

出國報告(出國類別：研習)

赴美研習「新興人畜共通傳染病原
體立克次體診斷技術」

服務機關：衛生福利部疾病管制署

姓名職稱：楊素鈴 技正

派赴國家/地區：美國/馬里蘭州

出國期間：108年6月2日至6月12日

報告日期：108年7月22日

摘要

由於國際間交通往來頻繁、全球溫室效應及氣候變遷等因素，使得新興/再浮現立克次體傳染病在全世界散佈範圍擴大，對人類健康所造成的威脅日益嚴重。近年來立克次體如恙蟲病、地方性斑疹傷寒、人類顆粒細胞無形體症、人顆粒球艾利希氏體症皆引起急性高燒、淋巴結腫大等臨床症狀，有時會併發肺炎或肝功能異常。立克次體的臨床診斷不易判定，然而許多病原體的感染都會引發類似的症狀，難於區別。因此常見立克次體的誤診或延誤了正確治療時機，故有必要在急性的早期需建立高靈敏、快速的核酸檢測系統，檢測出立克次體。

本次職奉派前往美國馬里蘭州銀泉的海軍醫學研究中心研習新興人畜共通傳染病原體立克次體相關技術與參加第 30 屆美國立克次體年會，將習得技術與新知應用於例行性病原監測業務，以提高本署檢驗量能。同時也分享我國立克次體防治政策及經驗，期望進一步穩固雙方合作關係，有助於未來與國際間的防疫檢驗資訊交流與持續合作。

目次

一、摘要	2
二、目的	4
三、過程	6
四、心得及建議	21
五、附件 1.....	23

目的

立克次體目(order)可分成立克次體科及無形體科，立克次體科可再細分 2 種屬，分別為 *orientia* genus 及 *Rickettsia* genus，本次研習重點為台灣最重要的立克次體傳染病-恙蟲病。恙蟲病（又稱叢林型斑疹傷寒），為患者遭帶有病原 *Orientia tsutsugamushi* (O.t)之恙蟲幼蟲叮咬，所引起的急性傳染性疾病。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。

恙蟲病之地理分佈，主要是在東南亞三角區域，北到蘇俄南端，南到澳洲北部，東到阿富汗，巴基斯坦，涵蓋整個東南亞國家皆為流行地區 (tsutsugamushi triangle)。

台灣地區的恙蟲病近年來每年約有 400 個確定病例，在各縣市均有病例報告，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 歲及 50~54 歲。

本次職奉派前往美國海軍醫學研究中心研習最新立克次體核酸重組酶聚合酶擴增(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)快速診斷與該中心建置血清學(ELISA)相關診斷技術，RPA是一種可以在固定的溫度下進行反應，且只要 15 分鐘就可以完成核酸增值的一項技術，較例行性所用RT-PCR更為便利與快速，RT-PCR的缺點是反應進行時需要一個能升降溫度的精密昂貴儀器，而且往往需要較長的時間進行核酸擴增反應。

立克次體的RPA方法，其優點為可在疾病的早期進行偵測，以等溫條件下進行核酸增殖，可在極短時間完成實驗結果與判定，有利於開發出定點照護 (point-of-care) 核酸檢測方法，為及早診斷立克次體傳染病原提升檢驗效能，本次奉派前往美國NMRC研習立克次體核酸與血清學相關診斷技術，期望將習得技術應用於例行病原監測業務，以提高本署檢驗量能。

同時也分享我國立克次體防治政策及經驗，期許穩固雙方合作關係，將有助於未來與國際間的防疫檢驗資訊交流與持續合作。

過程

一、行程

此次奉派赴美國研習地點為美國馬里蘭州銀泉的海軍醫學研究中心 (Naval Medical Research Center, 簡稱 NMRC) 的 Viral and Rickettsial Disease Department，本次研習期間自民國 108 年 6 月 3 日起至 6 月 7 日止共 5 天，及 6 月 8 日從華盛頓州前往新墨西哥州聖塔菲參加美國立克次體第 30 屆國際研討會，該年會從 6 月 8 日起至 6 月 11 日止共 4 天，含路程總計 12 天。相關時間、地點及行程內容詳述如下：

日期	工作日誌	行程內容	地點
108.6.2-108.6.2	啟程	啟程、抵達	臺北→日本→華盛頓
108.6.3-108.6.8	研習	研習檢驗技術	海軍醫學研究中心
108.6.8-108.6.8	啟程	啟程、抵達	華盛頓→新墨西哥
108.6.8-108.6.11	國際研討會	參加年會	新墨西哥
108.6.12-108.6.13	返程抵達	路程	新墨西哥→日本→臺北

海軍醫學研究中心 (NMRC) 的 Viral and Rickettsial Disease Department 研究機構位於馬里蘭州銀泉，距離華盛頓大約兩公里的城市，NMRC 坐落在沃爾特里德陸軍醫療中心(圖一)，NMRC Infectious Disease Directorate 包括四個研究部

門：(1)瘧疾、(2)腸道疾病、(3)病毒和立克次體病、(4)傷口感染的相關研究部門。



圖一、海軍醫學研究中心 (NMRC)

此次研習的實驗室是在病毒和立克次體病部門 (Viral and Rickettsial Disease Department)，實驗室負責人為 Dr. Chien-Chung Chao，對病媒立克次體的研究已有 20 年的學術研究經歷，該研究室主要負責立克次體診斷相關研究；同時也在東南亞國家進行恙蟲病的血清學相關研究，本次研習的所有訓練，是由該實驗室負責人 Dr. Chien-Chung Chao 親自安排督導，並由研究員 Dr. Le Jiang 及實驗室資深同仁 Miss Zhiwen Zhang 全程指導教學。

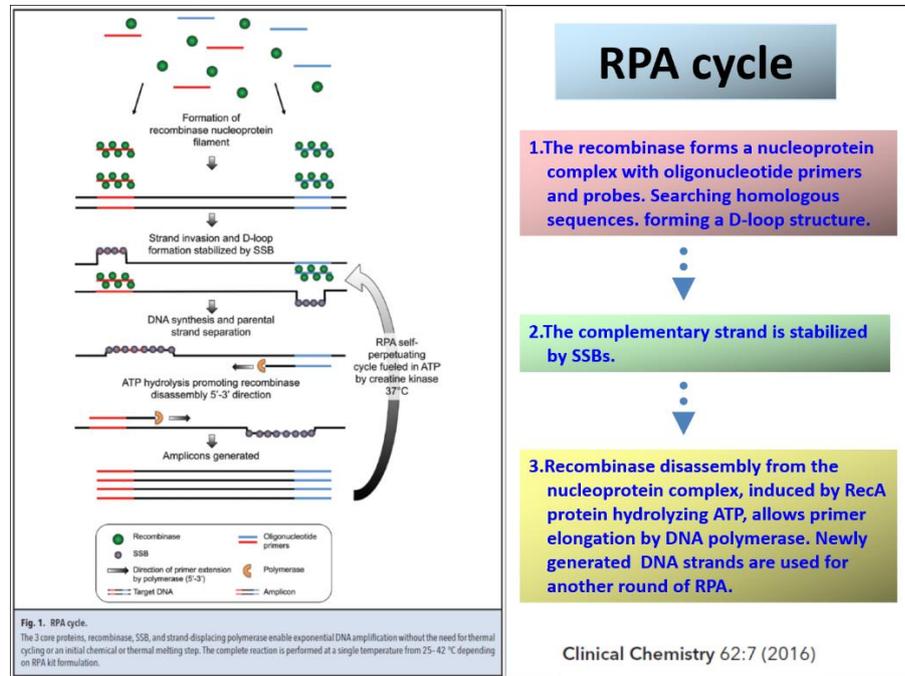
二、研習內容

本次研習診斷技術的內容包含：

(一) 研習 NMRC Viral and Rickettsia Disease 的 RPA 方法

恙蟲病為立克次體目(Rickettsiales order),立克次體科(Rickettsiaceae family)的東方體菌屬(orientia genus)，是絕對細胞內寄生的細菌，在疾病感染早期雖然可用 RT-PCR 做檢測，但 RT-PCR 缺點是反應進行時需要一個能升降溫度的

精密昂貴儀器，而且往往需要較長的時間(3 個小時)進行核酸擴增反應，所需經費不僅昂貴且費時，本次藉由研習 RPA (圖二)，可在固定溫度(37°C)、短時間(15 分鐘)即可完成反應。



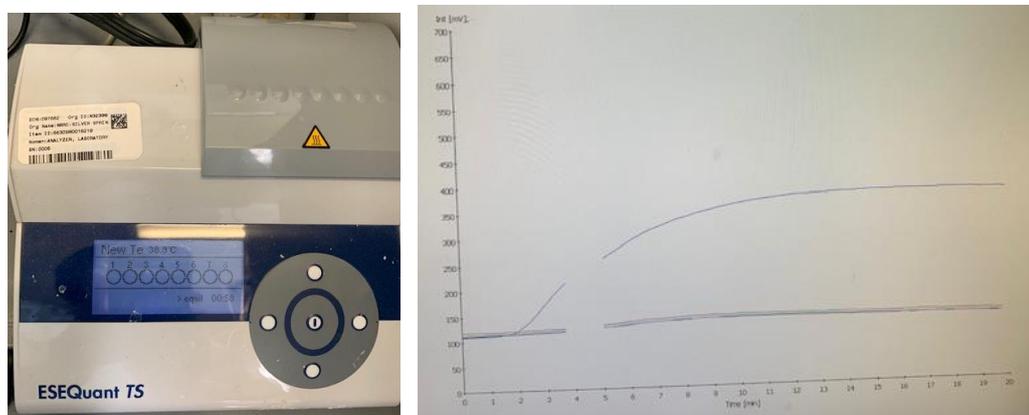
圖二、RPA 反應過程的原理流程圖

本實驗由該實驗室研究員 Dr. Le Jiang 指導教學，帶我準備 RPA 反應所需的成分(圖三)，讓我了解如何用簡單又快速 RPA 偵測恙蟲病(病原體 *Orientia tsutsugamushi*)核酸 (圖四)，該方法能在短短的 15 分鐘內即可偵測到恙蟲病的核酸，(甚至在第 5 分鐘即可區分出陽性)，而同屬於立克次體屬其它菌種，如地方行斑疹傷寒 (病原體 *Rickettsia typhus*)、人類顆粒細胞無形體症(病原體 *Anaplasma phagocytophilum*)及人類顆粒球艾利希氏體症(病原體 *Ehrlichia chaffeensis*) 則不會有反應，顯示 RPA 具有極高靈敏度與優異的專一性。

RPA reaction

1. Preparation of RPA mixture
 - ① 2.1 ul of forward primer (5 uM)
 - ② 2.1 ul of reverse primer (5 uM)
 - ③ 0.6 ul of Twistamp probe (10 mM)
 - ④ 3 ul of template (recombinant plasmid 56kDa– pUC19 or control plasmid pUC19 at a concentration of 1×10^4 copies/ml)
 - ⑤ 10.2 ul of DNase- and RNase-free water
 - ⑥ 29.5 ul of rehydration buffer were mixed together and added to the reaction tubes to rehydrate the pellet containing freeze-dried recombinase, polymerase, and single-strand binding protein.
 - ⑦ Then 2.5 ul of MgAc (280 mM) was added to the tube cap.
2. 37°C incubate for 15 min

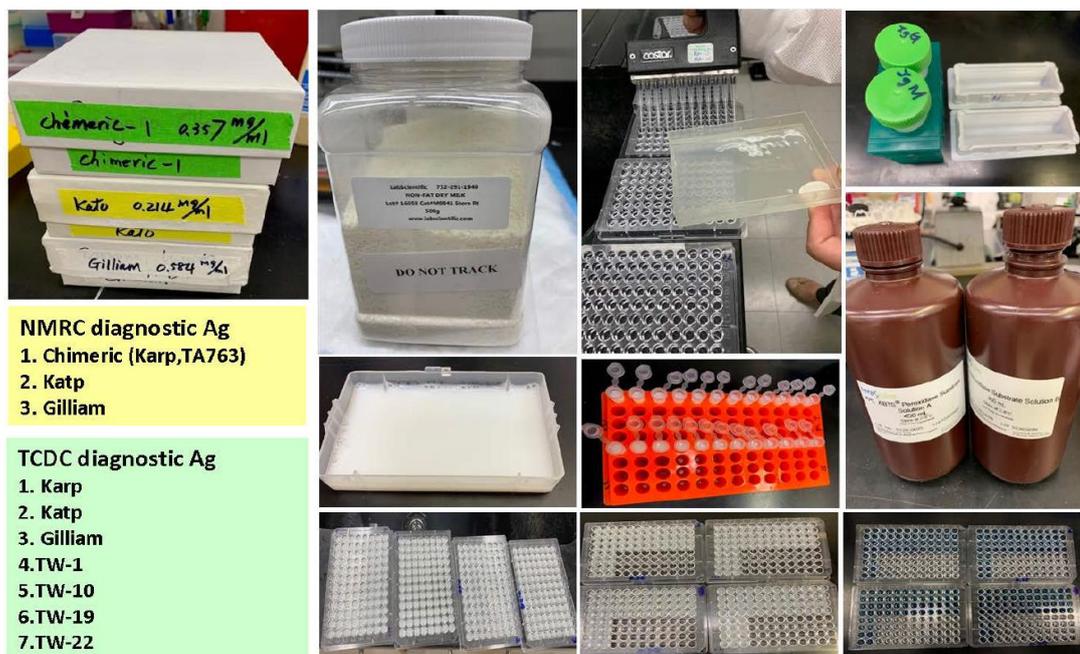
圖三、 RPA 反應所需的試劑成分包括正逆向引子(Forward primer and Reverse primer)、螢光偵測劑(probe)、少許核酸、水、復原水溶液與鎂離子，放入恆溫的儀器內作用即可及時偵測。



圖四、 RPA 反應結果，只有恙蟲病 (藍色線條)能在 10 分鐘內即可偵測到，地方行斑疹傷寒 (綠色線條)、人類顆粒細胞無形體症(紅色線條)及人類顆粒球艾利希氏體症 (紫色線條)、NC (粉色)則不會有反應。

(二) 研習 NMRC Viral and Rickettsia Disease 血清學 ELISA 方法

該實驗室專責為恙蟲病的血清學診斷，他們將 2 種 world-wide phototype strains (Kato, Gilliam)及 1 種 world-wide phototype strains (Karp)與泰國菌株 TA763 的 TSA56 主要抗原蛋白質作成 chimeric protein 表現在 *E.coli* expression system, 總共表現出 3 種重組蛋白質，作為血清學的診斷抗原，以 PBS 稀釋成為 1 ug/mL, 並 coating 在 96 wells ELISA plates, 每個 well 加入 100 uL 使成為 0.1 ug/well 的量，放入冰箱 2 個晚上後再進行 wash, 以 PBST (0.1% tween-20 in 1x PBS)重複清洗 3 次；加入 10% milk in PBS 進行 blocking 反應 1 小時，以 PBST (0.1% tween-20 in 1x PBS)清洗 3 次；最後再依序加入稀釋 100X 的血清抗體、二級抗體與呈色劑(NMRC ELISA SOP 詳見附件一)，我們也用 TCDC 所表現 7 種不同 strains [3 種 world-wide phototype strains (kato, Gilliam, karp)及 4 種 Taiwan local strains (TW-1, TW-10, TW-19, TW-22)] 進行 ELISA 平行比對(圖五)，結果我們發現 TCDC 的抗原(TW-0.25 與 TW-0.39)診斷東南亞國家恙蟲病的血清似乎較 NMRC 的抗原更靈敏也更專一性(表一)。



圖五、NMRC Viral and Rickettsia Disease 實驗室進行 ELISA 研究

表一、TCDC 與 NMRC 的抗原對不同國家恙蟲病血清進行 ELISA 測試，結果顯示 TCDC 的抗原偵測效果優異，能靈敏偵到恙蟲病的感染血清也更具專一性。

sera from country	Sample	IFA Titer		IgM			IgG		
		IgG	IgM	NMRC	TW-0.39	TW-0.25	NMRC	TW-0.39	TW-0.25
Thailand	11-1-723	1:400	1:200	1.4528	1.4944	1.43735	0.7134	1.24965	1.2812
	11-1-725	1:200	1:400	1.4491	1.47815	1.4377	0.69735	1.2064	1.2501
	11-1-748	1:200	1:400	1.44045	1.5159	1.45765	0.6787	1.2458	1.317
	11-1-749	1:100	1:800	1.45135	1.4699	1.47785	0.7212	1.14335	1.201
	11-1-771	1:400	1:400	1.40535	1.47495	1.44815	1.02435	1.29865	1.3307
	11-1-780	1:400	1:400	1.46465	1.45095	1.4495	1.23365	1.36705	1.35965
Sri Lanka	Duke 2250C	+	+	1.47475	1.46965	1.4634	1.08895	1.33595	1.3799
	Duke 2447C	+	230	1.15965	1.3248	1.36535	1.2198	1.4022	1.4244
Taiwan	Pool MAK day11	+	+	1.4098	1.48975	1.47745	1.06665	1.40565	1.47295
	Pool MAK day10 1:100	+	+	0.74445	1.17625	1.16705	0.2264	0.5051	0.59995
NC	NHS	-	-	0.33725	0.1443	0.1377	0.06015	0.05615	0.0383
	NHS3	-	-	0.36595	0.1233	0.11735	0.05285	0.0425	0.0438
	NHP	-	-	0.62815	0.23955	0.3167	0.0527	0.2388	0.0628
	NHP A-	-	-	0.4052	0.2247	0.29575	0.0772	0.0646	0.065
	930235	-	-	0.1306	0.0631	0.0652	0.10375	0.17255	0.09
	930239	-	-	0.08085	0.05185	0.051	0.19095	0.062	0.0507
	930240	-	-	0.53985	0.1949	0.179	0.086	0.0462	0.03805
	930241	-	-	0.2525	0.1185	0.12175	0.0408	0.05155	0.0424
	930242	-	-	0.6875	0.28145	0.266	0.0655	0.05495	0.03975
	930246	-	-	0.15485	0.0542	0.0785	0.0738	0.0554	0.04485

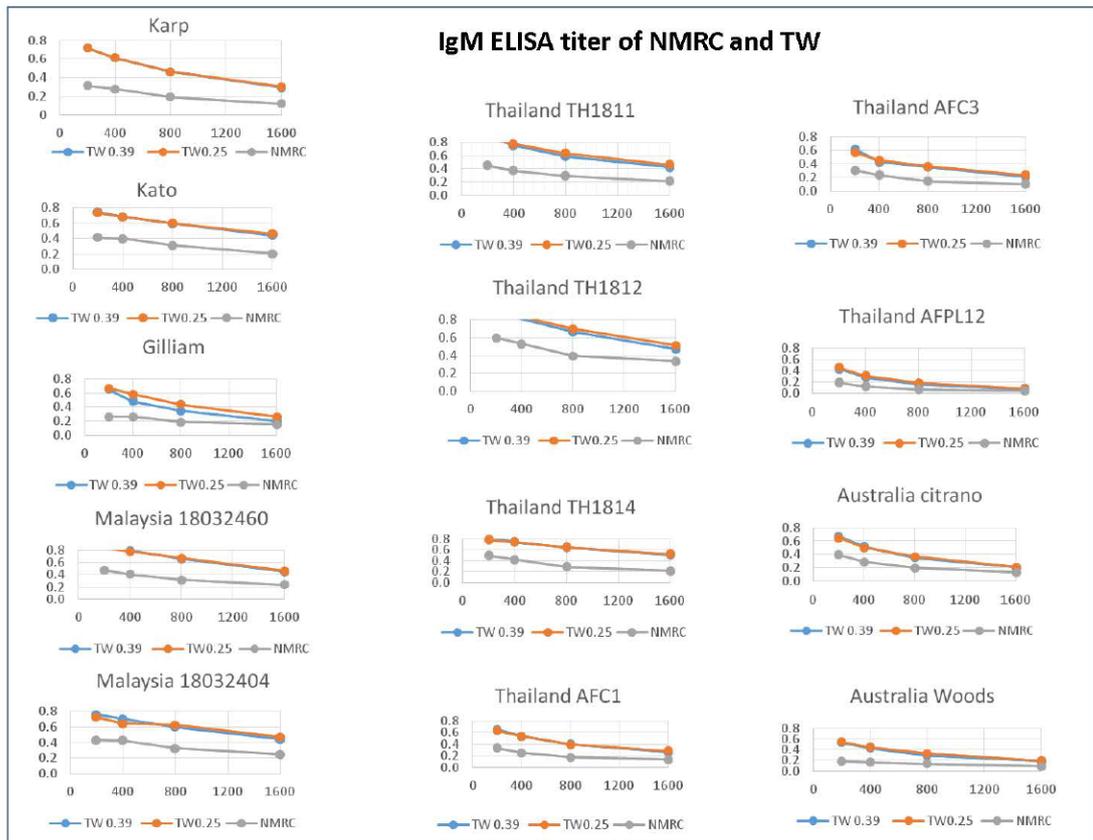
恙蟲病在世界地理的分佈主要是在東南亞國家，每年約有 100 百萬感染個案發生，Dr Chien-Chung Chao 也與東南亞的國家有合作的研究團隊，他們實驗室除了取得亞太地區的陽性血清外，NMRC 也有來自亞太區域的恙蟲病菌株，將這些來自不同國家的菌株免疫小鼠產製抗體，進行分析 NMRC 與 TCDC 診斷抗原辨識這些不同抗體的效能，此實驗由我與 Miss Zhiwen Zhang 分別重複進行 2 次，結果皆顯示 TCDC 抗原(TW-0.25 與 TW-0.39)較 NMRC 抗原更靈敏，能偵測出來自不同國家菌株所產生的 IgM (表二)與 IgG (表三)，特別是在疾病早期，更能靈敏診斷陽性檢體的 IgM，用 EXCEL 進一步繪製成圖四，可以更清楚看出 TCDC 與 NMRC 的診斷抗原的效能與差異(圖六)。

表二、TCDC 抗原(TW-0.25 與 TW-0.39)與 NMRC 抗原偵測 IgM 結果

IgM 35 min												
strain	NMRC				TW 0.39				TW 0.25			
	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:200	1:400	1:800	1:1600
karp	0.314	0.278	0.192	0.122	0.720	0.613	0.464	0.293	0.720	0.615	0.465	0.303
kato	0.414	0.398	0.311	0.200	0.744	0.685	0.594	0.443	0.734	0.681	0.598	0.463
Australia citrano	0.398	0.292	0.201	0.136	0.671	0.519	0.351	0.210	0.651	0.501	0.369	0.211
Thailand TH1811	0.447	0.373	0.289	0.216	0.887	0.752	0.583	0.422	0.861	0.774	0.634	0.463
Thailand TH1812	0.599	0.535	0.399	0.338	0.912	0.815	0.664	0.476	0.902	0.834	0.704	0.519
Thailand TH1814	0.498	0.423	0.296	0.217	0.839	0.750	0.654	0.511	0.791	0.743	0.650	0.522
Thailand AFC1	0.335	0.249	0.175	0.138	0.651	0.537	0.400	0.267	0.635	0.536	0.398	0.283
Thailand AFC3	0.305	0.234	0.144	0.102	0.617	0.430	0.357	0.215	0.571	0.451	0.363	0.232
Thailand AFPL12	0.188	0.121	0.075	0.046	0.438	0.282	0.159	0.075	0.455	0.314	0.187	0.087
Malaysia 18032404	0.438	0.430	0.330	0.250	0.764	0.705	0.604	0.442	0.731	0.646	0.632	0.469
Malaysia 18032460	0.474	0.410	0.312	0.233	0.870	0.792	0.658	0.447	0.836	0.782	0.669	0.463
Gilliam	0.264	0.267	0.192	0.158	0.652	0.483	0.351	0.197	0.668	0.582	0.439	0.262
Australia Woods	0.195	0.168	0.141	0.093	0.532	0.433	0.296	0.189	0.547	0.449	0.327	0.196

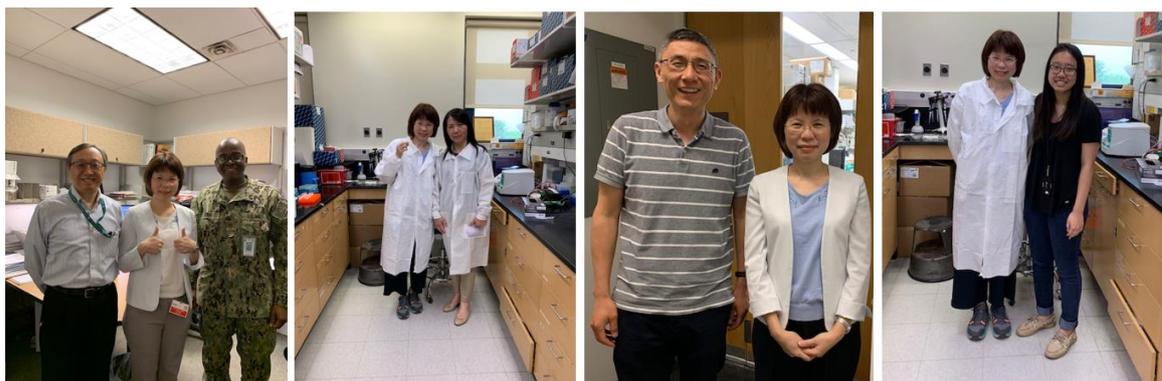
表三、TCDC 抗原(TW-0.25 與 TW-0.39)與 NMRC 抗原偵測 IgG 結果

IgG 35min												
strain	NMRC				TW 0.39				TW 0.25			
	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
karp	1.425	1.480	1.466	1.420	1.391	1.485	1.517	1.483	1.399	1.482	1.519	1.481
kato	1.416	1.491	1.507	1.480	1.375	1.459	1.506	1.480	1.379	1.471	1.499	1.490
Australia citrano	1.421	1.488	1.458	1.353	1.395	1.486	1.520	1.459	1.389	1.498	1.529	1.464
Thailand TH1811	1.424	1.487	1.441	1.416	1.362	1.464	1.503	1.476	1.370	1.476	1.508	1.488
Thailand TH1812	1.400	1.483	1.508	1.467	1.343	1.451	1.488	1.472	1.360	1.459	1.498	1.469
Thailand TH1814	1.407	1.482	1.509	1.480	1.352	1.445	1.481	1.454	1.361	1.450	1.487	1.462
Thailand AFC1	1.431	1.491	1.462	1.356	1.363	1.457	1.500	1.480	1.376	1.468	1.510	1.488
Thailand AFC3	1.441	1.492	1.454	1.270	1.371	1.460	1.510	1.452	1.374	1.483	1.516	1.466
Thailand AFPL12	1.439	1.370	0.958	0.298	1.414	1.496	1.464	1.024	1.424	1.506	1.453	1.070
Malaysia 18032404	1.409	1.485	1.540	0.736	1.352	1.439	1.479	1.452	1.353	1.451	1.491	1.459
Malaysia 18032460	1.410	1.494	1.529	0.900	1.354	1.441	1.493	1.459	1.351	1.448	1.503	1.469
Gilliam	1.442	1.509	1.396	0.707	1.379	1.486	1.528	1.419	1.386	1.489	1.531	1.384
Australia Woods	1.453	1.422	1.302	1.045	1.425	1.440	1.447	1.381	1.453	1.450	1.439	1.377



圖六、 TCDC 與 NMRC 診斷抗原偵測不同國家菌株的抗體 IgM

由於台灣是整個流行地區(tsutsugamushi triangle)的中間交會點，因此 NMRC Viral and Rickettsia Disease 實驗室同仁(圖七)對於恙蟲病在台灣的流行病學、診斷開發與建置、與相關防治也很有興趣，希望我能對他們的實驗室做一些台灣的立克次體簡介，於是在 6 月 7 日下午簡介 2006 年到 2018 年台灣立克次體的分子流行病學與快速診斷研發成果，會議中報告了 30 分鐘，提問 50 分鐘，他們很佩服台灣對立克次體有如此完善的檢驗與研發診斷平台，及本署研檢中心能製備出多元化的立克次體特異性單株抗體，希望未來能進行雙邊交流恙蟲病的診斷抗原，也藉此提升台灣對立克次體相關研究發展的能見度。



圖七、實驗室同仁合照（右 1 為 Rickettsia 實驗室負責人 Dr. Chien-Chung Chao 與 Viral and Rickettsia Disease 主任 Dr. Gabriel Defang。右 2 為實驗室資深助理 Miss Zhiwen Zhang。右 3 研究員 Dr. Le Jiang 負責教導 RPA。右 4 為暑期生 Jacklyn Chen 合影

(三) 參加美國立克次體第 30 屆年會

今年的美國立克次體年會是第 30 屆年會，在新墨西哥的聖塔菲地區舉辦，舉辦期間為 6 月 8 日至 6 月 11 日止共計四天 (圖八)。

	Saturday June 8	Sunday June 9	Monday June 10	Tuesday June 11	
<p>American Society for Rickettsiology</p> <p>30th Meeting</p> <p>Santa Fe, NM June 8-11, 2019</p> <p>Rickettsial Diseases at the Vector-Pathogen Interface</p>	Breakfast in the Cava Lounge 7:00-8:00				
	All talks/Sessions and Business Meeting will be in the Anasazi Ballroom	NIH funded Workshop	Session 5: Eco/Epi 8:00-10:05	Session 8: T4 Effectors 8:00-9:50	
		Session 1: Ticks 8:00-9:40	Break	Break	
		Break	Session 6: Vacc/Inf, Diag & Treat 10:30-11:45	Session 9: Omics 10:30-12:00	
	Registration noon->	Session 2: Fleas and Lice 10:10-12:20	Free Afternoon	Optional Outing to Taos	Lunch Cava and Zia Posters
		Lunch on your own			Session 10: Path I 2:00-3:15
	Special Symposium 3:00-6:00	Session 3: Microbiome 2:00-3:45	Dinner on your own	Dinner on your own	Break
	Historical Lecture 6:30-7:30	Posters Zia Ballroom 3:45-5:30			Session 11: Path II 3:45-5:00
	Mixer Presidential Suite 7:30-9:30	Dinner on your own	Session 4: Mentoring Session 7:30-9:30	Session 7: H-P-V Interactions 7:30-9:30	Business Meeting 5:00-6:00
					Gala Dinner Cava Lounge 7:00-9:00

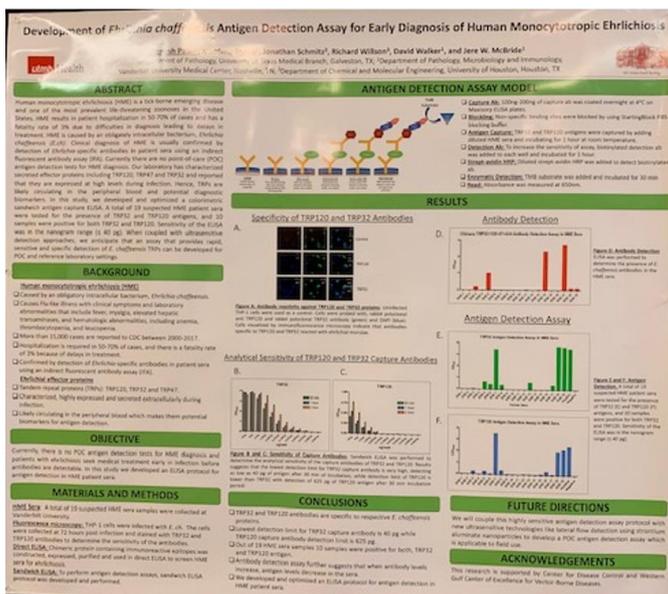
圖八、第 30 屆美國立克次體年會暨研習課程表

該年會總主題為 Tick, Fleas and lice, Microbiome, Mentoring, Eco/Epi, Vaccine/Diagnosis/Treat, Host-Pathogen-Vector interactions, T4 Effectors, Omics, Pathogenesis. 並有相關海報參展，與我們實驗室較相關的議題為診斷、疫

苗開發及流行病學的監測等，其它多屬理論的學術科學（例如恙蟲病原體的感染會造成細胞內 NF-κB 進入細胞核等調控來抑制細胞的凋亡；*Anaplasma phagocytophilum* 在染 HL60 細胞後，是藉由和細胞內 cytoskeletal protein Vimentin 相互作用的訊息傳遞，而引發後續致病原理；立克次體在腦中可能藉由 Annexin a2 作用來調控出血機制；*Ehrlichia Chaffeensis* 的單株抗體如何以 humoral immunity 和細胞交互作用來保護病原體的感染；立克次體的感染會造成細胞內那些轉譯基因的表現等）。

在這次年會研習到 *Ehrlichia Chaffeensis* 的診斷開發研究是以 TRP120, TRP32 等作為診斷抗原(圖九)，可以用來篩檢 *Ehrlichia Chaffeensis* 感染病人的血清抗體，這剛好可以應用到我們明年的 109 年科技計畫，我們可以再額外加入另一個診斷抗原(P28)重組蛋白質，以達全方位快篩，此次參加年會能夠學習並應用到明年 *Ehrlichia Chaffeensis* 的開發 ELISA 診斷系統，頗有成效。

Diagnostic: ELISA of *Ehrlichia Chaffeensis*



- * Human monocytotropic ehrlichiosis (HME) is a tick-borne emerging disease.
- * HME results in patient hospitalization in 50-70% of cases and has a fatality rate of 3%.
- * Currently there are no point-of-care (POC) antigen detection tests for HME diagnosis.
- * TRP120, TRP47 and TRP32 are expressed at high levels during infection as potential diagnostic biomarkers.
- * A total of 19 suspected HME patient sera were tested for the presence of TRP32 and TRP120 antigens, and 10 samples were positive for both TRP32 and TRP120.
- * That provides rapid, sensitive and specific detection of *E. chaffeensis*. TRPs can be developed for POC and reference laboratory settings.

圖九、*Ehrlichia Chaffeensis* 的 ELISA 開發 system

另外也有看到 *Rickettsia felis* 的 ELISA 診斷的開發研究，這和我們今年所開發的議題幾乎是一樣的，但我們實驗室是以 ompA 作為診斷抗原，用 E.coli expression 表現並純化出，作為篩檢疑似病人的 biomarker。而此參展的研究則是利用(1) *R. felis*-infected cat flea feces, (2) *R. felis* cultured in ISE6 cells, (3) *R. parkeri* cultured in Vero cells 作為免疫抗原免疫小鼠製得 polyclonal Antibody 進行 IFA 與 ELISA 研究，結果發現(1) *R. felis*-infected cat flea feces, 與(2) *R. felis* cultured in ISE6 cells 這 2 種抗原免疫所得的 serum 對 ELISA 的 profile 與 titer 有所區別 (Results revealed that sera antibodies had different reaction profiles between *R. felis*-infected cat flea feces and cultured *R. felis* antigens)，這些初步結果顯示 *R. felis* 病原體從感染過的貓蚤排汗物分泌出來後，可能會進行抗原的轉變 (a shift of Ag expression)，使得 *R. felis* Ag 與其它 SFG Rickettsia Ag 的血清反應能有所區隔 (圖十)。

Diagnostic: ELISA of *Rickettsia felis*-1

LSU Developing an ELISA as a diagnostic assay for the detection of *Rickettsia felis*
 Hanna Laukaitis*, Kelsey Legendre, and Kevin Macaluso
 Vector-borne Disease Laboratories, Department of Pathobiological Sciences
 School of Veterinary Medicine, Louisiana State University

INTRODUCTION
 The genus *Rickettsia* is composed of four groups based on serological, biological, and genetic characteristics. Among the members of the group SFG, the species *Rickettsia felis*, the causative agent of Rickettsia spotted fever, was initially recognized when the SFG was reclassified into the TRO in its revised nomenclature and taxonomic characteristics.

HYPOTHESIS
 R. felis changes antigen expression when secreted from an infected cat flea. This will be differential antigen recognition when compared to cultured R. felis.

MATERIALS AND METHODS
 Rickettsia culture: R. felis were cultured in the tick-derived embryonic cell line DF-91 and Rickettsia antigen was cultured in DMEM.

RESULTS
 Figure 1. ELISA reactivity between primary mouse sera against R. felis antigens was evaluated by fluorescence microscopy (Figure 1).

CONCLUSIONS
 1. Identification of gene expression have previously been documented for other rickettsial pathogens, such as *Anaplasma phagocytophilum*, *Orientia tsutsugami*, and *Rickettsia typhi* in an infected host (2011).

ACKNOWLEDGEMENTS

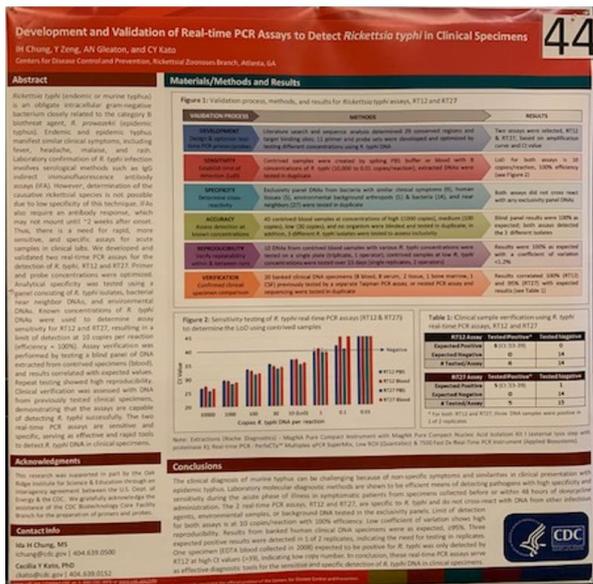
- * *R. felis* infection of hosts has the potential to occur through infectious flea feces.
- * To develop an ELISA and to determine its sensitivity in differentiating *R. felis* from the SFG *Rickettsia*.
- * Sera collected from BALB/c mice injected with (1) *R. felis*-infected cat flea feces, (2) *R. felis* cultured in ISE6 cells, (3) *R. parkeri* cultured in Vero cells were exposed to *R. felis* cultured in ISE6 cells and *R. felis*-infected cat flea feces antigens to assess cross-reactivity.
- * Results revealed that sera antibodies had different reaction profiles between *R. felis*-infected cat flea feces and cultured *R. felis* antigens.
- * The preliminary results suggest that *R. felis* undergoes a shift in Ag expression when secreted from a cat flea, allowing for serological differentiation of *R. felis* from the SFG *Rickettsia*.

Polyclonal sera + ELISA (Ag: purified *Rickettsia felis*) / IFA (purified *Rickettsia felis*)

圖十、*R. felis* 的 ELISA system

其間也遇到美國 CDC 立克次體部門的主管 Dr. Kato. 她們實驗室主要是在開發立克次體(*Rickettsia typhi*)感染時以核酸診斷的研究為主 (圖十一), 及以分析方法確效進行驗證為研究(圖十二)。Dr. Kato 她有表示很願意分享該引子給我們 TCDC 進行交流, 希望對我們實驗室的立克次體核酸能有所助益。

Development and Validation of RT-PCR Assays to Detect *Rickettsia typhi* in Clinical Species

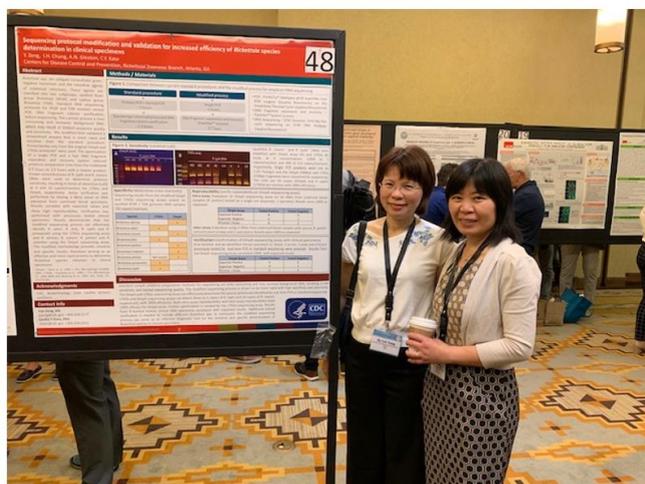


RT12 and RT27

- Development**
29 conserved regions
11 primer probe set
- Sensitivity**
LOD : 10 copy/Reaction
100% efficiency
- Specificity : 100% , Not cross react**
- Accuracy : 100% expected**
40 samples (high, medium, low, and no) duplicated
- Reproducibility : 100% expected**
 - a single plate (triplicate, 1 operator)
 - over 15 day (single replicates, 2 operators)
- Verification**
20 clinical (8 blood / 8 serum / 2 tissue . 1 CSF)
 - Result correlated RT 12 (100%)
 - Result correlated RT 27 (95%)

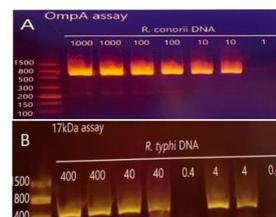
圖十一、*R. typhi* 的 Development RT-PCR system

Sequencing protocol modification and Validation for increased efficiency of Rickettsia species determination in clinical specimens



US CDC Yan Zeng, Ms
Rickettsia Zoonoses Branch, Atlanta, GA

1. LOD :



2. Specificity :

Species	17kDa	OmpA
<i>Rickettsia africae</i>	-	+
<i>Rickettsia akari</i>	+	-
<i>Rickettsia conorii</i>	-	+
<i>Rickettsia felis</i>	+	-
<i>Rickettsia parkeri</i>	-	+
<i>Rickettsia rickettsii</i>	-	+
<i>Rickettsia philipii</i>	Not tested	+
<i>Rickettsia prowazekii</i>	+	-
<i>Rickettsia typhi</i>	+	-

3. Reproducibility : inter & intra

4. Verification :

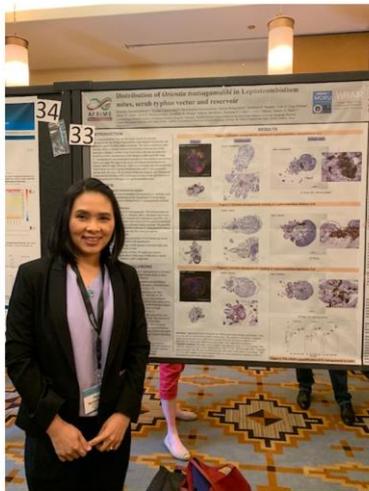
- 1 blood
- 2 serum
- 3 swab
- 3 tissue

圖十二、立克次體核酸檢驗的分析方法確效進行驗證

值得一提的是 Bovine Anaplasmosis 在歐美有很多案例發生，它主要分布於溫和的氣候區，例如台灣、美國、南美、非洲、南歐、澳洲等。在牛隻身上，會感染動物之紅血球，造成紅血球脆弱而導致嚴重貧血，嚴重時可能因缺氧而死亡。進而影響國家的畜牧業與相關農產品，影響重挫經濟發展，日前我們也在疑似的立克次體血清檢體發現到人感染到 *Anaplasma spp.* 的 case，因此建議我國對疑似的立克次體血清檢體進行監測，及早對感染的人進行抗生素治療，進行相關防疫措施。

泰國 AFRIMS 研究恙蟲病的宿主 mite，是用 IHC 方法分析感染的 O.t 病原體在 mite 的不同發育階段的身體分佈，結果發現在 female 的 chigger, nymph, 與 adult 皆可偵測到感染的 O.t 病原體 (圖十三)，而 Male mite 卻沒有偵測到，非常有趣！同時泰國 AFRIMS 的 Dr. Piyada Linsuwanon 也歡迎我們台灣的恙蟲病 vector (mite) 可送到他們實驗室，他們可指導如何以 IHC 鑑定病原體在 vector 上的分佈情形等相關學術交流。

Distribution of O.t in Leptotrombidium mites, scrub typhus vector and reservoir



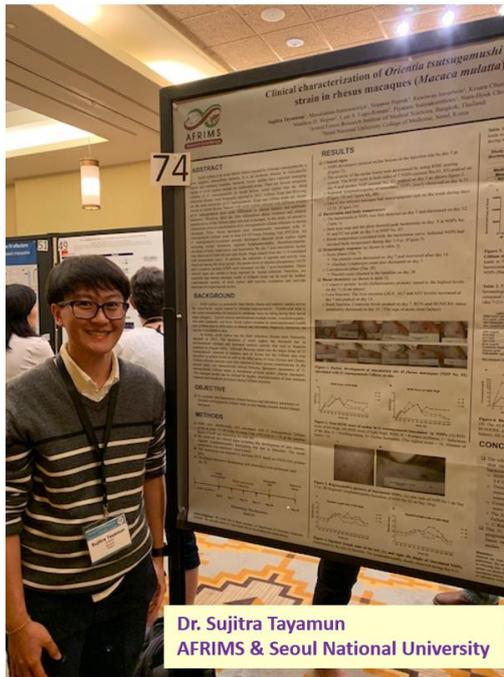
D. Piyada Linsuwanon AFRIMS (Armed Forces Research Institute of Medical Science, Thailand & Mahidol)

- * The IHC showed systemic infection of O.t in all three stage: chigger (larvae), nymph, and female adult, **but not in male adult.**
- * In chigger and nymph, O.t distributed throughout their bodies, however, higher density of O.t are observed in the anterior part of their bodies.
- * In adults, they were also observed in the anterior part of their bodies, especially in the salivary glands, and brain, excretory tubules, midgut lobes.
- * Interestingly, in *L. delicense* adults they observed high conc. Of O.t in ovaries.
- * The density of O.t in nymphs and adults were 10-fold higher than eggs and larvae.
- * The amount of O.t increased with the size/stage of mite, ascending from egg, larva, nymph to adult, were observed in all three *Leptotrombidium*.

圖十三、恙蟲病的 vector (mite)感染的 O.t 的分佈情形

另外韓國首爾大學有和 AFRIMS 合作，將 O.t (Gilliam) 接種到 rhesus 後，觀察免疫過的動物臨床症狀，與分析實驗室相關的數據，結果發現免疫過的 rhesus 與人類感染恙蟲病一樣，出現相類似的臨床徵兆 (eschar, skin lesions) 與臨床實驗室所測得 creatinine, Liver enzyme, thrombocytopenia, lymphopenia 結果，在疾病感染早期會出現上升(peak)，在恢復期時會下降，這樣的結果認為 rhesus model 可以作為 vaccine candidate 的 evaluation，以及後續的 progression 與 pathogenesis 相關研究 (圖十四)。

Clinical Characterization of O.t Gilliam strain in rhesus macaques



* Horse were intradermally injected Gilliam (5 x 10⁸) Focus Forming unit (n=3) at the anterior thighs of both legs.

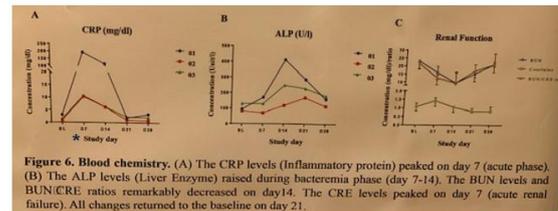
* Clinical sign :

- Eschar
- Skin lesions



* Lab. Diagnosis :

- Thrombocytopenia (acute phase, day 7)
- Lymphopenia (acute phase, day 7)
- Creatinine level were peaked at day7
- Liver enzyme were peaked at acute level
- BUN remarkably decreased on day 14



*The O.t Gilliam in rhesus model can be utilized to elucidate the progression and pathogenesis of scrub typhus, will support the evaluation of future vaccine candidate.

圖十四、Rhesus model 研究 O.t (Gilliam)感染的免疫機制

心得及建議

1. 此次向美方研習的新興人畜共通病原體立克次體 RPA 技術，這種技術能在疾病早期以 15 分鐘快篩病原體感染，也可應用於其它立克次體的檢驗 (恙蟲病、地方性斑疹傷寒)。
2. 研習第 30 屆美國立克次體年會，學習最新立克次體診斷新知 (*Ehrlichia Chaffeensis* 的診斷開發研究是以 TRP120, TRP32 作為診斷抗原)，與核酸檢驗分析方法確效，將可應用到我們明年的 109 年科技計畫，應用於開發診斷試劑與提升例行性病原監測量能，收益良多。
3. 會後我對美方也進行學術交流，分享台灣立克次體流行病學與研發近況，報告內容包括近 10 年來恙蟲病、地方性斑疹傷寒實驗室檢驗、單株抗體製備，和快速篩檢研發應用等， Dr. Chien-Chung Chao 對於台灣有如此完善的立克次體研發診斷系統，感到認同及欽佩，初步成果顯示我們的診斷抗原較 NMRC 更具靈敏度與專一性，未來希望取得我們實驗室所開發-恙蟲病診斷抗原 TSA56，希望雙方進行實務的 MTA 簽署，在未來能建立及維持暢通的國際合作與聯繫管道，提高台美對立克次體學術的學術交流。

1. 附件一、NMRC ELISA (Scrub Typhus)標準操作程序

I. Checking your equipment

- a. Make sure that all of the plates you are coating with antigen fit easily onto the plate washer
- b. NOTE: This protocol is using Medium bind 96-well U-bottom plates ordered from Phenix research, Cat# MPG-650001

II. Buffer preparation

- a. 1xPBS: dilute 1: 10 with 10xPBS
- b. Wash buffer(PBST): 0.1% tween-20 in 1x PBS

III. Preparing the antigen

Note: Dilute the antigen/protein to a final concentration of 0.3 micrograms/100microliters with 1XPBS.

- a. Based on the concentration of each antigen and how many plates you are going to coat calculate the amount of antigens and add them to the 1XPBS to obtain the final concentration of 0.3micrograms/100microliters(0.1ug Chimeric-1 + 0.1ug Gilliam + 0.1ug Kato)per 100ul
- b. Mix it very well

IV. Coating the plates

- a. Pipette 100ul prepared antigen to each well.
- b. Cover the plate with plastic wrap and label
- c. Refrigerate at 4° C for two overnights

V. Blocking

- a. Prepare 10% milk in 1x PBS
- b. Rinse coated plates twice by pipetting 200ul/well 1xPBS each time
- c. Add 200ul/well of 10% milk in 1XPBS
- d. Incubate at room temperature for one hour

VI. Adding the primary antibody to the plate

- a. Dilute each primary antibody 1:100 in 5% milk 1xPBS
- b. Rinse the plates twice by pipetting 200ul/well 1xPBS each time
- c. Mix prepared primary antibody very well
- d. pipette 100ul primary antibody into desired well
- e. incubate 1 hour at room temperature

VII. Wash the plates

- a. Recover the primary antibody
- b. Pipette 200ul wash buffer 1x PBST into each well and incubate 10 minutes on shaker
- c. Wash plates with plate washer 3 times with wash buffer

d. Pipette 200ul 1xPBS into each well and incubate 5 minutes on shake

VIII. Adding the secondary antibody

- a. Dilute secondary body: Rabbit anti-Human IgG(Santa Ctuz, Cat# sc-2923) 1:4000* or Rabbit anti-Human IgM(Dako, Cat#P0215) 1:4000* with 5% milk in 1xPBS
- b. Pipette 100ul prepared secondary antibody into each well
- c. incubate 1 hour at room temperature

IX. Wash the plates using the procedure in section VII

X. Adding the substrate

- a. Prepare Substrate(KPL, Cat#50-62-01): Combine equal amounts (1:1) of ABTS Peroxidase Substrate Solution A and ABTS Peroxidase Substrate Solution B to the amount required
- b. Mix it very well
- c. Pipette 100ul prepared substrate into each well
- d. Incubate in dark for 30 minutes
- e. Read the plates

XI. Incubate in dark another 30 minutes and then read the plates again (1 hr reading).