientia tsutsugamushi* Karp 56kD 基因全長及片段的重組蛋白質

Indirect ELISA 測試

60 min	kp2-4 (0418)		kp1-5 (0616)		kp2-4 (0614)		kp3-4 (0614)	
	indirect IgG	indirect IgM	indirect IgG	indirect IgM	indirect IgG	indirect IgM	indirect IgG	indirect IgM
941242A	0.314	0.111	0.314	0.105	0.391	0.109	0.341	0.114
941242B	0.810	0.140	0.364	0.110	2.094	0.179	1.497	0.138
941314A	0.395	0.368	0.265	0.193	1.058	0.569	0.764	0.390
941314B	0.562	1.064	0.335	0.436	1.003	2.026	0.859	1.340
941350A	0.242	0.127	0.234	0.121	0.265	0.118	0.292	0.119
941350B	1.319	0.180	0.660	0.132	2.278	0.210	2.136	0.155
941371A	0.406	0.163	0.357	0.144	0.949	0.152	1.061	0.141
941371B	2.379	0.395	1.126	0.253	3.759	0.519	3.458	0.333
941373A	0.314	0.157	0.325	0.152	0.244	0.151	0.311	0.157
941373B	0.562	1.180	0.263	0.479	0.882	2.046	0.535	1.541
941402A	0.309	0.194	0.264	0.182	0.373	0.182	0.357	0.204
941402B	0.625	1.298	0.411	0.596	1.281	2.247	0.789	1.445
941411A	0.196	0.092	0.213	0.088	0.274	0.089	0.245	0.089
941411B	0.158	0.100	0.198	0.094	0.268	0.099	0.289	0.096
941729A	0.194	0.137	0.196	0.145	0.265	0.149	0.270	0.146
941729B	0.326	0.189	0.375	0.187	0.361	0.200	0.405	0.182
941808A	0.428	0.098	0.316	0.089	0.657	0.105	0.586	0.105
941808B	0.364	0.093	0.286	0.086	0.614	0.089	0.625	0.104
941794A	0.277	0.132	0.307	0.121	0.350	0.134	0.400	0.147
941794B	0.339	0.147	0.362	0.134	0.437	0.153	0.507	0.163
941795A	0.294	0.188	0.319	0.166	0.318	0.204	0.403	0.179
941795B	0.102	0.073	0.105	0.076	0.105	0.076	0.111	0.088
941792A	0.242	0.091	0.214	0.086	0.399	0.086	0.343	0.095
941792B	0.329	0.081	0.422	0.084	0.622	0.087	0.466	0.085

(0418) kp2-4 (0.0372 mg/ml) 300ul / 5000 ul
(0616) kp1-5 (0.0753 mg/ml) 150ul / 5000 ul
(0614) kp2-4 (0.1185 mg/ml) 75ul / 5000 ul
(0614) kp3-4 (0.1865 mg/ml) 50ul / 5000 ul

表六、恙蟲病立克次體 ELISA 檢測系統之建立

檢體編號	病日	Karp		Gilliam		Kato		Karp+Gilliam+Kato	
		IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
1350A	1	0.075	0.626	0.125	0.433	0.080	0.509	0.243	0.931
1350B	36	0.131	2.499	0.132	1.337	0.082	0.367	0.231	1.922
1371A	1	0.084	0.353	0.098	0.906	0.071	0.300	0.186	1.682
1371B	19	0.680	2.280	0.398	3.280	0.111	0.363	0.730	3.522
1402A	3	0.068	0.698	0.092	0.274	0.007	0.837	0.183	0.629
1402B	16	2.291	1.476	1.613	1.062	0.132	1.118	2.585	2.010
14A	1	0.071	0.154	0.086	0.335	0.062	0.178	0.199	0.888
14B	16	0.131	0.159	0.142	0.390	0.087	0.169	0.329	1.073
95A	2	0.062	0.078	0.169	0.277	0.076	0.097	0.354	0.593
95B	13	0.403	1.172	0.692	0.987	0.121	0.176	1.255	1.685
1242A	4	0.056	0.097	0.072	0.219	0.059	0.112	0.115	0.504
1242B	17	0.186	1.609	0.111	2.258	0.075	0.211	0.191	3.056
1314A	8	0.280	0.285	0.330	0.791	0.069	0.086	0.587	1.347
1314B	20	2.102	0.647	1.777	0.472	0.180	0.121	3.185	0.991
1373A	6	0.063	0.139	0.078	0.215	0.070	0.123	0.160	0.592
1373B	23	1.371	1.445	1.553	1.092	0.161	0.137	2.888	2.312
1411A	NC	0.056	0.062	0.010	0.144	0.061	0.066	0.116	0.309
1411B	NC	0.080	0.207	0.075	0.223	0.080	0.233	0.116	0.567
1729A	NC	0.075	0.137	0.096	0.280	0.072	0.114	0.153	0.674
1729B	NC	0.069	0.150	0.090	0.259	0.072	0.120	0.158	0.666
1792A	NC	0.057	0.162	0.065	0.205	0.062	0.186	0.105	0.566
1792B	NC	0.059	0.354	0.067	0.265	0.059	0.210	0.120	0.718
1795A	NC	0.087	0.110	0.069	0.099	0.094	0.077	0.151	0.249
1795B	NC	0.055	0.041	0.064	0.049	0.057	0.039	0.124	0.091

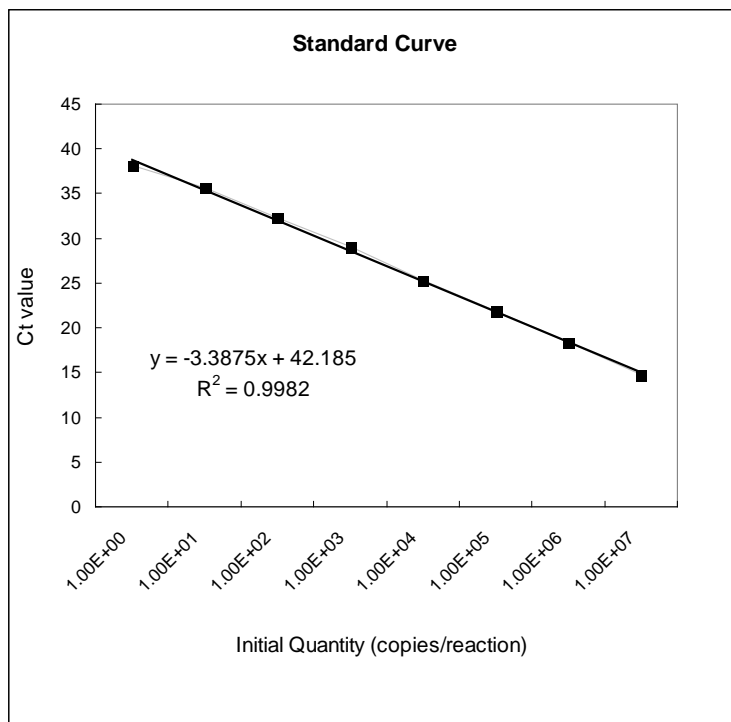
表七、恙蟲病立克次體 ELISA 檢測系統之建立

檢體 編號	病日	coating His-tag mAb (1:500)								coating 9-1 (1:200)							
		Karp (5.75ug/ml)				Gilliam (6.31ug/ml)				Karp (5.75ug/ml)				Gilliam (6.31ug/ml)			
		30mins		60mins		30mins		60mins		30mins		60mins		30mins		60mins	
		IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
1350A	1	0.078	0.876	0.132	1.775	0.079	0.923	0.133	1.872	0.079	0.766	0.130	1.543	0.084	0.852	0.147	1.700
1350B	36	0.063	0.371	0.098	0.772	0.081	1.694	0.140	2.958	0.093	1.808	0.160	3.044	0.087	1.637	0.148	2.873
1371A	1	0.068	0.188	0.107	0.375	0.066	1.199	0.103	2.360	0.074	0.455	0.118	0.936	0.071	1.078	0.111	2.120
1371B	19	0.084	0.249	0.150	0.510	0.292	3.047	0.618	3.183	0.293	2.440	0.603	3.195	0.383	3.092	0.793	3.271
1402A	3	0.064	0.730	0.105	1.514	0.060	0.822	0.093	1.699	0.081	0.758	0.140	1.531	0.079	0.865	0.131	1.739
1402B	16	0.076	0.980	0.132	1.991	0.767	1.774	1.624	3.160	0.802	1.839	1.652	3.293	1.080	1.910	2.164	3.208
14A	1	0.064	0.385	0.103	0.807	0.064	0.476	0.103	1.000	0.080	0.335	0.134	0.684	0.069	0.384	0.112	0.785
14B	16	0.077	0.366	0.129	0.764	0.104	0.518	0.190	1.066	0.114	0.384	0.205	0.781	0.115	0.436	0.211	0.884
95A	2	0.067	0.307	0.109	0.626	0.111	0.430	0.204	0.888	0.103	0.454	0.184	0.935	0.112	0.338	0.202	0.692
95B	13	0.068	0.444	0.115	0.926	0.416	1.301	0.877	2.479	0.289	1.924	0.599	3.044	0.407	1.171	0.833	2.239
1242A	4	0.051	0.143	0.073	0.278	0.056	0.183	0.079	0.363	0.059	0.157	0.087	0.301	0.058	0.193	0.079	0.378
1242B	17	0.058	0.251	0.089	0.516	0.086	2.431	0.146	3.029	0.096	2.227	0.173	3.195	0.095	2.302	0.159	3.020
1314A	8	0.058	0.149	0.088	0.291	0.203	0.689	0.407	1.431	0.198	0.503	0.398	1.044	0.252	0.732	0.503	1.497
1314B	20	0.073	0.196	0.012	0.397	0.973	0.565	2.015	1.174	0.993	0.724	2.039	1.488	1.070	0.674	2.140	1.379
1373A	6	0.057	0.188	0.083	0.371	0.059	0.266	0.093	0.545	0.065	0.261	0.101	0.527	0.068	0.281	0.106	0.566
1373B	23	0.077	0.260	0.130	0.531	0.779	1.534	1.066	2.903	0.450	1.805	0.932	3.152	0.945	1.540	1.881	2.987
1411A	6	0.055	0.047	0.078	0.063	0.062	0.051	0.091	0.067	0.059	0.052	0.085	0.074	0.058	0.057	0.085	0.081
1411B	15	0.050	0.086	0.069	0.150	0.052	0.107	0.075	0.194	0.057	0.124	0.083	0.229	0.057	0.149	0.085	0.298
1729A	6	0.053	0.187	0.073	0.376	0.060	0.259	0.087	0.541	0.070	0.195	0.111	0.384	0.071	0.246	0.111	0.495
1729B	11	0.053	0.329	0.075	0.693	0.058	0.396	0.088	0.836	0.072	0.321	0.117	0.657	0.071	0.399	0.109	0.825
1792A		0.052	0.128	0.074	0.246	0.053	0.189	0.075	0.368	0.070	0.229	0.129	0.465	0.054	0.246	0.076	0.491
1792B		0.052	0.157	0.071	0.308	0.052	0.240	0.071	0.478	0.054	0.419	0.078	0.863	0.055	0.304	0.075	0.612
1795A		0.051	0.074	0.070	0.124	0.056	0.075	0.080	0.123	0.063	0.100	0.096	0.179	0.066	0.121	0.100	0.225
1795B		0.051	0.049	0.068	0.062	0.057	0.051	0.081	0.066	0.052	0.051	0.077	0.069	0.059	0.060	0.081	0.083

表八、斑點熱立克次體 ELISA 檢測系統之測試

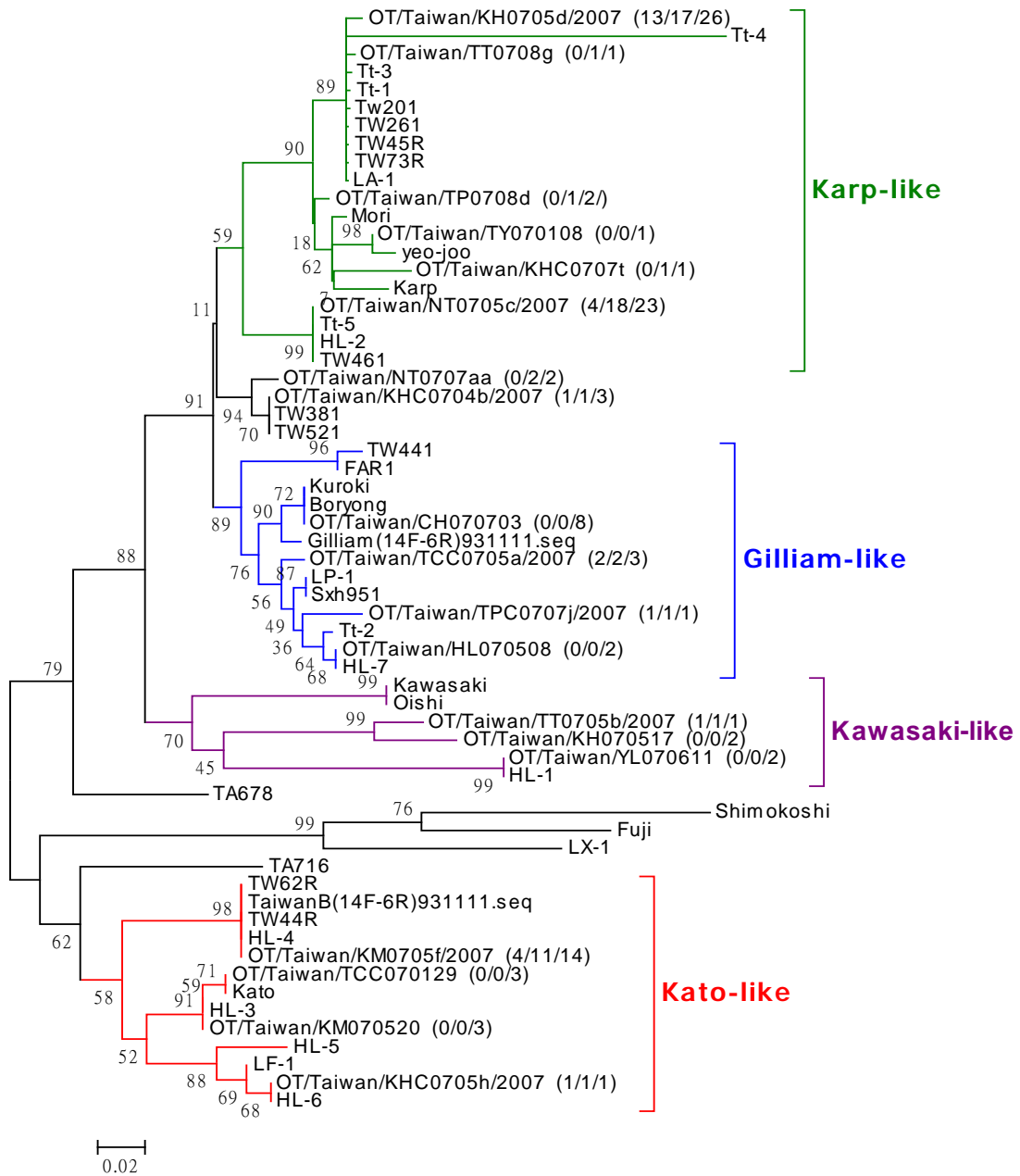
Sample #	IFA- Spotted fever group (R. rickettsii)	rOmpB-S1 (3ug/ml) (R. japonica)	rOmpB-L1 (10ug/ml) (R. japonica)
8514	+	0.690	ND
8515	+	0.212	0.086
8516	+	0.330	0.135
8517	+	0.226	0.063
8518	+	0.261	0.083
8513	-	0.138	0.075
8519	-	0.406	0.786
8523	-	0.158	0.060
8525	-	0.067	0.046
8533	-	0.165	0.070
1633	ND	0.390	0.107
1634	ND	0.298	0.107
1635	ND	0.282	0.103
1636	ND	0.298	0.089
1637	ND	3.592	2.653
1638	ND	1.619	0.215
1638	ND	0.257	0.063
1640	ND	0.190	0.076
1641	ND	0.253	0.101
1642	ND	0.126	0.074
NMS1	-	0.090	0.052
NMS2	-	0.124	0.058

圖一、恙蟲病引子組 RST-14F-6R 之標準曲線圖



**Ct=38,
1~5 copies/rxn**

圖二、恙蟲病立克次體之演化樹分析



圖三、*Orientia tsutsugamushi* Karp 56kD 基因全長及片段的重組蛋白質之

基因圖譜

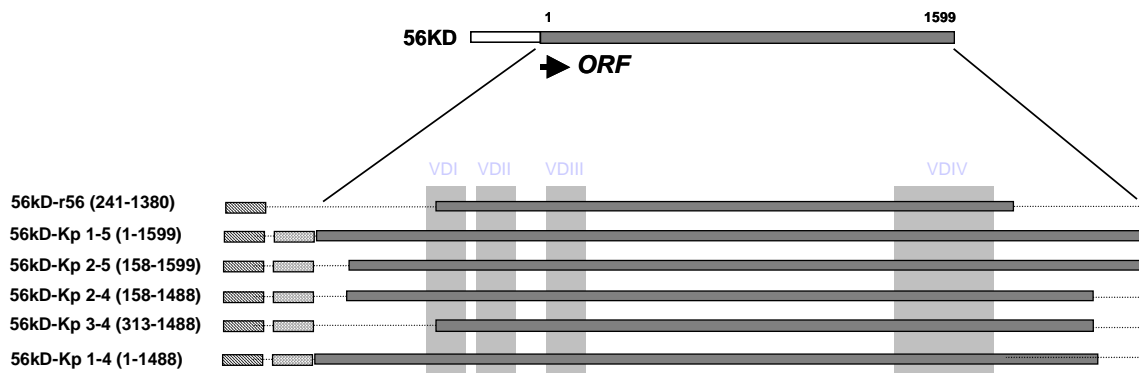


Fig. 1. Schematic representation of full length of ORF and truncated 56kD recombinant proteins used in this study. His tag (hatched box); HRV3C (cross-hatched boxes)

圖四、Rickettsia sp. OmpA 及 ompB 基因全長及片段的重組蛋白質之基因

圖譜

Expression of SFG Recombinant Protein

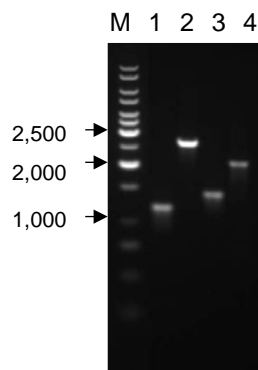
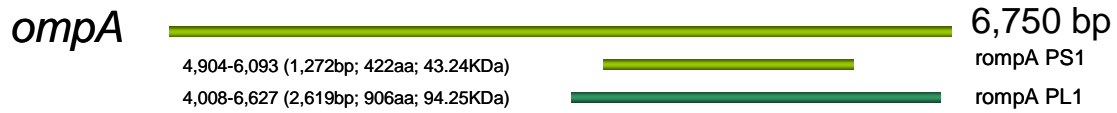


FIG. PCR products *ompA* and *ompB*

Lane M, 1Kb DNA Marker

Lane 1, rompA PS1

Lane 2, rompA PL1

Lane 3, rompB PS1

Lane 4, rompB PL1